Carla Poleselli Bruniera

Estudos filogenéticos e sistemáticos em Rutaceae: análise cladística e posicionamento de *Almeidea* A. St.-Hil. entre as Galipeinae (Galipeae, Rutoideae) com o uso de dados morfológicos e moleculares

São Paulo

2010

Carla Poleselli Bruniera

Estudos filogenéticos e sistemáticos em Rutaceae: análise cladística e posicionamento de *Almeidea* A. St.-Hil. entre as Galipeinae (Galipeae, Rutoideae) com o uso de dados morfológicos e moleculares

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

Orientador: Prof. Dr. Milton Groppo

São Paulo

2010

Bruniera, Carla Poleselli

Estudos filogenéticos e sistemáticos em Rutaceae: análise cladística e posicionamento de *Almeidea* A. St.-Hil. entre as Galipeinae (Galipeae, Rutoideae) com o uso de dados morfológicos e moleculares

143 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Almeidea* 2. Galipeinae 3. Rutaceae 4. *Conchocarpus* 5. Filogenia 6. Taxonomia

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Milton Groppo

Orientador

Dedico aos meus pais, meus mestres da vida.

Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores... Tornam-se seu destino.

(Mahatma Gandhi)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelo Curso de Pós-Graduação;

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, por disponibilizar as instalações, equipamentos, materiais e técnicos de seus laboratórios para o desenvolvimento deste estudo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (Processo 2007/06336-0) e por todo o apoio financeiro para os projetos de pesquisa com as Rutaceae neotropicais, principalmente ao auxílio de pesquisa (Jovem Pesquisador) concedido ao Prof. Dr. Milton Groppo (Processo 2006/03170-0), viabilizando uma importante parte deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Milton Groppo, pela orientação e disponibilidade em todos e quaisquer momento em que este trabalho foi realizado. Obrigada pela sua dedicação contínua aos seus alunos, laboratório e projetos, e pelas oportunidades concedidas que têm contribuído para minha formação profissional;

Ao Prof. Dr. José Rubens Pirani, pela paciência com todas as questões burocráticas envolvidas no início do curso de mestrado como orientador temporário. Obrigada também pela disponibilidade constante e pelas sugestões proporcionadas durante o trabalho;

Ao Laboratório de Sistemática de Plantas, do Departamento de Biologia da FFCLRP; à sua técnica Maria Helena Pires, pela disponibilidade e auxílio em todos os momentos necessários; aos estagiários e pós-graduandos deste laboratório pelo apoio, sugestões, discussões e amizade, em especial à Kátia Freire, Tatiana Martins e Gustavo Tanaka, amigos queridos;

Ao Prof. Dr. Emerson Ricardo Panzarin e a Ms. Ludmila Mickeliunas Pansarin do Lab. de Biologia Molecular e Biossistemática de Plantas (Dep. de Biologia, FFLCRP – USP), por disponibilizarem o laboratório e equipamentos e também pelas sugestões durante a etapa de coleta de dados moleculares;

À Prof. Dra. Ana Lilia Alzate Marin e à Ms. Marcela Corbo Guidugli, do Laboratório de Genética Vegetal (Dep. de Genética, FMRP – USP), pela disponibilidade e pelo auxílio com os protocolos de extração de DNA, ajuda esta indispensável;

À Prof. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, e a equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (Dep. de Biologia, FFLCRP – USP), pelas sugestões durante a etapa de coleta de dados moleculares e pelas diversas seqüências adquiridas neste laboratório durante o presente trabalho;

Ao Laboratório de Parasitologia Molecular (FMRP – USP) e ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (Dep. de Tecnologia, UNESP Jaboticabal) pelos seqüenciamentos realizados durante este estudo e às respectivas técnicas destes laboratórios, Tânia Paula Aquino Defina e Agda Paula Facincani, pelas sugestões e disponibilidade durante o processo de obtenção das seqüências;

À Dra. Cláudia Inês da Silva, do Laboratório de Ecologia e Conservação de Abelhas (Dep. de Biologia, FFLCRP – USP), por toda a orientação, auxílio e disponibilidade durante a análise polínica;

À Prof. Dra. Simone de Pádua Teixeira, do Laboratório de Botânica (FCFRP- USP), pela disponibilidade e orientação na etapa de coleta de dados anatômicos. Espero que estes materiais e dados possam ser utilizados em pesquisas futuras;

À Dra. Jacquelyn A. Kallunki, e ao Herbário do New York Botanical Garden (NY), por todas as sugestões e ajuda principalmente com os caracteres morfológicos e também pela disponibilidade de me receber no herbário NY para visita e consulta da coleção;

Ao Dr. Alexandre Antonelli, do Institute of Systematic Botany (Zürich, Switzerland) pela ajuda com os programas de construção filogenética na etapa final deste trabalho. Sua disponibilidade constante foi imprescindível para que eu pudesse realizar todas as análises aqui incluídas;

Aos herbários e seus respectivos curadores, pelos empréstimos e doações de exsicatas concedidas ao herbário SPFR, indispensáveis para este estudo: ALCB, BHCB, BHZB, CEPEC, GFJP, HPL, HUEFS, MBML, NY, RB, SP, SPF, UEC e UPCB;

Aos professores que ministraram disciplinas durante o Curso de Mestrado, que foram extremamente importantes para meu aprendizado na área de botânica e de sistemática filogenética: Dr. Fernando Portella de Luna Marques, Dra. Grace Annemarie

Wyngaard, Dr. Jefferson Prado, Dra. Nanuza Luiza de Menezes e Dr. Tarciso de Souza Filgueiras;

À minha família, que além de todo o amor e carinho, me concedem apoio total e constante na minha vida acadêmica. Em especial aos meus pais por me lembrarem sempre dos meus objetivos e de nunca desviar o olhar daquilo que realmente queremos no futuro. Obrigada por serem tão presentes e essenciais em minha vida;

Aos meus amigos de graduação da 41ª turma de Ciências Biológicas da FFCLRP – USP, que continuam a fazer parte da minha vida e que são tão importantes na minha vida acadêmica e pessoal e também aos demais amigos, simplesmente por me suportarem apesar do meu jeito marrento e teimoso, entre outras "qualidades";

À "Terra do Nunca", que tem contribuído demais para meu crescimento pessoal. Bruna, Du, Gi, Gra e Pri, vocês são peças fundamentais na minha vida, são irmãs que a vida me deu e que contribuíram em muitos aspectos para que eu pudesse realizar este trabalho, e também à Sarah, amiga que me acolheu com muito carinho em sua casa nas minhas idas para São Paulo;

Ao Léo, pela ajuda com a formatação do texto e com a capa, e também pela sua grande amizade;

A todos aqueles que me ajudaram em viagens de coleta, nas visitas aos herbários, durante os processos experimentais, na discussão de metodologias e de resultados, nas questões burocráticas, ou em qualquer outro aspecto deste trabalho. Agradeço imensamente a todos;

E também ao povo brasileiro, por pagarem seus impostos, permitindo que eu e diversos outros estudantes e pesquisadores possamos realizar trabalhos de pesquisa como este. Espero que algum dia os frutos dessas pesquisas possam direta ou indiretamente retornar para a sociedade.

Índice

RESUMO **11**

SUMMARY **12**

Introdução **13**

1. Breve caracterização da família Rutaceae 14
2. A subtribo Galipeinae 16
3. O gênero Almeidea 17

Objetivos **20**

Material e Métodos **21**

1. Táxons utilizados 21
2. Dados morfológicos 23
   - 2.1. Aquisição de material 23
   - 2.2. Viagens de coleta 24
   - 2.3. Análise dos caracteres morfológicos 25
3. Dados moleculares 26
   - 3.1 Regiões do DNA utilizadas na análise 26
   - 3.2. Obtenção do material e extração do DNA 27
   - 3.3. Amplificação das regiões 27
   - 3.4. Purificação e reação de seqüenciamento 28
   - 3.5. Edição e alinhamento das seqüências 29
   - 3.6. Análise filogenética 30

Resultados **33**

1. Teste de congruência e análise combinada 33
2. Análise das hipóteses filogenéticas baseadas nos dados moleculares 33

2.1 Monofiletismo de *Almeidea* e relações entre suas espécies 34

2.2 Monofiletismo de *Conchocarpus* e relações entre suas espécies.....35

2.3 Monofiletismo de Galipeinae e relações entre seus gêneros 36

2.4 Posicionamento de *Hortia oreadica* 38

2.5 Monofiletismo de Pilocarpinae e relações entre seus gêneros 38

3. Análise das hipóteses filogenéticas baseadas nos dados morfológicos.....39

4. Análise da hipótese filogenética baseada em dados moleculares e morfológicos combinados 40

5. Mapeamento de caracteres morfológicos.....41

6. Análise da morfologia polínica.....42

Discussão 45

1. Alinhamentos das seqüências.....45

2. Hipóteses filogenéticas 45

2.1 Monofiletismo de *Almeidea* e relações entre suas espécies 46

2.2 Monofiletismo de *Conchocarpus* e relações entre suas espécies.....49

2.3 Monofiletismo de Galipeinae e relações entre seus gêneros 50

2.4 Posicionamento de Hortia oreadica 52

2.5 Monofiletismo de Pilocarpinae e relações entre seus gêneros 52

Conclusões 54

Referências Bibliográficas 56

Tabelas e Figuras 63

Apêndices 120

Anexo 131

RESUMO

No presente trabalho foram testados o monofiletismo e relações filogenéticas de *Almeidea* A. St.-Hil. (Galipeinae, Rutaceae) utilizando-se dados de morfologia, incluindo macromorfologia foliar e floral e morfologia polínica e dados moleculares, com o uso de seqüências de DNA das regiões nucleares ITS-1 e ITS-2 e das regiões plastidiais *trnL-trnF* e *rps-16*. *Almeidea* é um gênero exclusivamente neotropical, ocorrendo em áreas de Mata Atlântica do Leste do Brasil, com uma espécie (*A. rubra*) conhecida também da Bolívia. Foram incluídas todas as cinco espécies do gênero *Almeidea*: *A. albiflora* (espécie nova inédita), *A. coerulea, A. lilacina, A. limae* e *A. rubra*, além de outros gêneros de Galipeinae (Galipeae, Rutoideae), notadamente do gênero *Conchocarpus* no grupo interno. Foram realizadas análises filogenéticas individuais de cada partição e combinadas, sob os critérios de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana. Os resultados obtidos demonstraram que o gênero *Almeidea* é monofilético, sustentado por dados moleculares e por uma sinapomorfia morfológica (pólen pantocolporado). As espécies *A. lilacina*, *A.limae* e *A. rubra* aparecem como mais próximas na maioria das análises, enquanto que *A. coerulea* seria a espécie mais basal do clado *Almeidea*. *Conchocarpus*, outro gênero pertencente à mesma subtribo de *Almeidea* (Galipeinae), aparece em todas as análises relacionado à *Almeidea*, com a sua espécie tipo, *C. macrophyllus,* posicionando-se na base do clado formado por este dois gêneros. Assim o monofiletismo de *Conchocarpus* só será alcançado com a exclusão de um grupo de espécies mais distante filogeneticamente (representado na análise por *C. concinnus*) e com a inclusão das espécies de *Almeidea* no gênero *Conchocarpus*. Propõe-se, entretanto, que *Almeidea* seja mantido como gênero até que uma análise filogenética mais completa de Galipeinae, especialmente com uma maior amostragem de *Conchocarpus*, esteja disponível.

SUMMARY

In the present study the monophyly and phylogenetic relationships of *Almeidea* A. St.-Hil. (Galipeinae, Rutaceae) were examined using morphological data, including macromorphology of leaves and flowers and pollen morphology and molecular data, including sequences from nuclear regions ITS-1 and ITS-2 and the plastid regions *trnL-trnF* and *rps-16*. *Almeidea* is a exclusively Neotropical genus, ocurring in the Atlantic Rain Forest from Eastern Brazil, with one species (*A. rubra*) also present in Bolivia. Individual (for each partition) and combined phylogenetic analysis were made, using maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference as optimization criterion. The results have showed *Almeidea* as a monophyletic group supported by molecular data and by a morphological sinapomorphy (pantocolporate pollen). Almeidea *lilacina*, *A.limae* and *A. rubra* appear as closely related in most analysis, while *A. coerulea* appears as the most basal group in the clade *Almeidea*. *Conchocarpus*, another genus that belongs to the same tribe as *Almeidea* (Galipeinae) appears as close to *Almeidea*, with the type species of the genus, *C. macrophyllus*, at the base of the clade formed by these two genera. As a result, *Conchocarpus* will be monophyletic only with the exclusion of a group of species more distant phylogeneticaly (represented in the analysis by *C. concinnus*) and with the inclusion of all species of *Almeidea* in *Conchocarpus*. It is proposed however, that *Almeidea* be maintained at the genus rank until a more complete phylogenetic analysis of Galipeinae, especially with a larger sampling of *Conchocarpus*, be available.

Introdução

A utilização de análises filogenéticas iniciou-se como uma ferramenta usada pelos taxonomistas na classificação de organismos (Hall 2008). Hoje, os sistemas filogenéticos procuram usar toda a informação disponível no momento a respeito dos táxons envolvidos, procurando relacioná-los segundo uma afinidade baseada em ancestralidade e descendência. Além de descrever o parentesco histórico entre os organismos, as filogenias são a base, para estudos biogeográficos e de entendimento de evolução de determinados caracteres (Amorim 2002).

O uso da metodologia cladística, tanto com o uso de dados morfológicos e mais modernamente moleculares (notadamente aqueles provenientes de seqüenciamento de DNA), na reconstrução de filogenias teve um impacto profundo na sistemática, não só botânica, mas na zoologia e a de microorganismos. Ao uso desse tipo de dados foram somados avanços na computação (tanto na capacidade física dos computadores quanto nos programas) com a coordenação de conceitos como homologia, sinapomorfias e grupos monofiléticos. Um número grande de trabalhos, especificamente na área de sistemática vegetal, tem sido produzido e publicado nos últimos 20 anos com base em dados morfológicos e moleculares, alterando muito nossa visão da filogenia dos grupos vegetais.

Atualmente, análises combinadas dos dois tipos de dados – morfológicos e moleculares - (e de outras naturezas, se disponíveis), nas chamadas análises de evidência total também estão sendo mais e mais utilizadas, na tentativa de se produzir hipóteses filogenéticas mais robustas segundo um determinado critério.

Além dos tipos de dados utilizados, os métodos de inferência filogenética também foram se tornando mais complexos nos últimos anos, com a implementação de métodos estatísticos, como a máxima verossimilhança (introduzido por Edwards & Cavalli-Sforza 1964) e a análise bayesiana, com uma revisão recente deste método feita por Huelsenbeck *et al.* (2001). Esses métodos estão sendo largamente utilizados pelos sistematas a fim de investigar as relações entre os organismos com métodos além da máxima parcimônia. Entretanto a utilização da máxima parcimônia como único critério de otimização dentro da sistemática filogenética é defendida por alguns autores (e.g. Farris 1983).

Na botânica, o uso do método cladístico e as novas tecnologias disponíveis para as análises filogenéticas estão mudando o panorama da visão interna de varias famílias botânicas, como a família Rutaceae. Desde os trabalhos de Engler (*e.g.* 1931), que trata da classificação infra-familiar de Rutaceae, novas hipóteses de parentesco têm surgido, especialmente com a utilização de dados moleculares (Chase *et al.* 1999, Scott *et al.* 2000, Samuel *et al.* 2001, Morton *et al.* 2003, Poon *et al.* 2007, Groppo *et al.* 2008, Salvo *et al.* 2008). Para a região neotropical, o trabalho de Pirani (1999) com os grupos de Pteleinae (Toddalioideae) foi o primeiro a se ocupar com gêneros de Rutaceae nativos, dentro de um contexto filogenético cladístico, com dados morfológicos. O trabalho de Dias (2007) com uma análise filogenética dos grupos neotropicais *Pilocarpus* e da subtribo Pilocarpinae (e mais alguns gêneros correlacionados) foi importante, pois utilizou tantos dados morfológicos quanto moleculares.

Atualmente está em processo um estudo mais acurado das Galipeinae (Galipeae, Rutoideae) coordenado pelo Prof. Dr. Milton Groppo (Depto. de Biologia, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto), utilizando principalmente caracteres moleculares. Esse estudo prevê uma completa varredura dos gêneros e grupos internos da subtribo neotropical Galipeinae, na busca de um melhor entendimento das relações filogenéticas dos grupos que compõe a subtribo. Um dos gêneros de Galipeinae é *Almeidea* A. St-Hil., cujo estudo filogenético e sistemático está inserido neste projeto maior de entendimento da filogenia desta subtribo.

1. Breve caracterização da família Rutaceae

A família Rutaceae é constituída por 161 gêneros e 1815 espécies (Stevens 2001 onwards, Angiosperm Phylogeny Website), distribuídas principalmente pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo todo, com maior abundância na América Tropical, Sul da África e Austrália (Porter & Elias 1979). No Brasil ocorrem 32 gêneros e ca. 154 espécies, sendo os centros de diversidade a Amazônia e a Mata Atlântica (Pirani 1999). A família está posicionada na ordem Sapindales segundo APGIII (2009), com forte sustentação de dados moleculares, com famílias como Meliacaeae, Sapindaceae e Simaroubaceae. As sinapomorfias morfológicas da ordem incluem folhas compostas e estipuladas e presença de disco nectarífero bem desenvolvido (Groppo *et al.* 2008, Judd *et al.* 2008).

Rutaceae é formada por árvores, arbustos e ervas, perenes ou anuais (*Apocaulon*, *Ertela)*, ás vezes apresentando acúleos ou espinhos. As folhas são alternas, raramente opostas, simples ou compostas 1-3-folioladas, palmadas ou pinadas, sendo que a lâmina foliar pode apresentar pontuações translúcidas bem evidentes. As inflorescências são bastante variadas, podendo ser terminais ou axilares, ás vezes caulifloras, constituindo geralmente tirsos ou panículas, mais raramente racemos, espigas ou flores solitárias. As flores podem ser unissexuadas e/ou bissexuadas, geralmente 4-5-meras, actinomorfas ou zigomorfas, com sépalas livres ou concrescidas e pétalas livres, raramente unidas ou ausentes; o androceu pode ser haplo, iso, diplo ou polistêmone, sendo os estames livres, raramente coerentes a conatos entre si ou aderentes a adnatos às pétalas; apresentam disco nectarífero intra-estaminal bem desenvolvido, sendo este raramente reduzido ou ausente; o gineceu pode ser apocárpico ou sincárpico, com (1-)2-5(-muitos) carpelos e ovário súpero. Os frutos exibem uma grande variação, podendo ser indeiscente, do tipo sâmara, samarídeos, hesperídeos (tipo especial de baga que possui tricomas suculentos emergindo do endocarpo, como é o caso do gênero *Citrus*), drupas ou bagas ou deiscentes, do tipo cápsula ou esquizocarpo. O número de semente também varia de 1-2-muitas por lóculo; o endosperma pode ser carnoso ou oleaginoso, ou ausente; os cotilédones são plano-convexos ou planos, ás vezes conduplicados e mais raro também plicados (informações baseadas em Kallunki 2004, Groppo 2010). Com toda essa variação na família, Rutaceae apresenta como sinapomorfia a presença de glândulas translúcidas em suas folhas (Groppo *et al.* 2008), que correspondem a cavidades secretoras multicelulares produtoras de óleos essenciais aromáticos (Metcalfe & Chalk 1950, Judd *et al.* 2008) e que estão presentes em todos os tecidos parenquimáticos do caule, folhas, flores e frutos.

Muitos dos membros dessa família possuem importância econômica, notadamente espécies do gênero *Citrus*, com frutos comestíveis (diversas variedades e cultivares de laranjas, limões, tangerinas, limas), além de fonte de óleos voláteis; *Pilocarpus*, fonte de pilocarpina (alcalóide utilizado no tratamento de glaucoma); *Angostura* e *Galipea* (preparo das amargas angosturas, antifebris); espécies dos gêneros *Boronia* e *Ruta* (arruda), utilizadas para extração de óleos essenciais, a última também em rituais afro-brasileiros e na crendice popular; espécies dos gêneros *Flindersia*, *Zanthoxylum*, *Balfourodendron* e *Euxylophora*, utilizadas na indústria madeireira, as duas últimas de excelente qualidade. Além desses

usos, espécies dos gêneros *Boronia, Choisya, Clausena, Correa, Murraya, Poncirus, Ravenia, Skimmia* e *Triphasia*, entre outras, são utilizadas como ornamentais em várias partes do mundo (Pirani 1999).

Em relação à sistemática da família, em 1862, Bentham & Hooker apresentaram uma divisão da família Rutaceae em 7 tribos, que é bastante parecida à que Engler adotaria em 1874, 1896 e 1931, primeiro na Flora Brasiliensis de Martius, e depois em Die natürlichen Pflanzenfamilien (Pirani 1999). A obra de Engler (1931) divide a família Rutaceae em sete subfamílias, classificação esta baseada principalmente em características morfológicas, como número e grau de conação dos carpelos, características do fruto, hábito e também na histologia glandular (Groppo *et al.* 2008). No entanto esta divisão tem sido também objeto de estudo dos especialistas da família, que propõem novas classificações para a mesma, visto que várias das subfamílias de Rutaceae propostas por Engler aparecem em estudos atuais (principalmente baseados em dados moleculares) como não monofiléticas (e.g. Chase *et al.* 1999, Scott *et al.* 2000, Groppo *et al.* 2008, Salvo *et al.* 2008).

2. A subtribo Galipeinae

Dentre os grupos de Rutaceae, as Galipeinae (tribo Galipeae, subfamília Rutoideae) como circunscritas por Engler (1931), diferem da maioria das Rutaceae, pelas flores com tendência à zigomorfia, corolas mais ou menos tubulares, redução do número de estames férteis de 5 para 2, transformação dos estames em estaminódios, a presença de anteras apendiculadas, cotilédones freqüentemente plicados e ausência de endosperma na semente. O fruto é sempre deiscente, do tipo cápsula ou folículo. Constituem um grupo exclusivamente neotropical, com 26 gêneros e ca. 130 espécies, sendo o grupo de Rutaceae mais diverso nos neotrópicos (Groppo *et al.* 2008). Vários deles já foram objeto de revisões ou estudos recentes, como *Desmodes, Erythrochiton* e *Toxosiphon* (Kallunki 1992), *Andreadoxa* (Kallunki 1998), *Angostura* e *Conchocarpus* (Kallunki & Pirani 1998) e *Neoraputia* (Kallunki 2009). Espécies novas ainda estão sendo descobertas, principalmente em áreas de matas residuais do leste do Brasil (Espírito Santo e sul da Bahia), inclusive com uma espécie nova de *Almeidea* descoberta durante o presente estudo. O pólen do grupo foi estudado em detalhe por Morton & Kallunki (1993).

Dos 26 gêneros reconhecidos no estudo de Morton & Kallunki (1993), 10 são

monoespecíficos e 8 possuem cinco ou menos espécies. Em compensação, apenas *Conchocarpus* possui 45-47 espécies (43-45 no Brasil). Os gêneros são muitas vezes definidos não por estados de caráter exclusivos (sinapomorfias), mas por combinações exclusivas de estados de caráter (de um número limitado de caráter), onde qualquer estado de caráter ocorre em mais de um gênero. Caracteres variam independentemente e estados de caráter similares aparentemente surgiram mais de uma vez na história evolutiva do grupo, como pétalas conatas ou ovário sincárpico. Com isso, a delimitação de gêneros que exibem esse tipo de variação nos estados de caracteres é dificultada, pois os caracteres devem ser avaliados em grupos. A observação de qualquer caráter não permitirá uma identificação precisa de um espécime em um gênero, nem verificar a relação entre os gêneros (Kallunki & Pirani 1998). Mesmo dentro de gêneros aceitos essa variação pode ocorrer (como em *Conchocarpus*), onde existem espécies com pétalas livres ou coerentes, mais ou menos aderentes aos filetes. Ademais, estudos filogenéticos prévios com a utilização de dados moleculares mostraram que algumas espécies de *Conchocarpus* são filogeneticamente mais próximas de *Almeidea* do que de outros *Conchocarpus* (Kallunki & Groppo 2007), evidenciando que um estudo sistemático de *Almeidea* se fazia necessário para elucidação desta questão.

3. O gênero Almeidea

O gênero *Almeidea* A. St.-Hil. é formado por cinco espécies de acordo com o trabalho de Silva (1988). No entanto durante o presente estudo, foi verificada a ocorrência de uma espécie nova e também uma possível sinonimização de *A. affinis* A. St.-Hil (mais conhecida como *A. longifolia* A. St.-Hil.) em *A. rubra*. Assim, o gênero é reconhecido neste trabalho também com cinco espécies, sendo que quatro delas foram mantidas da revisão de Silva (1988), e com uma espécie nova para a ciência: *A. albiflora* Bruniera & Groppo sp nova[1], *A. coerulea* (Nees & Mart.) A. St-Hil., *A. lilacina* A. St-Hil., *A. limae* I.M.Silva e *A. rubra* A. St-Hil.

As espécies do gênero caracterizam-se como sendo arvoretas de até 7 m altura. As folhas são alternas, 1-folioladas ou aparentemente simples (ausência de pulvino), congestas

[1] O nome *Almeidea albiflora* não está sendo proposto neste trabalho, sendo que o texto submetido à publicação encontra-se em anexo.

no ápice do ramo; os pecíolos são espessados no ápice e na base. As inflorescências são tirsos terminais ou subterminais, podendo aparecer caulifloria em *Almeidea rubra*. As flores são vistosas, róseas, lilases ou alvas (em *A. albiflora*), bissexuadas; o cálice é gamossépalo, 5-dentado, persistente; a corola possui 5 pétalas livres, pubérulas a tomentosas; o androceu apresenta 5 estames férteis ou 1-3 transformados em estaminódios, sendo alternos as pétalas e inseridos no receptáculo entre o disco e a corola, os filetes são livres e achatados, e possuem um tufo de tricomas alvos na região mediana adaxial, as anteras são deiscentes longitudinalmente, introrsas, basifixas, linear-oblongas, pubérulas, o pólen é pantocolporado, médio, com exina reticulada; o gineceu possui ovário súpero, glabro a seríceo, pentacarpelar com os carpelos conatos no ápice, os lóculos são biovulados e a placentação é axial, o disco nectarífero é cupular, glabro a pubérulo, o estilete é terminal, filiforme, pubérulo notadamente no ápice, o estigma é terminal, capitado, 5-lobado. O fruto é um esquizocarpo formado por 1-3 mericarpos, por aborto dos demais, raro 5 mericarpos, glabro. As sementes são reniformes, de testa parda e coriácea; o embrião é axial e curvo, e os cotilédones carnosos, planos, conduplicados e plicados.

As espécies são encontradas nos estados do leste do Brasil, distribuídas pelas submatas da floresta do sul da Bahia, leste de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Até o presente estudo pensava-se tratar de um gênero exclusivo do Brasil, mas novas coleções examinadas correspondentes a *Almeidea rubra*, provenientes da província de La Paz, Bolívia, puderam estender a distribuição do gênero para limites extra-brasileiros.

Das cinco espécies reconhecidas aqui, as que apresentam maior distribuição geográfica são *Almeidea lilacina* (sul do ES, sudeste de MG, RJ e SP) e *A. rubra* (BA, MG, ES, RJ, PR e Depto. de La Paz, Bolívia), que ocorrem simpatricamente em alguns trechos da Mata Atlântica. *A. limae* é aparentemente restrita da região de Guapimirim, Rio de Janeiro (Estação Ecológica Estadual de Paraíso); *A. coerulea* é conhecida da Mata Higrófila do sul da Bahia e *A. albiflora* está presente em uma localidade no sul do Espírito Santo e no Rio de Janeiro. Fotos dos ambientes de ocorrência das espécies são apresentadas na Fig. 1.

Almeidea lilacina e *A. rubra* (Figs. 3 C-F, 4) são bastante semelhantes quanto à forma e tamanho das folhas, entretanto diferem pela inflorescência, muito desenvolvida na primeira e reduzida na segunda. Assim, estas duas espécies constituem táxons de difícil

identificação quando se apresentam estéreis. *A. coerulea* (Fig. 2 D) é de fácil identificação, principalmente por suas folhas coriáceas longas e de base obtusa, além de caracteres florais como pétalas e estilete de menor tamanho. *A. limae* (Figs. 2 E-F, 3 A-B) também é uma espécie que não apresenta problemas de identificação, já que as pétalas apresentam um espessamento em forma de quilha no dorso, facilmente visível, além de ser uma espécie endêmica da região de Guapimirim, Rio de Janeiro. *A. albiflora* (Fig. 2 A-C) também possui várias características exclusivas, como inflorescência bem desenvolvida quando comparada com as outras espécies, com raques secundárias apicais atingindo 5,0 cm, corola alva, ovário seríceo, entre outras, que permitem diferenciá-la facilmente das demais espécies.

Almeidea é morfologicamente bastante semelhante ao gênero *Conchocarpus*, e difere da maioria das espécies deste gênero apenas pela coloração da corola (creme ou alva na maioria dos *Conchocarpus*) e pelas pétalas livres, geralmente coerentes em *Conchocarpus*. Em uma análise cladística preliminar com dados moleculares (*trnL-trnF* e *rps-16*) de alguns gêneros de Galipeinae, a única espécie de *Almeidea* (*A. rubra*) analisada posicionou-se em um clado composto por outras espécies de *Conchocarpus* (Fig. 5), sugerindo a proximidade filogenética de algumas espécies desse gênero polimórfico com *Almeidea*.

Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Estudar a filogenia das espécies de *Almeidea*, utilizando o método cladístico, incluindo dados morfológicos e moleculares;
2. Levantar caracteres relevantes para a filogenia do gênero;
3. Contribuir para a circunscrição do gênero, caracterizando-o morfologicamente, além de atualizar o número de espécies conhecidas e a distribuição geográfica das mesmas;
4. Contribuir para o melhor conhecimento das Galipeinae, verificando o posicionamento de *Almeidea* nesta subtribo e suas relações com outros gêneros próximos, como *Conchocarpus*;
5. Enriquecer os herbários com coletas de Rutaceae;
6. Atualizar as coleções de *Almeidea* nos herbários com determinações das espécies.

Material e Métodos

1. Táxons utilizados

Para acessar a filogenia de *Almeidea* foram utilizadas todas as espécies reconhecidas para o gênero no trabalho de Silva (1988), considerando *A. affinis* como sinônimo de *A. rubra*, mais o acréscimo de uma espécie nova para o gênero, *A. albiflora*. Com isso, cinco espécies foram utilizadas: *A. albiflora*, *A. coerulea*, *A. lilacina*, *A. limae* e *A. rubra*.

Além das espécies de *Almeidea* foram utilizados no grupo interno representantes da subtribo Galipeinae, notadamente do gênero *Conchocarpus*, que tem emergido como próximo de *Almeidea* em análises filogenéticas preliminares (Kallunki & Groppo 2007). Espécies dos gêneros *Andreadoxa*, *Erythrochiton, Galipea, Neoraputia, Rauia* e *Ravenia*, pertencentes à Galipeinae, tribo Galipeae (Rutoideae), também fizeram parte do grupo interno. Com isso, 18 terminais foram incluídos no grupo interno. Como grupos externos foram escolhidos espécies dos gêneros *Esenbeckia*, *Metrodorea* e *Pilocarpus*, todos da subtribo Pilocarpinae e da mesma tribo Galipeae. Uma espécie de *Hortia*, da subfamília Toddalioideae, mais próxima dos grupos neotropicais de Rutaceae (segundo Groppo *et al.* 2008) também fez parte do grupo externo, além de uma espécie de *Zanthoxylum* (Rutoideae, Euodieae ou Zanthoxyleae), mais distante filogeneticamente segundo Groppo *et al.* (2008) e que foi utilizado para a polarização efetiva dos caracteres.

Uma listagem dos táxons que foram utilizados neste estudo é apresentada abaixo:

Grupo interno:

Subfamília Rutoideae – Tribo Galipeae – Subtribo Galipeinae

1. *Almeidea albiflora* Bruniera & Groppo, sp. nova inédita (Fig. 2 A-C)
2. *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. (Fig. 2 D)
3. *Almeidea lilacina* A. St.-Hil.
4. *Almeidea limae* I.M.Silva (Figs. 2 E, F e 3 A, B)
5. *Almeidea rubra* A. St.-Hil. (Figs. 3 C-F, 4)
6. *Andreadoxa flava* Kallunki (Fig. 6 A)
7. *Conchocarpus concinnus* Kallunki (Fig. 6 B, C)
8. *Conchocarpus heterophyllus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani

9. *Conchocarpus macrophyllus* J.C.Mikan (Fig. 6 D-F)
10. *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki
11. *Conchocarpus minutiflorus* Groppo & Pirani, sp. nova inédita (Fig. 7 A, B)
12. *Conchocarpus odoratissimus* (Lindl.) Kallunki & Pirani
13. *Conchocarpus pentandrus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani
14. *Erythrochiton brasiliensis* Nees & Mart. (Fig. 7 C, D)
15. *Galipea jasminiflora* (A. St.-Hil.) Engl.
16. *Neoraputia alba* (Nees & Mart.) Emmerich (Fig. 7 E-G)
17. *Rauia nodosa* (Engl.) Kallunki (Fig. 8 A-C)
18. *Ravenia spectabilis* (Lindl.) Engl. (Fig. 8 D)

Grupos externos:

Subfamília Rutoideae – Tribo Galipeae – Subtribo Pilocarpinae

19. *Esenbeckia febrifuga* (A. St.-Hil.) Juss. ex. Mart.
20. *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Fig. 8 E, F)
21. *Metrodorea nigra* A. St.-Hil. (Fig. 9 A)
22. *Pilocarpus spicatus* A. St.-Hil. (Fig. 9 B,C)

Subfamília Rutoideae – Tribo Zanthoxyleae

23. *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.

Subfamília Toddalioideae – Tribo Toddalieae – Subtribo Toddaliinae

24. *Hortia oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani. (Fig. 9 D, E)

O estudo das relações filogenéticas entre as espécies de *Almeidea* e outros grupos relacionados foi baseado no método cladístico (Hennig 1966, Amorim 2002, Kitching *et al.* 1998). Foram utilizados para tanto dados morfológicos e moleculares.

2. Dados morfológicos

2.1. Aquisição de material

Os dados de morfologia incluem análise de macromorfologia floral, foliar e análise polínica. Os dados foram coletados de espécimes depositados em coleções científicas, sendo que os herbários ricos em gêneros da subfamília Galipeinae foram visitados, com empréstimos e doações de duplicatas remetidos aos cuidados do herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Herbário SPFR). A seguir são listados os herbários cujas coleções foram analisadas (acrônimos de acordo com Holmgren *et al.* 1990, conferidos na página eletrônica do New York Botanical Garden http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp):

ALCB - Herbário da Universidade Federal da Bahia, Salvador/ BA

BHCB - Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte / MG

CEPEC[1] - Herbário do Centro de Pesquisas do Cacau, Itabuna/ BA

CVRD - Herbário da Reserva Natural da Vale do Rio Doce, Linhares/ES

ESA - Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP, Piracicaba/ SP

GFJP[1] - Herbário Guido F. J. Pabst, Carangola/ MG

HPL - Herbário do Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa/SP

HRB - Herbário RADAMBRASIL, Salvador/ BA

HRCB - Herbarium Rioclarense, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP

HUEFS - Herbário Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana/ BA

K - Herbário do Royal Botanic Gardens, Kew, Inglaterra

LPB - Herbário Nacional da Bolívia, La Paz, Bolívia

MBM - Herbário do Museu Botânico Municipal, Curitiba/ PR

MBML[1] - Herbário do Museu de Biologia Mello Leitão, Santa Teresa/ ES

MO - Herbário do Missouri Botanical Garden, Saint Louis, EUA

NY[1] - Herbário do New York Botanical Garden, New York, EUA

RB[1] - Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/ RJ

RUSU - Herbário da Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro/RJ

SP[1] - Herbário do Instituto de Botânica, São Paulo/ SP

SPF[1] - Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo/ SP

SPFR[1] - Herbário do Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto / SP

UB - Herbário da Universidade de Brasília, Brasília/ DF

UEC[1] - Herbário da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/ SP

UPCB - Herbário da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ PR

[1] - Herbários visitados pessoalmente

No total foi adquirido material suficiente para as análises morfológicas, sendo que ca. 280 coleções de *Almeidea* foram identificadas e analisadas. Os materiais utilizados para as análises morfológicas de todos os táxons estão listados no Apêndice A. Todas as análises morfológicas foram realizadas no Laboratório de Sistemática de Plantas, Dep. de Biologia, FFCLRP-USP (Ribeirão Preto).

2.2. Viagens de coleta

Foram realizadas viagens para analisar as espécies no campo e obter material para análise morfológica e molecular (Tabela 1). Os principais locais e ambientes de ocorrência das espécies de *Almeidea* foram visitados (Fig. 1), com coleta de materiais deste gênero e de outros pertencentes à Galipeinae e à Rutaceae em geral.

A ida para Vassouras (RJ), na Fazenda Ubá, foi realizada principalmente como uma tentativa de encontrar *Almeidea affinis* (aqui considerada sinônimo de *A. rubra*), que é conhecida apenas pela coleção tipo, datada de 1823, e outras poucas coletas da época. No entanto não se obteve sucesso nesta tentativa, e contatou-se que nos arredores da Fazenda Ubá (localidade típica da espécie) restaram apenas áreas de pastagens e cafezais, estando os poucos remanescentes de mata degradados.

Durante todas as coletas ramos das espécies, estéreis ou férteis, foram prensados e herborizados. Fragmentos de folhas foram conservados em sílica-gel para posterior extração de DNA para análises moleculares. Os vouchers foram depositados no Herbário SPFR e SPF. Além disso, flores e frutos foram fixados em Formalina Neutra Tamponada (FNT), e folhas e pecíolos em FAA 50 - formaldeído, ácido acético e etanol 50% - (Johansen 1940) para futuras análises anatômicas.

2.3. Análise dos caracteres morfológicos

Os caracteres de macromorfologia foram obtidos pela observação direta de materiais herborizados, frescos ou fixados de diferentes coleções. Além disso, descrições das espécies presentes na literatura também auxiliaram na codificação dos carateres morfológicos. As principais obras utilizadas foram: Emmerich (1978), Silva (1988), Kallunki (1992), Kallunki (1998), Kallunki & Pirani (1998), Pirani (1999), Pirani (2002) e Pirani *et al.* (submetido) para os táxons de Galipeinae; Kaastra (1982) e Skorupa (1996) para os táxons de Pilocarpinae; Groppo (2004) para *Hortia oreadica* e Pirani (2002) para *Zanthoxylum rhoifolium*.

Para os caracteres de morfologia polínica, aqueles táxons que já possuíam o pólen descrito em literatura não foram analisados, com exceção de *Almeidea*, que possuía as espécies *A. coerulea, A. limae* e *A. rubra* com pólen descrito por Barth (1982) e Morton & Kallunki (1993) e que foram analisadas novamente neste estudo.

Assim, todas as espécies de *Almeidea* e seis espécies de *Conchocarpus* tiveram seu pólen analisado. Foram selecionados botões florais (ca. 15 por espécie) em pré-antese de materiais herborizados de diferentes populações para cada espécie (os materiais utilizados estão listados no Apêndice B). Estes botões foram hidratados em água destilada e então todas as anteras foram retiradas e colocadas em etanol 50% e a seguir foram armazenadas em etanol 70%. Essas anteras foram maceradas 72 horas depois e então os grãos de pólen foram submetidos ao processo de acetólise descrito em Erdtman (1960). Os grãos acetolisados foram armazenados em glicerina 50%, por pelo menos 24 horas. Para cada espécie incluída neste estudo, foram elaboradas três lâminas com o material polínico. Essas lâminas foram montadas com gelatina de Kisser (Salgado-Labouriau 1973), lutadas com parafina, etiquetadas e acondicionadas na Palinoteca do Departamento de Biologia da FFCLRP, USP.

As descrições dos grãos de pólen foram feitas com o auxílio de microscópio trinocular Leica DM 4000B com aumento de até 2500x. Foram capturadas imagens dos grãos de pólen utilizando câmara digital Leica DFC500 acoplada ao microscópio. Estas imagens foram transferidas automaticamente para um computador para a mensuração dos

e anotadas as suas características morfológicas. Para cada espécie foram realizadas 20 medidas para os valores dos distintos diâmetros dos grãos (eixo polar e equatorial). Todas as medidas dos grãos de pólen foram tomadas utilizando o programa software analySIS® 3.1 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) e foram dadas em micrômetros (µm). Para facilitar a visualização tridimensional, o que favorece uma descrição mais precisa dos grãos, foi utilizado o acessório *Leica Movie Recorder /movie Player* para gravação seqüencial de imagens. Essas filmagens foram feitas a partir dos grãos de pólen suspensos em glicerina P.A. Todas as descrições no texto seguem a ordem de unidade polínica, tamanho (dado pelas medidas dos eixos polar e equatorial), simetria, polaridade, âmbito, forma (dada pela razão P/E), número e tipo de abertura e ornamentação da exina.

Para *Almeidea albiflora* também foram feitas imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para este procedimento os grãos de pólen foram coletados diretamente de anteras secas de botões forais do holótipo. As amostras de pólen foram montadas em suportes metálicos ("stubs") e então metalizadas com ouro. As observações e imagens foram realizadas em um Microscópio Eletrônico Shimadzu (Modelo SS-550), alocado do Departamento de Química da FFCLRP-USP. O procedimento de MEV foi realizado apenas para *A. albiflora* pois no decorrer este trabalho foi submetido um artigo para esta espécie nova (anexo). Para os outros táxons a microscopia óptica se mostrou suficiente para a coleta de dados para a matriz morfológica.

Com os dados de macromorfologia somados aos de morfologia polínica foi construída uma matriz de caracteres (Tabela 2). A codificação dos mesmos foi efetuada segundo os critérios descritos em Scotland & Pennigton (2000).

3. Dados moleculares

3.1 Regiões do DNA utilizadas na análise

Para acessar a filogenia de *Almeidea* foram utilizadas duas regiões não codificantes do DNA do núcleo (ITS-1 e ITS-2) mais o íntron *rps-16* e a região *trnL-trnF* do cloroplasto. A região *trnL-trnF* é formada pelo íntron *trnl* e o espaçador intergênico *trnL-trnF* (Taberlet *et al.* 1991). Essas regiões não codificantes possuem uma taxa de evolução maior quando comparada as codificantes, como o *rbcL* (1,93-11,72 vezes mais rápida em certos gêneros de

Graminae, ver Gielly & Tabberlet 1994 e referências neste). Com isso, esses fragmentos têm sido empregados preferencialmente em nível intrafamiliar, com boa resolução (*e.g.* Andersson & Rova 1999; Baker *et al.* 2000, Wallander & Albert 2000, Asmussen & Chase 2001, Groppo *et al.* 2008, Salvo *et al.* 2008). A extração do DNA e amplificação dos fragmentos foi realizada no Laboratório de Sistemática de Plantas, Depto. Biologia, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto.

3.2. Obtenção do material e extração do DNA

O DNA total foi extraído de folhas provenientes de material fresco obtido nas coletas. Foi priorizada a coleta de folhas sadias, que foram fragmentadas e incluídas em recipientes contendo sílica gel para uma rápida desidratação dos tecidos, de acordo com o procedimento de Chase & Hills (1991). "Vouchers" foram depositados nos Herbários SPFR e SPF. A Tabela 3 apresenta informações sobre o número de coletor, coleção e localidade dos "vouchers" para todos os terminais.

A extração foi realizada de acordo com o Protocolo de Doyle & Doyle (1987), modificado. Todo o material extraído foi armazenado em Freezer a -20ºC até a sua utilização. Do gênero *Almeidea* foi extraído o DNA de pelo menos 3 indivíduos diferentes de cada uma das espécies. Em relação às demais espécies da análise foi realizada a extração do DNA total de pelo menos 1 indivíduo de cada espécie.

3.3. Amplificação das regiões

As amostras foram preparadas a um volume total de 49,5 µL para amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction, White *et al.* 1990). Neste volume estão incluídos 27,5 µL de ddH_2O, 6 µL de Betaína (5M), 5 µL de Taq Buffer (10x) com $(NH4)_2SO_4$- $MgCl_2$, 4 µL de $MgCl_2$ (25mM), 2,5 µL de dNTPs Mix (2,5mM cada), 1 µL de cada iniciador (10 pM), 2 µL de amostra de DNA (diluída em 1:10 ou não-diluída) e 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (5 unidades/µL). As reações de amplificação foram realizadas em termo-ciclador (SWIFT™ MAXI THERMAL CYCLER BLOCKS).

A região *trnL-trnF* foi amplificada com a utilização dos iniciadores universais trn-c> e trn-f< descritos em Tabberlet *et al.* (1991), que amplificam a região inteira. Para algumas amostras, entretanto, foram usados também os iniciadores internos trn-e> e trn-d< descritos no trabalho supra-citado. As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial de 99ºC (10 min), seguida de 35 ciclos de 94ºC (30s), 56ºC (30s), 72ºC (45s) e terminando com 72ºC (3 min) para permitir completa extensão dos produtos de reação. Entre o primeiro passo de 10 min e o início dos ciclos foi inserido um novo passo com duração de apenas 10s a 80 ºC no qual o programa era interrompido para adição da enzima Taq DNA Polimerase. Este novo passo foi efetuado também na PCR das demais regiões amplificadas.

O íntron *rps-16* foi amplificado utilizando os iniciadores *rps*F> e *rps*R2< descritos em Oxelman *et al.* (1997). As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial de 99ºC (10 min), 80ºC (10s), 94ºC (2 min), seguida de 33 ciclos de 94ºC (1 min), 50ºC (45s), 72ºC (1,2 min) e terminando com 72ºC (5 min).

ITS-1 foi amplificado com a utilização dos iniciadores descritos em Scott *et al.* (2000) e ITS-2 foi amplificado utilizando-se os iniciadores descritos em White *et al.* (1990). As reações de amplificação em ambas as regiões foram realizadas com desnaturação inicial de 99ºC (10 min), 80ºC (10s), seguida de 30 ciclos de 95ºC (15s), 56ºC (30s), 72ºC (1,5min) e terminando com 72ºC (3min).

Para verificar se as amplificações tinham sido bem sucedidas, era retirada uma amostra de 5 µL de cada produto de PCR que eram então verificados sob luz U.V. após eletroforese a 70V em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.4. Purificação e reação de seqüenciamento

Os produtos de PCR cuja amplificação foi bem sucedida foram purificados com a utilização de colunas GFX^{TM} PCR (Amersham Biociences, Psicataway-USA), seguindo protocolo do fabricante.

Uma amostra de 5 µL dos produtos purificados eram submetidas a eletroforese a 70V em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As imagens capturadas sob luz

U.V. serviram para “quantificar” visualmente o volume de produto purificado necessário para as reações de seqüenciamento.

O volume para as reações de seqüenciamento foi de 20µL: 4µL de BigDye Buffer (5x), 2µL de BigDye Terminator, 1µL de iniciador (10 pM), o volume de produto de PCR purificado variava entre 3 e 10µL, assim, o volume de ddH_2O também variava entre 3 e 10µL. O ciclo utilizado foi o mesmo para todas as amostras: desnaturação inicial de 96ºC (5 min), seguido por 40 ciclos de 96ºC (30s), 50ºC (30s) e 60ºC (4min). Os produtos foram precipitados e então enviados para seqüenciamento em um dos seguintes laboratórios: Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Depto. Biologia, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto; Laboratório de Parasitologia Molecular, FMRP-USP, Ribeirão Preto e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Dep. de Biotecnologia, UNESP Jaboticabal.

3.5. Edição e alinhamento das seqüências

As seqüências foram analisadas e editadas com o auxílio do programa Biological Sequence Alignment Editor (BioEdit), v.7.0.9 (copyright Tom Hall 1999). Cada fragmento foi examinado isoladamente e de maneira cuidadosa, para verificar a concordância entre os sítios nas diferentes fitas. Os terminais são os mesmos da análise morfológica, porém para a análise molecular mais de um indivíduo por espécie teve sua seqüência obtida, gerando mais de um terminal por espécie em alguns casos.

As seqüências obtidas para cada fragmento do DNA foram alinhadas com o programa MUSCLE v3.6 (Edgar 2004). O alinhamento resultante foi então refinado manualmente utilizando-se novamente o programa BioEdit. Os “blocos” iniciais e finais dos alinhamentos que geralmente contém erros de seqüenciamento e que não são informativos foram excluídos dos alinhamentos, além das séries longas de “A”s e “T”s (variáveis entre espécies e/ou causadas por erros de leitura no seqüenciamento, ver Kelchner & Wendel, 1996).

3.6. Análise filogenética

Os dados morfológicos foram analisados utilizando o critério de Máxima Parcimônia (MP). Além deste foram utilizados dois métodos estatísticos para a análise dos dados moleculares: a Máxima Verossimilhança (ML) e a Análise Bayesiana. O objetivo do uso de três metologias (ou antes, critérios de escolhas das melhores árvores, ou ainda diferentes otimizações) foi comparar se haveria disparidades nos resultados dependendo do critério escolhido, dado um mesmo conjunto de dados (os alinhamentos produzidos).

Cada partição de dados moleculares foi primeiramente analisada individualmente em cada um dos critérios de otimização.

Foram feitas dois tipos de análises para cada região do DNA estudada. A primeira análise incluiu todos os táxons seqüenciados durante o desenvolvimento do trabalho, consistindo assim em uma análise por indivíduos (resultando em uma árvore com um maior número de terminais), sendo que para a espécie *Almeidea rubra* foram seqüenciados vários indivíduos de diferentes populações. A segunda análise incluiu apenas um indivíduo por espécie, sendo chamada portanto de análise reduzida. A única exceção seria para *A. rubra* que teve três indivíduos (pertencentes a três populações diferentes, uma de Minas Gerais, uma do Espírito Santo e outra da Bolívia) incluídos na análise reduzida.

A análise de MP com dados moleculares foi realizada utilizando PAUP* v.4.0b10 (Swofford 2001). As árvores iniciais foram obtidas por *stepwise addiction* com adição aleatória de seqüência, retendo-se 10 árvores após cada réplica. Foram executadas buscas heurísticas para obtenção das melhores árvores por *branch-swapping*, utilizando o algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR), com 10.000 réplicas retendo-se 1 árvore por réplica, e sem a opção MULTREES. Nas análises da região *trnL-trnF* e do íntron *rps-16* a opção MAXTREES foi ajustada para 10.000 árvores. Os caracteres foram tratados como não ordenados e com pesos iguais ("Parcimônia de Fitch", Fitch 1971). Os *gaps* não foram codificados, sendo considerados como dados ausentes ("missing data"). A sustentação dos ramos foi estimada usando a análise de *bootstrap* (Felsenstein 1985) com o programa TNT 1.1 (Goloboff *et al.* 2003), calculada em 1000 réplicas através de busca heurística utilizando-se adição aleatória de táxon e *branch-swapping* por TBR. A escolha do programa TNT para esta análise foi devido à rapidez do resultado obtido, quando comparado ao tempo gasto no PAUP.

Na análise de MP com dados morfológicos os parâmetros utilizados foram os mesmos utilizados nas análises moleculares, com exceção da análise de *bootstrap*, que foi realizada no PAUP* v.4.0b10, e não no TNT, porém com mesmos parâmetros de busca.

Para a análise de ML o melhor modelo evolutivo de substituição de bases foi estimado pelo programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). Para todas as partições, o modelo GTR + G foi identificado como o mais apropriado. As buscas heurísticas foram executadas utilizando-se PAUP* v.4.0b10. As árvores iniciais foram obtidas por *stepwise addiction* com adição aleatória de seqüência, retendo-se uma árvore após cada réplica. A obtenção das melhores árvores por feita por *branch-swapping*, utilizando o algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR), com 1.000 réplicas retendo-se 1 árvore por réplica, e sem a opção MULTREES. Os *gaps* foram tratados sem qualquer codificação e considerados como dados ausentes. A sustentação dos ramos foi estimada usando a análise de *bootstrap* com o programa PAUP* v.4.0b10, calculada em 100 réplicas através de busca heurística utilizando-se adição simples de táxon e *branch-swapping* por SPR.

As análises bayesianas foram realizadas utilizando MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). O modelo de substituição de bases GTR + G foi utilizado nas análises, e as buscas consistiram em três corridas independentes, cada uma com quatro cadeias simultâneas (i.e., uma “cold chain” e três “heated chains”). As cadeias de Markov foram iniciadas com uma árvore aleatória e o número inicial de gerações foi de 1.000.000, amostrada a cada 1.000 gerações. Quando completado o número total de gerações, era monitorado visualmente se o programa teria atingido a convergência (i.e., *average standart deviation of split frequencies* <0.01), caso contrário um número maior de gerações era aplicado (500.000 – 1.000.000). Após descartar 25% das árvores, correspondentes ao “burnin”, uma árvore de consenso era calculada a partir das “cold chains” de cada uma das três corridas. Probabilidades posteriores foram calculadas durante a análise para a sustentação dos ramos.

Foi realizado o teste ILD (“Incongruence Lenght Difference Test”, Farris *et al.* 1995), presente no PAUP* v.4.0b10 para testar a congruência entre as partições de dados. Foi testada primeiramente a congruência entre as duas regiões nucleares (ITS-1 e ITS-2) e entre as duas regiões do cloroplasto (*trnL-trnF* e *rps-16*). Posteriormente, as quatro regiões foram compiladas em uma única matriz e o ILD foi novamente calculado. Por último foi inserida a

matriz morfológica nesta última para testar a congruência entre os dados moleculares (quatro regiões utilizadas) e morfológicos. Os testes foram feitos utilizando 1000 réplicas e com parâmetros de busca heurística iguais aos das análises de MP.

Utilizando as mesmas matrizes (alinhamentos) construídas para o teste ILD, foram realizadas análises combinadas dos dados moleculares segundo os três critérios de otimização, MP, ML e Bayesiana. Foi realizada também uma análise de MP combinando as quatro partições de dados moleculares com a matriz de dados morfológicos para uma análise de evidência total. As buscas foram realizadas no PAUP* v.4.0b10, com os mesmos parâmetros das análises individuais.

Foram consideradas neste trabalho as seguintes categorias de sustentação de ramos: forte para porcentagem de *bootstrap* (BS) $\geq$ 88% e probabilidade posterior (PP) $\geq$ 91%. Segundo Zander (2004) estes valores representam os valores mínimos requeridos para um intervalo de confiança de 95% de um nó sobre certas circunstâncias. Outros intervalos de valores de suporte (definidos arbitrariamente) são considerados como moderado (76 - 87 % para BS e 85 – 90 % para PP), fraco (63 – 75 % para BS e 75 – 84 % para PP) e ambíguo (< 63% para BS e < 75% para PP).

Resultados

1. Teste de congruência e análise combinada

Os testes de ILD resultaram em valores de P > 0,05 para todas as partições moleculares, revelando que os dados poderiam ser combinados. A inspeção visual das árvores das análises individuais também revelou congruência entre as topologias, sendo que as relações mais variáveis nas análises correspondem àquelas com suporte fraco dos ramos.

As análises combinadas dos dados moleculares foram feitas apenas com os alinhamentos produzidos pelas análises reduzidas de cada região do DNA, pois nas análises por indivíduo muitos dos espécimes que foram incluídos na análise de uma região não correspondiam aos mesmos da análise da outra região, levando a uma grande quantidade de "missing data", que atrapalhava a análise filogenética.

Em relação a combinar os dados moleculares com os dados morfológicos, o teste de ILD resultou em um valor de P < 0,05, indicando a presença de dados conflitantes entre essas partições e que não deveriam ser combinadas. A inspeção visual das árvores também revelou várias diferenças na topologia das árvores de consenso (estrito e de maioria) com dados morfológicos sob o critério de MP (Figs. 10 e 11, respectivamente) e da árvore de consenso estrito com dados moleculares combinados sob critério de MP (Fig. 42). Apesar desses resultados os dados morfológicos e moleculares foram combinados em uma tentativa de produzir uma análise de evidência total.

2. Análise das hipóteses filogenéticas baseadas nos dados moleculares

Todas as informações a respeito do número de caracteres e dos índices de consistência e retenção das análises moleculares (individuais e combinadas) por máxima parcimônia estão descritas nas Tabelas 4 e 5.

As árvores produzidas pelas análises individuais de cada região do DNA e combinadas, segundo cada critério de otimização são mostradas nas Figs. 12 – 44.

2.1 Monofiletismo de *Almeidea* e relações entre suas espécies

O gênero *Almeidea* apareceu como monofilético em todas as análises individuais, com exceção das análises da região ITS-2 (Figs. 30 a 35), e das análises reduzidas da região ITS-1 (Figs. 25, 27 e 29), com forte sustentação de ramos em algumas delas (principalmente nas análises bayesianas). Em todas as análises combinadas o gênero também formou um clado, inclusive nas árvores resultantes dos dados combinados das quatro regiões (Figs. 42 a 44), com forte sustentação na análise de ML (BS 99%) e bayesiana (PP 100%).

Uma das principais constatações do estudo foi que alguns indivíduos da espécie *Almeidea rubra* se posicionaram mais próximos filogeneticamente de outras espécies do que com outros indivíduos de *A. rubra*, independente da região analisada e do método utilizado.

As relações entre as espécies de *Almeidea* variaram dentre as diferentes regiões do DNA analisadas. Nas análises da região *trnL-trnF* por MP (Figs. 12 e 13) não houve resolução dentro do clado formado pelas espécies de *Almeidea*, já nas análises por ML (Figs. 14 e 15) e bayesiana (Fig. 16 e 17) as espécies *A. limae* e *A. lilacina* apareceram juntas, porém com sustentação ambígua e moderada.

Nas análises da região *rps-16* (Figs. 18 a 23) a resolução também foi baixa para o clado de *Almeidea*, porém os indivíduos de *A. rubra* e de *A. albiflora* formaram um clado nas diferentes análises, com suporte moderado nas árvores de MP e forte nas árvores de ML e bayesiana. Outras espécies que emergiram juntas foram *A. lilacina* e *A. limae*, mas com suporte ambíguo a fraco, com exceção do filograma produzido por análise bayesiana (Fig. 23) onde esta relação apresenta um suporte de 97% de PP.

Nas análises de ITS-1 (Figs. 24 a 29) ficou constatada a proximidade entre as espécies *Almeidea rubra*, *A. limae* e *A. lilacina*, que apareceram juntas nas diferentes análises, com forte sustentação (PP 99%) na análise reduzida por método bayesiano (Fig. 29). Além disso, a espécie *A. coerulea* apresentou-se como táxon mais basal dentro do gênero seguido por *A. albiflora* (nas análises por indivíduo), porém nas análises reduzidas *A. coerulea* se posicionou ou como mais próxima de *Conchocarpus macrophyllus* (Figs. 27 e 29) ou formou uma politomia com *C. heterophyllus* e *C. macrophyllus* (Fig. 25), deixando o gênero *Almeidea* não-monofilético.

Nas análises de ITS-2 (Figs. 30 a 35) a espécie *Almeidea coerulea* apareceu como mais próxima das espécies de *Conchocarpus*, se posicionando na base do clado formado por este gênero e deixando *Almeidea* não-monofilético. As espécies *A. limae* e *A. rubra* formaram um clado em todas as árvores da região ITS-2, com suporte moderado a forte. Em algumas análises *A. lilacina* se posicionou mais próxima do clado formado por essas duas espécies, mas com sustentação ambígua.

Na análise combinada das regiões do cloroplasto (*trnL-trnF* e *rps-16*) por MP (Fig. 36), as únicas espécies que formaram um clado foram *Almeidea lilacina* e *A. limae* (BS 64%) com as relações entre as demais espécies não resolvidas. Nas análises por ML e bayesiana (Figs. 37 e 38), *A. lilacina* e *A. limae* também apareceram juntas (BS 89% e PP 100%), e *A. albiflora* formou um clado com indivíduos de *A. rubra* (do ES e MG), porém com sustentação baixa (BS 70%) e ambígua (PP 60%).

Na análise combinada das regiões nucleares (ITS-1 e ITS-2) pelos três métodos (Figs. 39 a 41) as relações entre as espécies de *Almeidea* foram iguais. *A. limae* a *A. rubra* (do ES e MG) apareceram como mais próximas filogeneticamente, formando um clado. A espécie *A. lilacina* também se posicionou próxima a elas, como grupo-irmão deste clado, seguida por *A. rubra* (Bolívia). Já as espécies *A. albiflora* e *A. coerulea* assumiram posições mais basais dentro do clado de *Almeidea*. Estas relações tiveram forte sustentação na análise bayesiana.

Na análise combinada das quatro regiões moleculares (Figs. 42 a 44) as relações entre as espécies de *Almeidea* ficaram iguais às verificadas nas análises combinadas de ITS-1 e ITS-2. A única diferença está na análise de MP (Fig. 42), onde não foi resolvido se *A. lilacina* ou *A. rubra* (Bolívia) é grupo-irmão do clado formado por *A. rubra* (ES e MG) e *A. limae*. A sustentação dos ramos variou dependendo do método aplicado.

2.2 Monofiletismo de *Conchocarpus* e relações entre suas espécies

O gênero *Conchocarpus* apareceu como não-monofilético em todas as análises individuais, com exceção das análises da região ITS-2 (Figs. 30 a 35), nas quais aparece como um grupo monofilético, com sustentação forte nas análises bayesianas (PP 100%). Nas análises combinadas o não-monofiletismo de *Conchocarpus* foi constatado independente das regiões combinadas e do método.

Entre as espécies de *Conchocarpus* algumas relações foram constantes nas diferentes análises. As espécies *C. odoratissimus* e *C. pentandrus* formaram um clado em todas as análises individuais (com exceção de três árvores – Figs. 12, 13 e 16), sendo que nas Figs. 12 e 13 (análise da região *trnL-trnF* por MP) as relações entre a maioria das espécies de *Conchocarpus* não foram resolvidas, aparecendo em uma politomia. Também nas diferentes análises combinadas, os táxons *C. odoratissimus* e *C. pentandrus* emergiram como clado, com sustentação moderada a forte.

A espécie *Conchocarpus macrophyllus* apareceu como táxon basal entre as espécies do gênero em todas as análises (com exceção das análises reduzidas de ITS-1), se posicionando como a espécie mais basal do clado formado pelas espécies de *Almeidea* e *Conchocarpus* (com exceção de *C. concinnus*). Nas análises de ITS-2, *C. macrophyllus* não foi incluído (devido a problemas de alinhamento). Na maioria das análises, a sustentação deste posicionamento de *C. macrophyllus* foi forte, inclusive nas combinadas.

A espécie *Conchocarpus concinnus* apareceu em todas as análises em que foi incluída (*trnL-trnF* e *rps-16*) separada das demais espécies do gênero, e posicionada como mais próximas de outros gêneros de Galipeinae, com as espécies *Andreadoxa flava*, *Erythochiton brasiliensis* e *Neoraputia alba*, inclusive nas análises combinadas.

O posicionamento das espécies *Conchocarpus heterophyllus*, *C. mastigophorus* e *C. minutiflorus* foi variável dependendo da região do DNA e do método utilizado.

2.3 Monofiletismo de Galipeinae e relações entre seus gêneros

A subtribo Galipeinae apareceu como monofilética em todas as análises, com exceção de algumas análises da região ITS-1, nas quais o posicionamento da espécie *Hortia oreadica* (pertencente a outra subfamília) deixou Galipeinae não-monofilética (Figs. 24, 25, 27 e 29). Nas análises combinadas a subtribo também apareceu formando um clado, com exceção da análise combinada de ITS-1 e ITS-2 por ML (Fig. 40).

Entre os gêneros de Galipeinae incluídos, *Almeidea* e *Conchocarpus* apareceram em todas as análises formando um clado (com exceção de *C. concinnus*), tendo *C. macrophyllus* como táxon basal na maioria das árvores produzidas.

A espécie *Conchocarpus concinnus* se posicionou em todas as análises em que foi incluída como mais próxima de *Andreadoxa flava*, *Erythrochiton brasiliensis* e *Neoraputia alba*, formando um clado com estas espécies. Na análise combinada das quatro regiões moleculares (Figs. 42 a 44), estes quatro táxons formaram um politomia na análise de MP, mas nas análises de ML e bayesiana, as espécies *A. flava* e *N. alba* formaram um clado com *E. brasiliensis* como grupo-irmão, no entanto estas relações tiveram suporte ambíguo (Fig. 44). A posição de *C. concinnus* como táxon basal no clado formado por estas quatro espécies teve suporte moderado (BS 86%) e forte (PP 100%).

Os gêneros *Galipea* e *Rauia* também exibiram proximidade filogenética entre as espécies analisadas, *G. jasminiflora* e *R. nodosa*. Em todas as análises (com exceção das análises da região *rps-16* - Figs. 18 a 23) estas duas espécies apareceram formando um clado, inclusive nas análises combinadas. A sustentação deste clado foi variável, mas na maioria das árvores apareceu como forte.

O posicionamento de *Ravenia spectabilis* foi variável dependendo da região do DNA e do método utilizado. Em algumas análises a espécie apareceu formando uma politomia com outros clados de Galipeinae (ver Fig. 12), em outras apareceu como grupo-irmão do clado formado por *Almeidea* e *Conchocarpus* (com exceção de *C. concinnus*), como na Fig. 14. Nas análises de *rps-16* apareceu formando um clado com *Rauia nodosa* (Figs. 18 a 23). Em outras análises apareceu como táxon basal dentro do clado formado pela subtribo Galipeinae (ver Fig. 26). Nas análises combinadas também surgiu em diferentes posições nas topologias. Nas análises combinadas de *trnL-trnF* (Figs. 36 a 38), *R. spectabilis* aparece como grupo-irmão do clado formado por *Galipea jasminiflora* e *Rauia nodosa*, com sustentação fraca nas análises de MP e ML (BS 64 e 73%, respectivamente) e forte na análise bayesiana (PP 97%). Nas análises combinadas de ITS-1 e ITS-2 (Figs. 39 a 41), ela se posiciona como táxon basal dentro de Galipeinae, porém na análise de ML ela divide esta posição basal com *Hortia oredica*, táxon pertencente à outra subfamília de Rutaceae. Nas análises combinadas das quatro regiões moleculares (Figs. 42 a 44), cada método colocou *R. spectabilis* em uma posição: na análise de MP a espécie apareceu como táxon basal dentro do clado formado por Galipeinae, na análise de ML ela surge como grupo-irmão do clado formado por *Almeidea* e *Conchocarpus* (com exceção de *C. concinnus*), com sustentação ambígua e na

análise bayesiana ela aparece em uma politomia com outros dois grandes clados formados pelos gêneros de Galipeinae, com forte sustentação (PP 100%).

2.4 Posicionamento de *Hortia oreadica*

A posição de *Hortia oreadica* também foi variável nas diferentes análises realizadas. Em algumas topologias sua posição ficou como não resolvida, formando uma politomia com o clado formado pelos táxons de Galipeinae, com o clado formado pelos táxons de Pilocarpinae e com *Zanthoxylum rhoifolium* (e.g. Fig. 13). Em outras análises, *H. oreadica* posicionou-se dentro da subtribo Galipeinae (e.g. Fig. 24). No entanto, a maioria das análises colocou *H. oreadica* como grupo-irmão do clado formado por Galipeinae (e.g. Fig. 14), inclusive as análises combinadas (com exceção da análise combinada de *trnL-trnF* e *rps-16* por MP, e da análise combinada de ITS-1 e ITS-2 por ML), com sustentação moderada nas análises de ML e bayesiana das quatro regiões moleculares (BS 87% e PP 89%, respectivamente).

2.5 Monofiletismo de Pilocarpinae e relações entre seus gêneros

Os táxons da subtribo Pilocarpinae apareceram formando um clado na maioria das árvores, com algumas exceções nas análises das regiões ITS-1 (Figs. 24 a 26) e ITS-2 (Figs. 31, 33 e 35). Nas análises combinadas a subtribo também apareceu monofilética, com exceção da combinada de ITS-1 e ITS-2 sob critério de ML (Fig. 40).

Em relação às espécies de Pilocarpinae, *Esenbeckia grandiflora* e *Metrodorea nigra* apareceram formando um clado nas análises em que esta foi incluída (*trnL-trnF* e *rps-16*). Nessas análises a espécie *E. febrifuga* apareceu como grupo-irmão deste clado. A única exceção para estas relações ocorreu na análise por indivíduos da região *rps-16* por MP (Fig. 18), onde as três espécies formam uma politomia. Nas análises nas quais *Metrodorea nigra* não foi incluída, as duas espécies de *Esenbeckia* apareceram formando um clado na maioria das árvores.

A espécie *Pilocarpus spicatus* surgiu como grupo-irmão do clado formado por *Esenbeckia* e *Metrodorea* na maioria das análises.

Nas análises combinadas das quatro regiões moleculares (Figs. 42 a 44) apareceram as relações mais constantemente encontradas nas análises individuais: *Esenbeckia grandiflora* e *Metrodorea nigra* formaram um clado, com *E. febrifuga* como grupo-irmão e com *Pilocarpus spicatus* como táxon mais basal do clado. Essas relações possuem forte sustentação nas árvores produzidas pelos três métodos.

3. Análise das hipóteses filogenéticas baseadas nos dados morfológicos

Os caracteres analisados de macromorfologia foliar e floral e de morfologia polínica foram compilados em uma única matriz morfológica (Tabela 2), resultando em 41 caracteres, binários e multiestados. A lista dos caracteres e seus respectivos estados é apresentada no Apêndice C.

A análise da matriz morfológica utilizando o critério de máxima parcimônia produziu 309 árvores igualmente parcimoniosas, com 152 passos. As informações a respeito do número de caracteres e índices de consistência e retenção estão descritas nas Tabelas 4 e 5.

A árvore de consenso estrito (Fig. 10) não indicou resolução entre a maior parte dos táxons analisados, assim, foi utilizada a árvore de consenso de maioria (Fig. 11) para a discussão das relações entre as espécies envolvidas. No entanto, mesmo utilizando o consenso de maioria, as relações entre as espécies de *Almeidea* não apresentaram resolução. Como a árvore de *bootstrap* não foi congruente com a árvore do consenso de maioria, o suporte dos ramos foi indicado na Fig. 11 apenas no clado de *Almeidea* (que foi congruente nestas duas árvores). As demais porcentagens indicadas nos ramos da Fig. 11 correspondem à porcentagem de ramos presentes no consenso de maioria.

Na árvore de consenso de maioria (Fig. 11) o gênero *Almeidea* surgiu como monofilético, porém com baixa sustenção (BS 70,1%), e a espécie *A. albiflora* apareceu na base do clado, como grupo-irmão das demais espécies do gênero. A única sinapomorfia morfológica não-homoplástica que sustenta o gênero é a presença de pólen com mais de seis aberturas (pólen pantocolporado - caracter 39, ver Tabela 2). Outras sinapomorfias, porém homoplásticas que sustentam o grupo são: prefloração do cálice imbricado (caracter 5), presença de “nectários” no ápice das sépalas (caracter 7) e pétalas com cor predominante rósea (caracter 12).

Conchocarpus apareceu na árvore de consenso de maioria (Fig. 11) como não-monofilético e a espécie *C. heterophyllus* como grupo-irmão de *Almeidea*, sendo que o clado formado pelas espécies de *Almeidea* emerge dentro do clado formado pelas espécies de *Conchocarpus* (com exceção de C. concinnus). A espécie *C. concinnus* se distanciou filogeneticamente das demais espécies do gênero, se posicionando na base do clado que inclui os táxons da subtribo Galipeinae. *C. macrophyllus* apareceu na base do clado formado por *Almeidea* e *Conchocarpus* (com exceção de *C. concinnus*).

A subtribo Galipeinae surgiu como monofilética. Algumas sinapomorfias morfológicas que sustentam este clado são: pétalas coerentes (caracter 11), aderência entre pétalas e filetes (caracter 15), redução do número de estames e transformação em estaminódios (caracteres 17 e 18), anteras com inserção basifixa (caracter 19), embrião curvo (caracter 34) e cotilédones conduplicados e plicados (caracteres 35 e 36).

A subtribo Pilocarpinae (formada pelos gêneros *Esenbeckia*, *Metrodorea* e *Pilocarpus*) apareceu na análise morfológica como não-monofilética. A espécie *E. febrifuga* formou um clado com *M. nigra*, se posicionando mais próxima desta do que de *E. grandiflora*. As espécies *E. febrifuga* e *M. nigra* compartilham uma sinapomorfia não-homoplástica (caracter28: estigma capitado, simples) e duas sinapomorfias homoplásticas, que são: folhas com filotaxia oposta (caracter 1) e compostas, com 1-3 folíolos (caracter 2).

4. Análise da hipótese filogenética baseada em dados moleculares e morfológicos combinados

Os dados morfológicos e moleculares foram combinados em uma matriz única (apesar do teste de ILD ter sido contrário à combinação) para uma análise de evidência total sobre critério de máxima parcimônia. A árvore de consenso estrito resultante da análise é mostrada na Fig. 45. A topologia dessa árvore é idêntica a topologia da Fig. 42, que consiste na árvore de análise combinada das quatro partições moleculares por MP. As diferenças estão apenas na sustentação dos ramos.

5. Mapeamento de caracteres morfológicos

Alguns caracteres morfológicos considerados importantes para caracterização do gênero *Almeidea* e da subtribo Galipeinae foram mapeados em uma das hipóteses filogenéticas, e para isso foi utilizada a árvore da análise combinada das quatro regiões moleculares, sob critério bayesiano (Fig. 44). Essa árvore foi escolhida pois sua topologia parece exibir as relações mais constantes encontradas nas diferentes análises, além de reunir os dados das quatro partições moleculares.

Foram selecionados seis caracteres morfológicos (caracteres 7, 11, 15, 34, 35 e 39), que foram mapeados e representados nas Figuras 46 a 48. Estes caracteres foram escolhidos pois representam características diagnósticas para a subtribo Galipeinae ou para o gênero *Almeidea*.

Na Fig. 46 A, o caracter 7 ("nectários"nos lacínios do cálice) apresentou seu estado apomórfico (presença) como sinapomorfia do clado que reúne o gênero *Almeidea* com espécies de *Conchocarpus*, com uma provável reversão nas espécies *C. odoratissimus* e *C. mastigophorus.*

A Fig. 46 B, com o caracter 11 (união das pétalas até a parte mediana da flor) mapeado, mostra que a coerência entre as pétalas pode ser considerada uma sinapomorfia de Galipeinae, com o estado mais derivado (conação das pétalas) ocorrendo em alguns táxons (*Erythrochiton brasiliensis*, *Rauia nodosa* e *Ravenia spectabilis*) como estados homoplásticos e com uma reversão para pétalas livres ocorrendo no clado de *Almeidea*.

A Fig. 47 A, com o caracter 15 (união das pétalas e filetes até a parte mediana da flor) mapeado, mostra que a aderência entre pétalas e filetes também pode ser considerada uma sinapomorfia de Galipeinae, com o estado mais derivado (adnação dessas estruturas) ocorrendo em *Erythrochiton brasiliensis*, *Galipea jasminiflora*, *Ravenia spectabilis* e em *Andreadoxa flava* (polimórfico) como homoplasias e com uma reversão ocorrendo no clado de *Almeidea* e em *Neoraputia alba* (polimórfico).

Na Fig. 47 B, os caracteres 34 (formato do embrião) e 35 (soldadura dos cotilédones) apresentaram seus respectivos estados apomórficos (embrião curvo e cotilédones conduplicados) como sinapomorfias do clado de Galipeinae, com reversão de ambos os estados na espécie *Conchocarpus concinnus*.

Na Fig. 48, o caracter 39 (número de aberturas do pólen) apresentou um dos estados mais derivados (mais de seis aberturas) como sinapomorfia do clado de *Almeidea*. O estado 1 (quatro aberturas) e 2 (cinco aberturas) apareceram como estados homoplásticos, e o estado 3 (seis aberturas) apareceu como autapomorfia de *Ravenia spectabilis* (polimórfico). *Galipea jasminiflora* e *Conchocarpus macrophyllus* também apareceram como táxons polimórficos para este caracter.

6. Análise da morfologia polínica

Algumas espécies dos gêneros *Almeidea* e *Conchocarpus* não possuíam seu pólen descrito em literatura, assim foi realizada uma análise dos grãos de pólen destes táxons para que os caracteres de morfologia polínica fossem codificados.

Segue abaixo uma descrição simplificada das espécies analisadas:

1) *Almeidea albiflora* (Fig. 49 A, B)
Mônade, médio, de diâmetro de 47,70 µm ± 2,22 (44,27 - 52,39), simetria radial, isopolar, âmbito circular, pantocolporado, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro circular, Exina reticulada.

2) *Almeidea coerulea* (Fig. 49 C, D)
Mônade, médio, de diâmetro de 49,44 µm ± 2,33 (43,97 - 54,91), simetria radial, isopolar, âmbito circular, pantocolporado, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro circular, Exina reticulada.

3) *Almeidea lilacina* (Fig. 49 E, F)
Mônade, grande, de diâmetro de 57,97 µm ± 6,68 (49,86 - 79,8), simetria radial, isopolar, âmbito circular, pantocolporado, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro circular, Exina reticulada.

4) *Almeidea limae* (Fig. 50 A, B)

Mônade, grande, de diâmetro de 73,50 µm ± 6,28 (61,43 - 89,13), simetria radial, isopolar, âmbito circular, pantocolporado, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro circular, Exina reticulada.

5) *Almeidea rubra* (Fig. 50 C, D)

Mônade, grande, de diâmetro de 75,53 µm ± 18,26 (57,35 - 113,25), simetria radial, isopolar, âmbito circular, pantocolporado, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro circular, Exina reticulada.

6) *Conchocarpus macrophyllus* (Figs. 50 E - F, 51 A)

Mônade, médio, de diâmetro de 39,73 µm ± 3,43 (36,48 – 42,03), simetria radial, isopolar, âmbito circular, tetra ou pentacolporado, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro, Exina reticulada.

7) *Conchocarpus minutiflorus* (Fig. 51 B)

Mônade, médio, P = 34,96 µm ± 2,41 (29,68 -40,67), E = 19,04 µm ± 0,95 (17,56 – 21,23), simetria radial, isopolar, âmbito circular, prolato a perprolato P/E = 1,82 ± 0,13 (1,55 – 2,08), tricolporados, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro. Exina reticulada.

8) *Conchocarpus odoratissimus* (Fig. 51 C, D)

Mônade, médio, P = 40,64 µm ± 3,86 (37,75 – 50,14), E = 39,32 µm ± 4,16 (31,1 - 48,64), simetria radial, isopolar, âmbito quadrangular, oblato-esferoidal a subprolato P/E = 1,04 ± 0,07 (0,92 – 1,18), tetracolporados, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro circular. Exina reticulada.

9) *Conchocarpus pentandrus* (Fig. 52 E, F)

Mônade, médio, P = 28,53 µm ± 1,37 (26,23 - 31,07), E = 37,56 µm ± 2,38 (30,85 - 41,95), simetria radial, isopolar, âmbito subquadrangular, oblato a oblato-esferoidal P/E = 0,76 ± 0,05 (0,70 - 0,95), tetracolporados, ectoabertura do tipo colpo, endoabertura do tipo poro. Exina reticulada.

Dois outros táxons (*Conchocarpus heterophyllus* e *C. mastigophorus*) também tiveram seu pólen analisado, no entanto a observação das lâminas revelou a presença de dois tipos polínicos diferentes em uma mesma amostra. Este fato pode ter ocorrido devido à contaminação de material, assim estas espécies não puderam ser descritas.

Discussão

1. Alinhamentos das seqüências

Nos alinhamentos foi verificado que as regiões do cloroplasto (*trnL-trnF* e *rps-16*) possuem um grande número de caracteres constantes, sendo as variações (possíveis sinapomorfias) facilmente constatadas. Como mostrado na Tabela 4 a porcentagem de caracteres informativos não superou 13% (*rps-16* - análise por indivíduo) para estas regiões. Assim, apesar de conterem um grande número total de caracteres (837 – 1083 pares de base), o número de caracteres informativos foi relativamente baixo (65 – 121 pares de base). Este número é, entretanto, compatível com o número de caracteres informativos esperados para estas regiões em Rutaceae (*cf.* Poon *et al.* 2007, Salvo *et al.* 2008, Groppo *et al.* 2008).

Diferentemente das regiões do cloroplasto, as duas regiões nucleares (ITS-1 e ITS-2) possuem uma grande variação nos estados de caracter (bases), sendo que o alinhamento das mesmas mostrava um grande número de substituições. Assim, comparando estas com as regiões plastidiais, o número de caracteres informativos foi bem mais alto, chegando a 31,7 % (ITS-2 – análise por indivíduo). No entanto a alta taxa de substituições nestas regiões dificultou o alinhamento das mesmas, sendo que as hipóteses de homologia primária nestes alinhamentos se tornaram muitas vezes subjetivas.

2. Hipóteses filogenéticas

Segundo o item 4 dos Resultados, a árvore de consenso estrito baseada nos dados moleculares e morfológicos combinados (Fig. 45) possui uma topologia idêntica à árvore de consenso estrito baseada nas partições moleculares combinadas (Fig. 42) sob critério de MP. Esse fato deve-se provavelmente ao número de caracteres morfológicos (41), baixo quando comparado ao número de caracteres moleculares (2728). Assim, era esperado que os caracteres morfológicos fossem “mascarados” pelos moleculares, tendo efeito apenas na alteração do suporte dos ramos.

No presente estudo foram obtidas diversas árvores, algumas mostrando relações distintas entre seus táxons e com suporte de ramos também distintos. Como todas

representam apenas hipóteses filogenéticas e não é possível saber qual dessas hipóteses evidencia a verdadeira história evolutiva desses táxons, foi escolhida uma árvore cuja topologia parecia "resumir" as relações encontradas nas diferentes árvores obtidas.

Assim, a árvore da análise combinada das quatro regiões moleculares, sob o critério bayesiano (Fig. 44) foi escolhida como mais adequada. Além de reunir os dados das quatro partições moleculares, sua topologia parece exibir as relações mais constantes encontradas nas diferentes análises. Adicionalmente, ela mostrou uma resolução relativamente alta entre as espécies (comparada às demais árvores), e ao mesmo tempo colocou aqueles táxons que tiveram sua posição muito "flutuante" (e.g. *Ravenia spectabilis*) em uma politomia, corrigindo agrupamentos que poderiam ser considerados "espúrios" em algumas árvores. Outra vantagem é que o suporte dos ramos (probabilidades posteriores) é indicado em todos os clados na análise bayesiana, não dependendo de que a topologia da árvore (análise de MP ou ML) fosse congruente com a árvore de *bootstrap*.

Portanto as discussões a seguir serão baseadas nas árvores resultantes de todas as análises, porém com a árvore da Fig. 44 como "guia" dessa discussão.

2.1 Monofiletismo de *Almeidea* e relações entre suas espécies

Almeidea pode ser considerado um gênero monofilético, como representado na Fig. 44, com suporte de 100% de PP. Uma possível sinapomorfia morfológica é a presença de pólen pantocolporado, estado exclusivo do gênero, como é mostrado na Fig. 48. Outra característica comum a todas as espécies de *Almeidea*, mas que não é exclusiva do gênero é a presença de "nectários" no ápice dos lacínios do cálice. Estas estruturas também foram visualizadas em espécies de *Conchocarpus* (*C. heterophyllus*, *C. minutiflorus* e *C. pentandrus*), sendo um caracter homoplástico para o grupo (ver Fig. 46 A).

Em relação às espécies de *Almeidea*, *A. rubra* parece apresentar uma variação genética considerável entre suas populações em relação às regiões analisadas, pois constantemente alguns indivíduos de *A. rubra* se apresentavam mais próximos filogeneticamente de outros indivíduos identificados como outras espécies do gênero do que com outros indivíduos de *A. rubra*. Como pode ser observado na Fig. 44, os indivíduos de *A. rubra* dos estados de Minas Gerais e do Espírito Santo aparecem juntos formando um

clado, no entanto a amostra de *A. rubra* proveniente da Bolívia assume uma posição mais basal na filogenia do gênero, deixando esta espécie, a princípio, não-monofilética. Há três explicações possíveis para este resultado: a primeira é a falta de sinal filogenético no caso das análises das regiões do cloroplasto para o nível de espécie, pois estas regiões apresentaram seqüências bastante conservadas; a segunda é a perda de sinal filogenético no caso das análises das regiões nucleares, já que a variação nas seqüências destas regiões foi grande o bastante para resultar em incongruências nas análises para níveis acima de gênero; e a terceira seria explicada pela presença de diferentes haplótipos, que são determinados pela existência de sítios polimórficos (Arias & Infante-Malachias 2001), nesses indivíduos de diferentes populações de *A. rubra*. Com isso, o seqüenciamento desses haplótipos teria resultado em seqüências diferentes o bastante para separar estes indivíduos na análise filogenética. Portanto uma análise de haplótipos poderia ajudar a esclarecer essa questão envolvendo os indivíduos desta espécie.

Entre as espécies do gênero, *Almeidea limae* parece ser a espécie mais próxima de *A. rubra*, pois além de sua posição como grupo-irmão do clado formado por dois indivíduos de *A. rubra*, morfologicamente são as espécies que mais se assemelham, compartihando semelhanças vegetativas (formato e tamanho relativo das folhas) e reprodutivas (inflorescências menos desenvolvidas). A diferença mais notável entre estas espécies é a presença de um espessamento dorsal na forma de quilha nas pétalas de *A. limae*, que representa uma autapomorfia desta espécie (Ver Tabela 2, caracter 13).

Almeidea lilacina posiciona-se como grupo-irmão do clado formado por *A. rubra* (MG e ES) e *A. limae*. Morfologicamente estas três espécies são muito parecidas, compartilhando semelhanças vegetativas e reprodutivas, sendo que as características que diferenciam *A. lilacina* de *A. limae* e *A. rubra* é o maior desenvolvimento da inflorescência em *A. lilacina*, com as raques principal e secundárias atingindo comprimentos maiores, e também um menor tamanho dos verticilos florais (principalmente pétalas e gineceu). Com isso, a identificação destas espécies fica dificultada quando o material se apresenta estéril ou apenas com frutos.

Almeidea coerulea assume uma posição basal no clado, sendo a primeira espécie a divergir na evolução do gênero, seguida por *A. albiflora*. Ambas possuem características morfológicas que as distinguem facilmente e das demais espécies. *A. coerulea* possui

características como folhas maiores, com base obtusa, inflorescência com raque principal bem desenvolvida e raques secundárias pouco desenvolvidas, flores com verticilos florais com tamanho menor (principalmente as pétalas e o gineceu). *Almeidea albiflora* também possui características exclusivas dentro do gênero, como inflorescência bem desenvolvida com raques secundárias apicais atingindo 5,0 cm (nas demais espécies elas atingem ca. 0,5 cm), corola alva e ovário seríceo. Outra constatação feita para estas espécies é que nas análises de ML e bayesiana os comprimentos dos ramos de ambas são maiores quando comparados às demais espécies de *Almeidea*, indicando uma maior taxa de evolução (o comprimento do ramo é equivalente ao número de subtituições por sítio no alinhamento).

Se forem levantadas questões sobre a distribuição geográfica das espécies de *Almeidea*, as relações filogenéticas discutidas acima são um pouco diferentes das esperadas, já que *A. rubra* possui uma distribuição geográfica ampla, ocorrendo simpatricamente com outras espécies (*A. coerulea*, *A. albiflora* e *A. lilacina*). Assim esperava-se que *A. rubra* ocupasse uma posição basal na filogenia do gênero, como uma linhagem que deu origem às demais espécies (que possuem distribuição geográfica mais restrita). Uma hipótese seria que uma linhagem ancestral teria divergido formando duas espécies: *A. rubra* e *A. coerulea*.

Posteriormente teria ocorrido a dispersão da espécie *Almeidea rubra* para demais localidades geográficas, inclusive na Bolívia, e em alguns destes locais teria ocorrido processos de especiação ocasionando o surgimento de novas espécies (no caso, *A. albiflora*, *A. lilacina* e *A. limae*), com a ocorrência simpátrica de *A. rubra* com *A. albiflora* e *A. lilacina* em alguns locais. Além disso, a espécie *A. lilacina* também possui distribuição geográfica ampla, porém esta espécie não ocorre em simpatria com outras espécies do gênero (com exceção de *A. rubra*), assim é provável que sua distribuição geográfica ampla seja explicada por processos de dispersão (ver Avise 2000). Um estudo biogeográfico futuro envolvendo estas espécies teria grande importância para resolução destas questões.

2.1.1 Implicações nomenclaturais

De acordo com as relações discutidas no item anterior e mostradas na Fig. 44, as espécies *Almeidea limae*, *A. lilacina* e *A. rubra* são muito próximas de acordo com dados moleculares, além de compartilharem diversas semelhanças morfológicas. Uma solução taxonômica seria chamar estas três espécies de *A. rubra* (nome mais antigo entre as três),

fazendo as respectivas sinonimizações. Só desta forma a espécie *A. rubra* ficaria monofilética de acordo com os dados analisados. Além da sinonimização, poderiam ser criadas três subespécies diferentes: *A. rubra* subsp. *rubra*, *A. rubra* subsp. *limae* e *A. rubra* subsp. *lilacina*, cada uma com respectivas autapomorfias morfológicas. Esta solução, entretanto, não resolveria o não-monofiletismo de *Almeidea rubra* subsp. *rubra*.

Outra espécie que durante o desenvolvimento deste trabalho foi reconhecida como sinônimo de *Almeidea* rubra é *A. affinis*. O motivo desta sinonimização é explicado principalmente pelas contradições encontradas entre a descrição original da espécie e as características observadas na foto do material tipo.

Com isso o gênero *Almeidea* ficaria com três espécies reconhecidas e sustentadas por dados moleculares: *A. albiflora*, *A. coerulea* e *A. rubra*.

2.2 Monofiletismo de *Conchocarpus* e relações entre suas espécies

Em todas as análises, com exceção da região ITS-2, o gênero *Conchocarpus* aparece como não-monofilético. A maioria das espécies se posiciona em um clado com as espécies de *Almeidea*, tendo a espécie tipo de *Conchocarpus* (*C. macrophyllus*) na base deste clado. No entanto, mesmo que o gênero *Almeidea* fosse incluído em *Conchocarpus*, este ainda não seria monofilético, já que *C. concinnus* se posiciona fora deste clado, sendo mais aparentado com outros gêneros de Galipeinae.

Uma análise prévia da subtribo como um todo (que está sendo investigada por um estudo maior) mostrou que outras espécies de *Conchocarpus* se posicionam junto com *C. concinnus*, mostrando que este grupo de *Conchocarpus* deve ser melhor investigado e recircunscrito.

Em relação às demais espécies de *Conchocarpus* investigadas neste estudo, *C. odoratissimus* e *C. pentandrus* estão intimamente relacionados, aparecendo juntos na maioria das análises, apesar de morfologicamente serem espécies bem distintas. Estas espécies formam um clado na Fig. 44, que possui *C. mastigophorus* como grupo-irmão. O posicionamento de *C. minutiflorus* e *C. heterophyllus* foi mais variável nas diferentes análises, sendo que em algumas apareciam formando um clado. Na Fig. 44 estas espécies assumem uma posição mais basal no clado de *Conchocarpus*, indicando uma provável

divergência precoce na evolução deste grupo. Morfologicamente essas espécies são bem distintas, e nenhum dos caracteres morfológicos analisados permite corroborar as relações resultantes da análise molecular entre estas espécies.

A espécie *C. macrophylus* (tipo do gênero) aparece na base do clado *Almeidea* + *Conchocarpus*, podendo ser considerada a linhagem que deu origem às demais espécies deste clado. Além disso, *C. macrophyllus* e *C. pentandrus* exibem um maior comprimento de ramo quando comparados com as demais espécies do gênero, indicando uma maior quantidade de substituições em seu DNA.

2.3 Monofiletismo de Galipeinae e relações entre seus gêneros

A subtribo Galipeinae aparece como monofilética na maioria das análises, sendo este monofiletismo corroborado por algumas sinapomorfias morfológicas, como a presença de pétalas coerentes (Fig. 46 B), presença de aderência entre filetes e pétalas (Fig. 47 A), embrião curvo e cotilédones conduplicados (Fig. 47 B), entre outras características comuns aos táxons da subtribo, mas que não foram mapeadas como as citadas acima.

Em relação a seus gêneros, *Almeidea* e *Conchocarpus* são muito próximas filogeneticamente, como já discutido acima. Outros gêneros que parecem estar relacionados são *Andreadoxa* e *Neoraputia*, cujas espécies *A. flava* e *N. alba* formam um clado em grande parte das análises, assim como os gêneros *Galipea* e *Rauia*, cujas espécies *G. jasminiflora* e *R. nodosa* também aparecem relacionadas na maioria das análises. Estes clados não possuem sinapomorfias morfológicas que sustentem suas relações, no entanto os dados moleculares indicam alto grau de parentesco entre elas.

Os táxons *Erythrochiton brasiliensis* e *Conchocarpus concinnus* aparecem constantemente relacionado ao clado formado por *Andreadoxa flava* e *Neoraputia alba*. Estas quatro espécies formam um clado irmão do formado por *Galipea jasminiflora* e *Rauia nodosa*, indicando parentesco íntimo entre estes táxons analisados. Na tentativa de mapear possíveis sinapomorfias morfológicas foi constatado que dentro da subtribo a variação morfológica é bastante homoplástica, com os estados de caracter surgindo várias vezes na evolução do grupo. Uma possível sinapomorfia para o clado que inclui estas seis espécies seria a presença de apêndices basais nas anteras (ver Tabela 2, caracter 22), no entanto

teria ocorrido uma reversão nos táxons *C. concinnus* e *R. nodosa*, já que ambos não apresentam esta estrutura.

O posicionamento de *Ravenia spectabilis*, em uma politomia com o clado *Almeidea* + *Conchocarpus* (exceção de *C. concinnus*) e com o clado formado pelos demais gêneros de Galipeinae + *C. concinnus* é um posicionamento adequado para o táxon, já que suas relações com as demais espécies foi bastante variável. Dessa forma sua posição dentro da subtribo fica não resolvida.

O posicionamento variável de *Ravenia spectabilis* pode ser explicado pelo elevado comprimento de ramo deste táxon (o maior dentre todas as espécies analisadas) que provavelmente é resultado de um processo anagenético mais ativo nesta linhagem. Assim, o comprimento desse ramo pode estar influenciando diretamente a estabilidade de *R. spectabilis* nas árvores analisadas, e também no suporte dos ramos vizinhos. A alta taxa de evolução deste táxon foi também evidenciada nos alinhamentos, nos quais foi observada uma grande quantidade de substituições de bases.

Estes táxons com comprimentos de ramos maiores têm levado a inferências precipitadas sobre as relações filogenéticas devido ao fenômeno conhecido como "long branch attraction", pois em métodos menos sensíveis a este fenômeno como a máxima parcimônia há uma tendência de agrupar táxons que possuem altas taxas de evolução (comprimentos maiores de ramos). Já os métodos como máxima verossimilhança e análise bayesiana possuem uma sensibilidade maior para estes casos, não agrupando táxons com comprimento de ramos longos de forma precipitada (Bergsten 2005).

Uma das possíveis soluções para estes casos de táxons com comprimento de ramo elevado é retirar o táxon da análise (Bergsten 2005). No estudo de Dias (2007) aconteceu algo semelhante com a espécie *Esenbeckia grandiflora*, que possuía na análise um comprimento de ramo que ultrapassava em mais de cinco vezes a média. Quando o táxon foi retirado da análise, o suporte (probabilidades posteriores) dos ramos vizinhos aumentou em cerca de 5 – 30%.

2.4 Posicionamento de Hortia oreadica

A espécie *Hortia oreadica*, pertencente a subfamília Toddalioideae (tribo Toddalieae, subtribo Toddaliinae), classificação esta proposta por Engler (1931), deveria ser (segundo esta classificação) a mais distante filogeneticamente das Galipeinae considerando os demais táxons analisados (todos pertencentes a subfamília Rutoideae). No entanto a classificação proposta por Engler (baseada apenas em dados morfológicos) está sendo revista em muitos trabalhos atuais (Chase *et al.* 1999, Scott *et al.* 2000, Groppo *et al.* 2008) e novas classificações têm sido propostas.

Neste estudo *Hortia oreadica* se posiciona como grupo-irmão do clado composto pelos gêneros de Galipeinae, e apesar de em algumas análises assumir posições diferentes desta, a maior parte das análises revelou seu parentesco mais próximo a Galipeinae. Este posicionamento de *Hortia* deixa a subfamília Rutoideae (sensu Engler) não-monofilética. No estudo de Groppo *et al.* (2008), com dados moleculares, ficou evidente o não monofiletismo tanto de Rutoideae quanto de Toddalioideae segundo a classificação de Engler (1931).

2.5 Monofiletismo de Pilocarpinae e relações entre seus gêneros

Em algumas análises a subtribo Pilocarpinae aparece como grupo não-monofilético, no entanto estas análises (regiões ITS-1 e ITS-2) exibem uma variação muito grande entre seus caracteres, não podendo ser recomendadas para inferir relações filogenéticas de níveis hierárquicos acima de gênero. Nas demais análises a subtribo emerge como monofilética, porém ressalta-se que apenas quatro táxons foram incluídos, um número muito reduzido para afirmar o monofiletismo da subtribo. Um estudo bem mais abrangente desta subtribo feito por Dias (2007), teve como resultado o não-monofiletismo de Pilocarpinae, pois gêneros como *Esenbeckia*, *Metrodorea* e *Raulinoa* (não incluído no presente trabalho) se posicionaram mais próximos de gêneros pertencentes a outra subtribo (Pteleinae) do que de *Pilocarpus* (gênero-tipo de Pilocarpinae). Assim, o monofiletismo da subtribo constatado neste trabalho deve-se ao baixo número de táxons analisados de Pilocarpinae e grupos próximos.

Em relação às espécies de Pilocarpinae, foi constatado que o gênero *Esenbeckia* é não-monofilético, pois em todas as análises que incluíram o táxon *Metrodorea nigra*, a

espécie *E. grandiflora* apareceu formando um clado com *M. nigra*, enquanto *E. febrifuga* aparecia como grupo-irmão deste clado. No estudo de Dias (2007), o monofiletismo de *Esenbeckia* também é questionado, apesar de a espécie *E. febrifuga* não ter sido incluída no estudo citado (porém, outras oito espécies deste gênero foram analisadas).

A espécie *Pilocarpus spicatus* se posicionou constantemente na base do clado formado pelas Pilocarpinae, mostrando que *Pilocarpus* é um gênero que provavelmente divergiu mais cedo na história evolutiva da subtribo. No trabalho de Dias (2007), o gênero *Pilocarpus* também assumiu uma posição mais distante dos demais gêneros da subtribo (*Esenbeckia*, *Metrodorea* e *Raulinoa*).

Conclusões

Este estudo filogenético de *Almeidea*, que incluiu diversas viagens a campo e visitas a vários herbários, possibilitou delimitar melhor as espécies do gênero estabelecendo as relações entre suas espécies e com gêneros próximos. Durante o estudo foi descoberta uma espécie nova para a ciência, com o artigo referente submetido à publicação; além disso foi verificada um sinonimização de *A. affinis* em *A. rubra*, e também verificado o nome correto de *A. affinis* (ao invés de *A. longifolia*).

A distribuição geográfica das espécies de *Almeidea* também foi atualizada, estendendo a distribuição de *A. rubra* para limites extra-brasileiros (Bolívia). Além disso, também foi realizada uma caracterização morfológica das espécies incluídas no estudo, como dados inéditos para a morfologia polínica de algumas espécies de *Almeidea* e *Conchocarpus*, que ainda não tinham sido descritas.

As análises filogenéticas mostraram que as espécies de *Almeidea* formam um grupo monofilético incluído em um grupo maior formado por espécies do gênero *Conchocarpus*. A inclusão das espécies de *Almeidea* em *Conchocarpus* e a exclusão das espécies do grupo de *Conchocarpus concinnus* poderia resolver o problema do não-monofiletismo de *Conchocarpus*. Entretanto, enquanto o estudo integrador da subtribo Galipeinae não é concluído, é preferível manter *Almeidea* como gênero, com o número de aberturas do pólen (pantocolporado) como sinapomorfia morfológica mais evidente.

Em relação às regiões do DNA utilizadas para as inferências filogenéticas, concluiu-se que as regiões do cloroplasto (*trnL-trnF* e *rps-16*) são informativas para níveis genéricos, porém não resolvem relações entre espécies, já que constituem regiões bastante conservadas. Em contrapartida as regiões nucleares (ITS-1 e ITS-2) são mais informativas para serem utilizadas para nível de espécie, porém para níveis acima de espécie ocorreu uma perda de sinal filogenético devido à variação nucleotídica presente nestas regiões. As análises combinadas dessas regiões demonstraram boa resolução para níveis de espécie e de gênero, além de combinar as congruências entre as análises individuais. Assim, combinar os dados de DNA nuclear e de cloroplasto foi bastante informativo para o grupo analisado.

Os dados morfológicos foram importantes para sustentar o monofiletismo de *Almeidea*, no entanto não foram informativos para estabelecer as relações entre as espécies do gênero.

O posicionamento de *Hortia oreadica* como grupo-irmão de Galipeinae é mais uma indicação de que a classificação tradicional das subfamílias de Rutaceae (sensu Engler 1931) deve ser abandonada, como já foi sugerido por diversos estudos atuais. Além disso, o gênero *Esenbeckia* deve ser analisado mais profundamente já que se mostrou não-monofilético com apenas duas espécies analisadas. Outros estudos já haviam revelado seu problema de circunscrição.

De forma geral este estudo serviu como ponto de partida para estudos maiores envolvendo a subtribo Galipeinae como um todo e para estudos mais aprofundados do gênero *Almeidea*. As relações constatadas entre as espécies deste gênero serão essenciais para a revisão do gênero (que está em andamento). Além disso, a grande variação genética entre os indivíduos de *A. rubra* constatou que há a necessidade de estudos envolvendo genealogias de haplótipos para esclarecer as relações entre as diferentes populações desta espécie. Estudos biogeográficos também ajudariam a esclarecer as questões sobre os processos de especiação e ocupação do espaço geográfico pelas espécies de *Almeidea*.

Referências Bibliográficas

Amorim, D.S. 2002. *Fundamentos de sistemática filogenética*. Holos Editora, Ribeirão Preto.

Andersson, L. & Rova, J.H.E. 1999. The *rps-16* intron and the phylogeny of the Rubioideae. *Plant Systematics and Evolution* 214: 161-186.

APG [Angiosperm Phylogeny Group] 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.

Arias, M.C. & Infante-Malachias, M.E. 2001. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA. *In* S.R. Matioli (ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 143-152.

Asmussen, C.B. & Chase, M.W. 2001. Coding and noncoding plastid DNA in palm systematics. *American Journal of Botany* 88: 1103-1117.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Baker, W.J., Asmussen, C.B., Barrow, S., Dransfield, J. & Hedderson, T.A. 2000. A phylogenetic study of the palm family (Palmae) based on chloroplast DNA sequences from the *trnL-trnF* region. *Plant Systematics and Evolution* 219: 111-126.

Barth, M.O. 1982. Variações polínicas em espécies brasileiras da família Rutaceae. *Boletim do Instituto de Geociências (USP)* 13: 129-134.

Bentham, G. & Hooker, J.D. 1862. *Genera Plantarum*. Vol. 1. L. Reeve & Co., London.

Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193.

Chase, M.W. & Hills, H.G. 1991. Silica Gel: an ideal material for field preservation of samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.

Chase, M.W., Morton, M.M. & Kallunki, J.A. 1999. Phylogenetic relationships of Rutaceae: a cladistic analisys of the subfamilies using evidence from *rbcL* and *atpB* sequence variations. *American Journal of Botany* 86: 1191-1199.

Dias, P. 2007. *Filogenética de Pilocarpinae (Rutaceae)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.

Edwards, A.W.F. & Cavalli-Sforza, L.L. 1964. Reconstruction of evolutionary trees. *In* Heywood, V. & McNeill, J. (eds.) *Phenetic and phylogenetic classification*. Systematic Association Publ. n. 6, London, p. 67-76.

Emmerich, M. 1978. Contribuição ao conhecimento da tribo Cusparinae (Rutaceae): nova conceituação de *Raputia* e gêneros derivados. *Rodriguésia* 30, 45: 223-307

Engler, H.G.A. 1874. Rutaceae. *In* C.F.P. Martius & A.G. Eichler (eds.). *Flora Brasiliensis*. Monachii, Typographia Regia, v. 12, pt. 2, p. 75-196, tabs. 14-39.

Engler, H.G.A. 1896. Rutaceae. *In* H.G.A. Engler & K. Prantl (eds.) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann., T.3, Ab. 5, ed. 1, p. 95-201, 357.

Engler, H.G.A. 1931. Rutaceae. *In* H.G.A. Engler & K. Prantl (eds.) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann., v. 19a, ed. 2, p. 187-359.

Erdtman, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54: 561-564.

Farris, J.S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. *In* N. Platnick & V. Funk (eds.) *Advances in cladistics*. Vol. 2, Columbia University Press, New York, p. 7-36.

Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bulk, C. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.

Gielly, L. & Taberlet, P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: nonconding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11: 769-777.

Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. 2003. *T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology.* Programa e documentação, disponibilizados pelos autores e disponíveis na página www.zmuc.dk/public/phylogeny.

Groppo, M. 2004. *Filogenia de Rutaceae e revisão de Hortia Vand*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Groppo, M., Pirani, J.R., Salatino, M.L.F., Blanco, R. & Kallumki, J.A. 2008. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany* 95(8): 985-1005.

Groppo, M. 2010. *Rutaceae.* Neotropikey, Royal Botanical Gardens, Kew, England. http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Rutaceae.html (no prelo)

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hall, B.G. 2008. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Hennig, W. 1966. *Phylogenetic Systematics.* University of Illinois Press, Urbana.

Holmgren, P.K., Holmgren, N.H. & Barnett, L.C. 1990. *Index Herbariorum: The Herbaria of the World.* New York Botanical Garden, New York.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J.P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.

Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc, New York.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2008. *Plant systematics: a phylogenetic approach.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Kaastra, R.C. 1982. Pilocarpinae (Rutaceae). *Flora Neotropica Monograph* n. 33. The New York Botanical Garden, New York.

Kallunki, J.A. 1992. A revision of *Erythrochitons sensu lato* (Cuspariinae, Rutaceae). *Brittonia* 44(2): 107-139.

Kallunki, J.A. 1998. *Andreadoxa flava* (Rutaceae, Cuspariinae), a new genus and species from Bahia, Brazil. *Brittonia* 50(1): 59-62.

Kallunki, J.A. & Pirani, J.R. 1998. Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* J.C. Mikan. *Kew Bulletin* 53: 257-334.

Kallunki, J.A. 2004. Rutaceae. *In* N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W. Stevenson & S.V. Heald (eds.) *Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton University Press, Princeton and Oxford, p. 333-335.

Kallunki, J.A. & Groppo, M. 2007. Phylogenetic analyses of the subtribe Galipeinae (Rutaceae). Pp. 180-181, *in Plant Biology and Botany* 2007. Program and Abstract Book, Chicago.

Kallunki, J.A. 2009. Validation of *Neoraputia* (Galipeae, Rutaceae) and description of two new species from Eastern Brazil. *Brittonia* 61(1): 28-34.

Kelchner, S.A. & Wendel, C.L.G. 1996. Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA*. Current Genetics* 30: 259-262.

Kitching, I., Forey, P.L., Humphries, C.J. & Williams, D.M. 1998. *Cladistics: the theory and practice of parsimony analysis*. The Systematic Association, Oxford.

Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. Claredon Press, Oxford.

Morton, C.M. & Kallunki, J. A. 1993. Pollen morphology of the subtribe Cuspariinae (Rutaceae). *Brittonia* 45(4): 286-314.

Morton, C.M., Grant, M. & Blackmore, S. 2003. Phylogenetic relantioships of the Aurantioideae inferred from chloroplast DNA sequence data. *American Journal of Botany* 90: 1463-1469.

Oxelman, B., Liden, M. & Berglund, D. 1997. Chloroplast *rps-16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206: 393-410.

Pirani, J.R. 1999. *Estudos taxonômicos em Rutaceae: Revisão de Helietta e Balfourodendron (Pteleinae), Análise cladística de Pteleinae, Sinopse de Rutaceae do Brasil.* Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pirani, J.R. 2002. Rutaceae. *In* M.G.L. Wandereley, G.J. Shepard & A.M. Giulietti (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo,* v. 2. Editora Hucitec, São Paulo.

Pirani, J.R., Groppo, M. & Kallunki, J.A. submetido. Two new species and a new combination in Conchocarpus J.C. Mikan (Rutaceae, Galipeae) from eastern Brazil. *Kew Bulletin*.

Poon, W.S., Shaw, P.C., Simmons, M.P. & But, P.P.H. 2007. Congruence of molecular, morphological and biochemical profiles in Rutaceae: A cladistic analysis of the subfamilies Rutoideae and Toddalioideae. *Systematic Botany* 32: 837-846.

Porter, D.M. & Elias, T.S. 1979. Flora of Panama: Rutaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 66: 123-164.

Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253-1256.

Saint-Hilaire, A.F.C.P. 1823. Des principales espèces nouvelles de la Flore du Brésil citées dans le premier mémoire sur te Gynobase. *Mémoires du Museum d'Histoire Naturelle* 10: 356-377.

Salgado-Labouriau, M.L. 1973. *Contribuição à Palinologia dos cerrados*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

Salvo, G., Bacchetta, G., Ghahremaninejad, F. & Conti, E. 2008. Phylogenetic relationships of Ruteae (Rutaceae): New evidence from the cloroplast genome and comparisons with non-molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 736-748.

Samuel, R., Ehrendorfer, F., Chase, M.W. & Greger, H. 2001. Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biology* 3: 77-87.

Scotland, R.E. & Pennington, R.T. 2000. Homology and systematics: coding characters for phylogenetic analysis. *The Systematics Association Special Volume*, series 58. Taylor & Francis, London and New York.

Scott, K.D., McIntyre, C.L. & Playford, J. 2000. Molecular analyses suggest a need for a significant rearrangment of Rutaceae subfamilies and a minor reassessment of species relationships within *Flindersia*. *Plant Systematics and Evolution* 223: 15-27.

Silva, I.M. 1988. *Revisão Taxonômica do gênero Almeidea Saint-Hilaire (Rutaceae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Skorupa, L.A. 1996. *Revisão taxonômica de Pilocarpus Vahl (Rutaceae)*. Tese de doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.* Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo.

Stevens, P.F. 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. Versão 9, junho 2008. Disponível em: http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/

Swofford, D.L. 2000. PAUP*: *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*, version 4.0b10. Sinauer Associates. Sunderland, Massachussets.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplifications of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.

Wallander, E. & Albert, V. A. 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps-16* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 87: 1827-1841.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky & T. White (eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, p. 315-322.

Zander, R.H. 2004. Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and bayesian posterior probability. *Phyloinformatics* 2: 1–13.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Viagens de campo realizadas para coleta dos táxons em estudo

Data viagem	**Principais locais de coleta** localidade - município (estado)	**Material coletado**
20-26 janeiro 2008	Jardim Botânico do Rio de Janeiro e Parque Nacional da Tijuca - Rio de Janeiro (RJ); Estação Ecológica Estadual do Paraíso - Guapimirim (RJ)	*Almeidea limae;* *Conchocarpus macrophyllus;* *Esenbeckia grandiflora;* *Metrodorea nigra;* *Pilocarpus spicatus;* *Ravenia spectabilis;* outros gêneros de Rutaceae
29 março - 13 abril 2008	Serra do Teimoso - Jussari (BA); Santa Cruz da Vitória (BA); Mata da Esperança - Ilhéus (BA); Parque Estadual da Serra do Condurú - Uruçuca (BA); Estrada Serra-Grande para Itacaré - Uruçuca (BA); Estrada Ilhéus para Itacaré - Itacaré (BA); Estrada Olivença para Maruim - Ilhéus (BA); Várzea Alegre - Santa Teresa (ES); Rio Carangola - Carangola (MG); Fazenda Santa Rita - Faria Lemos (MG)	*Andreadoxa flava;* *Almeidea coerulea;* *Almeidea rubra;* *Conchocarpus concinnus;* *Conchocarpus macrophyllus;* *Conchocarpus minutiflorus;* *Erythrochiton brasiliensis;* *Esenbeckia grandiflora;* *Neoraputia alba;* *Rauia nodosa;* *Zanthoxylum rhoifolium;* outros gêneros de Rutaceae
27 agosto 2008	Estação Ecológica de Ribeirão Preto (Mata de Santa Teresa) - Ribeirão Preto (SP)	*Galipea jasminiflora;* *Metrodorea nigra*
9 dezembro 2008	Mata Ribeirão Cachoeira - Campinas (SP)	*Almeidea lilacina*
17 - 31 janeiro 2009	Barra do Choça - Vitória da Conquista (BA); Estrada Olivença para Maruim - Ilhéus (BA); Estrada Serra Grande para Itacaré - Uruçuca (BA); Estrada Maraú para Saquaíra - Ilhéus (BA); Estrada Saquaíra para Campinhos - Maraú (BA); Estrada BR101 para lage do Banco - Aurelino Leal (BA); Estrada Itabela para Guaratinga - Guaratinga (BA); APA do Elefante - Nova Venécia (ES); Estrada Rio Bananal para Novo Brasil - Rio Bananal (ES); Estrada Linhares para Rio Bananal - Rio Bananal (ES); Morro Grande - Cachoeiro do Itapemirim (ES); Fazenda Ubá - Vassouras (RJ)	*Almedeia albiflora;* *Almeidea coerulea;* *Almeidea rubra;* *Conchocarpus macrophyllus;* *Esenbeckia grandiflora;* *Zanthoxylum rhoifolium;* outros gêneros de Rutaceae
14 - 16 fevereiro 2009	Mata Ribeirão Cachoeira - Campinas (SP)	*Almeidea lilacina*

Tabela 2. Matriz de dados morfológicos

"?" desconhecido "*" polimórfico "x" não aplicável

A. lilacina	0 3 0 0 2	0 1 1 x 0	0 3 0 0 0	0 * * 0 2	0 0 x 0 0	0 0 0 0 0	0 1 0 ? ?	? ? ? 4 0	0
A. coerulea	0 3 0 0 2	0 1 1 x 0	0 3 0 0 0	0 * * 0 2	0 0 x 0 0	* 0 0 0 0	0 * 0 1 1	1 1 1 4 0	0
A. limae	0 3 0 1 2	0 1 0 0 0	0 3 1 0 0	0 * * 0 2	0 0 x 0 0	0 0 0 0 0	0 1 0 1 1	1 1 1 4 0	0
A. rubra	0 3 0 * 2	0 1 1 x 0	0 3 0 0 0	0 * * 0 2	0 0 x 0 0	0 0 0 0 0	0 1 0 1 1	1 1 1 4 0	0
A. rubra (Bolivia)	0 3 0 0 ?	0 1 1 x 0	0 3 0 0 0	0 0 0 0 2	0 0 x 0 0	0 0 0 0 0	0 1 0 1 1	1 1 1 4 0	0
A. albiflora	0 3 0 0 ?	0 1 1 x 0	0 0 0 0 0	0 2 2 0 2	0 0 x 0 0	1 0 0 0 0	0 1 2 ? ?	? ? ? 4 0	0
C. concinnus	0 3 0 0 0	1 0 0 1 0	1 * 0 0 1	0 1 3 1 0	1 0 x 0 2	0 1 1 0 0	0 0 0 0 0	0 0 1 0 3	0
C. heterophyllus	0 1 0 0 0	0 1 1 x 0	1 0 0 0 1	0 2 2 2 2	0 0 x 0 0	1 1 1 0 0	0 0 0 1 1	1 1 1 ? ?	?
C. macrophyllus	0 3 0 0 0	0 0 1 x 0	1 0 0 0 1	0 1 3 1 1	1 0 x 0 2	0 1 1 0 0	0 0 0 1 1	1 1 1 * 0	0
C. mastigophorus	0 1 0 1 0	0 0 0 0 0	1 * 0 0 1	0 1 3 1 1	0 0 x 0 0	1 0 1 0 0	0 0 0 1 1	1 1 1 ? ?	?
C. minutiflorus	0 3 0 1 0	0 1 0 0 0	1 * 0 0 1	0 * * 1 0	0 0 x 0 0	1 1 1 0 0	? ? ? ? ?	? ? ? 0 *	0
C. odoratissimus	0 3 0 1 0	0 0 0 0 0	1 0 0 1 1	0 * * 1 1	0 0 x 0 1	1 0 1 0 0	0 0 0 1 1	1 1 1 1 *	0
C. pentandrus	0 3 0 1 0	0 1 1 x 0	1 * 0 0 1	0 * * 1 1	0 0 x 0 0	1 0 1 0 0	0 0 0 1 1	1 1 1 1 *	0
A. flava	0 3 0 0 ?	0 0 0 0 0	0 1 0 0 *	0 1 5 1 2	1 1 1 0 0	0 1 0 0 0	0 1 2 1 1	1 1 1 0 0	4
E. brasiliensis	0 3 1 * 1	0 0 1 x 0	2 0 0 1 2	1 * * 1 2	0 1 0 0 1	0 1 0 0 0	1 0 0 1 1	1 1 0 0 0	5
G. jasminiflora	0 1 0 0 ?	0 0 0 1 0	2 0 0 1 2	0 1 * 1 2	0 1 1 0 0	0 1 4 0 1	1 0 0 1 1	1 1 1 * 0	0
N. alba	0 3 3 0 ?	0 0 0 0 0	1 0 0 0 *	0 1 3 1 1	0 1 0 0 0	1 1 0 0 1	1 0 0 1 1	1 1 1 0 0	0
R. nodosa	0 2 0 * ?	0 0 0 0 0	1 0 0 0 1	0 1 * 1 2	1 0 x 0 1	0 0 4 0 1	0 0 0 1 1	0 0 1 0 4	3
R. spectabilis	1 1 3 1 2	1 0 0 0 0	2 3 0 1 2	0 1 3 1 0	0 0 x 0 1	0 1 0 0 0	0 0 0 1 1	0 1 1 * 0	0
H. oreadica	0 3 0 0 0	0 0 0 0 1	0 * 0 0 0	1 0 0 0 2	0 0 x 1 0	0 0 5 0 1	1 0 0 0 0	0 1 0 0 4	3
E. grandiflora	0 3 2 0 0	1 0 0 0 0	0 * 0 0 0	0 0 0 0 0	1 0 x 0 1	0 1 0 0 1	0 0 1 0 0	0 0 1 0 4	0
E. febrifuga	1 2 2 0 0	1 0 0 0 0	0 0 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 x 0 1	0 1 3 0 1	0 0 1 0 0	0 0 1 0 4	0
M. nigra	1 2 0 0 1	0 0 1 x 1	0 * 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 x 0 1	* 0 3 0 1	0 0 1 0 0	0 0 1 0 ?	2
P. spicatus	* 3 1 1 1	1 0 0 0 1	0 2 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 x 0 0	* 1 0 0 0	0 0 1 0 0	0 0 1 0 4	0
Z. rhoifolium	0 0 0 0 ?	0 0 0 0 0	0 2 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 x 1 0	0 0 2 0 0	1 1 1 0 0	0 ? 0 0 *	1

Tabela 3. Informações sobre os "vouchers"

Gênero	Espécie	Coletor e número	Coleção	Local de Coleta
Almeidea	*A. albiflora*	M. Groppo 1851	SPFR	Brasil, ES, Cachoeiro de Itapemirim
	A. albiflora	M. Groppo 1852	SPFR	Brasil, ES, Cachoeiro de Itapemirim
	A. albiflora	M. Groppo 1853	SPFR	Brasil, ES, Cachoeiro de Itapemirim
	A. coerulea	C.P. Bruniera 88	SPFR	Brasil, BA, Uruçuca
	A. coerulea	C.P. Bruniera 92	SPFR	Brasil, BA, Itacaré
	A. coerulea	C.P. Bruniera 93	SPFR	Brasil, BA, Itacaré
	A. coerulea	C.P. Bruniera 94	SPFR	Brasil, BA, Itacaré
	A. lilacina	C.P. Bruniera 121	SPFR	Brasil, SP, Campinas
	A. lilacina	C.P. Bruniera 122	SPFR	Brasil, SP, Campinas
	A. limae	C.P. Bruniera 79	SPFR	Brasil, RJ, Guapimirim
	A. limae	C.P. Bruniera 80	SPFR	Brasil, RJ, Guapimirim
	A. rubra	C.P. Bruniera 105	SPFR	Brasil, ES, Santa Teresa
	A. rubra	C.P. Bruniera 108	SPFR	Brasil, ES, Santa Teresa
	A. rubra	C.P. Bruniera 109	SPFR	Brasil, MG, Carangola
	A. rubra	C.P. Bruniera 110	SPFR	Brasil, MG, Carangola
	A. rubra	C.P. Bruniera 111	SPFR	Brasil, MG, Carangola
	A. rubra	C.P. Bruniera 140	SPFR	Brasil, ES, Nova Venécia
	A. rubra	C.P. Bruniera 151	SPFR	Brasil, ES, Cachoeiro de Itapemirim
	A. rubra	M. Groppo 978	SPF	Brasil, ES, Santa Teresa
	A. rubra	L. Cayola 2094	MO	Bolívia, La Paz, Franz Tamayo
Andreadoxa	*A. flava*	M. Groppo 1562	SPFR	Brasil, BA, Itabuna (CEPEC)
	A. flava	J.R. Pirani 4973	SPF	Brasil, BA, Itabuna (CEPEC)
Conchocarpus	*C. concinnus*	M. Groppo 1610	SPFR	Brasil, BA, Ilhéus - Olivença
	C. concinnus	M. Groppo 1613	SPFR	Brasil, BA, Ilhéus - Olivença
	C. heterophyllus	M. Groppo 999	SPF	Brasil, ES, Linhares
	C. macrophyllus	M. Groppo 985	SPF	Brasil, ES, Santa Teresa
	C. macrophyllus	M. Groppo 1571	SPFR	Brasil, BA, Jussari
	C. macrophyllus	M. Groppo 1628	SPFR	Brasil, ES, Santa Teresa
	C. mastigophorus	M. Groppo 1589	SPFR	Brasil, BA, Uruçuca
	C. minutiflorus	M. Groppo 1617	SPFR	Brasil, ES, Santa Teresa
	C. minutiflorus	M. Groppo 1618	SPFR	Brasil, ES, Santa Teresa
	C. odoratissimus	M. Groppo 1540	SPFR	Brasil, RJ, Rio de Janeiro
	C. odoratissimus	M. Groppo 1542	SPFR	Brasil, RJ, Rio de Janeiro
	C. pentandrus	M. Groppo 1262	SPFR	Brasil, SP, Ribeirão Preto
	C. pentandrus	J.R. Pirani 4996	SPF	

Tabela 3. Informações sobre os "vouchers" (continuação)

Gênero	Espécie	Coletor e número	Coleção	Local de Coleta
Erythrochiton	*E. brasiliensis*	M. Groppo 975	SPF	Brasil, ES, Santa Teresa
	E. brasiliensis	M. Groppo 1569	SPFR	Brasil, BA, Jussari
	E. brasiliensis	M. Groppo 1570	SPFR	Brasil, BA, Jussari
Galipea	*G. jasminiflora*	C.P. Bruniera 116	SPFR	Brasil, SP, Ribeirão Preto
	G. jasminiflora	C.P. Bruniera 117	SPFR	Brasil, SP, Ribeirão Preto
	G. jasminiflora	C.P. Bruniera 118	SPFR	Brasil, SP, Ribeirão Preto
	G. jasminiflora	M. Groppo 1258	SPFR	Brasil, SP, Ribeirão Preto
Neoraputia	*N. alba*	M. Groppo 979	SPF	Brasil, ES, Santa Teresa
	N. alba	M. Groppo 1624	SPFR	Brasil, ES, Santa Teresa
Rauia	*R. nodosa*	M. Groppo 1565	SPFR	Brasil, BA, Jussari
	R. nodosa	J.R. Pirani 4975	SPF	
Ravenia	*R. spectabilis*	M. Groppo 1514	SPFR	Brasil, RJ, Rio de Janeiro
Esenbeckia	*E. febrifuga*	M. Groppo 1577	SPFR	Brasil, BA, Santa Cruz da Vitória
	E. grandiflora	M. Groppo 1149	SPF	Brasil, SP, São Paulo
	E. grandiflora	M. Groppo 1827	SPFR	Brasil, ES, Rio Bananal
Metrodorea	*M. nigra*	M. Groppo 1111	SPF	Brasil, SP, São Paulo
Pilocarpus	*P. spicatus*	M. Groppo 1520	SPFR	Brasil, RJ, Rio de Janeiro
	P. spicatus	J.R. Pirani 4995	SPF	
Zanthoxylum	*Z. rhoifoilum*	M. Groppo 1145	SPFR	Brasil, SP, São Paulo
Hortia	*H. oreadica*	M. Groppo 458	SPF	Brasil, GO, Rio Verde

Tabela 4. Números de caracteres totais, constantes, variáveis e informativos para todas as análises realizadas por máxima parcimônia.

	Nº total caracteres	Nº caracteres constantes	Nº caracteres variáveis	Nº caracteres informativos	% caracteres informativos
Análise morfológica	41	0	41	40	97,5
Análise molecular					
por indivíduo					
trnl-trnf	1002	793	209	90	8,9
rps-16	925	656	269	121	13
ITS-1	451	263	188	117	25,9
ITS-2	350	188	162	111	31,7
por espécie					
trnl-trnf	1083	877	206	65	6
rps-16	837	618	219	74	8,8
ITS-1	456	270	186	106	23,2
ITS-2	352	193	159	107	30,4
Análise combinada					
trnl-trnf + rps16	1920	1495	425	139	7,2
ITS1 + ITS2	808	463	345	213	26,3
trnl-trnf + rps16 + ITS	2728	1958	770	352	12,9
molecular + morfologia	2769	1958	811	392	14,1

Tabela 5. Informações gerais dos resultados das análises por máxima parcimônia.

	Nº táxons	Nº árvores[1]	Nº passos	CI[2]	RI[3]
Análise morfológica	25	309	152	0,4474	0,6379
Análise molecular					
por indivíduo					
trnl-trnf	38	3545	281	0,8327	0,8576
rps-16	35	3869	397	0,7859	0,8506
ITS-1	30	3	449	0,6392	0,7549
ITS-2	26	2	412	0,6068	0,7138
por espécie					
trnl-trnf	26	862	268	0,8545	0,8274
rps-16	25	18	294	0,8299	0,8476
ITS-1	23	28	429	0,655	0,6803
ITS-2	21	3	397	0,6146	0,6652
Análise combinada					
trnl-trnf + rps16	26	1195	565	0,8372	0,8339
ITS1 + ITS2	24	2	834	0,6295	0,4181
trnl-trnf + rps16 + ITS	26	12	1410	0,7078	0,7205
molecular + morfologia	26	9	1583	0,6734	0,697

[1] número de árvores igualmente parcimoniosas; [2] CI = Índice de Consistência; [3] RI = Índice de Retenção

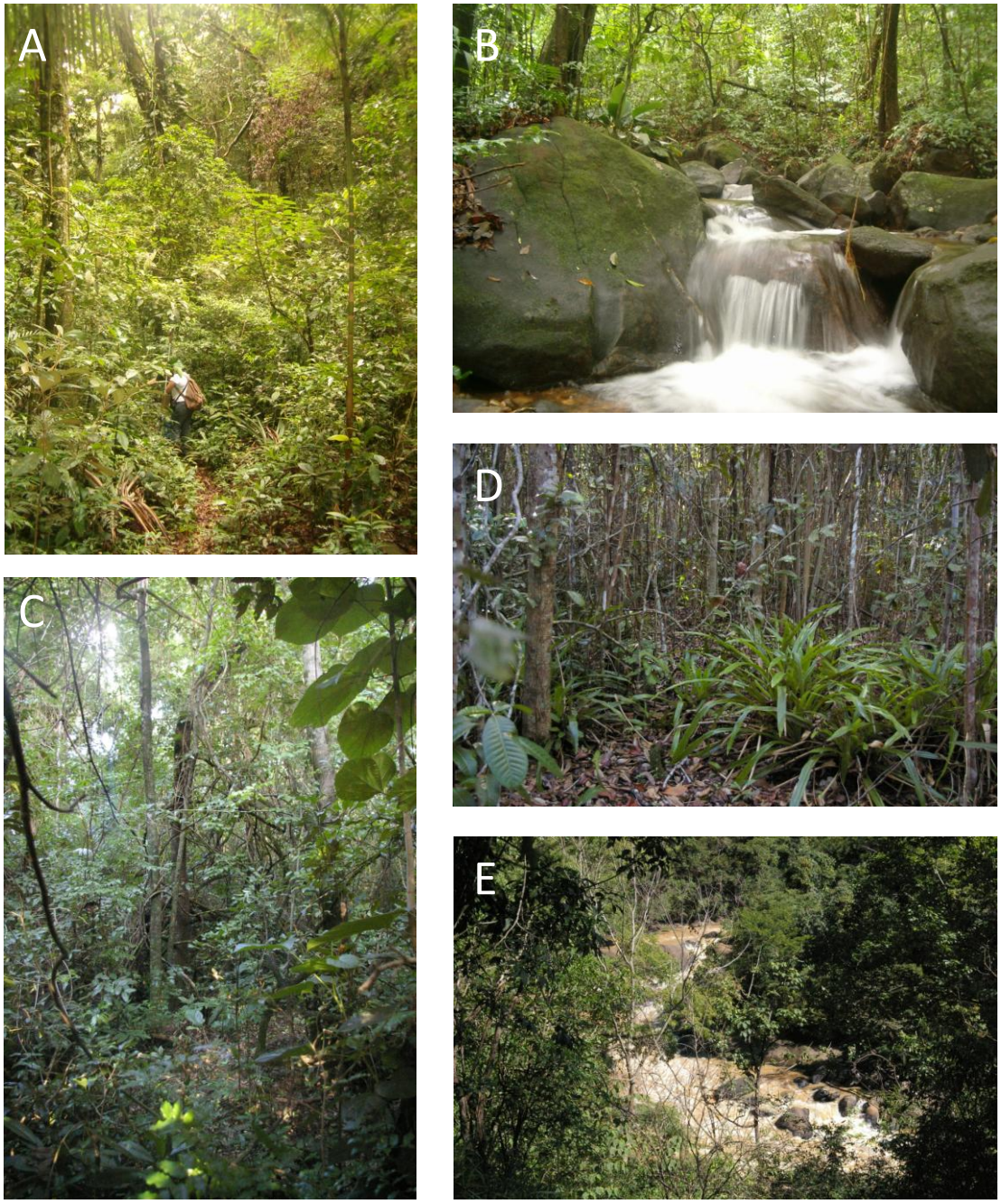

Fig. 1. Fisionomias dos ambientes de ocorrência das espécies de *Almeidea*. A, B. Mata de encosta, Guapimirim (RJ). C. Mata Estacional Semi-decídua, Santa Teresa (ES). D. Mata de Restinga, Ilhéus (BA). E. Mata ciliar, Carangola (MG). Fotos A e B, M. Groppo, C-E, C.P. Bruniera.

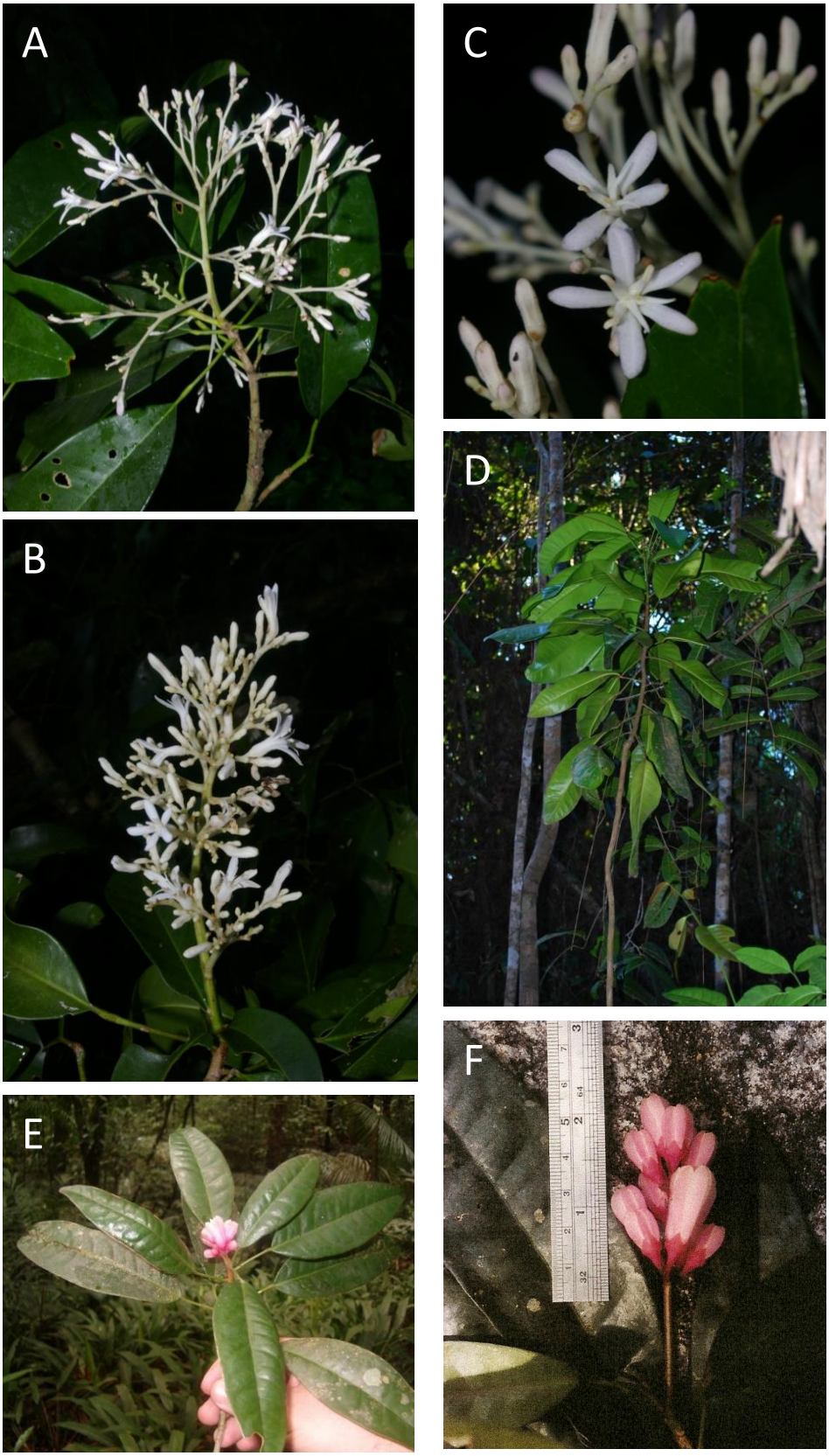

Fig. 2. A-C. *Almeidea albiflora*. A, B. Inflorescência. C. Flores. D. *Almeidea coerulea*, indivíduo ca. 3 m. E-F. *Almeidea limae*, inflorescência. A-C. Cachoeiro de Itapemirim (ES), D. Uruçuca (BA), E. Guapimirim (RJ). Fotos de M. Groppo, com exceção de F (retirado de Silva, 1988).

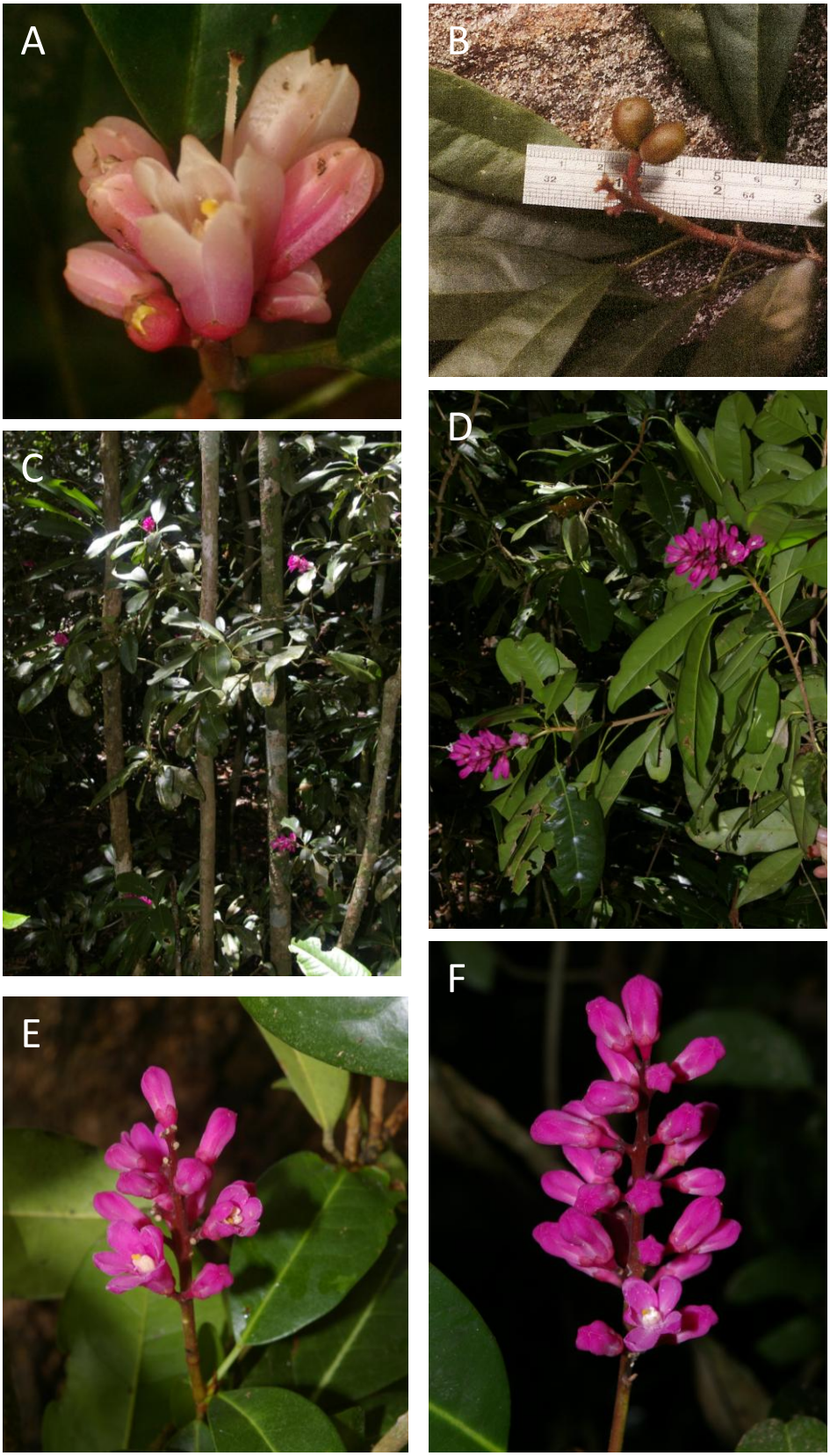

Fig. 3. A-B. *Almeidea limae*. A. Botões e flor na antese. B. Fruto. C-F. *Almeidea rubra*. C. Indivíduo. D. Ramos com inflorescências. E-F. Inflorescência. A. Guapimirim (RJ), C, D, F. Cachoeiro de Itapemirim (ES), E. Nova Venécia (ES). Fotos de M. Groppo, com exceção de B (retirado de Silva, 1988).

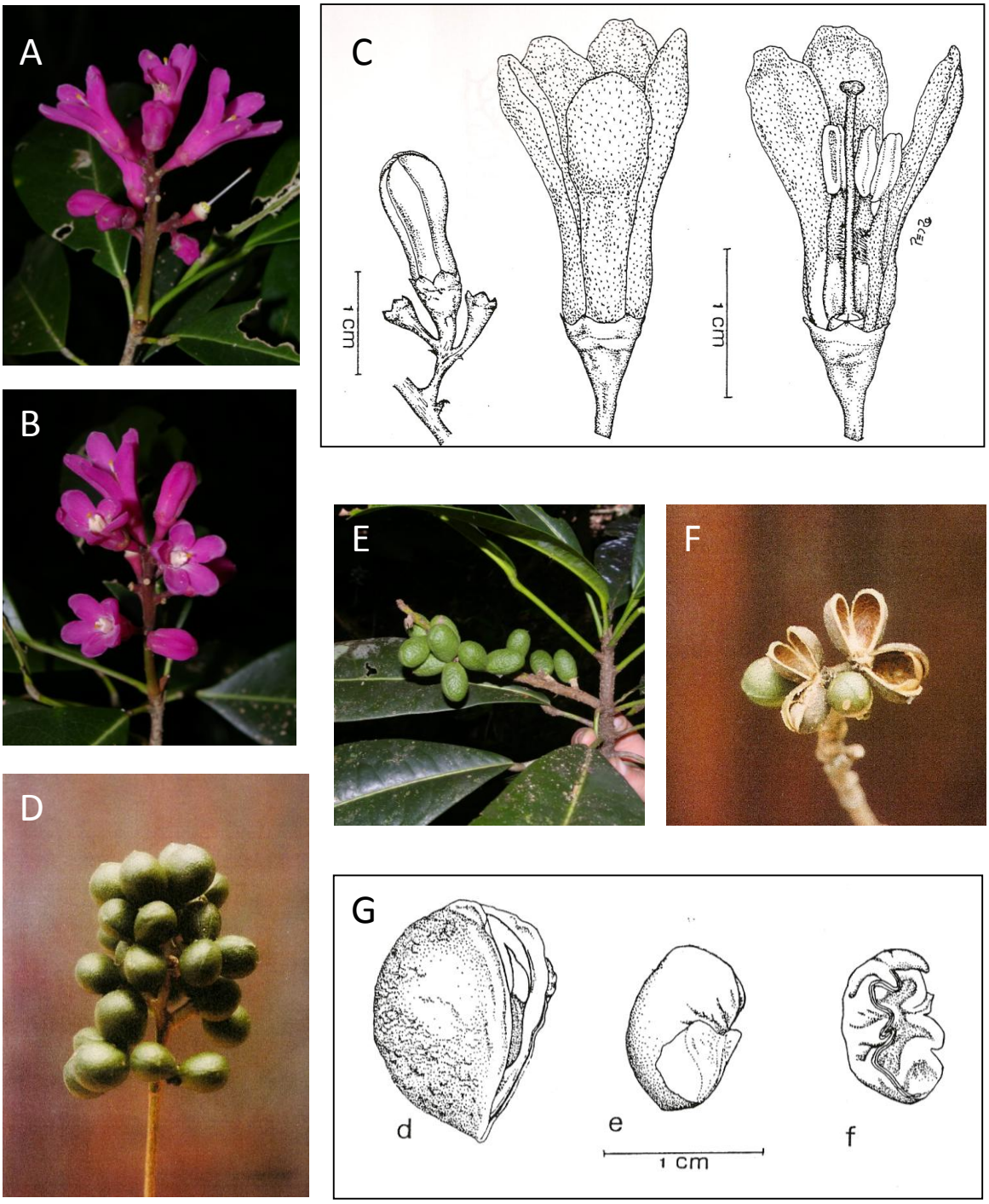

Fig. 4. *Almeidea rubra*. A, B. Botões e flores na antese. C. Esquema do botão, flor na antese e flor aberta (com 2 pétalas retiradas). D, E. Frutos jovens. F. Frutos maduros após deiscência. G. (d) mericarpo, (e) semente, (f) embrião. A, B, E. Cachoeiro de Itapemirim (ES), C, D, F, G. Retirado de Silva (1988). Fotos de M. Groppo.

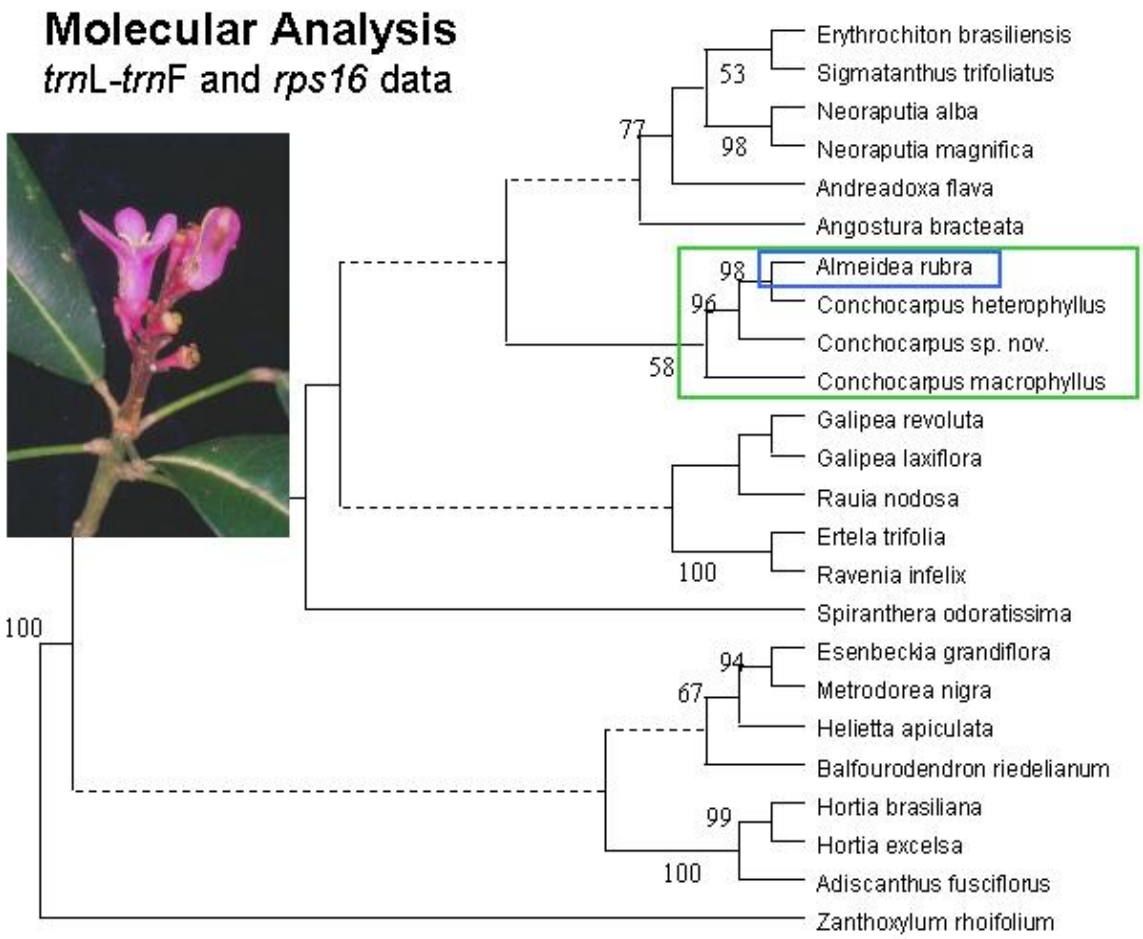

Fig. 5. Análise preliminar de Galipeinae (Galipeae, Rutaceae, não publicada), com utilização de dados moleculares (*trnL-trnF* e *rps-16*). Números acima dos ramos são porcentagens de *bootstrap*. Notar presença de *Almeidea rubra* (azul) em um clado com espécies de *Conchocarpus*. Foto ao lado de *Almeidea rubra* (cedida por J.Kallunki). (Apresentado no Sapindales Symposium, Kallunki & Groppo 2007)

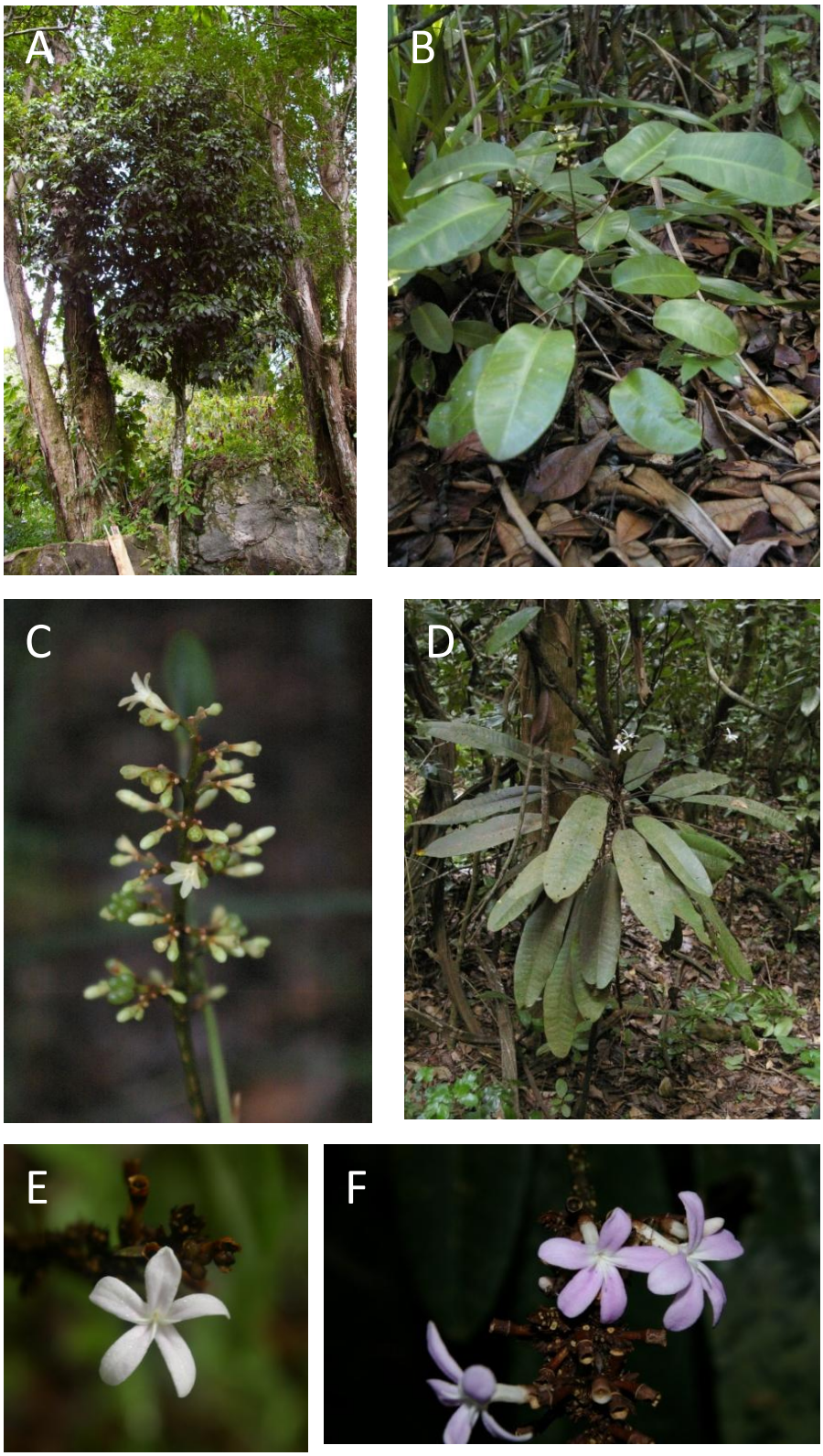

Fig. 6. A. *Andreadoxa flava*, indivíduo ca. 8 m alt. B, C. *Conchocarpus concinnus*. B. Indivíduo ca. 0,5 m alt. C. Inflorescência. D, F. *Conchocarpus macrophyllus*. D. Indivíduo ca. 1,5 m alt. E, F. Flores abertas. A. CEPEC, Itabuna (BA), B, C. Olivença – Ilhéus (BA), D, F. Uruçuca (BA). Fotos de M. Groppo.

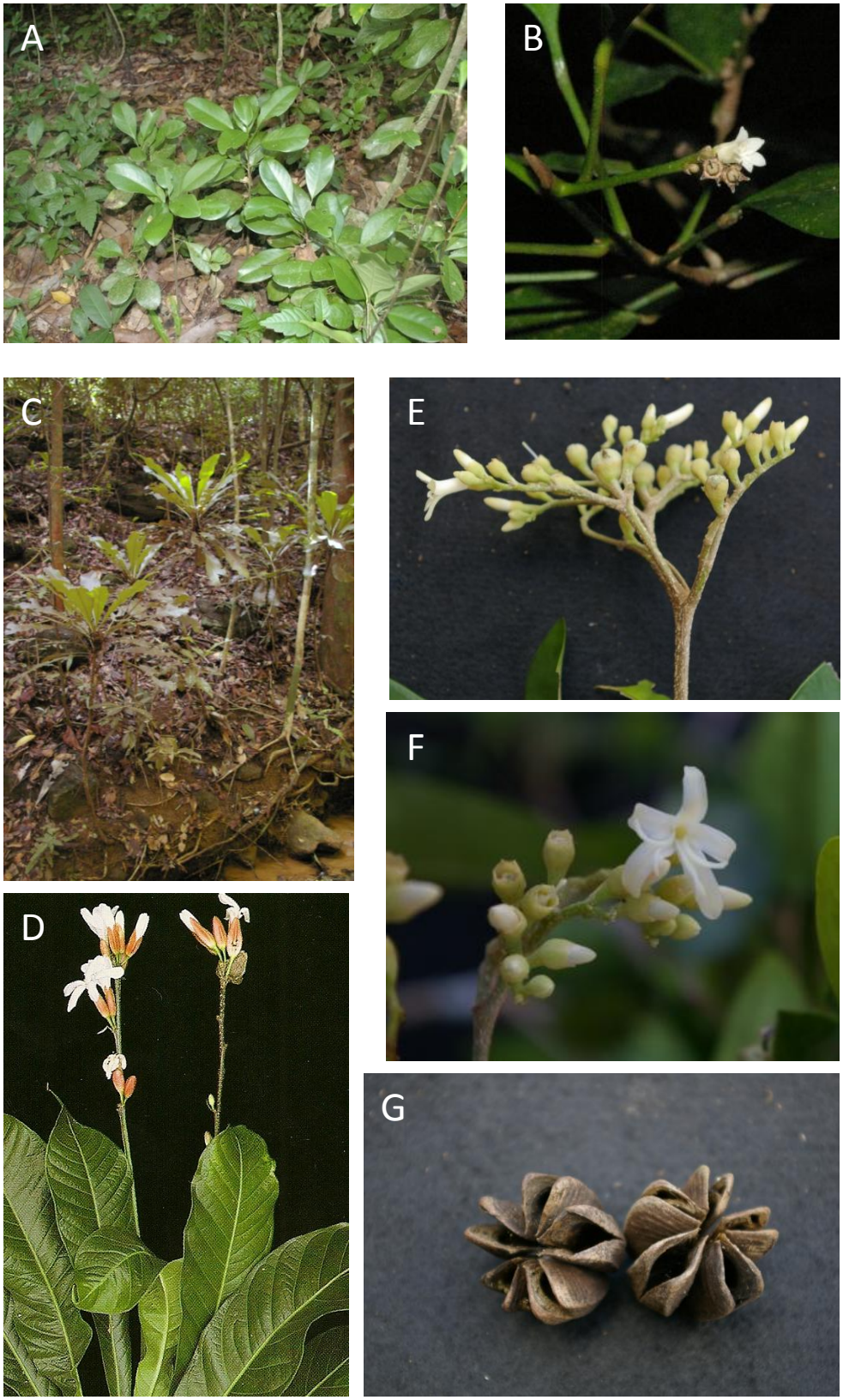

Fig. 7. A-B. *Conchocarpus minutiflorus.* A. População com indivíduos ca. 30 cm alt. B. Flor. C-D. *Erythrochiton brasiliensis*. C. População com indivíduos ca. 1,0-1,5 m alt. D. Inflorescências. E-G. *Neoraputia Alba*. E. Inflorescência. F. Inflorescência com flor aberta em destaque. G. Frutos após deiscência. A-C. Santa Teresa (ES), D. Retirado de Souza & Lorenzi 2005, E-G. Itacaré (BA). Fotos de M. Groppo.

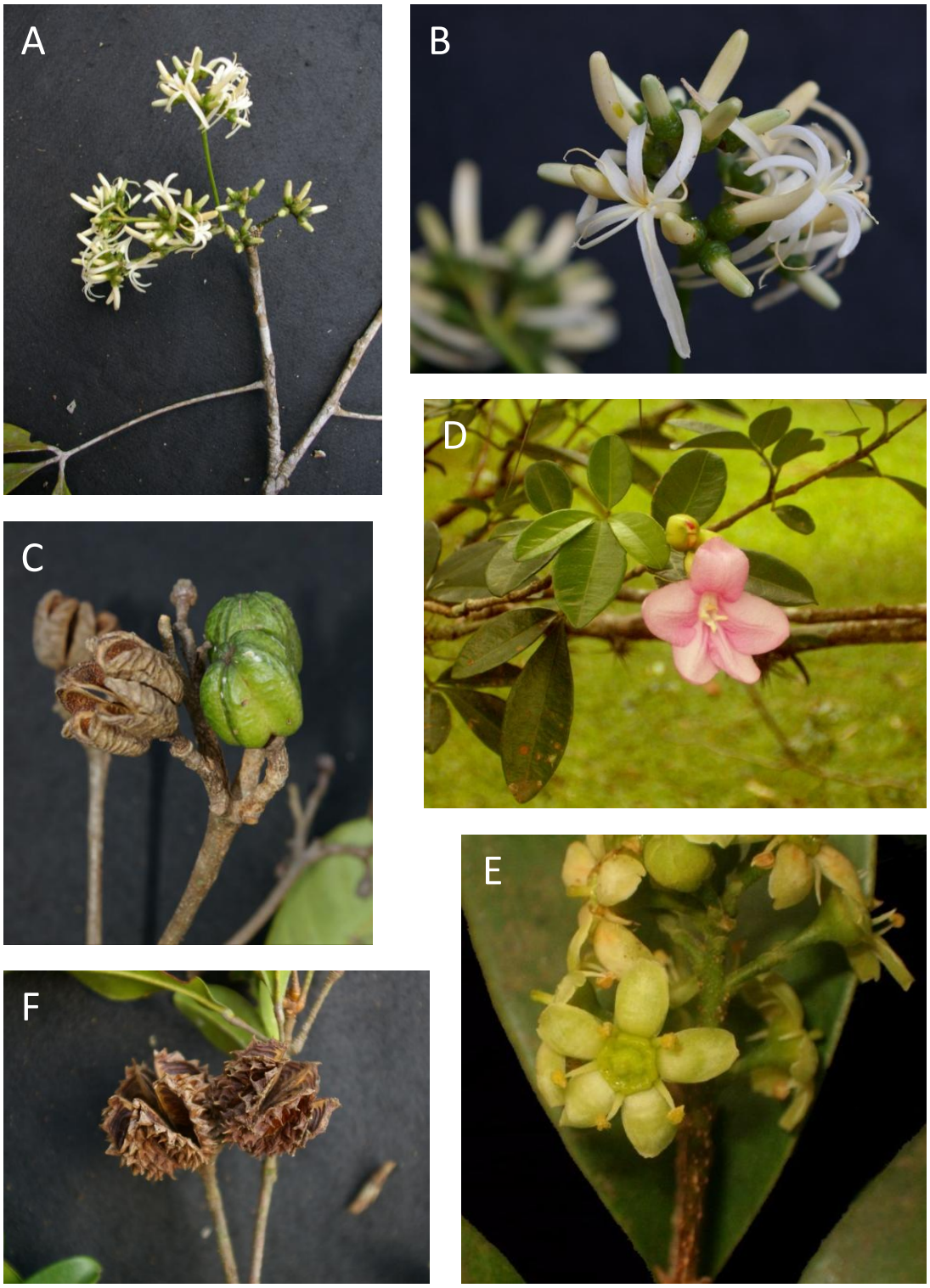

Fig. 8. A-C. *Rauia nodosa.* A. Inflorescência. B. Inflorescência com flor aberta em destaque C. Frutos. D. *Ravenia spectabilis*, inflorescência com botão e flor aberta em destaque. E-F. *Esenbeckia grandiflora*. E. Flor aberta. F. Frutos após deiscência. A-C. Itacaré (BA), D-F. JBRJ, Rio de Janeiro (RJ). Fotos de M. Groppo.

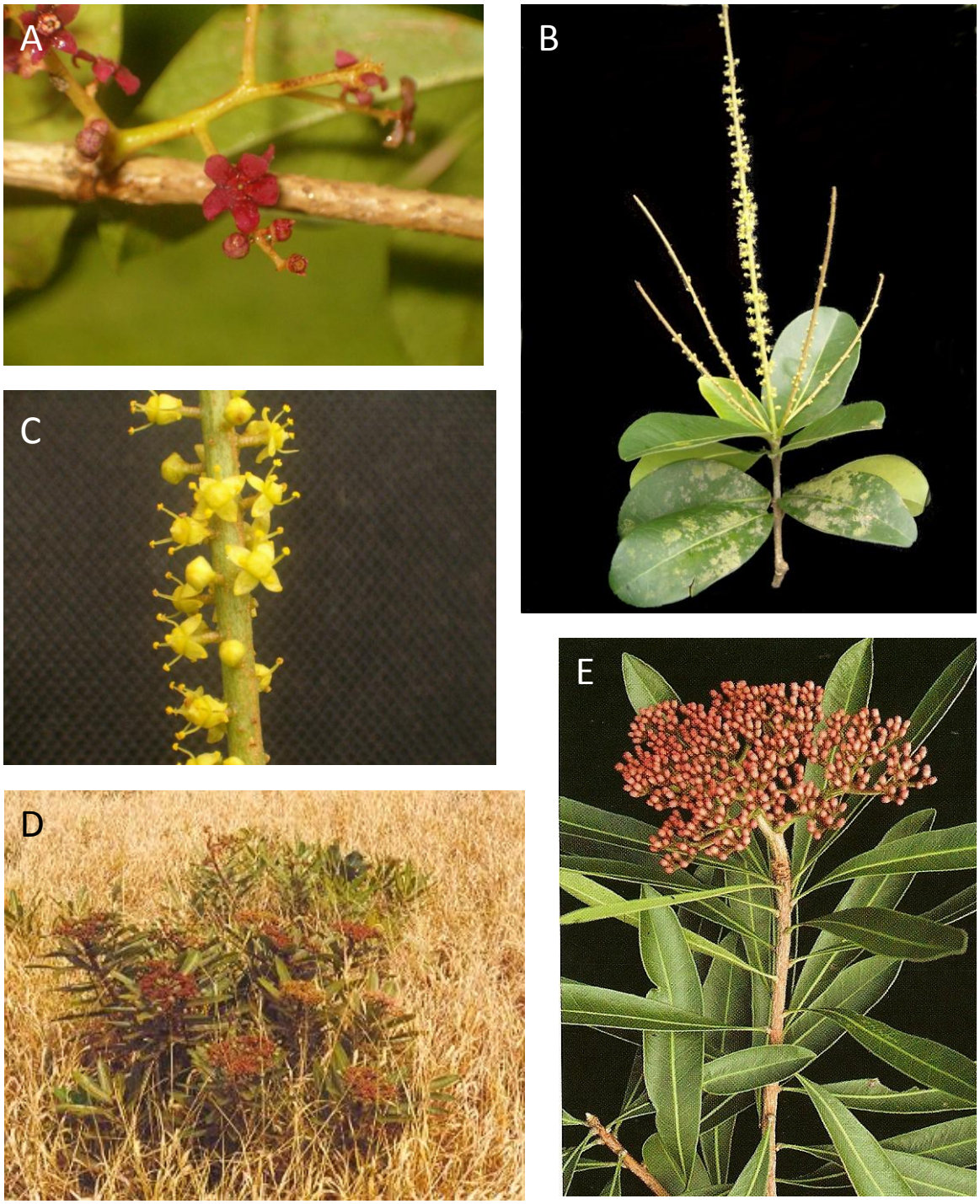

Fig. 9. A. *Metrodorea nigra*, inflorescência com botões e flor aberta em destaque. B-C. *Pilocarpus spicatus*. B. Ramo com inflorescência. C. Flores. D-E. *Hortia oreadica*. D. Indivíduos com inflorescências. E. Ramo com inflorescência. A-C. JBRJ, Rio de Janeiro (RJ), D. Retirado de Groppo (2004), E. Retirado de Souza & Lorenzi (2005). Fotos de M. Groppo.

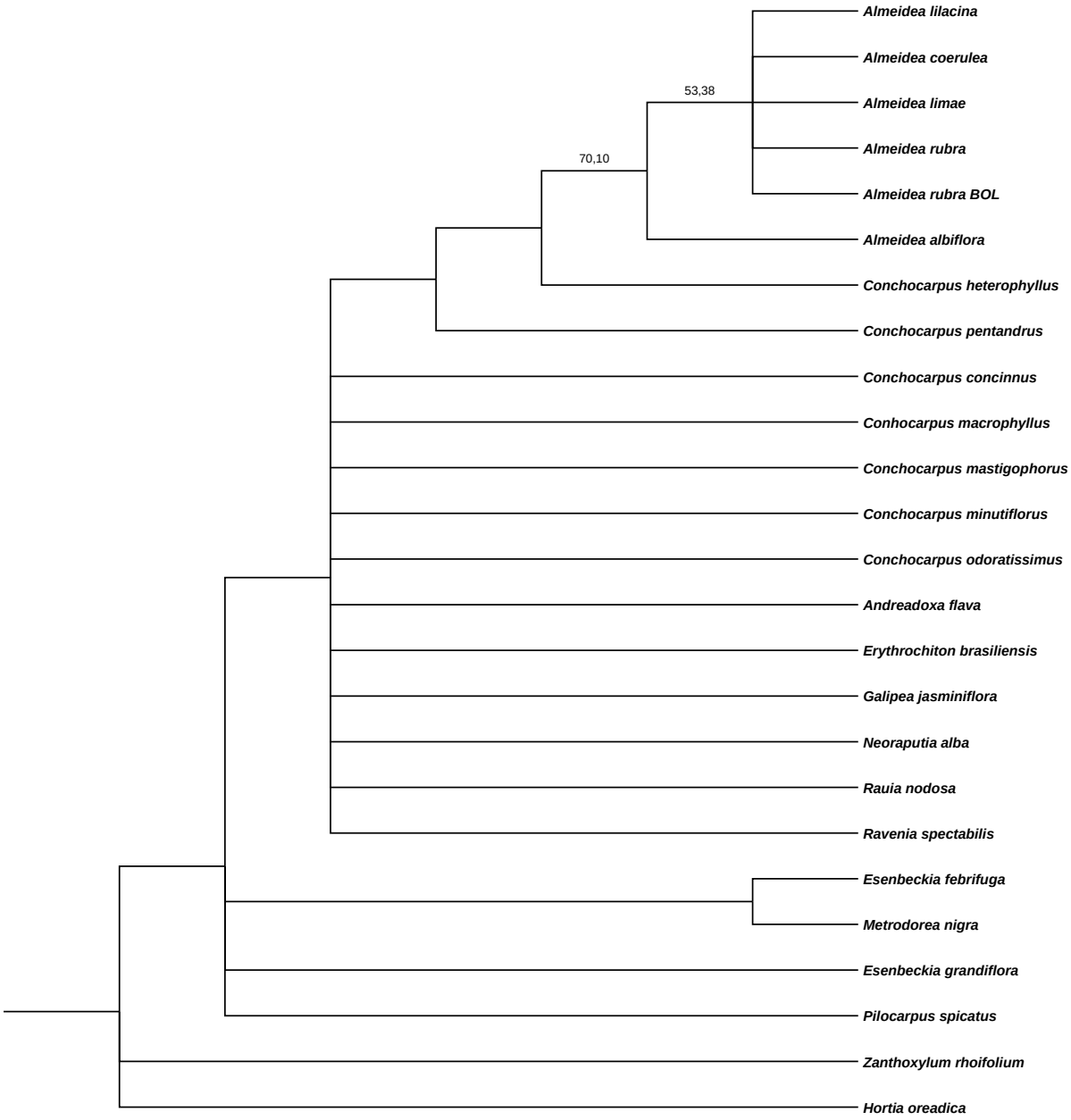

Fig. 10: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de dados morfológicos; valores de porcentagem de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

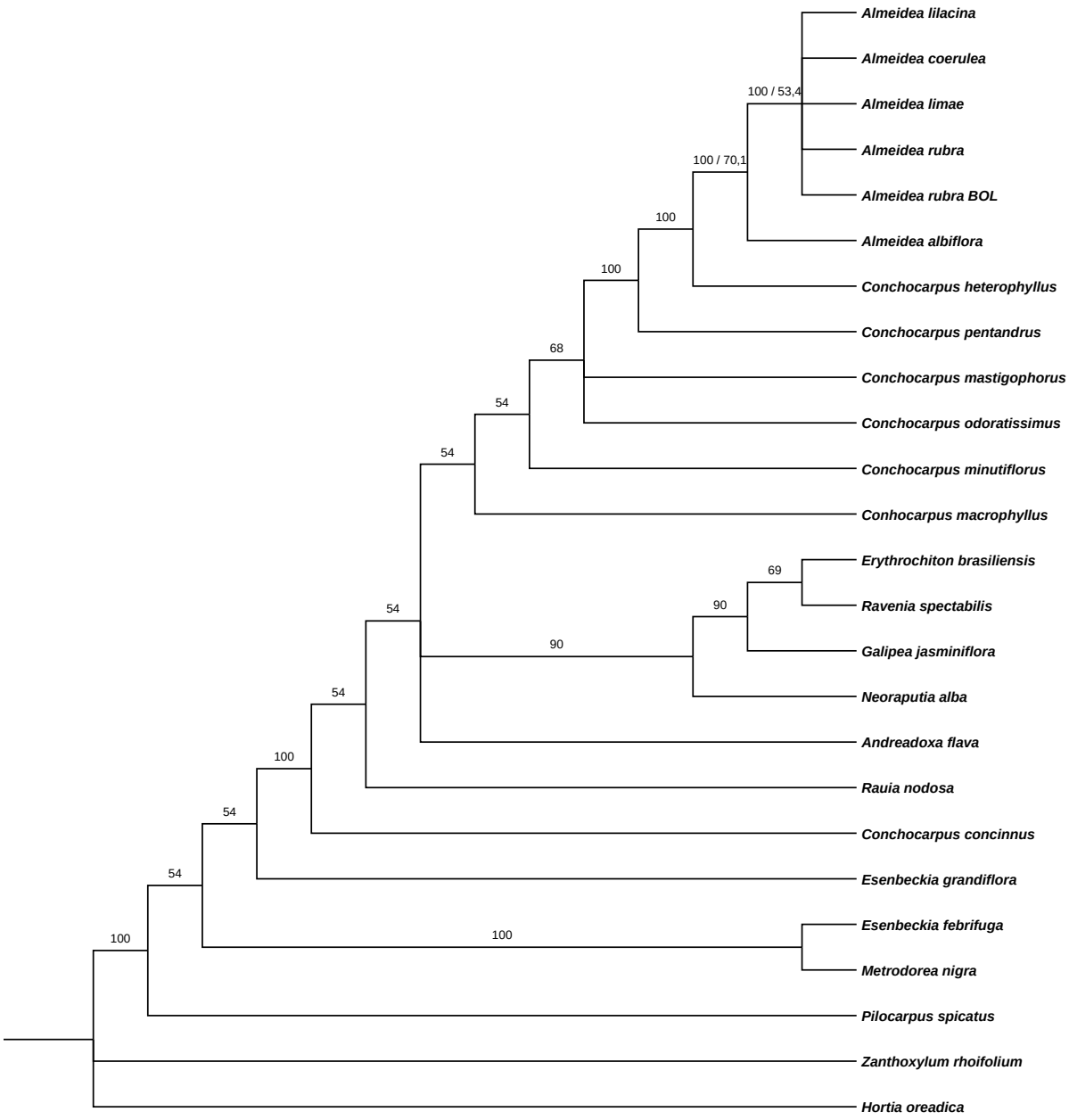

Fig. 11: Árvore de consenso de maioria por análise de máxima parcimônia de dados morfológicos; valores de porcentagem de ramos e *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso de maioria.

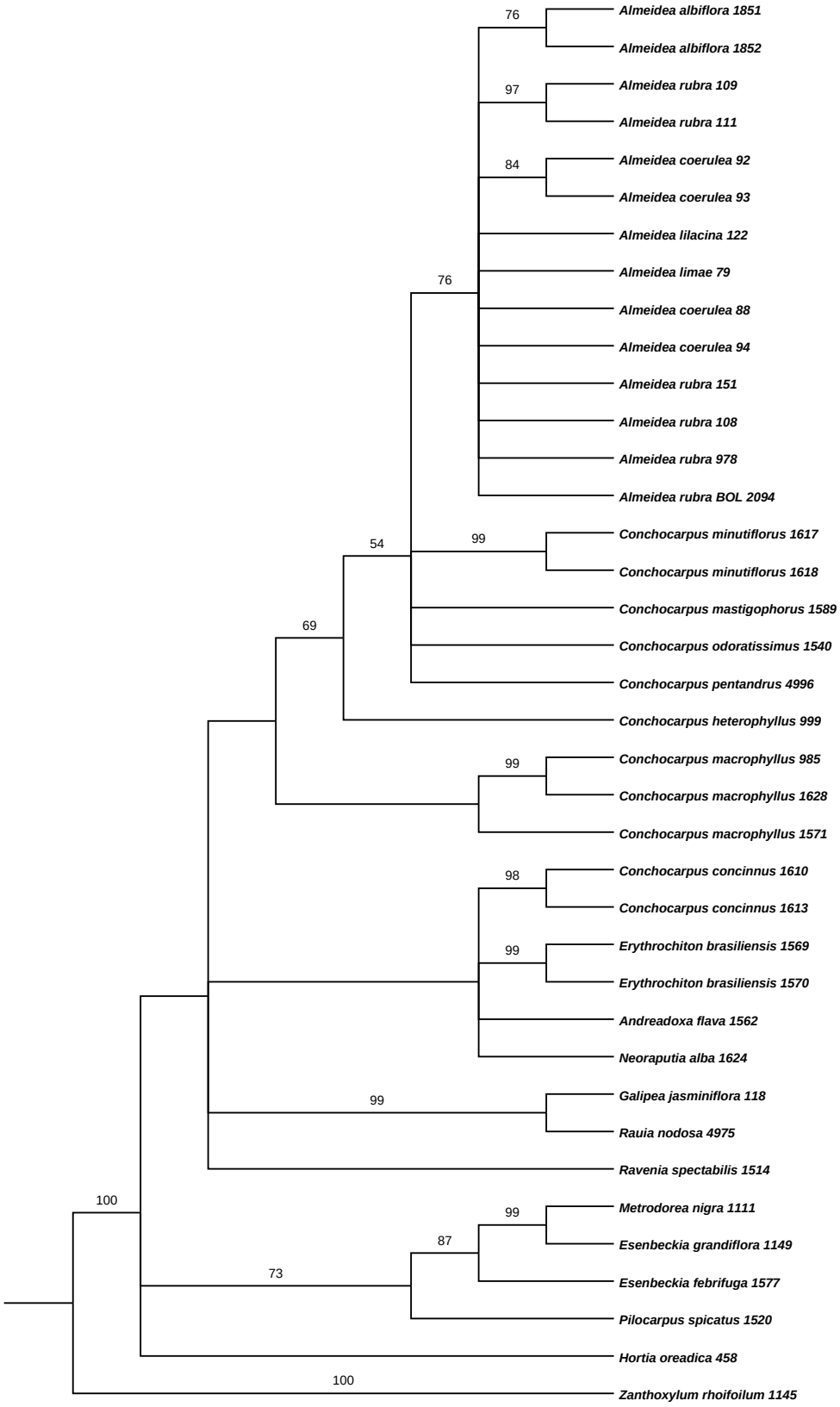

Fig. 12: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de *trnL-trnF* (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

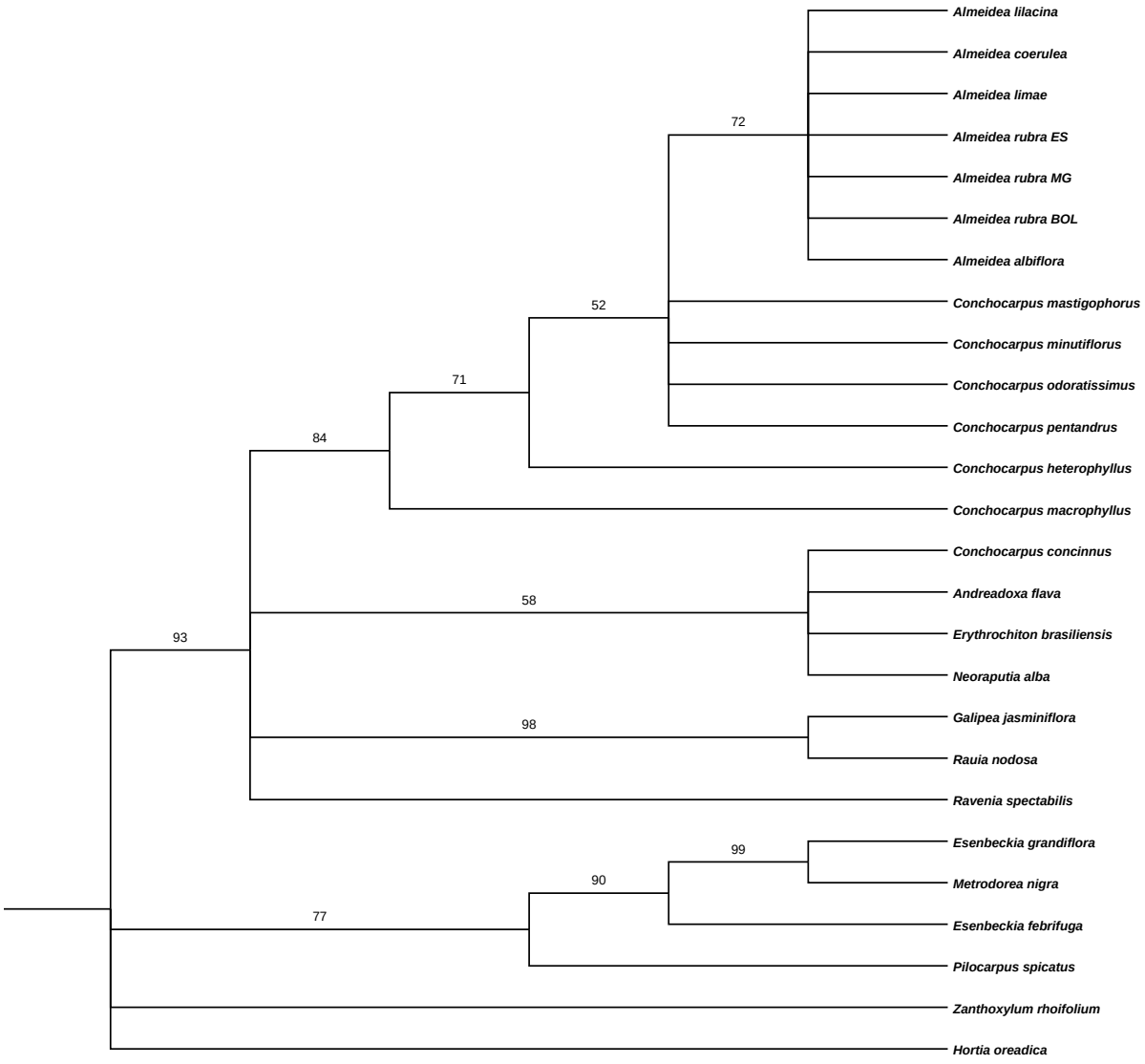

Fig. 13: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de *trnL-trnF* (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

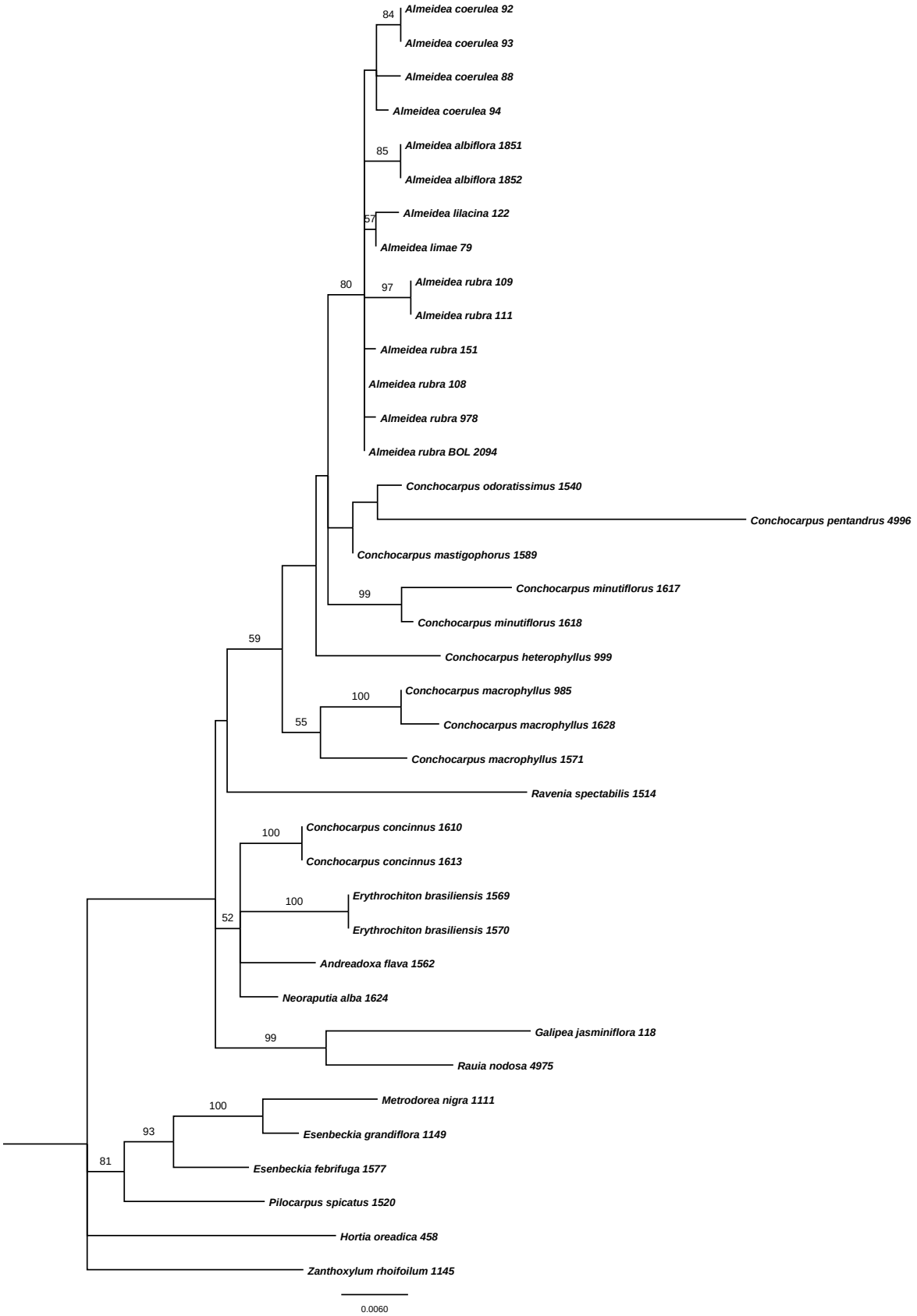

Fig. 14: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 3170.90006) de seqüências de *trnL-trnF* (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

Fig. 15: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 3155.88428) de seqüências de *trnL-trnF* (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

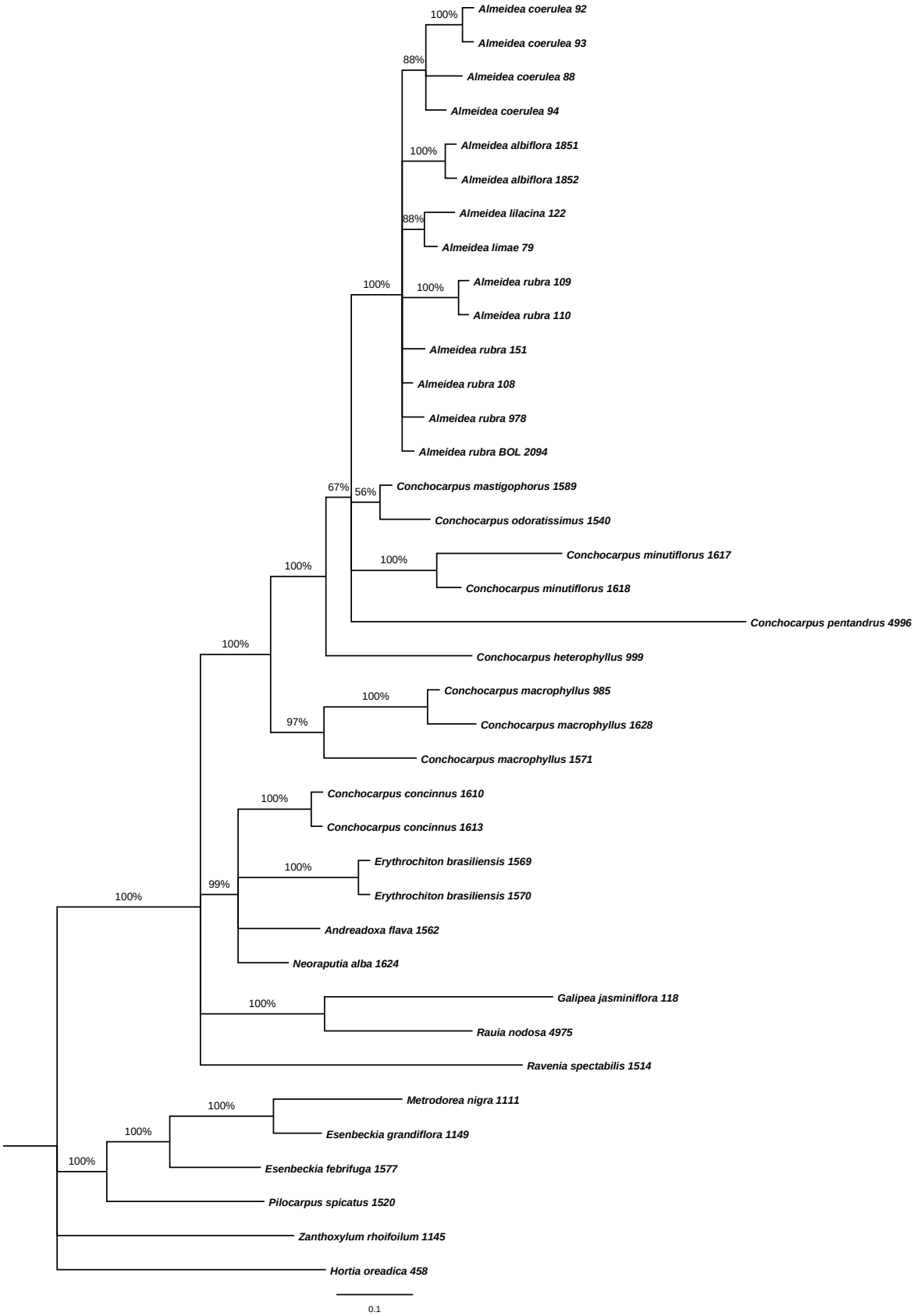

Fig. 16: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de *trnL-trnF* (análise por indivíduos); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

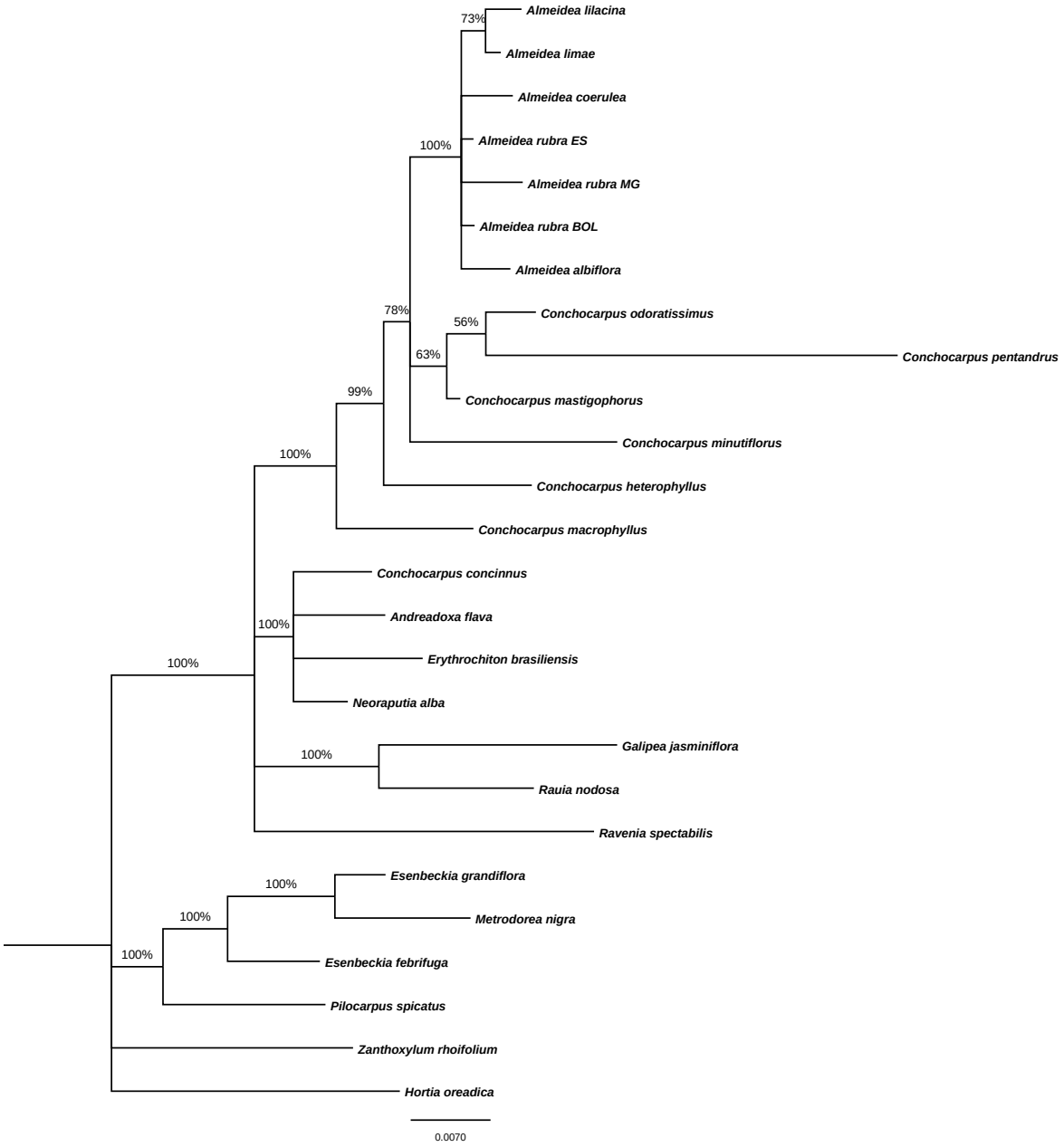

Fig. 17: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de *trnL-trnF* (análise reduzida); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

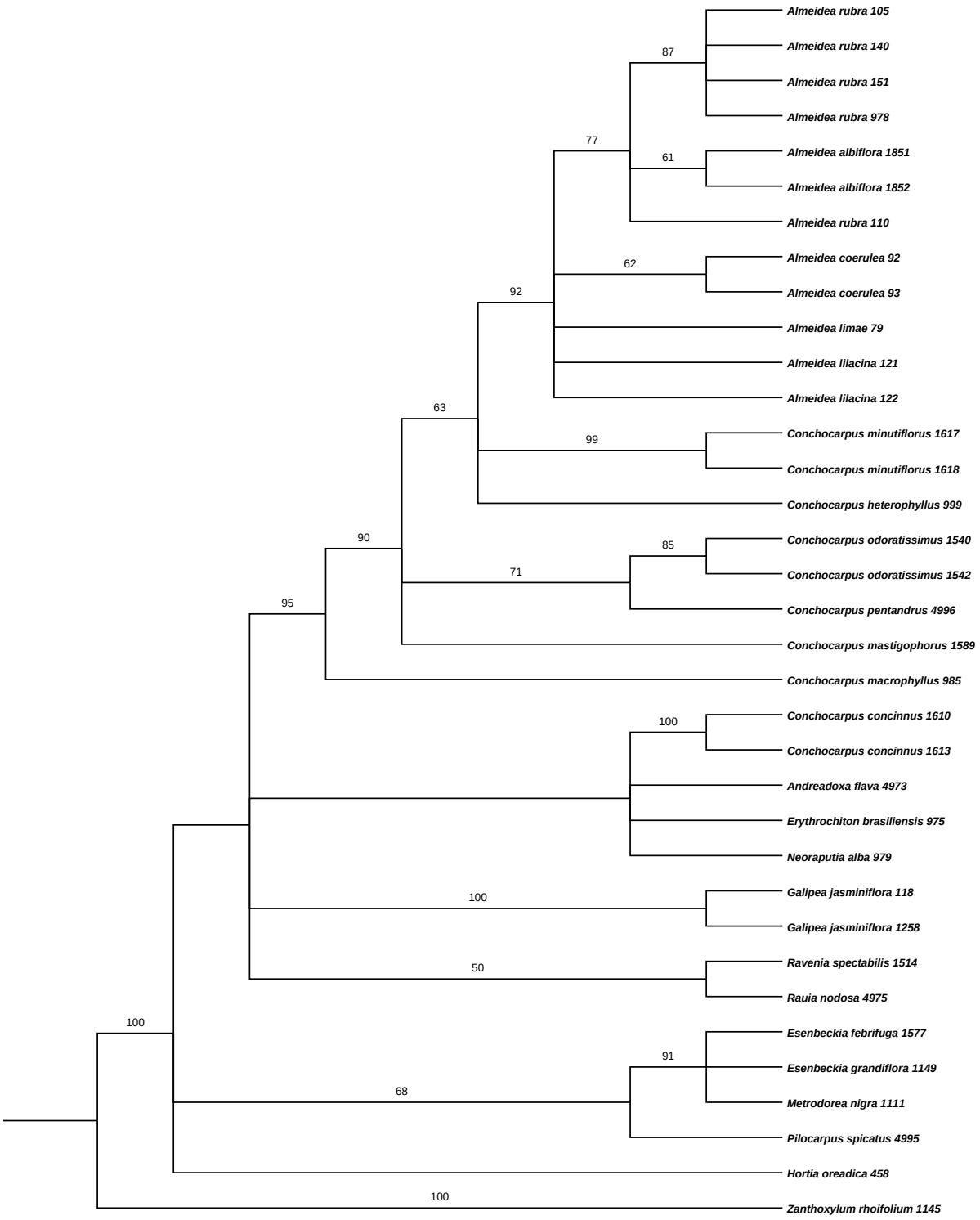

Fig. 18: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de *rps-16* (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

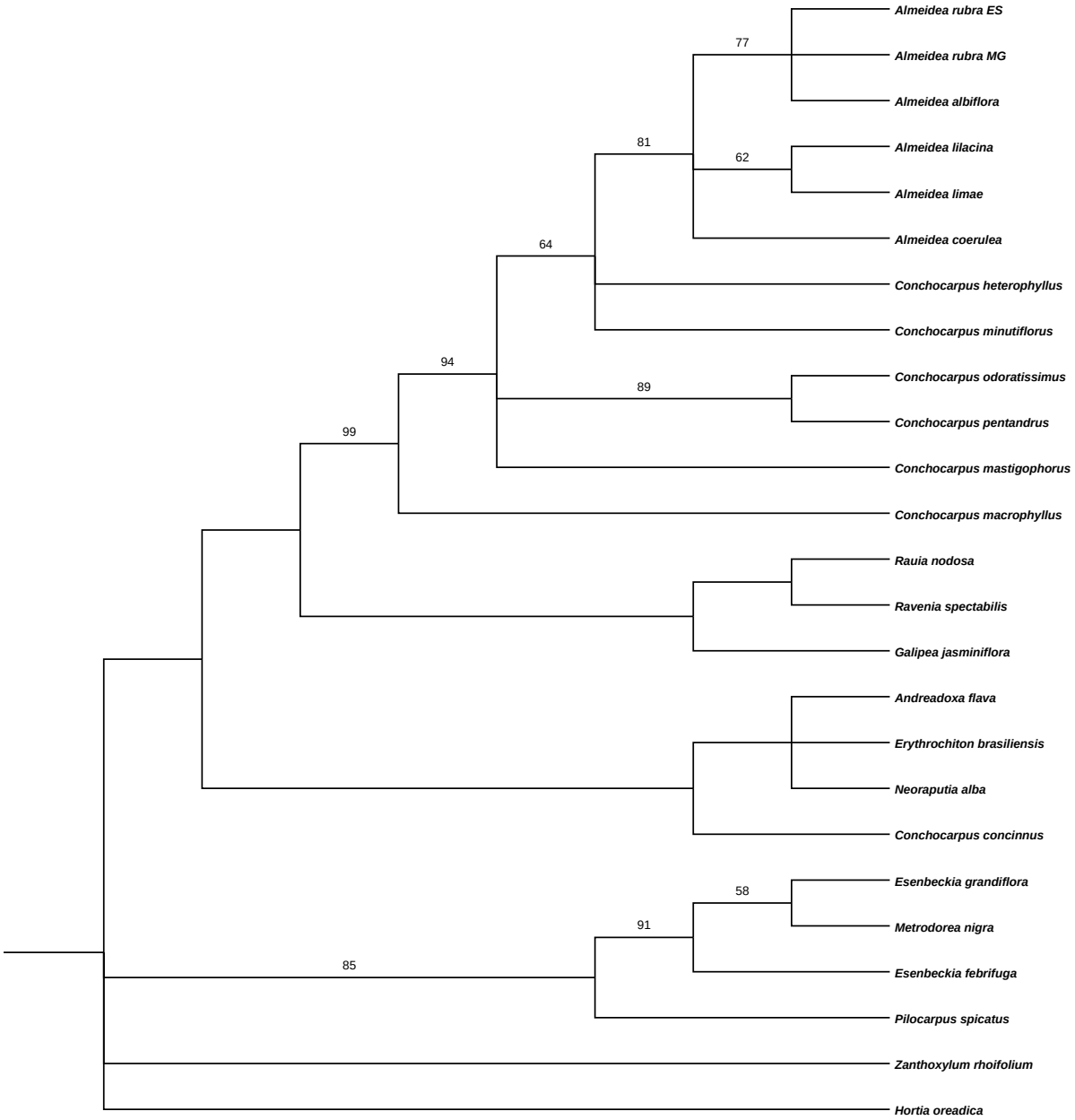

Fig. 19: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de *rps-16* (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

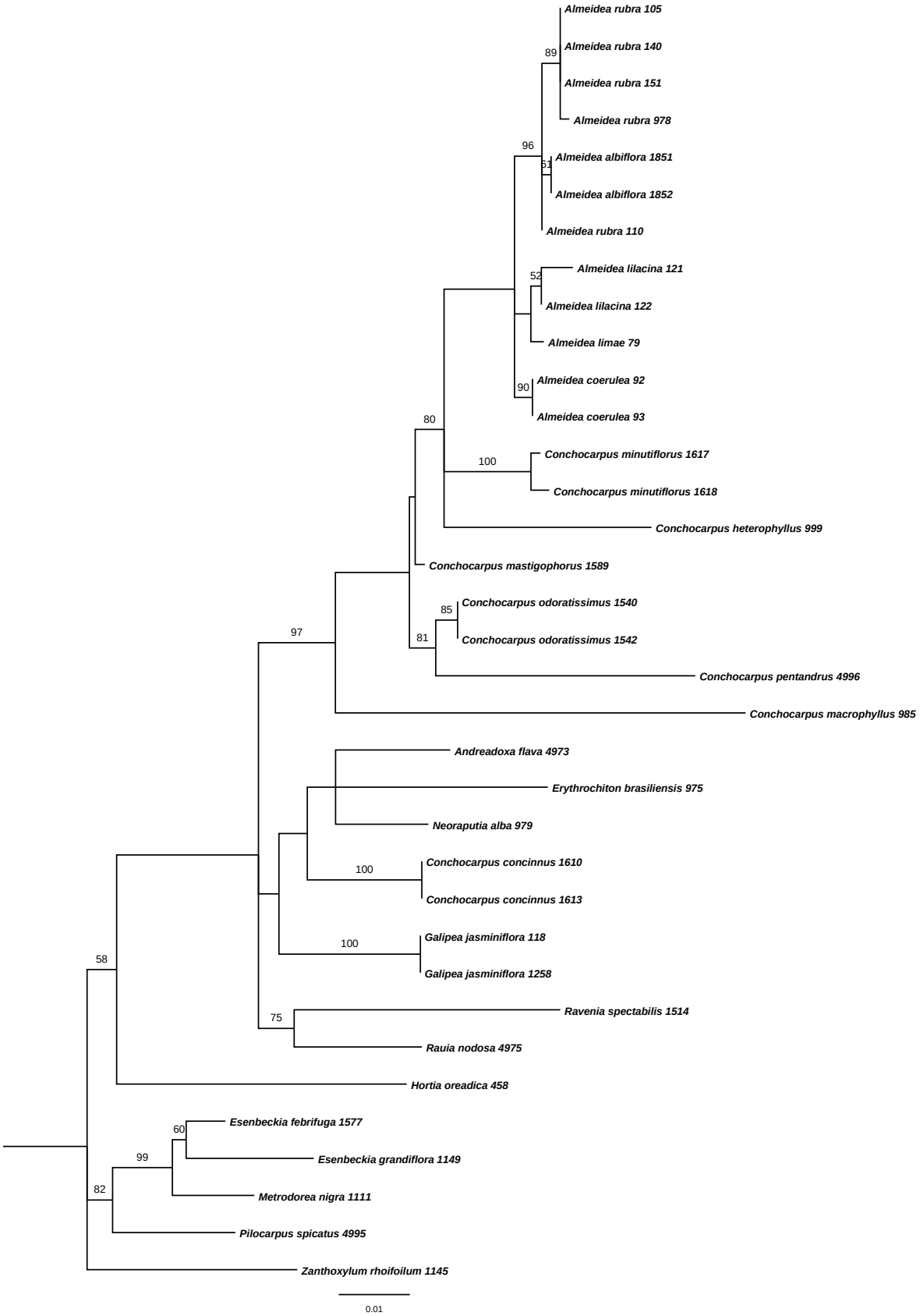

Fig. 20: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 3548.98606) de seqüências de *rps-16* (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

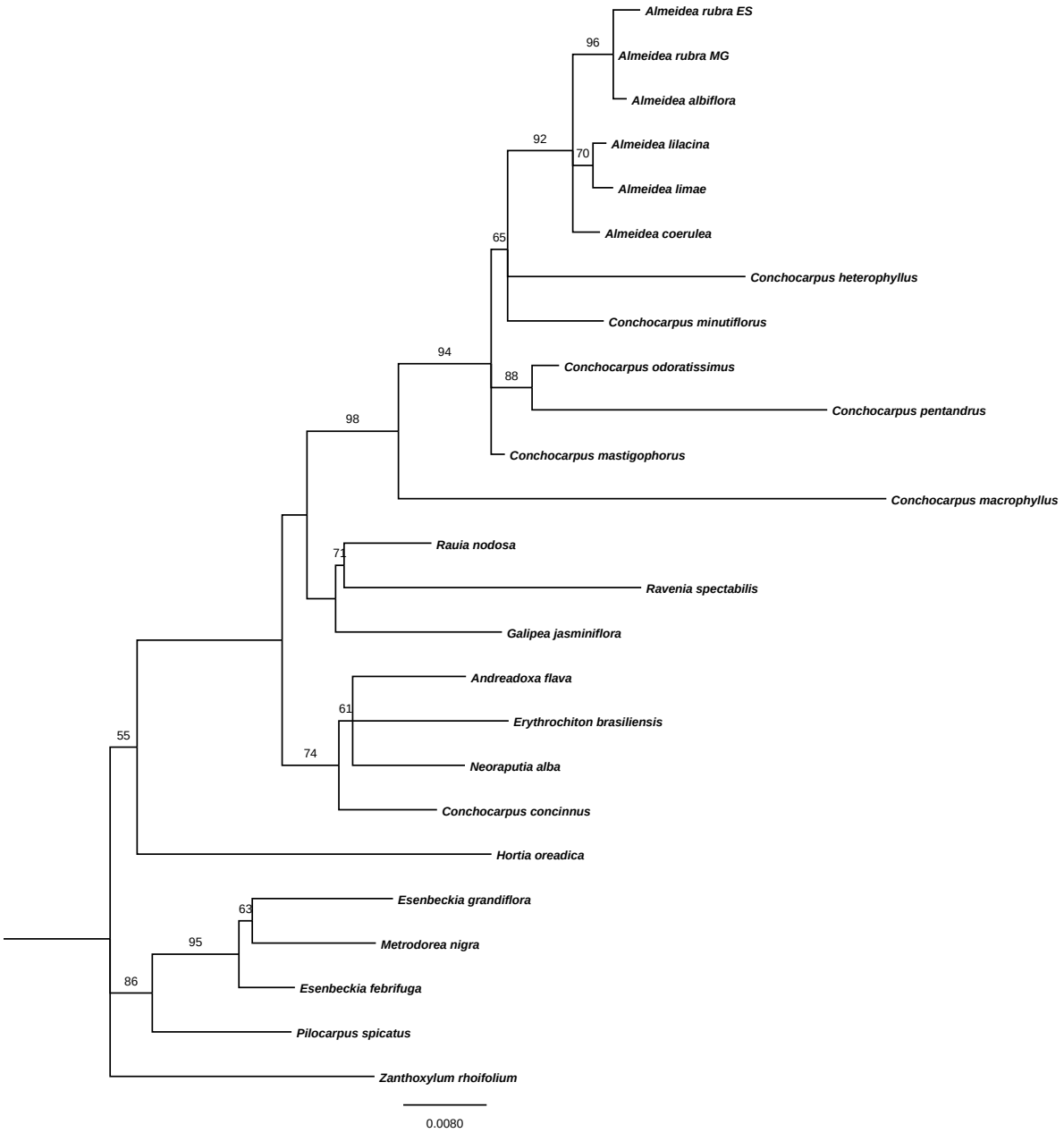

Fig. 21: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 2910.10313) de seqüências de *rps-16* (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

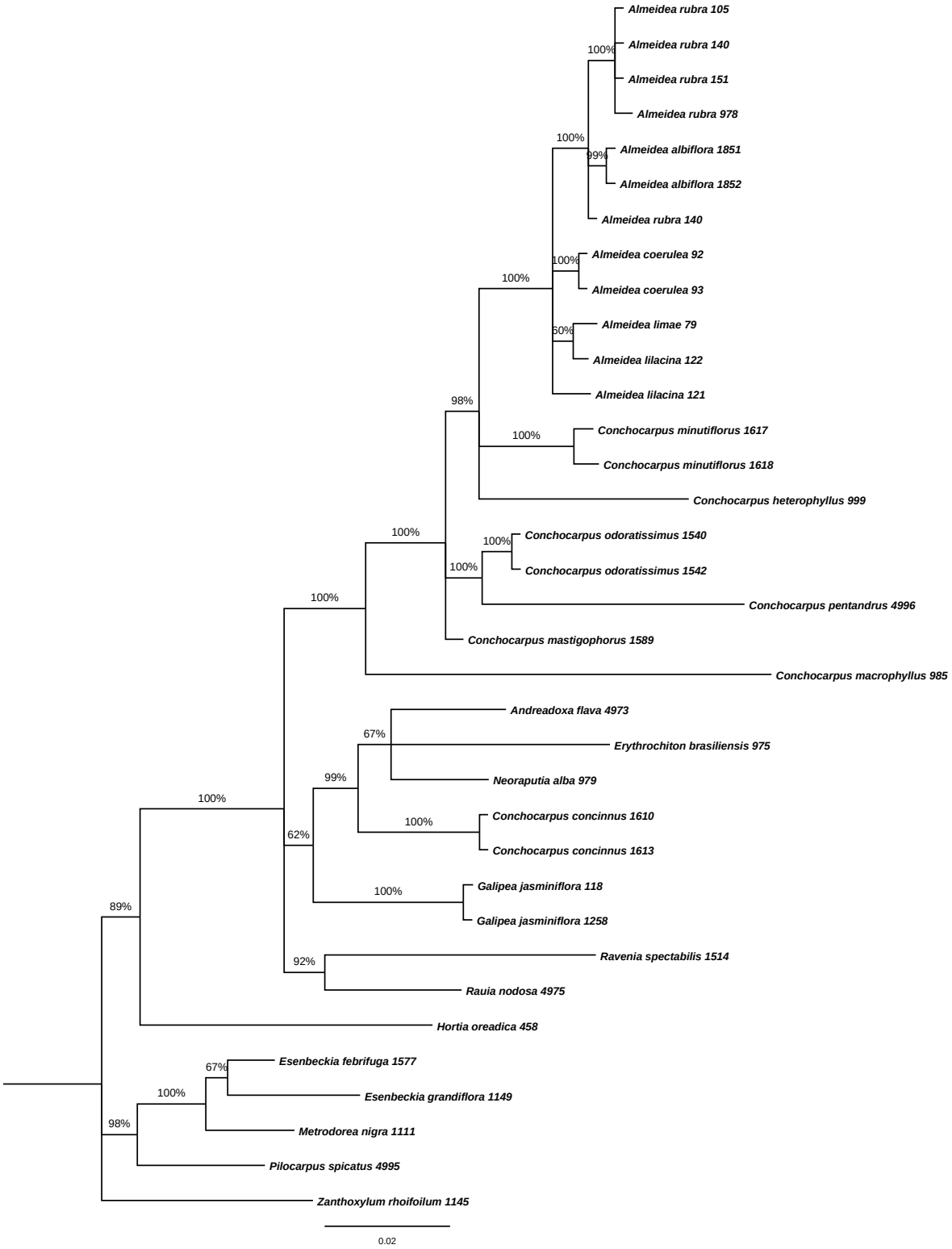

Fig. 22: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de *rps-16* (análise por indivíduos); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

Fig. 23: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de *rps-16* (análise reduzida); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

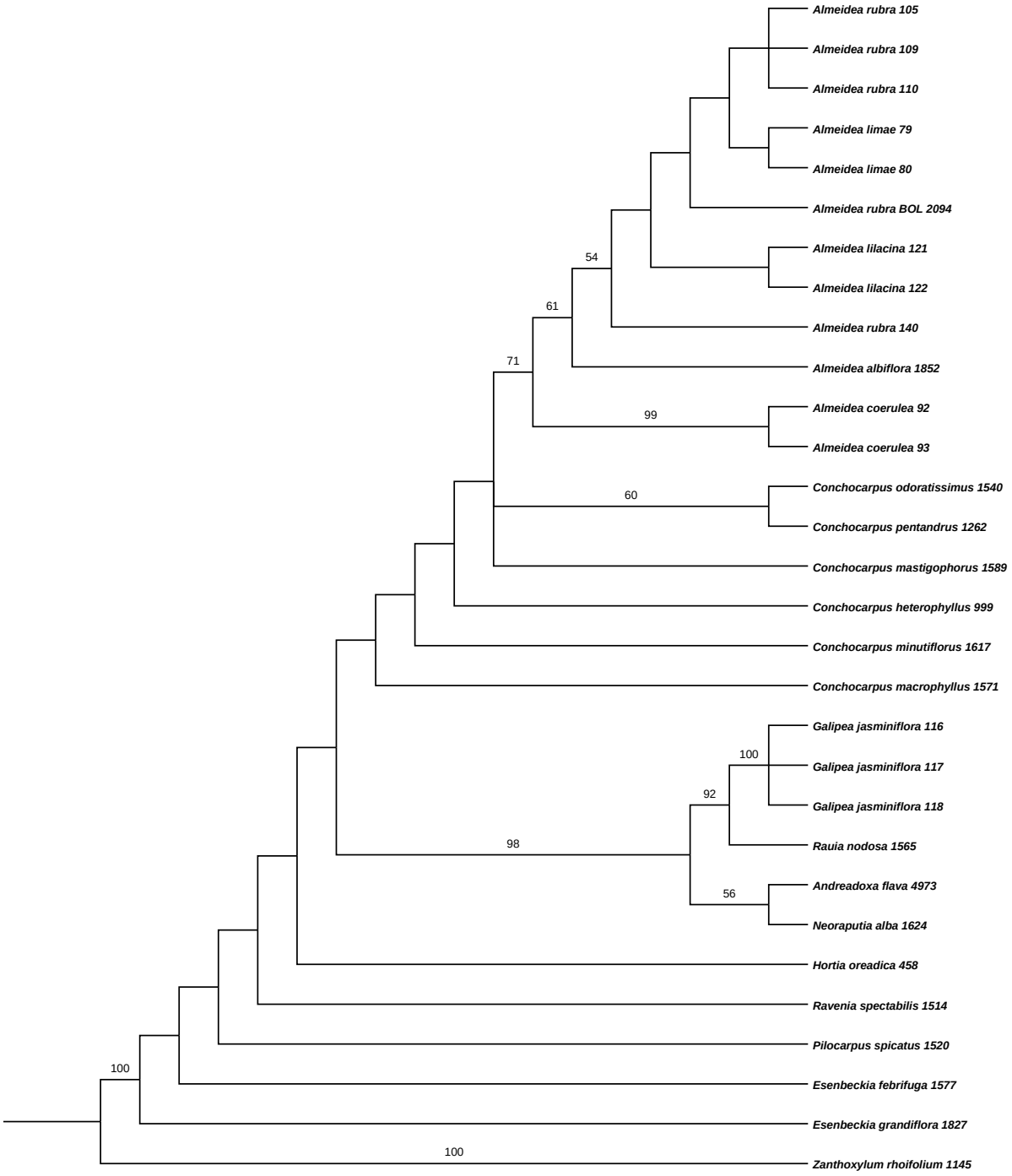

Fig. 24: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de ITS-1 (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

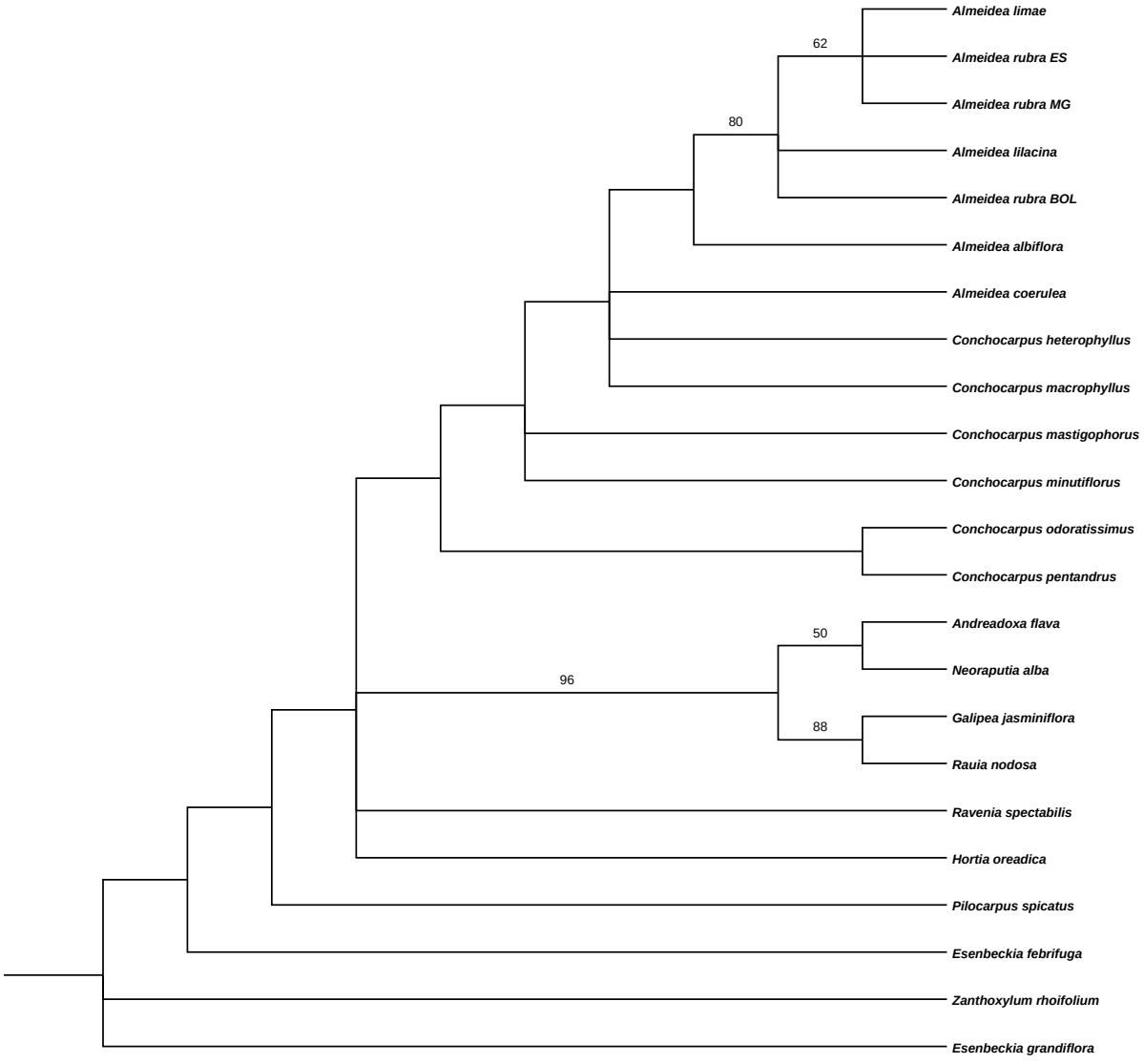

Fig. 25: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de ITS-1 (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

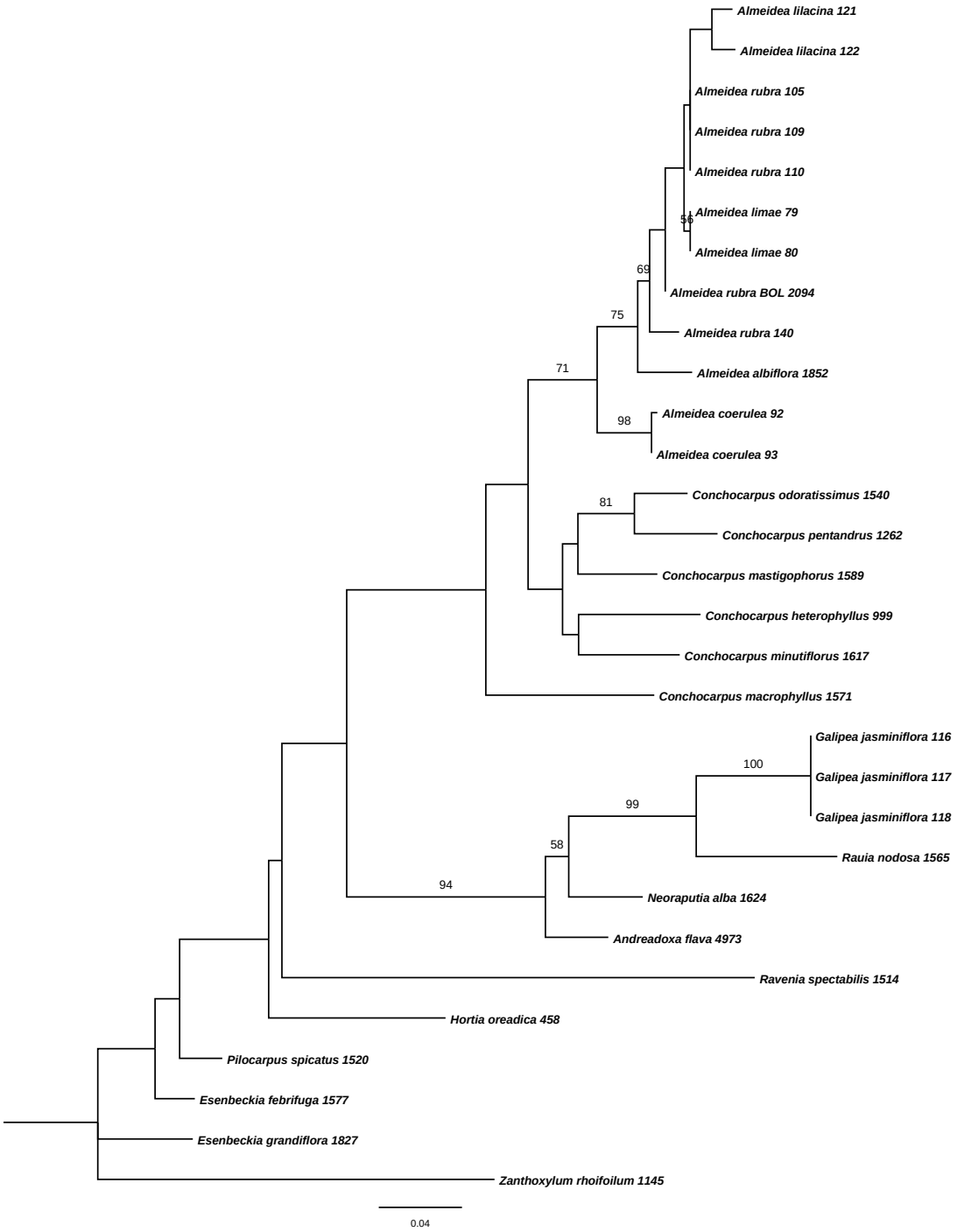

Fig. 26: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 2744.82419) de seqüências de ITS-1 (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

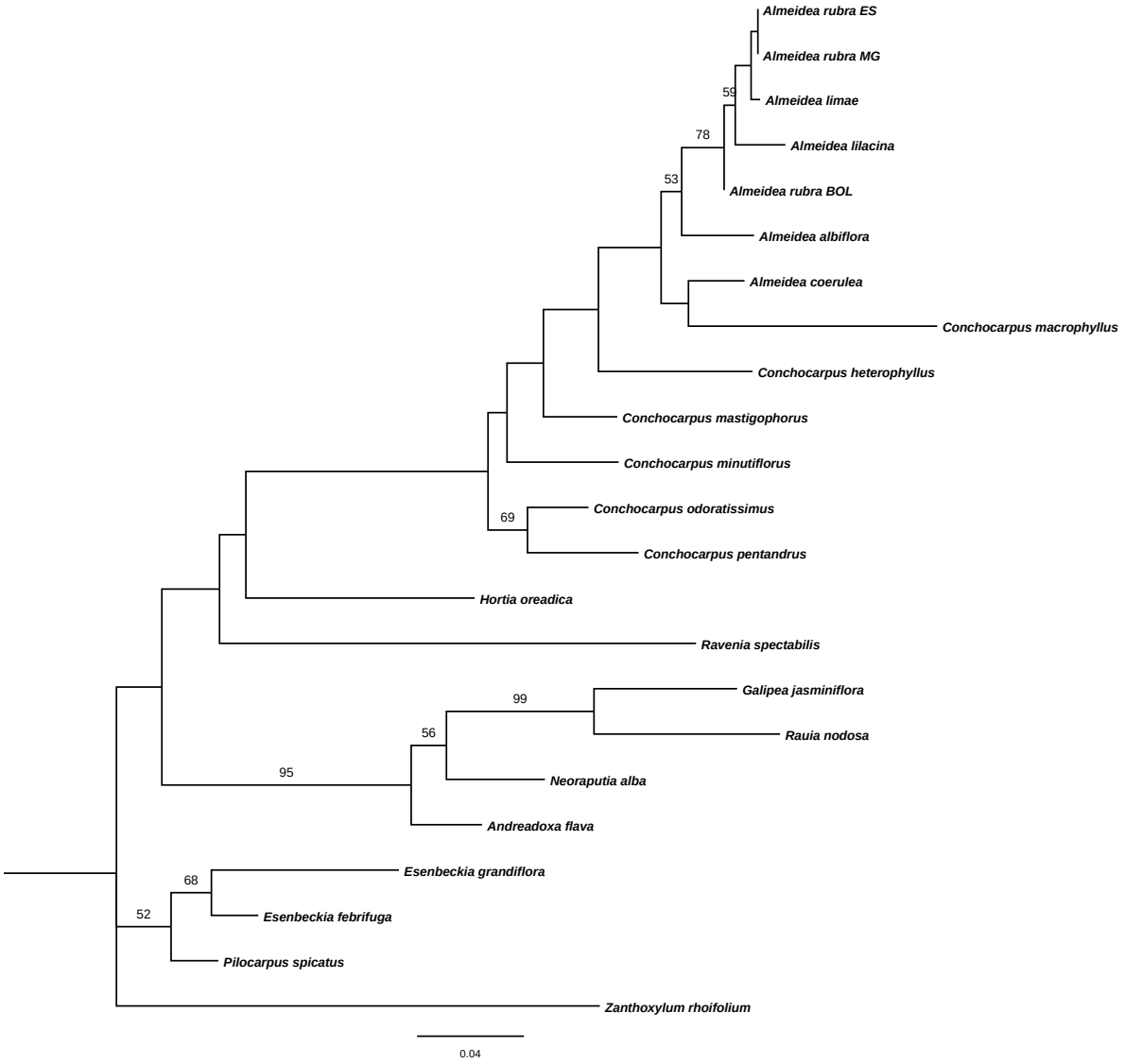

Fig. 27: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 2652.91297) de seqüências de ITS-1 (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

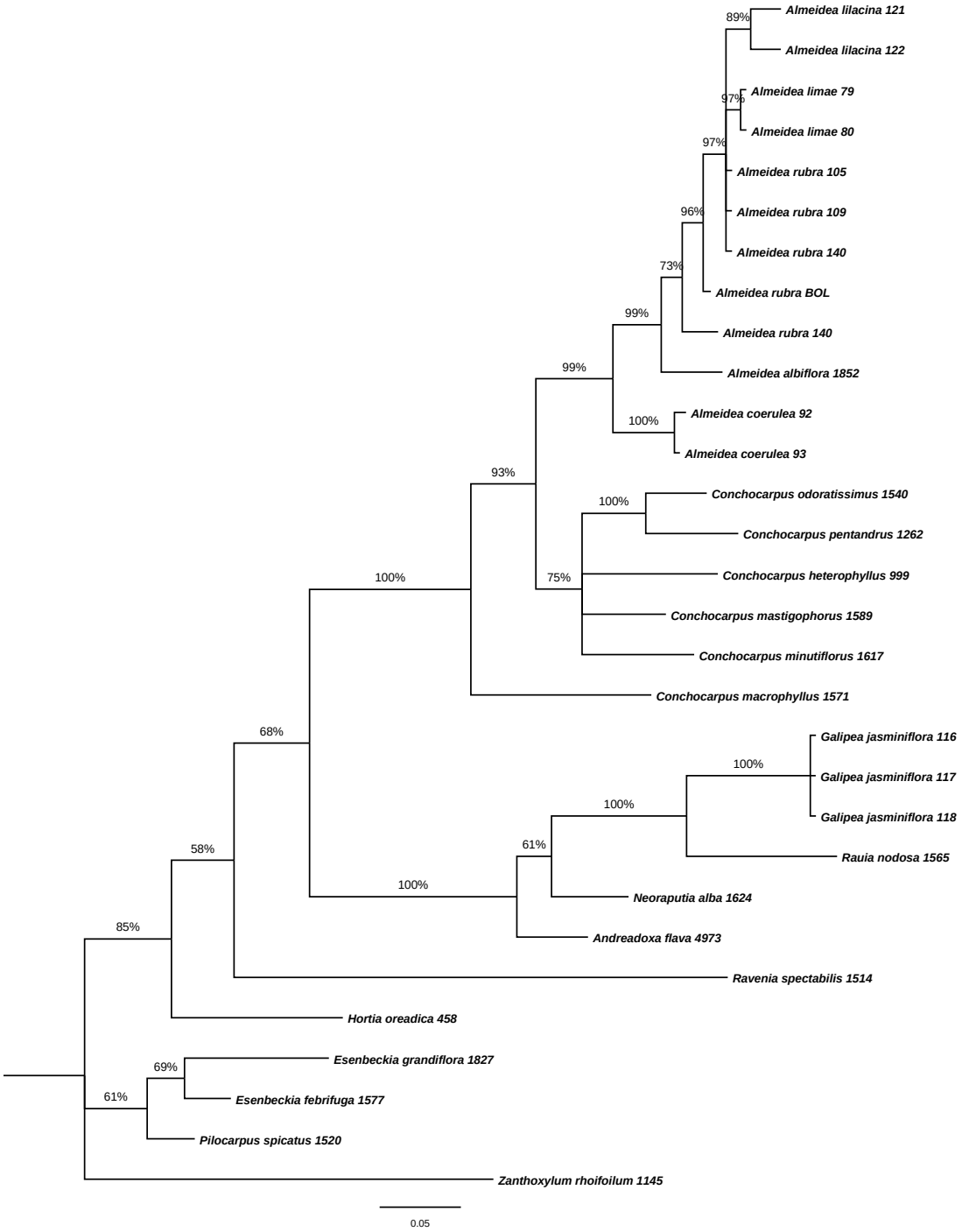

Fig. 28: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de ITS-1 (análise por indivíduos); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

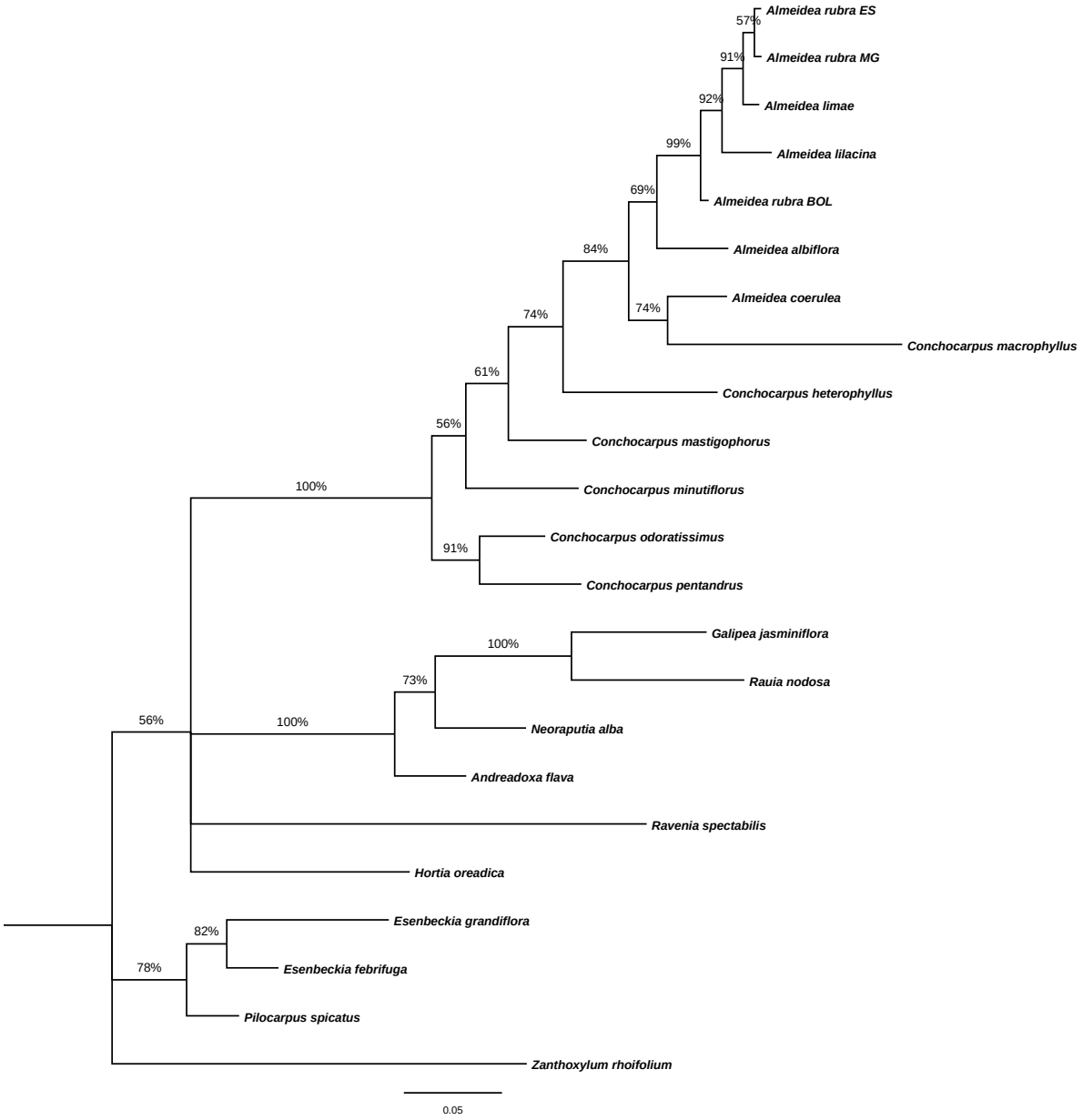

Fig. 29: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de ITS-1 (análise reduzida); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

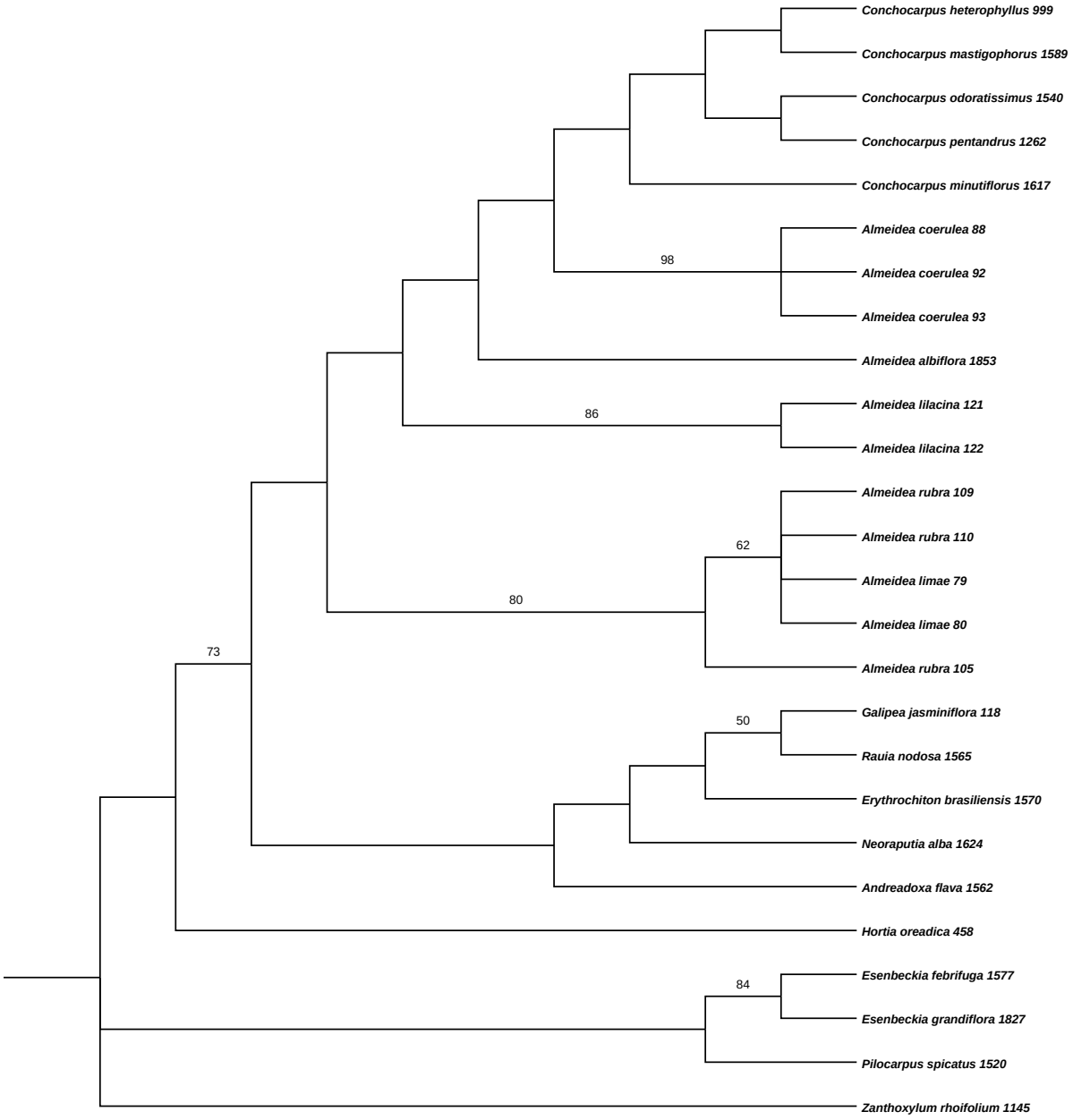

Fig. 30: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de ITS-2 (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

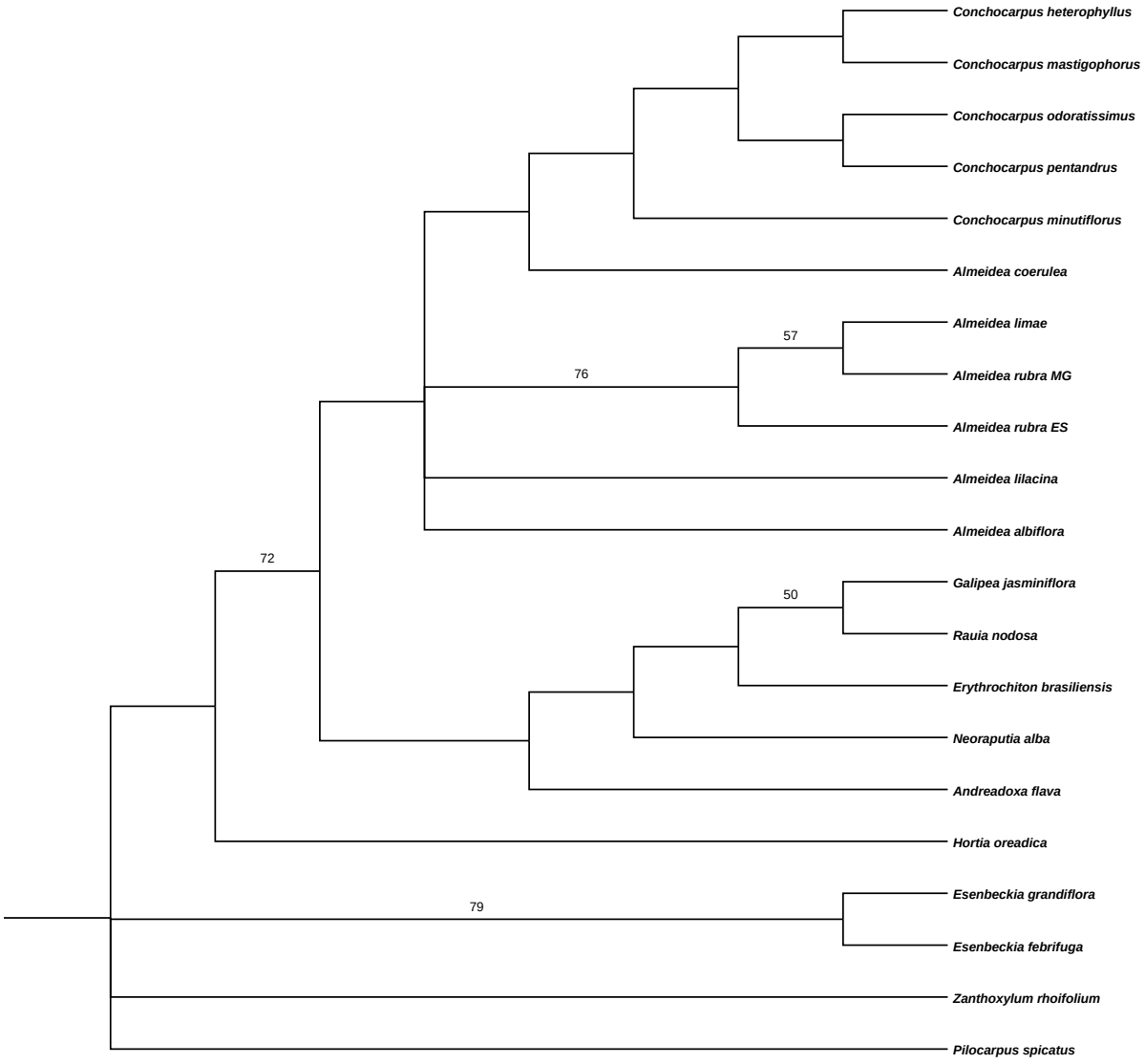

Fig. 31: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências de ITS-2 (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

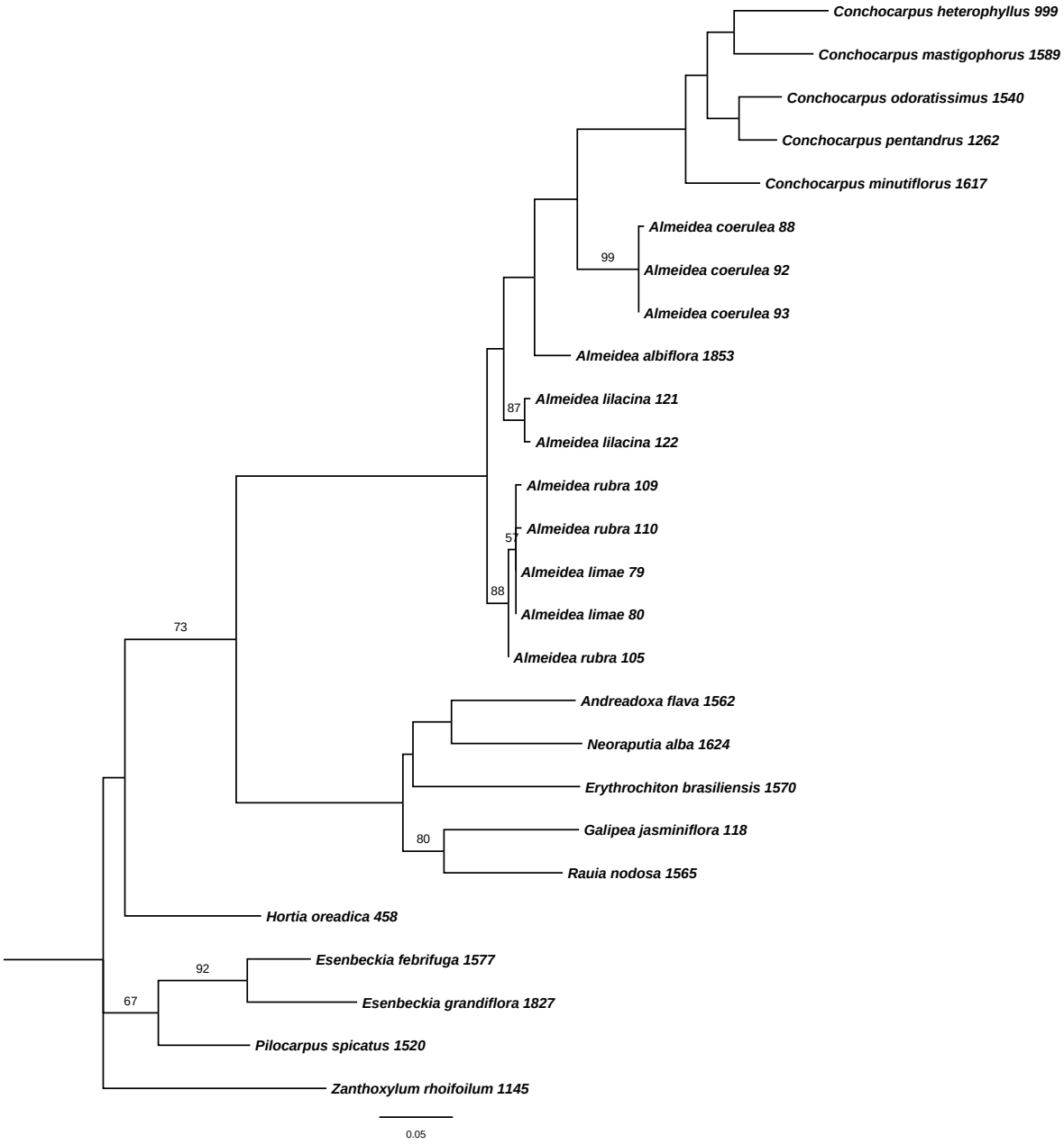

Fig. 32: Árvore ótima de máxima verossimilhança (1ª de duas; -ln*L* = 2371.43131) de seqüências de ITS-2 (análise por indivíduos); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

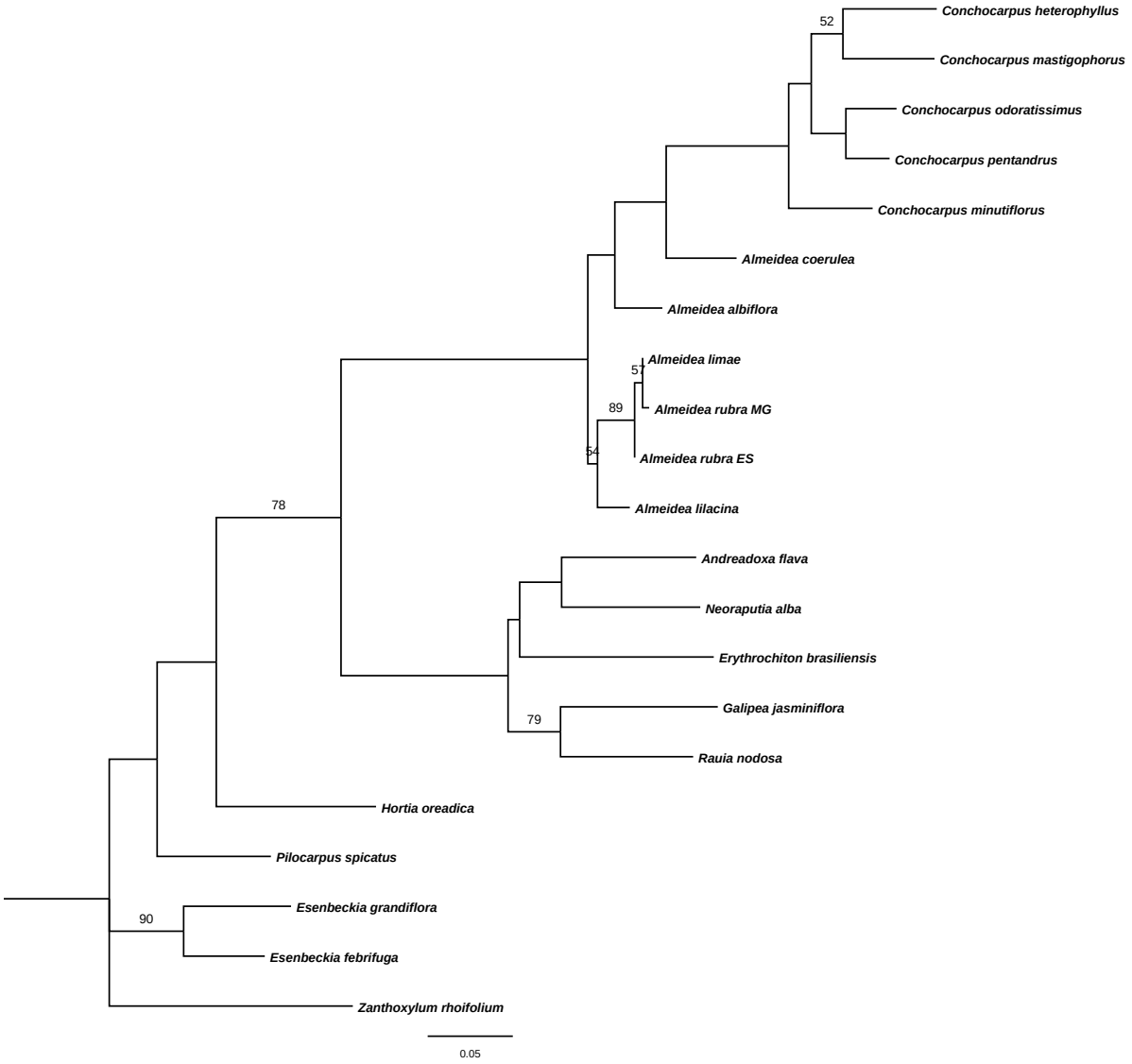

Fig. 33: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 2311.78098) de seqüências de ITS-2 (análise reduzida); valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

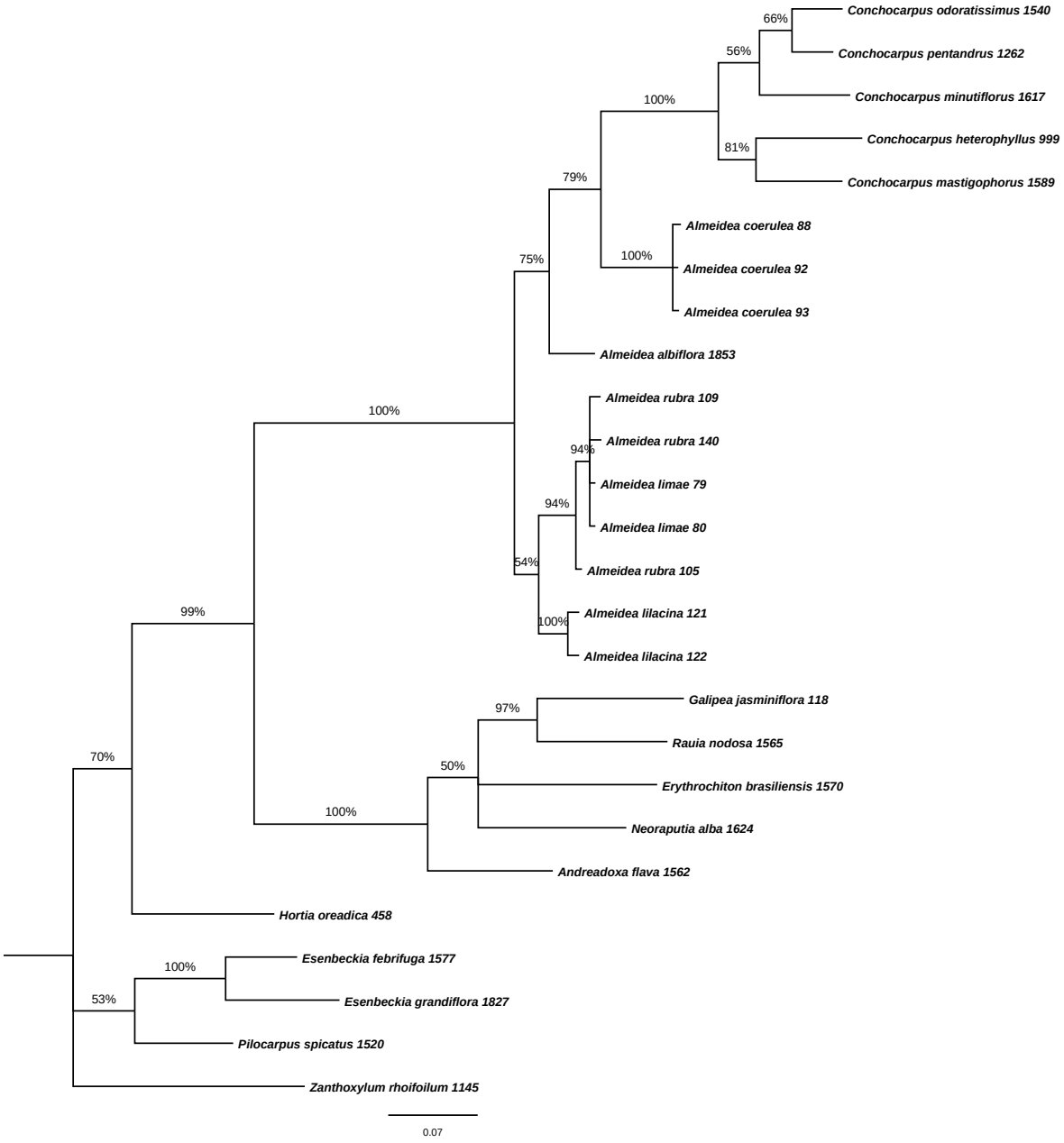

Fig. 34: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de ITS-2 (análise por indivíduos); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

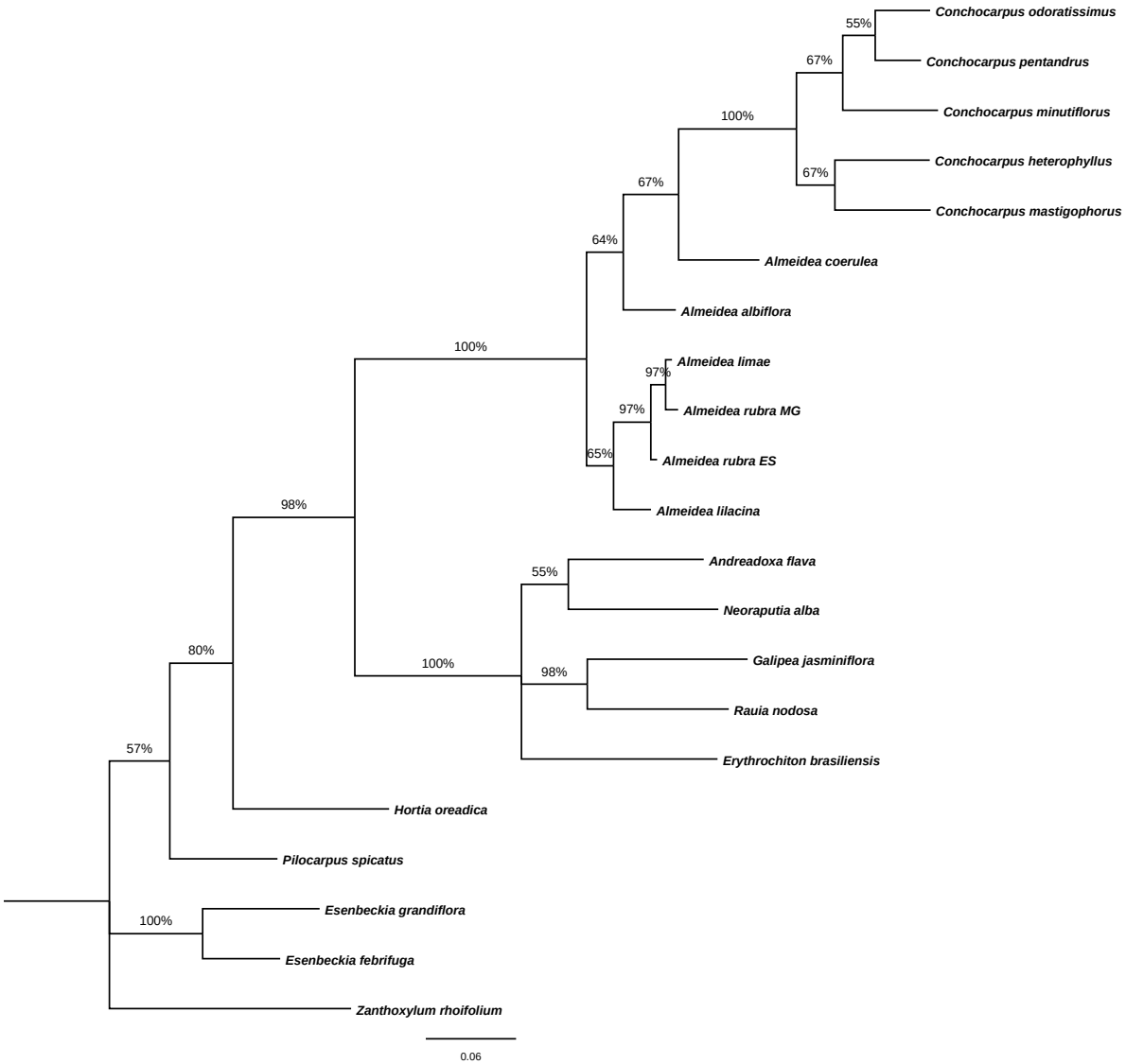

Fig. 35: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências de ITS-2 (análise reduzida); valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

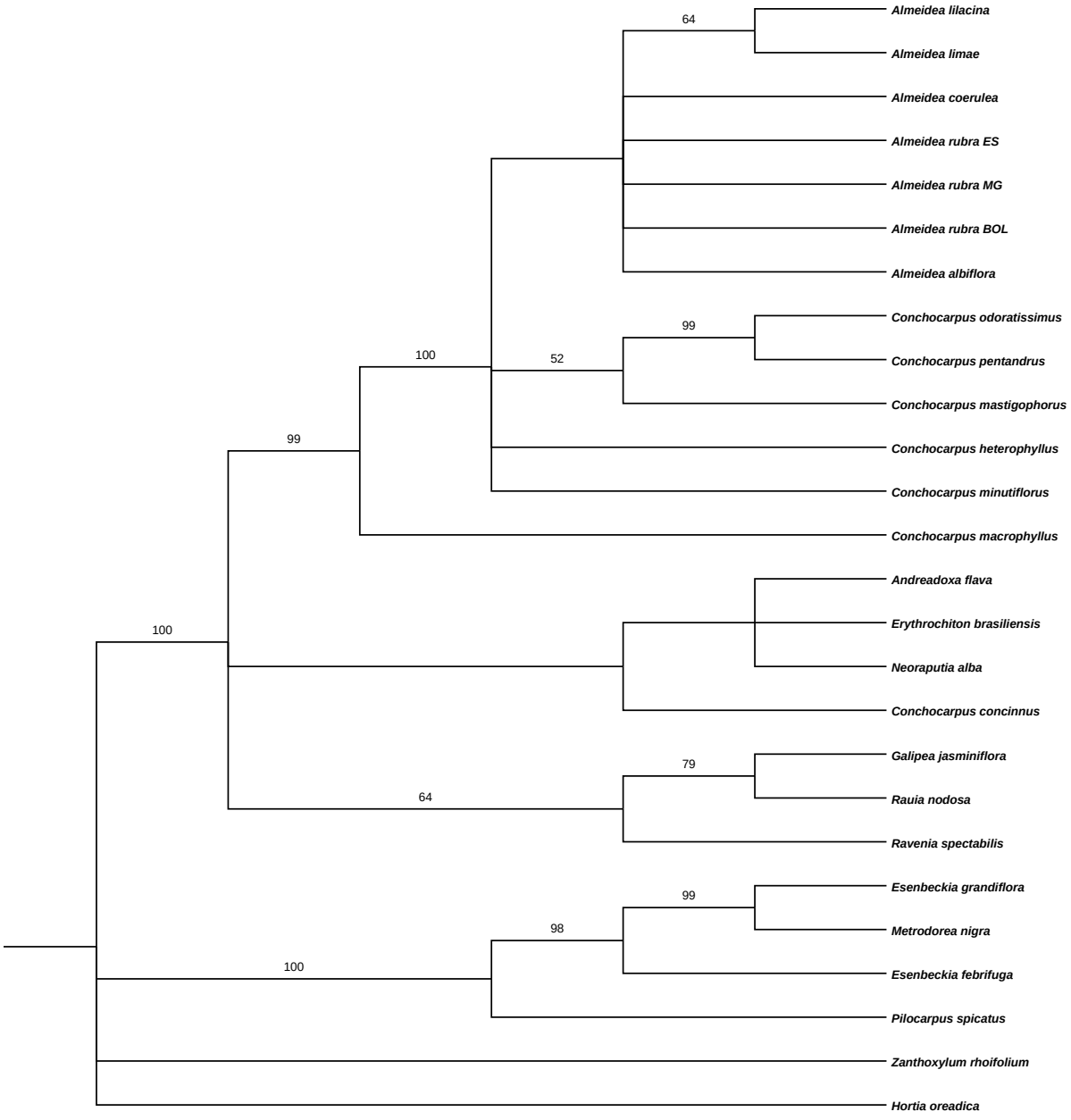

Fig. 36: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências combinadas de *trnL-trnF* e *rps-16*; valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

Fig. 37: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 6186.36336) de seqüências combinadas de *trnL-trnF* e *rps-16*; valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

Fig. 38: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências combinadas de *trnL-trnF* e *rps-16*; valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

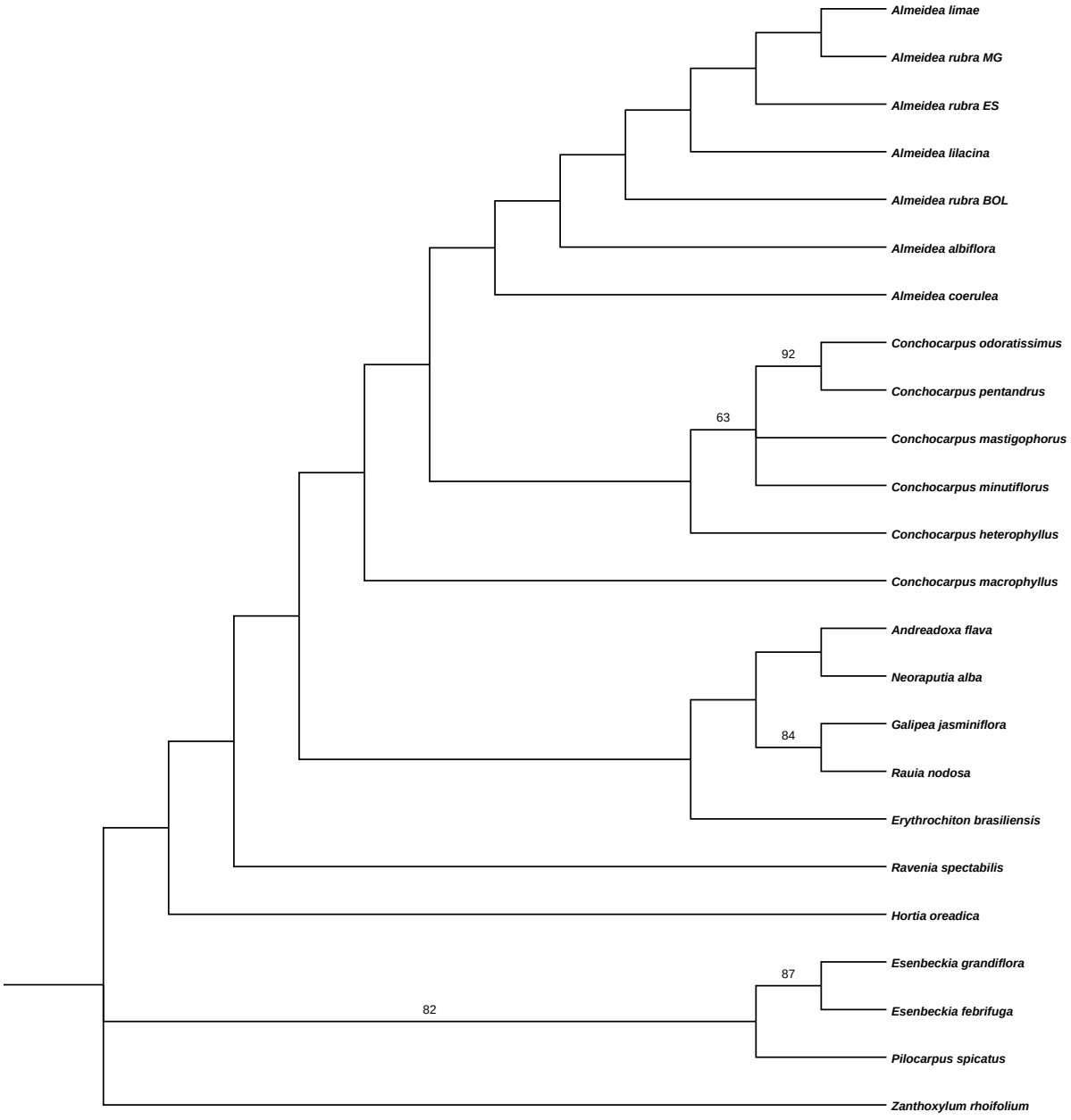

Fig. 39: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências combinadas de ITS-1 e ITS-2; valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

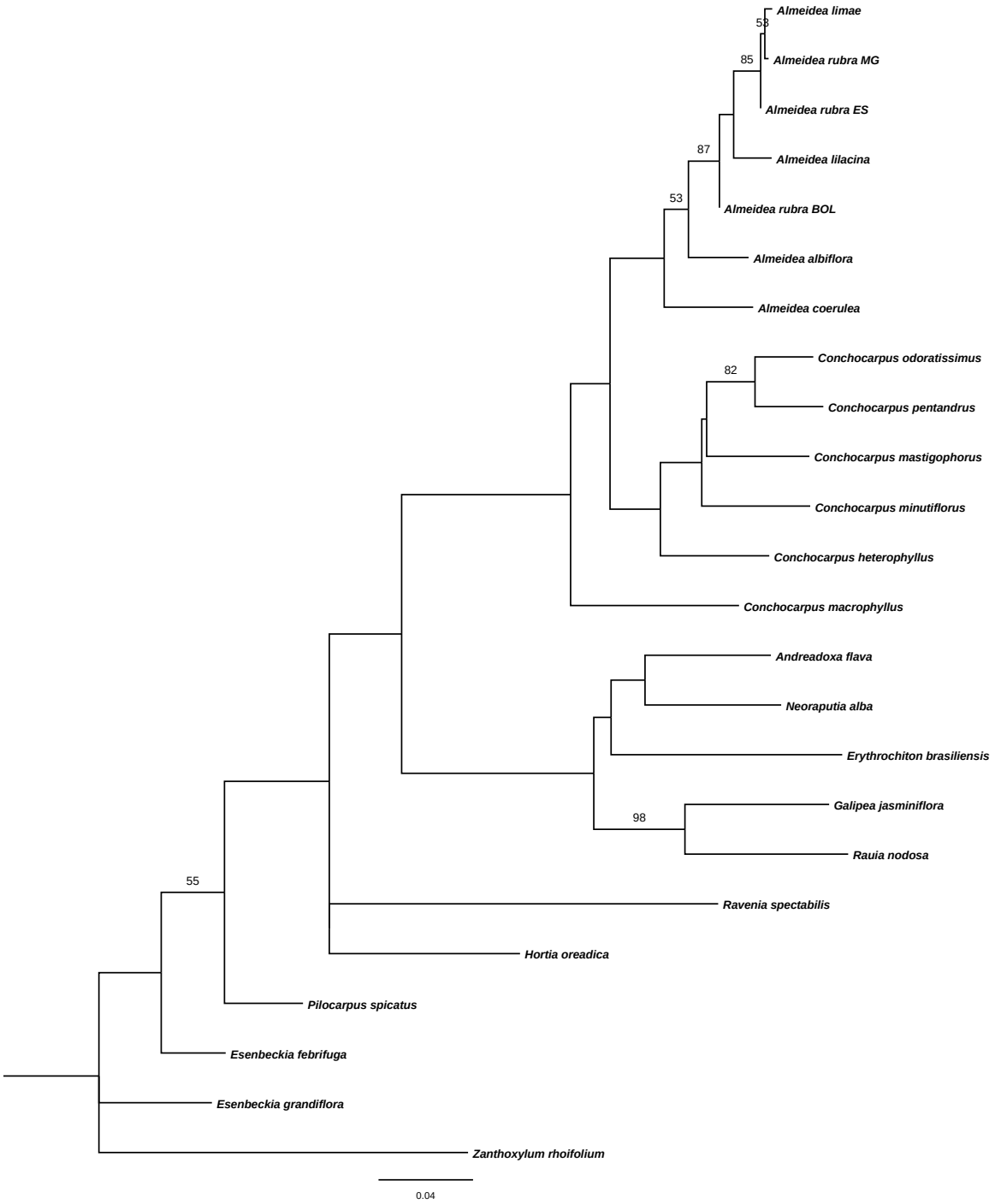

Fig. 40: Árvore ótima de máxima verossimilhança (1ª de três; -ln*L* = 5188.81234) de seqüências combinadas de ITS-1 e ITS-2; valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

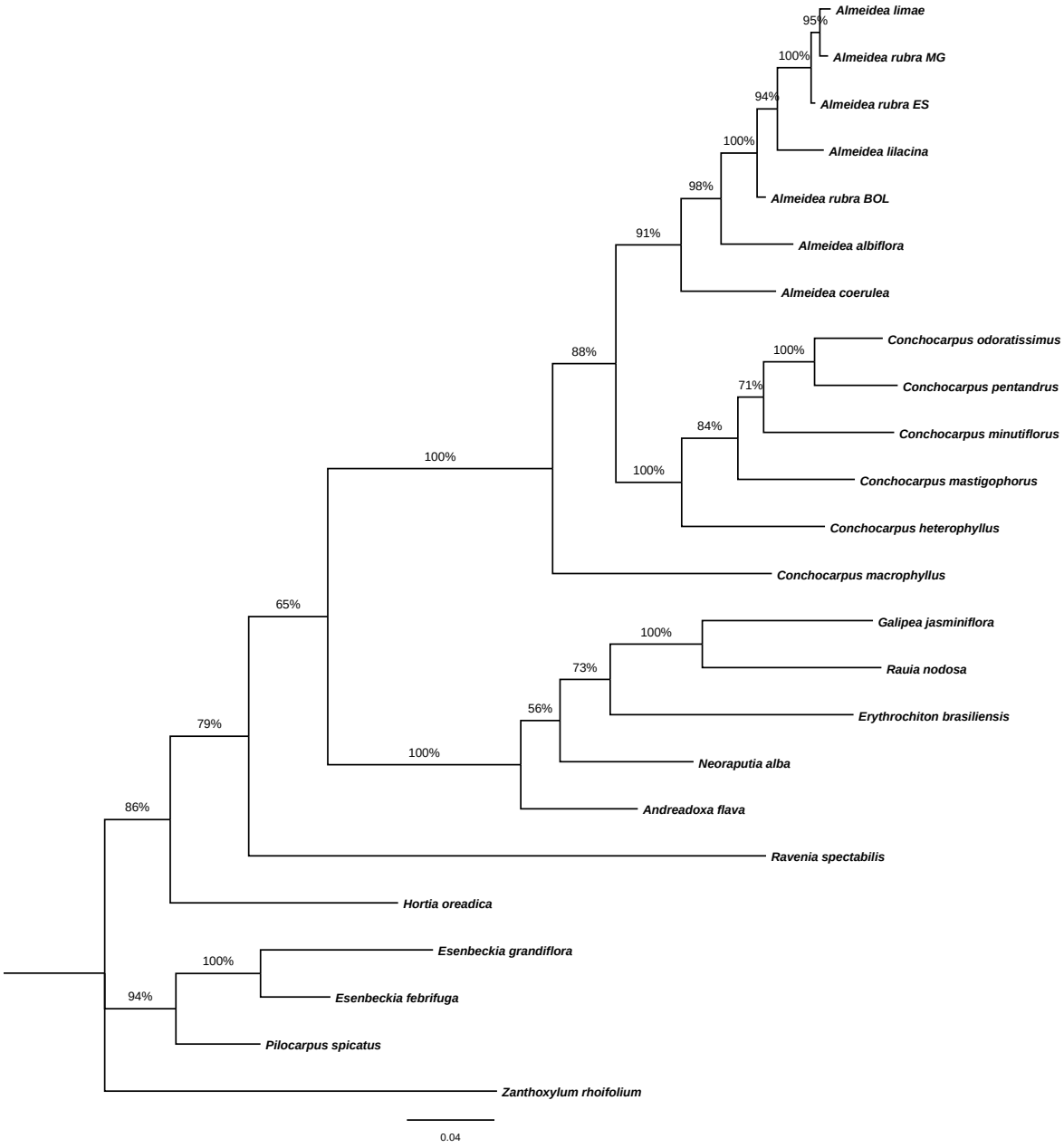

Fig. 41: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências combinadas de ITS-1 e ITS-2; valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

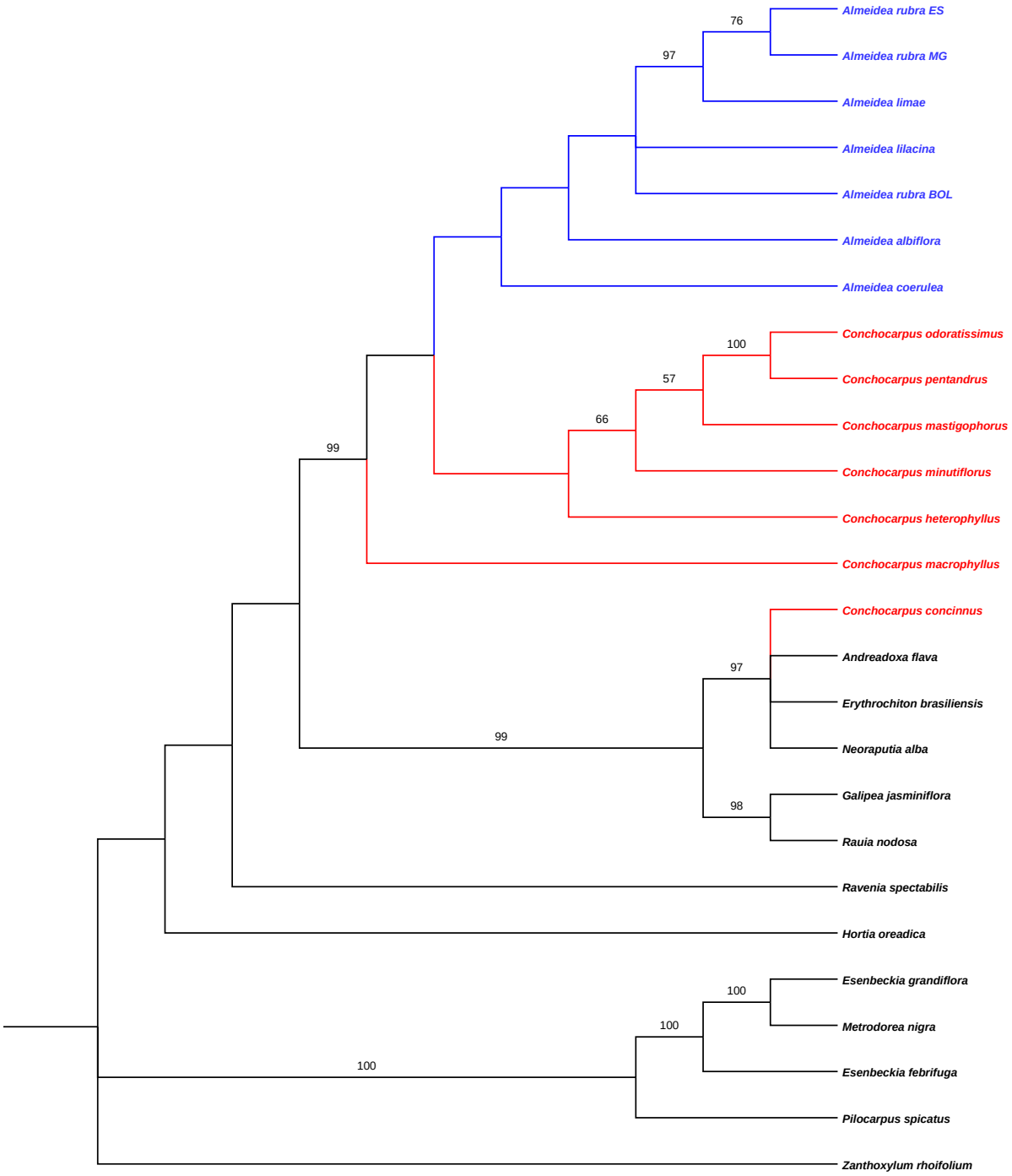

Fig. 42: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências combinadas de *trnL-trnF*, *rps-16*, ITS-1 e ITS-2; valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

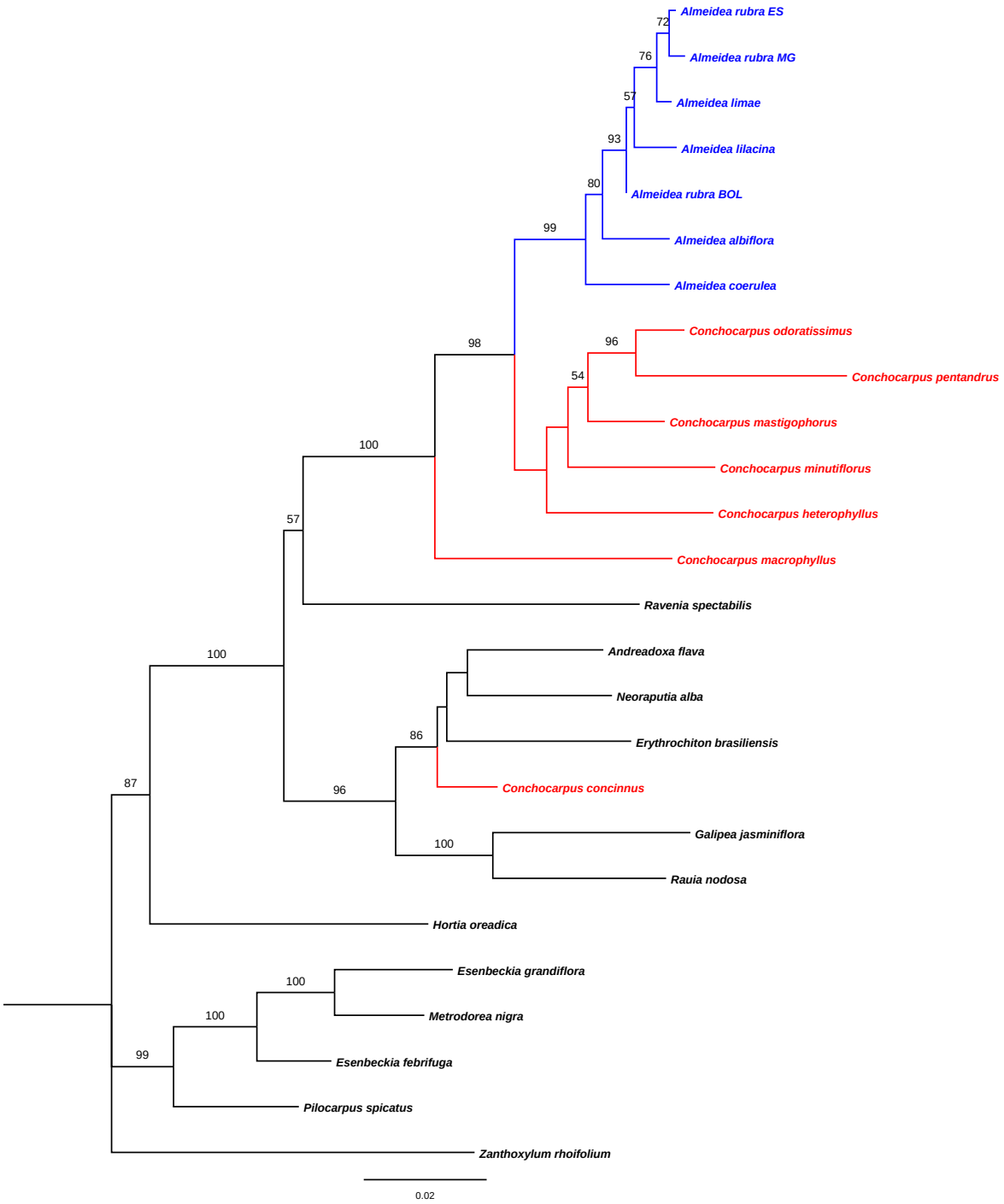

Fig. 43: Árvore ótima de máxima verossimilhança (-ln*L* = 11786.13933) de seqüências combinadas de *trnL-trnF*, *rps-16*, ITS-1 e ITS-2; valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos da árvore ótima. A escala indica número de substituições/sítio.

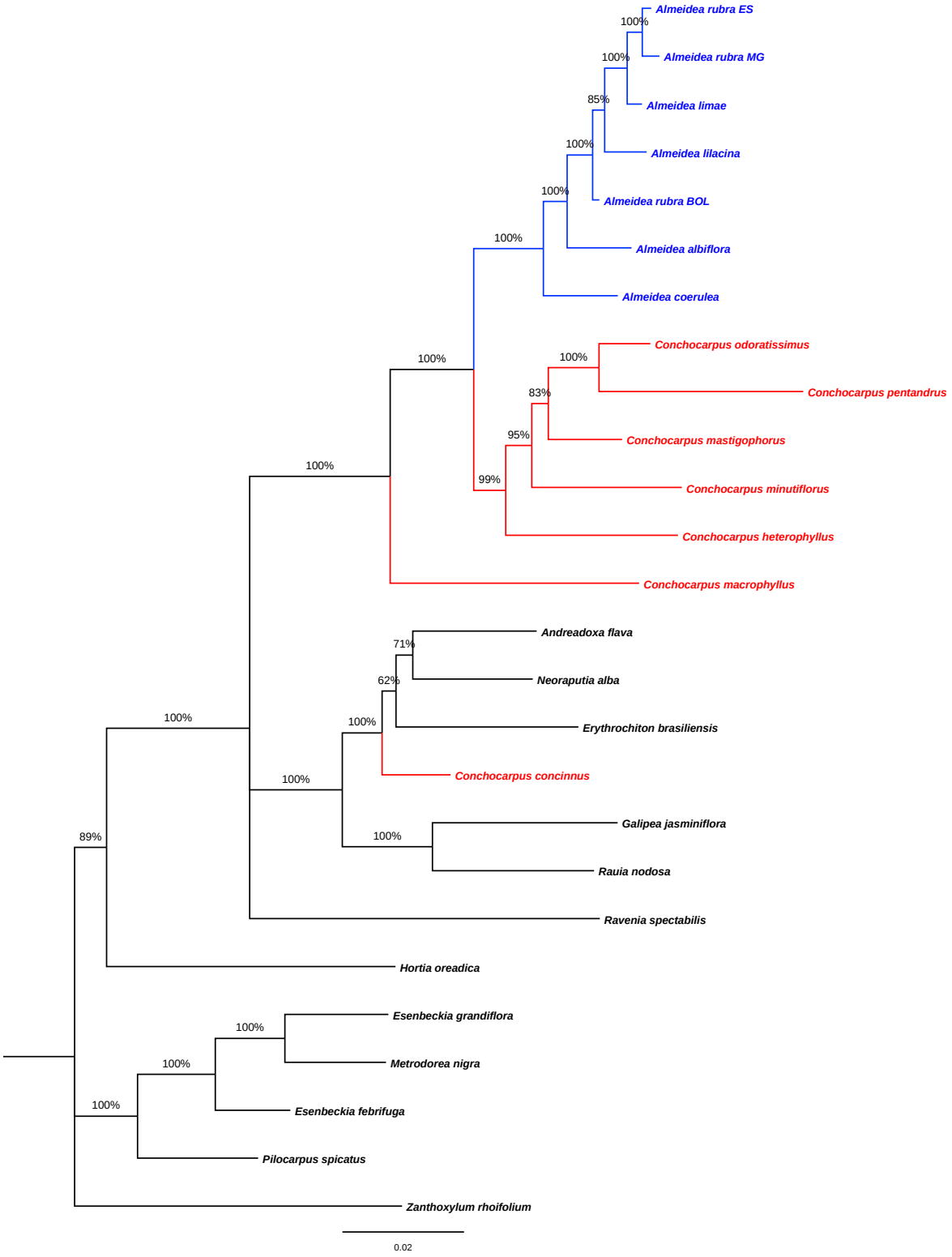

Fig. 44: Filograma obtido por análise bayesiana de seqüências combinadas de *trnL-trnF*, *rps-16*, ITS-1 e ITS-2; valores de probabilidades posteriores bayesianas indicados acima dos ramos. A escala indica número de substituições/sítio.

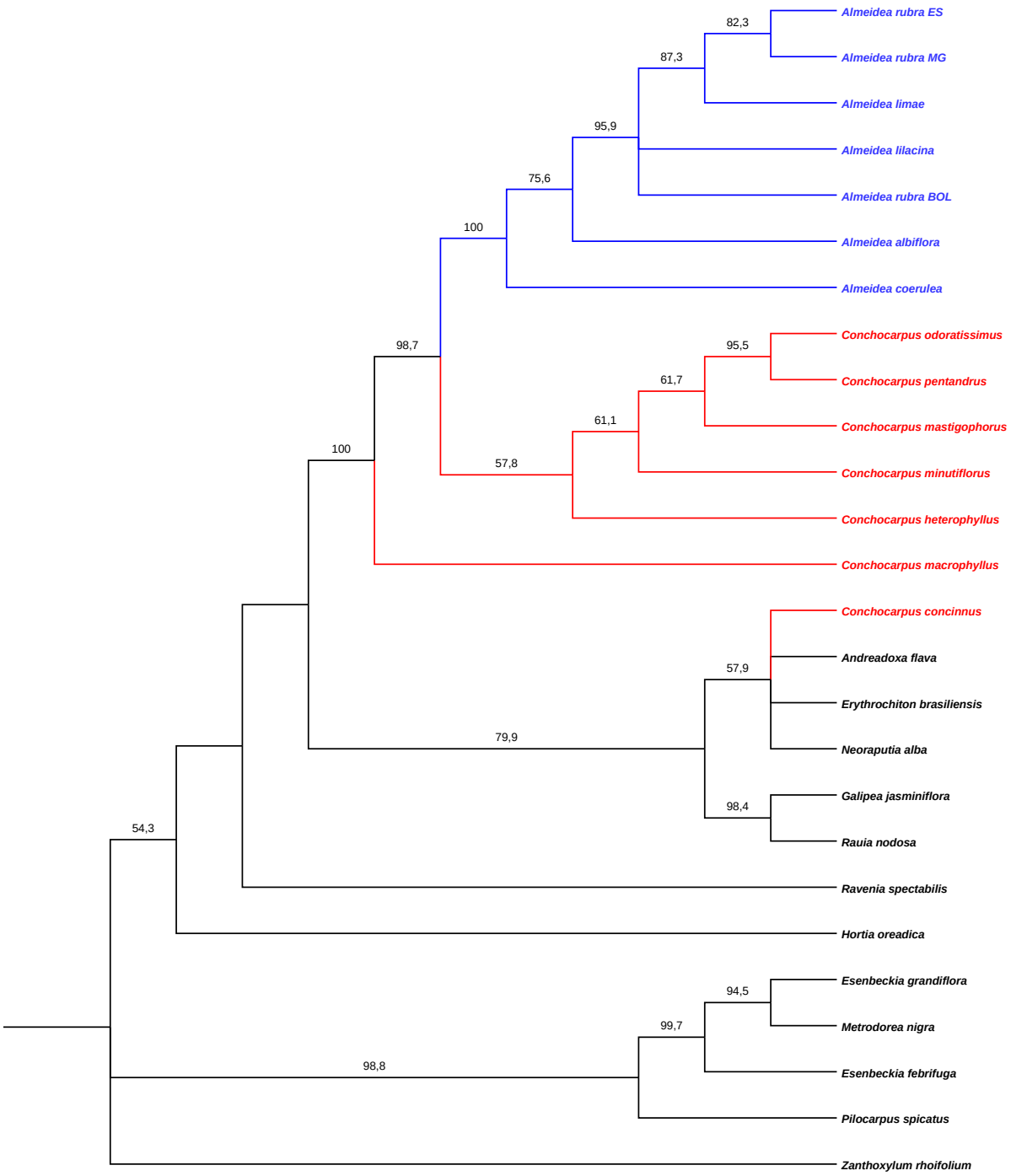

Fig. 45: Árvore de consenso estrito por análise de máxima parcimônia de seqüências combinadas de *trnL-trnF*, *rps-16*, ITS-1 e ITS-2 e de dados morfológicos; valores de *bootstrap* indicados acima dos ramos com suporte acima de 50% e concordantes com os ramos do consenso estrito.

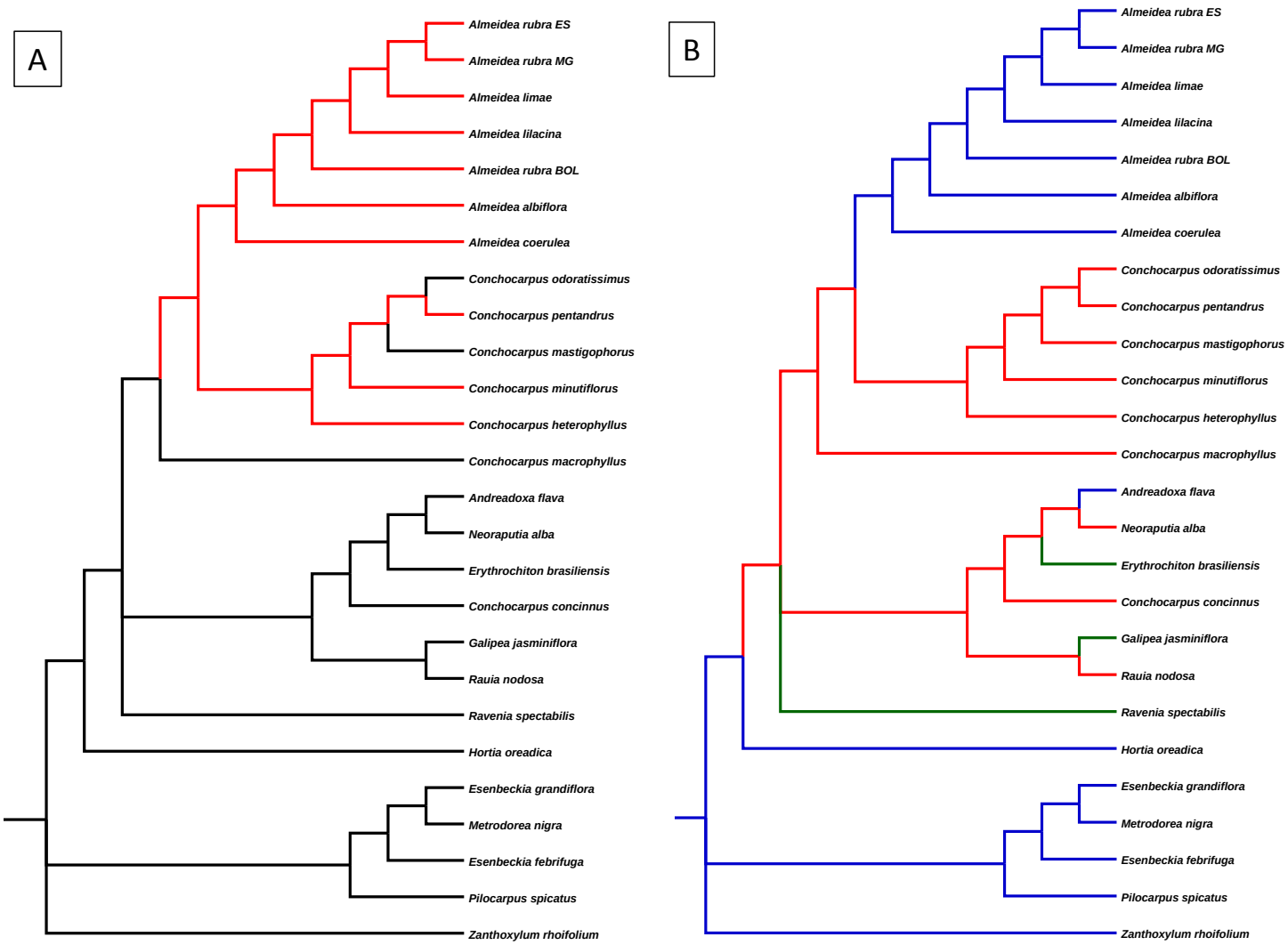

Fig. 46. Mapeamento de caracteres morfológicos em uma árvore de análise combinada de dados moleculares representada pela Fig. 44. **A.** Mapeamento do caracter 7 ("nectário" no ápice dos lobos do cálice): ramos pretos indicam ausência da estrutura e ramos vermelhos indicam presença da estrutura. **B.** Mapeamento do caracter 11 (união das pétalas até a parte mediana da flor): ramos azuis indicam pétalas livres, ramos vermelhos pétalas coerentes e ramos verdes pétalas conatas.

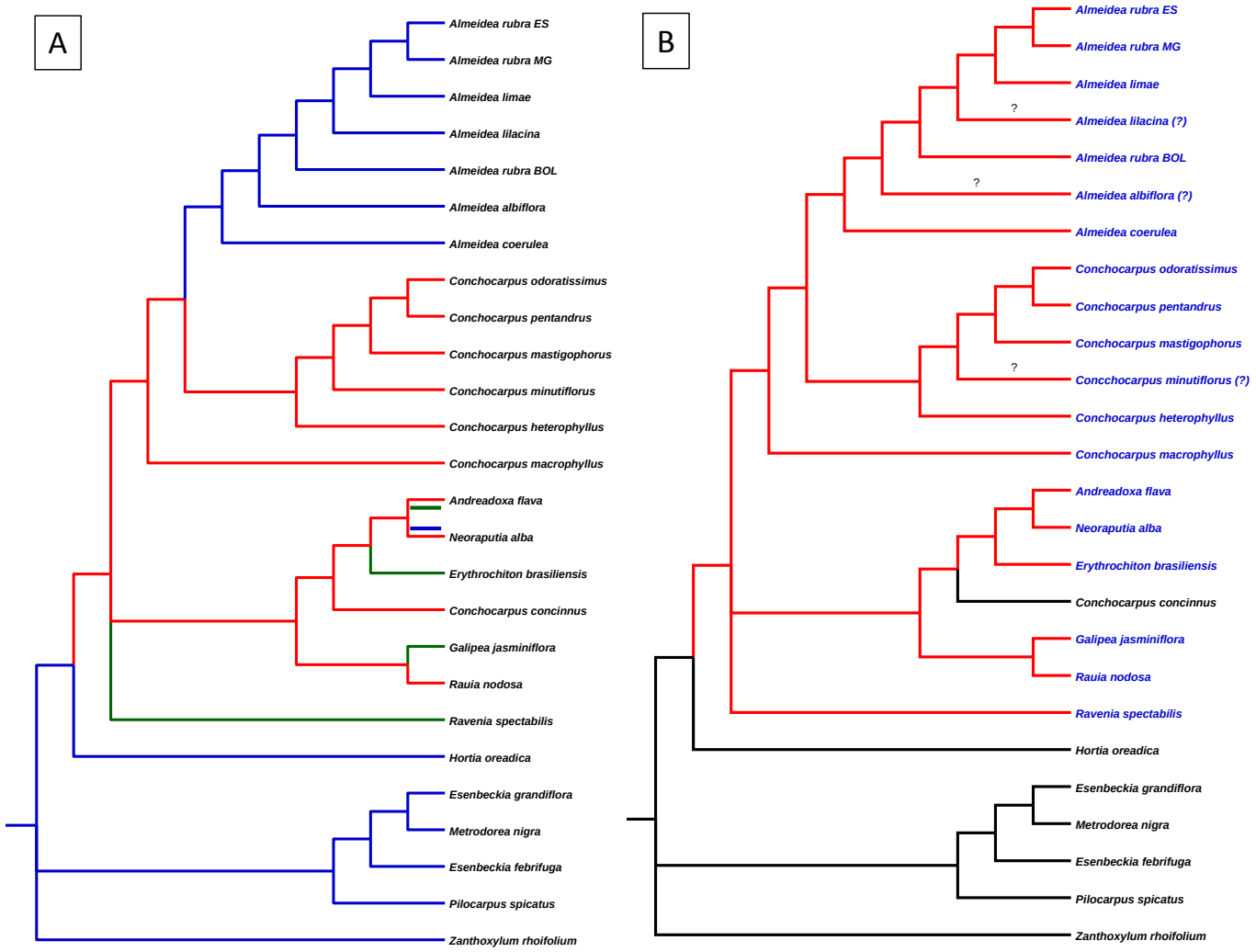

Fig. 47. Mapeamento de caracteres morfológicos em uma árvore de análise combinada de dados moleculares representada pela Fig. 44. **A.** Mapeamento do caracter 15 (união das pétalas e filetes até a parte mediana da flor): ramos azuis indicam pétalas e filetes livres entre si, ramos vermelhos indicam aderência entre pétalas e filetes e ramos verdes indicam adnação entre pétalas e filetes. **B.** Mapeamentos dos caracteres 34 (formato do embrião) e 35 (soldadura dos cotilédones): ramos pretos indicam embrião reto e ramos vermelhos embrião curvo; táxons em preto indicam cotilédones não conduplicados e táxons em azul indicam cotilédones conduplicados.

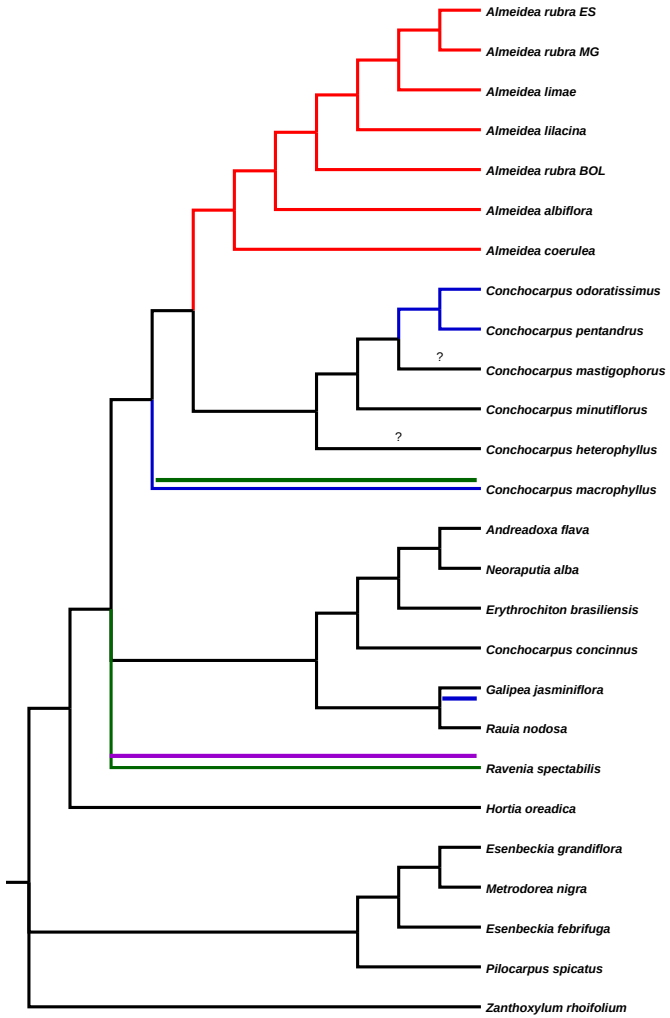

Fig. 48. Mapeamento de caracteres morfológicos em uma árvore de análise combinada de dados moleculares representada pela Fig. 44. O caracter 39 (número de aberturas do pólen) está mapeado nesta figura. Ramos em preto indicam três aberturas, ramos em azul indicam quatro aberturas, ramos em verde indicam cinco aberturas, ramo em lilás indica seis aberturas e ramos em vermelho indicam mais de seis aberturas.

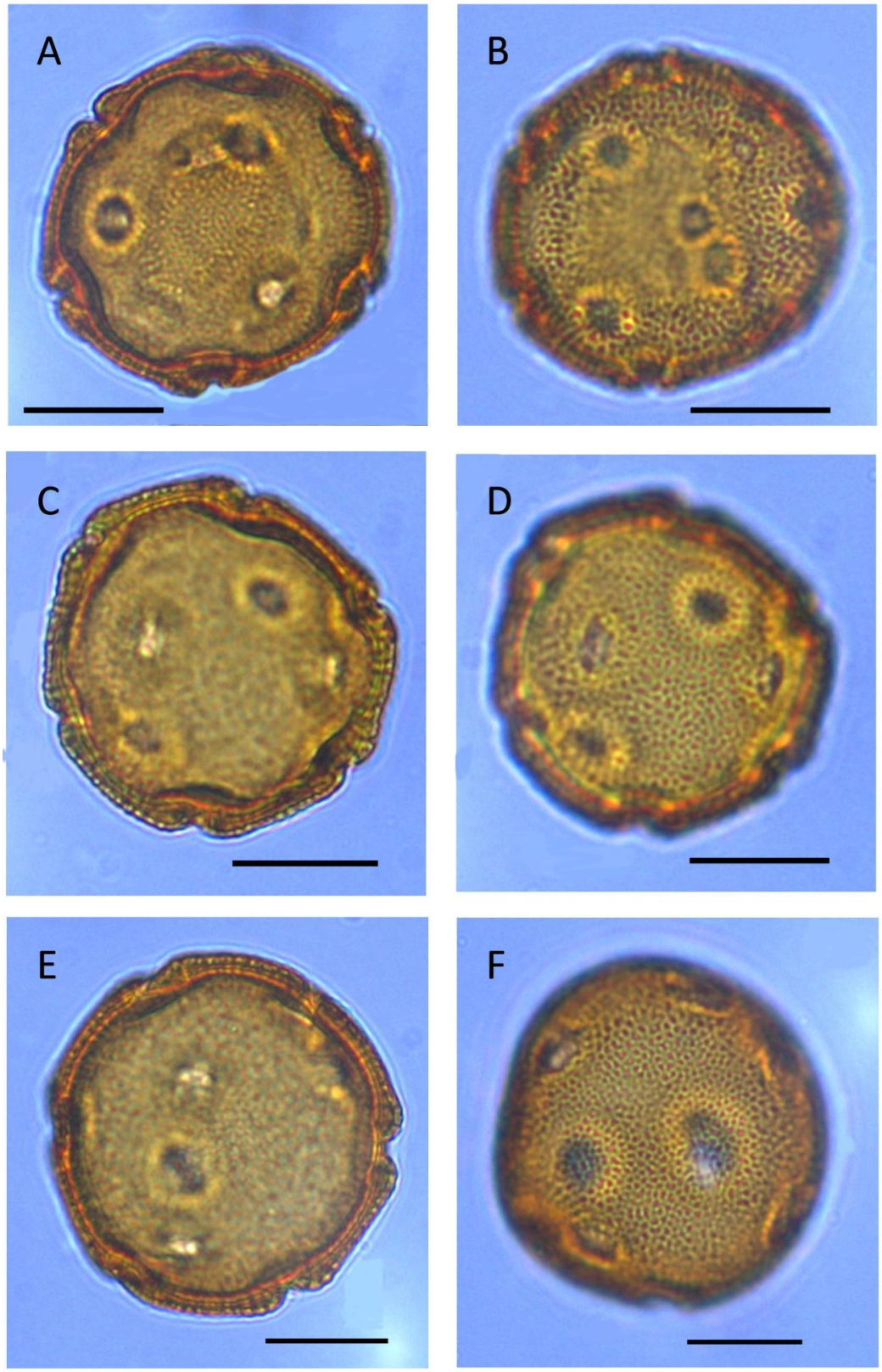

Fig. 49. A-B. *Almeidea albiflora*. C-D. *Almeidea coerulea*. E-F. *Almeidea lilacina*. A, C e E. Vista geral do grão, mostrando aberturas. B, D e F. Vista geral do grão, mostrando exina reticulada (Barras de escala = 20µm).

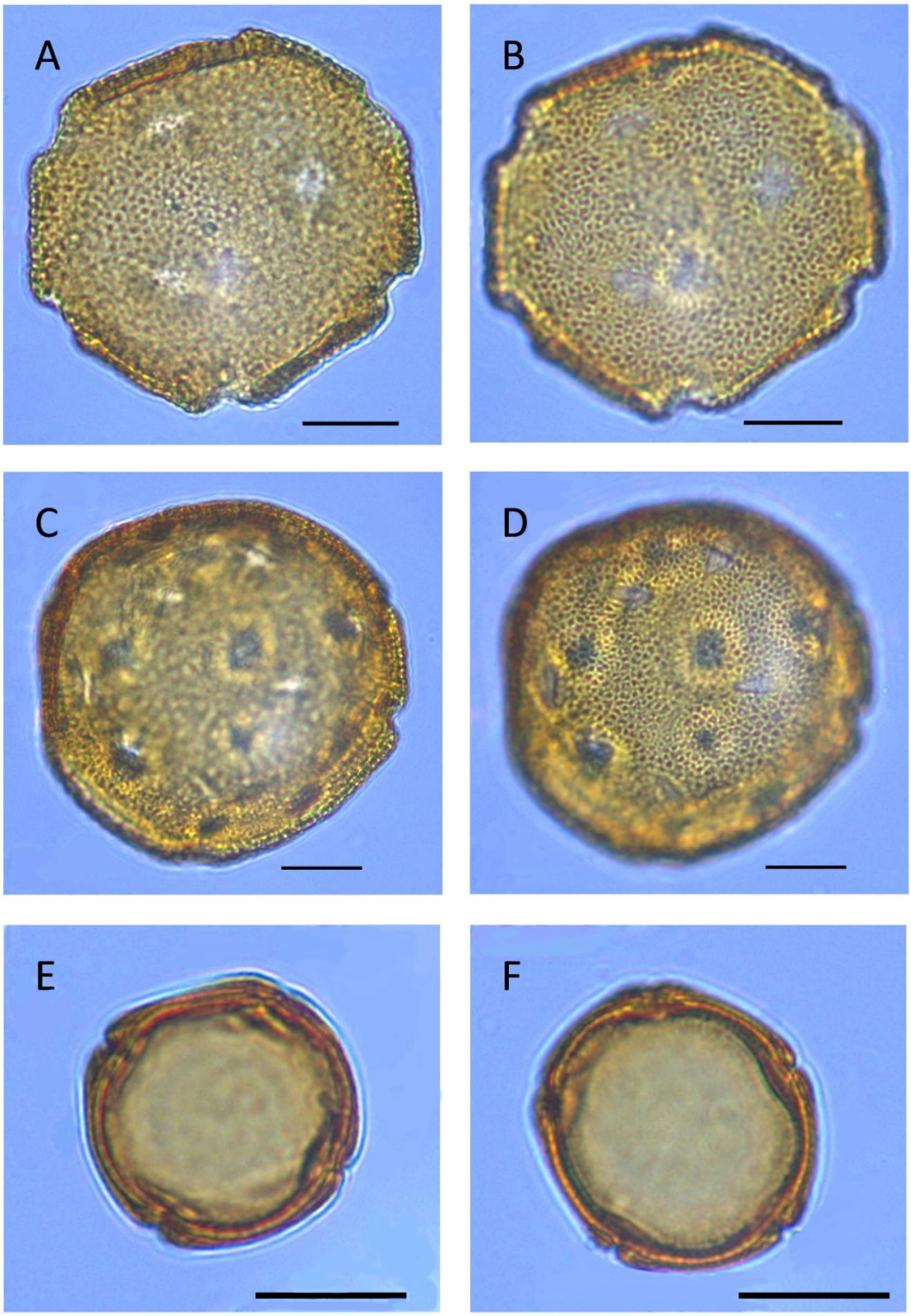

Fig. 50. A-B. *Almeidea limae*. C-D. *Almeidea rubra*. E-F. *Conchocarpus macrophyllus*. A e C. Vista geral do grão, mostrando aberturas. B e D. Vista geral do grão, mostrando exina reticulada. E. Vista polar do grão, mostrando 4 aberturas. F. Vista polar do grão, mostrando 5 aberturas (Barras de escala = 20µm).

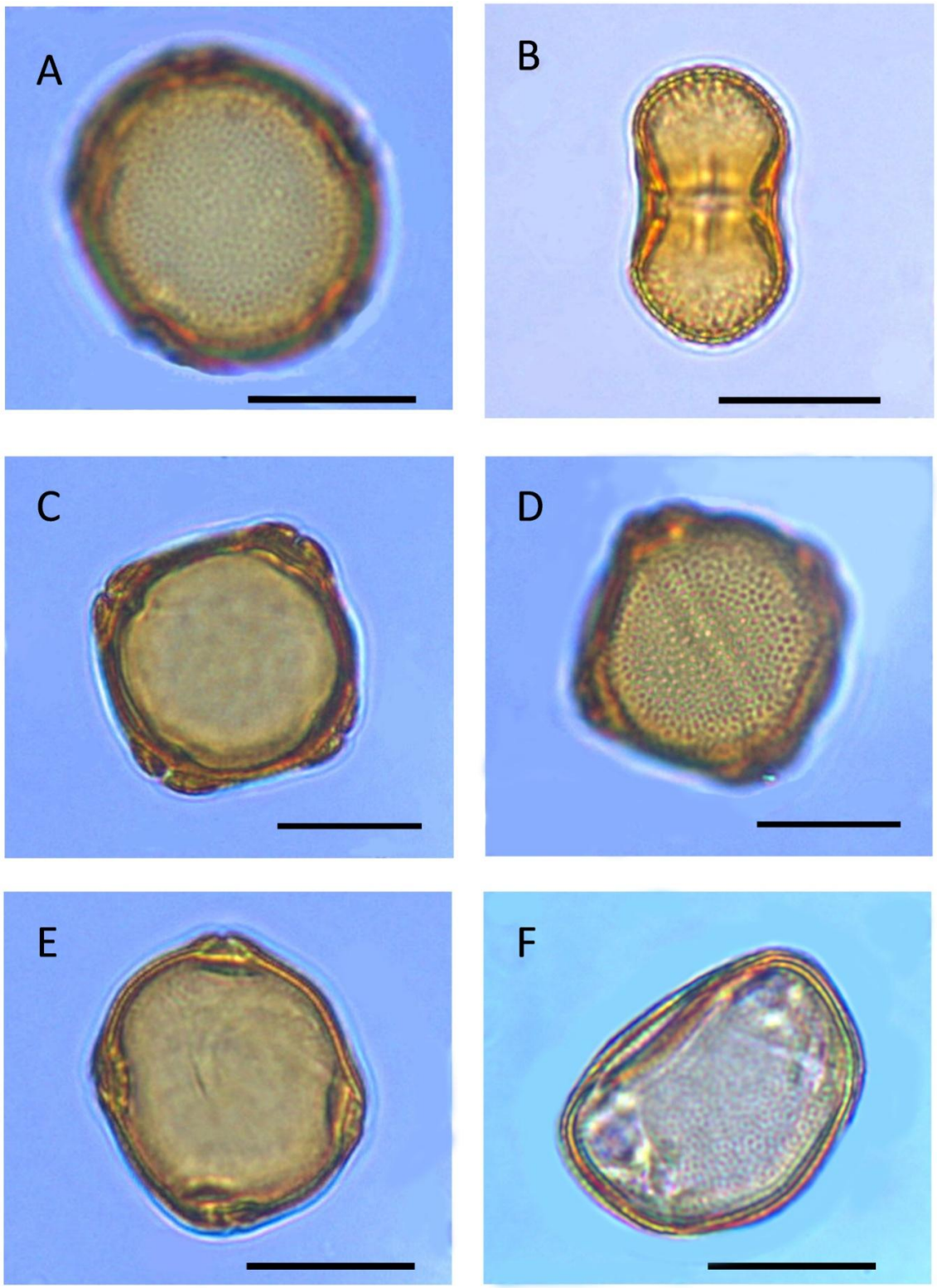

Fig. 51. A. *Conchocarpus macrophyllus*. B. *Conchocarpus minutiflorus.* C-D. *Conchocarpus odoratissimus*. E-F. *Conchocarpus pentandrus*. A. Vista polar do grão, mostrando exina reticulada. B. Vista equatorial do grão, mostrando aberturas e exina reticulada. C. Vista polar do grão, mostrando 4 aberturas. D. Vista polar do grão, mostrando exina reticulada. E. Vista polar do grão, mostando 4 aberturas. F. Vista equatorial do grão, mostrando aberturas e exina reticulada (Barras de escala = 20µm).

Apêndices

Apêndice A

Lista de espécimes utilizados para caracterização morfológica

(Foi incluído nesta lista apenas o nome abreviado do primeiro coletor citado no material examinado, com seu respectivo número de coleta e herbário(s)depositado(s)).

Almeidea albiflora Bruniera & Groppo, sp nova inédita

D. Araujo 6012 (GUA, NY), M. Groppo 1851[1], 1852, 1853, 1861 (SPFR), J. Kallunki 595 (NY), J.R. Pirani 1130 (SPF, SPFR)

Almeidea coerulea (Nees & Mart.) A. St.-Hil.

A.M. Amorim 927, 1299, 1669, 2649 (CEPEC), C.P. Bruniera 88, 92, 93, 97, 98 (SPFR), A.M. de Carvalho 3422, 4128, 4558 (CEPEC), R.M. Harley 18427 (CEPEC, NY), J.G. Jardim 1770 (CEPEC, NY), 4100 (CEPEC), J.A. Kallunki 494 (NY, SPF), 682 (NY), S. Mori 11749 (CEPEC, NY), T.S. Nunes 995 (HUEFS, SPF), J.L. Paixão 231 (CEPEC), J.R. Pirani 2747 (SPF), S.C. de Sant'Ana 599 (CEPEC), W. Thomas 7457, 8084, 9200, 9757 (NY), 9525, 9796, 11856 (CEPEC, NY), 9775 (NY, SPF)

Almeidea lilacina A. St.-Hil.

E. de Amaral s.n. (SP), J.E.A. Bertoni 309 (SPF), C.P. Bruniera 121, 122, 124 (SPF), R.B. Cardamone 176 (SPF), J. Kallunki 596 (NY, SPF), L.S. Leoni s.n. (GFJP, SPF), K. Santos 5 (SPF), Serviço Florestal do Estado de São Paulo 35 (SP), D. Sucre II.222 (RB), J. Vasconcellos Neto 6055 (RB)

Almeidea limae I.M.Silva

J.M.A. Braga 4783 (RB), C.P. Bruniera 79, 80, 81 (SPFR), L.C. Giordano 107 (RB), R. Guedes 2232, 2233 (RB, SPF), H.C. de Lima 2215 (RB, SPFR), 4380 (RB, SPF), G. Martinelli 9904, 9999 (RB), 10119 (RB, SPF, SPFR), M. Peron 897 (RB)

Almeidea rubra A. St.-Hil.

A.C. Brade 18435 (NY, RB, SPFR), C.P. Bruniera 142, 151 (SPFR), L.V. Costa s.n. (BHCB, SPF), V. Demuner 942 (MBML, SPFR), G.L. Farias 118 (NY), D. Fernandes 205 (RB), P. Fiaschi 2275 (CEPEC), G.S. França 485 (BHCB), G. Hatschbach 42571 (MBM, SPF), 33752 (MBM, RB, SP, UPCB), 61481 (MBM, RB), 68883 (ALCB, MBM, UPCB), J.G. Jardim 2090 (CEPEC, NY), H.C. de Lima 5289 (RB), 6090 (NY, RB), R. Marquete 2856 (RB), J. Ordones s.n. (BHZB, SPFR), S.V.A. Pessoa 1113 (RB, SPFR), J.R. Pirani 3395 (RB, SPF), 3415 (SPF), L.P. de Queiroz 10706

(HUEFS, SPF), D. Sucre 10098 (RB), L.G. Temponi 10 (BHCB), W.W. Thomas 10248 (NY), P.C. Vinha 1205 (SPF)

Almeidea rubra A. St.-Hil. (Bolívia)

A. Araujo-M. 1987 (MO, NY), 2032, 2168, 2191 (MO, SPF), L. Cayola 1769, 2094 (MO, SPF), N. Helme 127 (LPB, NY), M. Macia 7629 (MO, NY), R. Seidel 2241 (LPB, NY)

Andreadoxa flava Kallunki

M. Groppo 1562 (SPFR), T.S. dos Santos 4587, 4588 (CEPEC)

Conchocarpus concinnus Kallunki

C.P. Bruniera 102 (SPFR), M. Groppo 1610, 1613 (SPFR), J.G. Jardim 254 (CEPEC), J.A. Kallunki 686 (CEPEC, NY), L.A. Mattos Silva 1480, 1690 (CEPEC, SPF), J.R. Pirani 2943 (SPF)

Conchocarpus heterophyllus (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani

D. Cardoso 769 (HUEFS), M.A.A. Costa 97, 98 (ALCB), G. Hatschbach 71549 (CEPEC, MBM), J.A. Kallunki 394 (CEPEC, NY), M.A.B.L. Machado 122 (ALCB, MAC), E. Melo 3217 (HUEFS), J.R. Pirani 2893 (HUEFS, SPF), L.P. Queiroz 9908 (HUEFS), N.P. Taylor 1577 (CEPEC)

Conchocarpus macrophyllus J.C.Mikan

R.A.X. Borges 836 (CEPEC), C.P. Bruniera 83, 85 (SPFR), D. Cardoso 786 (CEPEC, HUEFS), P. Fiaschi 1283 (CEPEC), M. Groppo 1515, 1532, 1571, 1574, 1627 (SPFR), W.W. Thomas 12358, 14498 (CEPEC, NY).

Conchocarpus mastigophorus Kallunki

A.M. de Carvalho 3421 (CEPEC, SPF), 3590 (ALCB, CEPEC, SPF), 4401 (CEPEC, SPF), M. Groppo 1589, 1590 (SPFR), J.A. Kallunki 495 (NY, SPF), 527 (NY, SPF, SPFR)[2], J.R. Pirani 2346 (NY, SPF), W.W. Thomas 9035 (NY, SPF), 9744 (NY, SPF), 10400 (NY, SPF) [2]

Conchocarpus minutiflorus Groppo & Pirani, sp. nova inédita

V. Demuner 543 (MBML, SPF), M. Groppo 1617, 1618 (SPFR), L. Kollmann 4457 (MBML, SPF), J.R. Pirani 4931 (SPF, SPFR)

Conchocarpus odoratissimus (Lindl.) Kallunki & Pirani

A.P. Duarte 5495 (RB, SPF), M. Groppo 1540, 1541, 1542 (SPFR), J.A. Kallunki 714 (NY, SPF), H.C. de Lima 4259, 4278 (RB, SPF), J.R. Pirani 3417, 3440, 3566 (SPF)

Conchocarpus pentandrus (A. St-Hil.) Kallunki & Pirani

L.C. Bernacci 11 (SPFR), M. Groppo 1262, 1449 (SPFR), O. Kotchetkoff-Henriques 649 (SPFR)

Erythrochiton brasiliensis Nees & Mart.

M. Groppo 1569, 1570, 1626 (SPFR), J.G. Jardim 1474, 1873 (CEPEC, SPFR), R.S. Pinheiro 2340 (CEPEC), T.S.S. 1639 (CEPEC)

Esenbeckia febrifuga (A. St.-Hil.) Juss. ex. Mart.

F.A. Cloclet s.n. (FUEL, SPFR), M. Groppo 1577 (SPFR), A.B. Gusman 1531 (SPFR), G. Hatschbach 48544 (MBM, SPF), O. Kotchetkoff-Henriques 645 (SPFR), L.P. de Queiroz 2177 (HUEFS), E.R. Salviani 88 (HPL, SPFR), J.M. Silva 2528 (MBM, SPF), R.A.G. Viani s.n. (FUEL, SPFR), A.E. Yoshida s.n. (FUEL, SPFR), P.C. Zampa s.n. (CESJ, SPF)

Esenbeckia grandiflora Mart.

A.M. de Carvalho 727 (CEPEC), M.C. Ferreira 822 (HRB, SPF), A.M. Giulietti 1664 (CEPEC, HUEFS), M. Groppo 1522, 1578, 1759, 1827 (SPFR), M.L. Guedes 194, 7392, 8062, 8131 (ALCB), J.G. Jardim 1982 (CEPEC), A. Leal-Costa 845 (ALCB), J. Paula-Souza 5260 (ESA, SPFR), R.S. Pinheiro 2143 (CEPEC), J.R. PIrani 2001 (SPF), R.R. Rodrigues s.n. (ESA, SPFR)

Galipea jasminiflora (A. St.-Hil.) Engl.

A.B. Gusman 205 (SPFR), O. Kotchetkoff-Henriques 609, 610, 611, 612 (SPFR), W. Mantovani s.n. (ESA, SPFR)

Hortia oreadica Groppo, Kallunki & Pirani

P.G. Delprete 9425 (SPF), F.T. Farah 380, 449, 569 (ESA, SPF), G.F. Faria 09 (CEN, SPF), M. Groppo 458 (SPF), 846 (SPF), 1355 (SPFR), B.A.S. Pereira 3396 (SPF), G. Pereira-Silva 7927 (CEN, SPF), M.R. Silva 1020 (SPF)

Metrodorea nigra A. St.-Hil.

G.F. Arbocz 1995 (HPL, SPFR), C.P. Bruniera 115 (SPFR), J.S. Carneiro 556 (FUEL, SPF), A.L. Costa s.n. (ALCB), M. Groppo 1111 (SPF), 1529 (SPFR), A.B. Gusman 1485 (SPFR), O. Kotchetkoff-Henriques 651, 652, 653 (SPFR), R.S.C.R. Lima 27 (SPF, SPSF), Pinheiro 1251 (CEPEC), C.V. Roderjan 198 (MBM, SPF), T.S. dos Santos 763, 1206 (CEPEC), E.S. da Silva 30 (CEPEC), W.W. Thomas 10851 (CEPEC)

Neoraputia alba (Nees & Mart.) Emmerich

L.J. Alves s.n. (ALCB), P.I.S. Braga s.n. (BHCB, SPF), M. Gomes 26 (RB, SPF), M. Groppo 1624, 1625 (SPFR), J. Kallunki 611 (NY, SPF), L. Kollmann 5686 (MBML, SPF), M.A. Lopes 102 (SPF), J.R. Pirani 3524 (SPF), C.E. Ramos 236 (ALCB, SPF), V. de Souza 52, 264 (SPF), D. Sucre 8898 (RB, SPF)

Pilocarpus spicatus A. St-Hil.

P.D. Carvalho 299 (HUEFS), J. Costa 3535 (HUEFS), J.M. Gonçalves 72 (HUEFS), M. Groppo 1520, 1521 (SPFR), R.M. Harley 55009 (HUEFS), A. Miranda 250 (ALCB), L. Paganucci 138 (ALCB), L. Passos 5719 (ALCB), L.P. de Queiroz 5255 (HUEFS), N. Roque 1797 (ALCB), E. Saar 5251 (ALCB), V.C. Souza 29905 (ESA, HUEFS)

Rauia nodosa (Engl.) Kallunki

R.M. Harley 22055 (SPF), J.G. Jardim 191 (CEPEC, HUEFS), J.A. Kallunki 370, 748 (NY, SPF), L.A. Mattos-Silva 4570 (HUEFS, UESC), O.J. Pereira 2228, 2477 (SPF), J.R. Pirani 2754, 3075, 3493, 4734 (SPF), L.V. Rosa 257 (SPF), W.W. Thomas 9198 (NY, SPF)

Ravenia spectabilis (Lindl.) Engl.

J. Bertoldo 01 (RB, SPF), M. Groppo 1514 (SPFR)

Zanthoxylum rhoifolium Lam.

R. Barros 3260 (SPFR, TEPB), C.P. Bruniera 158 (SPFR), A.M de Carvalho s.n. PCD 2180 (ALCB, HUEFS), W. Ganev 2251, 2570 (HUEFS), R.M. Harley 54804, 54837 (HUEFS), G. Hatschbach 47891 (HUEFS, MBM)M.M.M. Lopes 812 (CEPEC, HUEFS), E.B. Miranda 95 (HUEFS), J. Paula-Souza 4464, 4881 (ESA, SPFR), L.P. de Queiroz 5550, s.n. PCD 4025 (ALCB, HUEFS), C.E. Ramos 324 (ALCB).

[1] holótipo (dado ainda não publicado)

[2] isótipo

PCD: Projeto Chapada Diamantina

Apêndice B

Lista de espécimes utilizados na análise polínica

(Foi incluído nesta lista apenas o nome abreviado do primeiro coletor citado no material examinado, com seu respectivo número de coleta e herbário(s)depositado(s)).

Almeidea albiflora Bruniera & Groppo, sp nova inédita

M. Groppo 1851 (SPFR)

Almeidea coerulea (Nees & Mart.) A. St.-Hil.

A.M. Amorim 2649 (CEPEC), R.M. Harley 18427 (CEPEC, NY)

Almeidea lilacina A. St.-Hil.

E. de Amaral s.n. (SP), L.S. Leoni 1471 (GFJP), K. Santos 5 (SPF), Serviço Florestal do Estado de São Paulo 35 (SP)

Almeidea limae I.M.Silva

J.M.A. Braga 4783 (RB), C.P. Bruniera 79, 80 (SPFR), H.C. de Lima 2215 (RB, SPFR), 4380 (RB, SPF), G. Martinelli 9904 (RB)

Almeidea rubra A. St.-Hil.

L.V. Costa s.n. (BHCB, SPF), D. Fernandes 205 (RB), L.P. de Queiroz 10706 (HUEFS, SPF)

Conchocarpus macrophyllus J.C.Mikan

R.A.X. Borges 836 (CEPEC), C.P. Bruniera 85 (SPFR), M. Groppo 1574 (SPFR), W.W. Thomas 13842, (CEPEC, NY).

Conchocarpus minutiflorus Groppo & Pirani, sp. nova inédita

M. Groppo 1617, 1618 (SPFR)

Conchocarpus odoratissimus (Lindl.) Kallunki & Pirani

M. Groppo 1541 (SPFR)

Conchocarpus pentandrus (A. St-Hil.) Kallunki & Pirani

M. Groppo 1262, 1449 (SPFR), O. Kotchetkoff-Henriques 649 (SPFR)

Apêndice C

Listagem de caracteres macromorfológicos e de pólen

1. Filotaxia folhas
    0. Alternas
    1. Opostas (inclui subopostas)

2. Divisão folha
    0. Composta pinada
    1. Composta 3-7 folíolos
    2. Composta 1-3 folíolos
    3. Simples ou 1-foliolada

3. Tipo da inflorescência
    0. Tirsóide
    1. Determinada, racemosa
    2. Determinada, paniculada
    3. Indeterminada, cimeira monocasial

4. Raque secundária da inflorescência desenvolvida (> 5,0 mm)
    0. Presente
    1. Ausente

5. Prefloração do cálice
    0. Quincuncial
    1. Valvar
    2. Imbricado

6. Sépalas ou margens dos lobos na antese
    0. Não Sobrepostas
    1. Sobrepostas

7. Presença de “nectários” no ápice dos lacínios do cálice
    0. Ausente
    1. Presente

8. Duração do cálice
    0. Persistente no fruto
    1. Decíduo

9. Expansão do cálice no fruto
    0. Não expandido
    1. Expandido (aumento de pelo menos 2X no comprimento)

10. Prefloração da corola

0. Imbricada
1. Valvar

11. União das pétalas até a parte mediana da flor (na antese)
    0. Livres
    1. Coerentes
    2. Conatas

12. Cor predominante nas pétalas
    0. Branca (alvas)
    1. Creme
    2. Esverdeada
    3. Rósea
    4. Púrpura

13. Espessamento em forma de quilha no dorso das pétalas
    0. Ausente
    1. Presente

14. União entre filetes
    0. Livres
    1. Conatos

15. União entre pétalas e filetes até parte mediana da flor (após a antese)
    0. Livres
    1. Aderentes
    2. Adnatos

16. Tricomas nos filetes
    0. Presentes
    1. Ausentes

17. Número de estames férteis
    0. Cinco
    1. Dois
    2. Três
    3. Quatro

18. Número de estaminódios
    0. Zero
    1. Um
    2. Dois
    3. Três
    4. Quatro
    5. Cinco

6. Seis ou mais

19. Inserção da antera
    0. Dorsifixa
    1. Basifixa
    2. Sub-basifixa

20. Formato da antera
    0. Ovóide
    1. Estreito-ovóide
    2. Linear-oblonga

21. Ápice da antera
    0. Não modificado
    1. Estéril

22. Apêndices basais da antera (abaixo da inserção do filete)
    0. Ausente
    1. Presente

23. União dos apêndices da antera
    0. Livres
    1. Conatos

24. Ginóforo
    0. Ausente
    1. Presente

25. Altura do disco nectarífero em relação ao ovário
    0. Menor
    1. Maior
    2. Igual

26. Tricomas no ovário
    0. Ausentes (Glabro)
    1. Presentes

27. União do ovário com o estilete
    0. Ovário atenuado
    1. Ovário umbilicado

28. Tipo de estigma
    0. Capitado, lobado
    1. Capitado, sulcado
    2. Capitado, peltado
    3. Capitado, simples

4. Clavado, sulcado
5. Não diferenciado

29. União axial dos carpelos no fruto antes da deiscência
    0. Ausente
    1. Presente

30. União lateral dos carpelos no fruto antes da deiscência
    0. Ausente
    1. Presente

31. Textura da testa da semente
    0. Não-crustácea
    1. Crustácea

32. Superfície da testa da semente
    0. Não-lisa
    1. Lisa

33. Formato do hilo
    0. Circular
    1. Linear
    2. Oblato

34. Formato do embrião
    0. Reto
    1. Curvo

35. Soldadura dos cotilédones
    0. Não conduplicado
    1. Conduplicado

36. Dobradura dos cotilédones
    0. Ausente
    1. Presente (cotilédones plicados)

37. Cotilédones em secção transversal
    0. Plano-convexo
    1. Plano

38. Endosperma
    0. Presente
    1. Ausente

39. Número de aberturas do pólen

0. Três
1. Quatro
2. Cinco
3. Seis
4. Mais de seis

40. Formato do pólen
    0. Esferoidal (inclui oblato-esferoidal e prolato-esferoidal) – P/E: 0,88 – 1,14
    1. Oblato (P/E: 0,5 – 0,75)
    2. Suboblato (P/E: 0,75 – 0,88)
    3. Subprolato (P/E: 1,14 – 1,33)
    4. Prolato (P/E: 1,33 – 2,0)
    5. Perprolato (P/E: > 2,0)

41. Exina do pólen (ornamentação)
    0. Reticulada
    1. Reticulada-estriada
    2. Estriada
    3. Perforada
    4. Gemada
    5. Baculada

Anexo

A new species of Almeidea (Galipeinae, Galipeae, Rutaceae) from Eastern Brazil[2]

Carla P. Bruniera[1], Cláudia Inês da Silva[2] & Milton Groppo[3]

[1] Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Travessa 14, 321, Cidade Universitária, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil; e-mail: carla_bruniera@yahoo.com.br

[2] Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Preto, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes 3900, 14051-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: claudiainess@gmail.com

[3] Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Preto, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes 3900, 14051-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil;e-mail: groppo@ffclrp.usp.br

Abstract. A new species of *Almeidea* (Rutaceae) belonging to Neotropical tribe Galipeinae (subtribe Galipeae) is described and illustrated. The species is known so far only from a few collections made in small disturbed forest remnants in the vicinity of Cachoeiro de Itapemirim, in the of state of Espírito Santo, and also from a single collection made in a locality in the state of Rio de Janeiro, both under the dominion of the Atlantic Rainforest, Eastern Brazil. Diagnostic features, including pollen morphology, are identified, and a brief discussion on the relationships of the new taxon to other species of *Almeidea* A.St.-Hil., as well comments on its conservation status, are also provided.

Key words. Galipeae, Galipeinae, morphology, taxonomy.

---

[2] Artigo submetido para publicação na revista *Brittonia*, em fevereiro de 2010

Almeidea is a genus belonging to Neotropical tribe Galipeae (replacing Cusparieae, see Kallunki & Pirani, 1998), subtribe Galipeinae (Rutaceae), the former five species ranging from south of Bahia to Paraná states (Brazil), including Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo and the Eastern portion of Minas Gerais, Brazil (Silva, 1988). All species occur in the Atlantic rainforest from coastal Brazil, but new collections (*A. rubra* A.St-Hil.) from forested areas in the province of La Paz, Bolivia, extended the known range of the genus. The species are tree or treelets from the forest undestory, with 1-foliolate or apparently simple, alternate leaves, a (sub)terminal thyrsoid or thyrse as a inflorescence, and pinkish or lilac, actinomorphic flowers with 5 to 2-3 fertile stamens, in the latter case with 3-2 modified into staminodes. The fruit is a squizocarpous with 1-3 to 5 follicles (mericarps) and an endocarp that splits in two valves when mature, ejecting the reniform seeds.

During fieldwork carried out in Espírito Santo state (Brazil) aiming at a phylogenetic study and a revision of the genus, a new species was detected in the understory of a remnant of forest near the municipality of Cachoeiro de Itaperimim. The new species was readily distinguished by its white (rather then pinkish or lilac) flowers, and other details in the inflorescence and indumentum of the ovary were able to confirm the species as new. The examination of other collections identified as *Almeidea* (especially as *A. lilacina* A.St.-Hil.) on loan to SPFR herbarium revealed other materials which belonged to the same taxon, and a new species, *Almeidea albiflora* Bruniera & Groppo, was recognized.

Only herbarium material of mature plants was used for the description. Flowers and fruits were rehydrated before being measured and drawn; material preserved in 70% ethanol was also used for the descriptions and drawings. Terminology of shapes of leaves and other organs follows Radford et al. (1974).

Pollen: pre-anthesis dried flowers were taken from the holotype deposited at SPFR herbarium (see further details of this collection below). Pollen grains were acetolysed according the

methodology described in Erdtman (1960) and then mounted in gliceryne jelly on three glass slides. Images were taken using light microscopy, and diameters of 20 grains were measured. Because pollen grains were shown to be isopolar, polar (P) and equatorial (E) diameters were not distinguished, and P/E ratio were not calculated.

Scanning electron microscopy (SEM) images were made using grains collected directly from dry anthers of the holotype. Pollen samples were subsequently mounted on stubs and sputtered with gold. A Shimadzu scanning microscope (SS-550 model) was used to obtain images in SEM, which were used to define the pattern of ornamentation of exine and apertures, according the terminology of Barth & Melhem (1988) and Punt *et al.* (2007). Characteristics of pollen grains were compared with those from other species of the genus and from Galipeinae as a whole.

Almeidea albiflora Bruniera & Groppo sp. nov. (Figs. 1 and 2). TYPE: BRAZIL. Espírito Santo: Cachoeiro de Itapemirim, Rodovia para Jerônimo Monteiro (BR 482), ca. 3 km da saída da cidade, Morro Grande, atrás da Marmoraria Sandrini (antiga Marmoraes), 20°48’26,6” S, 41°09’26,5” W, alt. 75 m, 29 Jan. 2009 (fl), *M.Groppo, C.P. Bruniera & G. M. Bueno 1851* (holotype SPFR; isotypes K, MO, NY, RB, SPF)

Ab omnibus speciebus generis floribus albis (neque purpuris nec lilacinis) ovario sericeo optime distincta. Species A. lilacina thyrsis amplis ramosis axibus secundaris proximis plus quam 1 cm longis similis, sed periantho albo ovario sericeo (non glabro) etiam thyrsis axibus secundaris ultimis plus longis differt.

Treelet 3-4 m tall, branched. Branches cylindrical, brown to grayish, with longitudinal grooves, glabrous. Leaves alternate, 1-foliate, forming congested groups at the apex of the branches; petiole 1-7 (8.5) cm long, cylindric, thickened at base and apex or more frequently near the apex, canaliculate towards the blade, glabrous; blade elliptic, narrowly elliptic, lanceolate or oblanceolate, acute or obtuse at base, acute, rounded or acuminate at apex, 10-21 x 2.7- 7.5 cm, chartaceous to slightly coriaceous, glabrous, with sparse pellucid dots (volatile oil glands) visible when against the light; venation broquidodromous, midvein plane to slightly sunken on the adaxial surface, prominent on the abaxial surface, secondary veins 9-18, alternate to subopposite. Inflorescence an erect, terminal thyrse, 8–19 cm long including the peduncle, this cylindric or complanate, puberulent, the secondary axes up to 9 cm long, usually branched, puberulent; primary and secondary bracts triangular, 1–2 mm long, puberulent; pedicels 0.5–3 mm long in flower, 3–5 mm long in fruit. Bud oblong at the anthesis. Calyx shortly campanulate, 1–2 mm long, puberulent mainly at margin, creamy white, deciduous, the lobes ovate-triangular, c. 1.5 x 1.5 mm, each one with a globose nectary at the apex. Corolla white with a discrete lilac spot at the tip of the petals (only seen in fresh flowers), with free petals, aestivation imbricate; petals 1.3-1.7 x 0.2-0.3 cm, spatulate, with a dorsal swollen, tomentose-villous in both surfaces, glabrous within at base, with many glands mainly in dorsal swollen. Androecium of 3 fertile stamens and 2 staminodes; filaments free from each other and free from the corolla, 8-10 x 1-2 mm, with a dorsal swollen, tomentose-villous in both surfaces, adaxially with a tuft of hair on the median region and glabrous on below half, the staminodes 11-14 x 0.5-1 mm, tomentose-villous, adaxially with a tuft of hair on the median region, glandular at apex; anthers linear-oblong, c. 2.5 x 1 mm, villous abaxially; disc cupular, c. 0.5 mm long, glabrous. Ovary of 5, free carpels united only in a single style, c. 1 mm long, apically tapered into the style, sericeous; style 6-11 mm long, pubescent, glabrous at base; stigma 5-lobed. Fruit schizocarpic of 1-2, rarely 3-5 free mericarps, subglobose, 0.8-1.2 x 0.7-1 cm, brown, rugose, sparsely puberulent to glabrescent, with loculicidal dehiscence along ventral suture; endocarp woody, yellowish, splitting into two valves

when mature. Seed 1 per carpel, reniform, c. 8 x 6 mm, brown to nigrescent, smooth, glabrous, the testa leathery, hilum oblate. Embryo (mature) not seen.

Pollen in monads, isopolar, with medium size (44.27-52.39µm, mean 47.70±2.22) and radial symmetry, circular amb, pantoporate; ectoaperture a colpus, endoaperture circular, exine homobrocate, microreticulate (muri and lumina smaller than 1µm, Figure 2C).

Almeidea albiflora is known from a few collections made in disturbed forest remnants near Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo state, Brazil, in the Atlantic rainforest. Another collection from Rio de Janeiro state (São João da Barra), probably in a forested area, is known to exist. In the forest remnant where the type was collected, the species is very common, being dominant in the understorey forming almost pure populations. Other Rutaceae are common as a part of the understory in the same remnant as *Angostura bracteata* (Nees & Mart.), including Kallunki, *Conchocarpus macrocarpus* (Engl.) Kallunki & Pirani, *C. macrophyllus* J.C.Mikan, and *C. cuneifolius* Nees & Mart. and another two sympatric species of *Almeidea, A. lilacina* and *A. rubra*. Flowering collections of the new species were made in January, with fruiting collections in January and February.

Almeidea albiflora can be readily distinguished from the other species of the genus by its white (rather than purple or lilac) flowers. There is only a discrete lilac spot at the tip of each petal, which can be seen only in buds and fresh flowers. Another remarkable difference is the ovary with a sericeous indumentum, which is glabrous in all other species of the genus or with scarse trichomes in *A. coerulea* A.St.-Hil. (endemic from state of Bahia, Brazil). Some floral characters are similar to those of *A. lilacina* A.St.-Hil.: measurements of flower parts (petals, ovary and style) and fruit are similar, as well as the branched thyrses with proximal secondary axes up to 9 cm long. These axes are usually branched, unlike those of *A. limae* I.M.Silva and *A. rubra* A.St.-Hil, for example, with

inflorescences bearing reduced (sometimes lacking) secondary axes. However, the distal secondary axes of the new species tend to be as long as the proximal ones, while in *A. lilacina* these are shorter towards the apex of inflorescence. Like other species of the genus, the new species has leaves with petioles thickened at base and apex, a common feature in other genus of subtribe Galipeinae. Nevertheless, and different from other species of the genus, the thickness at the apex of the petiole is more commonly not exactly at the apex but below it (Figure 1B), making the identification easier in sterile materials.

Pantopocolpate pollen grains are encountered in all other species of the genus analyzed so far (see Barth 1982 and Morton & Kallunki 1993) since it is a putative autapomorphic synapomorphy to the genus within subtribe Galipeinae, where the most common patterns are the 3-6-aperturate, heteropolar pollen grains (Morton & Kallunki, 1993). However, the microreticulate ornamentation of the exine in *Almeidea albiflora* contrasts with the foveolate-perforate pattern described for *Almeidea rubra* and *A. limae* (Morton & Kallunki,1993). Reticulate exine is reported for *A. coerulea* by Barth (1983), but the figure representing the pollen of this species in that article (with no voucher citation), with small lumina (less than 1µm in diameter) and no reticulate pattern in the exine, suggests a perforate ornamentation.

Flowers of *Almeidea albiflora* had a discrete *Citrus* flower-like scent at 5-6 p.m. when collected, but no insects or other potential pollinators were observed visiting flowers at that period. However, the observations were not extended to a 24-hour period, so it is not possible to determine whether the scent is produced all day long or only near twilight, which could suggest (together with the white color of the flowers) pollination by moths.

Almeidea albiflora can be classified as Endangered (ED) according the IUCN criteria (McGinley, 2009). The species is known to exist at no more than five locations, with an area of occurrence estimated to be less than 5000 km² and presenting an inferred or projected continuing

decline in the extent of occurrence (criterion Bbi and ii), given the rapid destruction of the Brazilian Atlantic Rainforest (Morellato & Haddad, 2000).

No economic uses or common names are reported for the new species.

Additional specimens examined. **BRAZIL**. **ESPÍRITO SANTO**: Cachoeiro de Itapemirim, Road to Jerônimo Monteiro (BR 482), Morro Grande, behind Marmoraria Sandrini (former Marmoraes), 20°48'26,6"S, 41°09'26,5"W, alt. 75 m, 29 Jan 2009 (sterile), *Groppo et al. 1852 and 1853*(both SPFR); idem, 29 Jan 2009 (fr.), Groppo et al. 1861 (K, MO, NY, RB, SPF, SPFR); idem, BR 482, ca. 6 km from the city going to Carangola, 14 Jan 1985 (fl, fr), *Pirani & Zappi 1130* (SPF, SPFR); idem, NW of Cachoeiro do Itapemirim, Morro Grande, forest remnant behind marble sawmill on S side of road to Jeronimo Monteiro (BR 482) 2 km NW of junction with road to Muqui (BR 393), ca. 20°50'S, 41°10'W, 22 Feb 1994 (fr), *Kallunki et al. 595* (NY). **RIO DE JANEIRO**: São João da Barra, Mata do Carvão, 21°38'S, 41°03'W, 26 Jan 1984 (fr), *Araujo & Maciel 6012* (GUA, NY).

Acknowledgements

The authors would like to thank the curators of the herbaria (ALCB, BHCB, CEPEC, HUEFS, MBML, NY, RB, SP, SPF) visited during the study and for the gifts of important collections of Rutaceae to SPFR; Departamento de Biologia (FFCLRP-USP) for making a vehicle available for the fieldwork; Dewey Litwiller (University of Saskatchewan, Canada), for the English review; Bruno Garcia Simões Favaretto for the illustrations; Departamento de Química (FFCLRP-USP) for the use of scanning microscopy and Rodrigo Ferreira Silva for technical guidance; and to FAPESP (Fundacão de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support (grants #2006/03170-0 and 2007/06336-0).

Literature cited

Barth, O.M. 1982. Variações polínicas em espécies brasileiras da família Rutaceae. Bol. IG-USP 13: 129-134.

Barth, O.M. & Melhem, T.S. 1988. Glossário Ilustrado de Palinologia. Editora da Unicamp, Campinas.

Erdtman, G. 1960. The acetolysis method: a revised description. Svensk Bot. Tidskr. 54:561-564.

Kallunki, J.A. & Pirani, J.R. 1998, Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* J.C.Mikan (Rutaceae). Kew Bull. 53(2): 257-334.

McGinley, M. 2009 (Topic Editor). IUCN Red List Criteria for Endangered. In: Encyclopedia of Earth. Eds. Cutler J. Cleveland (Washington, D.C.: Environmental Information Coalition, National Council for Science and the Environment). [First published in the Encyclopedia of Earth October 6, 2009; Last revised October 12, 2009; Retrieved December 31, 2009]. World Conservation Union (Content Partner). http://www.eoearth.org/article/IUCN_Red_List_Criteria_for_Endangered

Morellato L.P, Haddad C.F.B. 2000. The Brazilian Atlantic Forest. Biotropica 32: 786-792.

Morton, C.M. & Kallunki, J.A. 1993. Pollen morphology of the subtribe Cuspariinae (Rutaceae). Brittonia 45:286-314.

Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S. Nilsson, S. & Le Thomas, A. 2007. Glossary of pollen and spores terminology. Rev. Palaeobot. Palynol. 143(1-2):1-81.

Radford, A. E.; Dickinson, W. C.; Massey, J. R. & Bell, C. R. (1974). *Vascular Plant Systematics*. Harper & How, New York.

Silva, I.M. 1998. Revisão taxonômica do gênero *Almeidea* Saint-Hilaire (Rutaceae). Unpublished Master in Science dissertation. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Legend of the figures:

Fig. 1. *Almeidea albiflora.* **A**. Habit with inflorescence. **B**. Detail of the petiole thickness near to the apex. **C**. Flower, note the lobes of calyx, each one with a globose nectary at the apex (dots). **D**. Open flower showing pistil, three petals and androecium removed. **E**. Stamens (right) and staminodes. **F**. Pistil in longitudinal section. **G**. Detail of the ovary (ov) and disc (ds). **H**. Ovary in transversal section. **I**. Fruit. **J**. Open fruit showing detaching endocarp (en) and seed (sd). **K.** Seed, ventral (left) and lateral views (**A-H** from Groppo et al. 1851. **I-J** from Groppo et al. 1861)

Fig. 2. *Almeidea albiflora* **A.** Floriferous branch, **B**. Flower close-up, arrows showing staminodes. **C**. Pollen. **D**. Known distribution of *Almeidea albiflora*, Brazilian states indicated: BA – Bahia, ES – Espírito Santo MG- Minas Gerais, RJ – Rio de Janeiro, São Paulo.(**A-C** from Groppo et al. 1851).

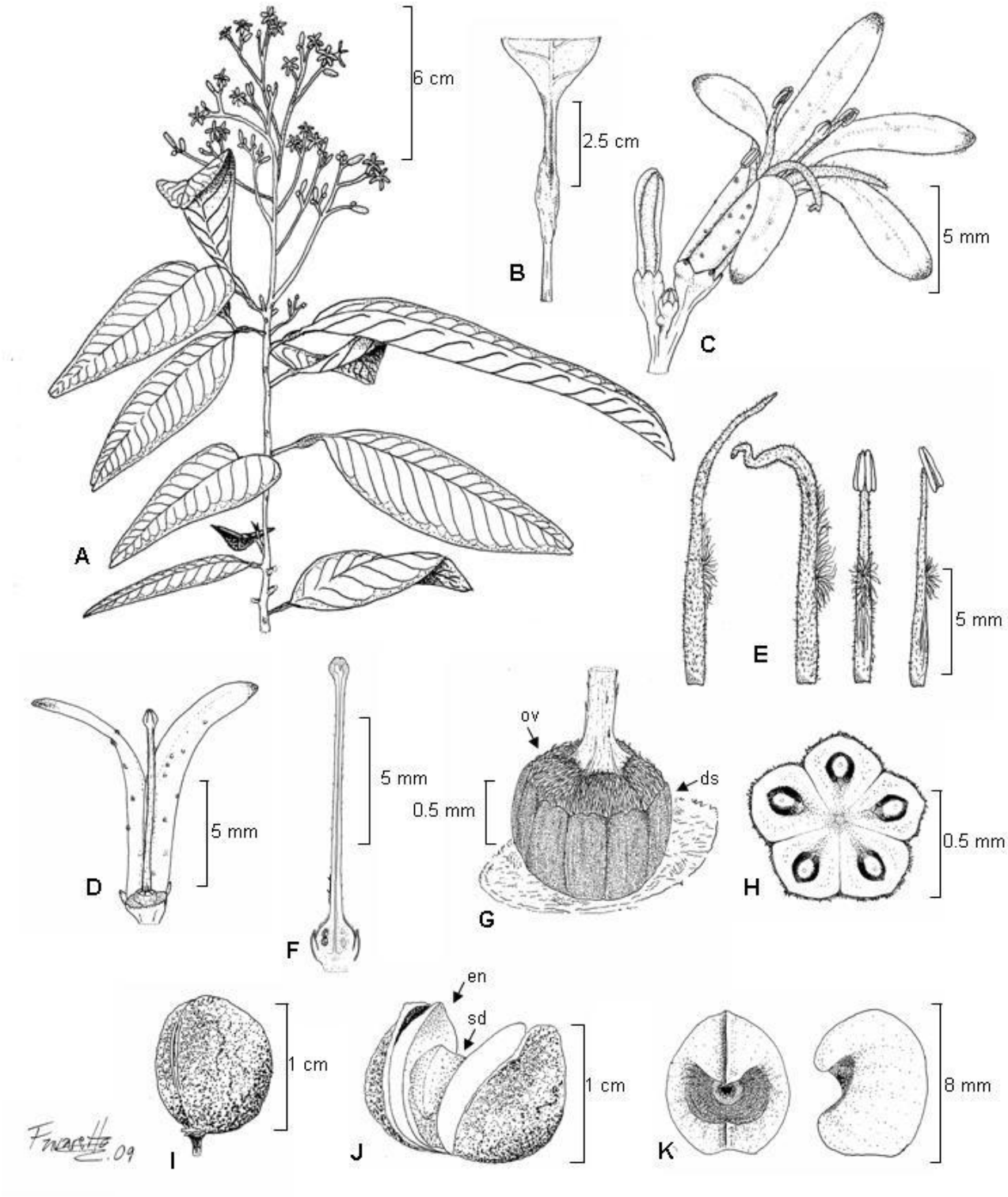
6 cm
2.5 cm
B
5 mm
C
A
5 mm
E
5 mm
D
5 mm
F
ov
ds
0.5 mm
G
0.5 mm
H
en
sd
1 cm
I
1 cm
J
8 mm
K

Fig. 1

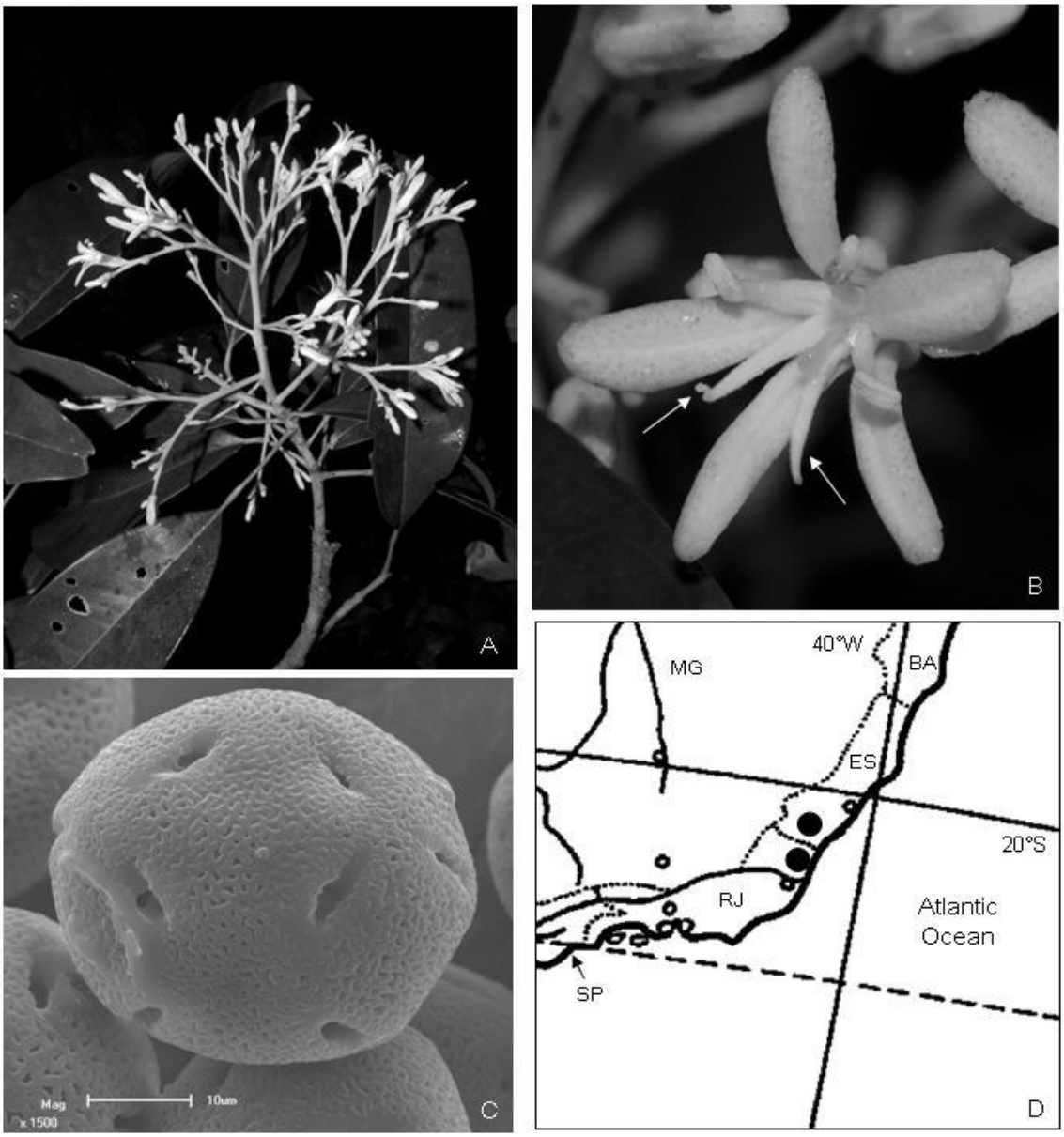

Fig. 2