

Universidade Católica de Brasília
Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e
Biotecnologia

**FILOGENIA DO COMPLEXO
CALADIEAE-ZOMICARPEAE (ARACEAE) BASEADA
EM SEQUÊNCIAS DO DNA PLASTIDIAL**

Adriana Ribeiro Silva Batista

Orientador: **Eduardo Gomes Gonçalves**

Co-orientadora: **Rosane Garcia Collevatti**

D
Dissertação apresentada à comissão avaliadora como um requisito ao título de mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia, sobre orientação do Prof. Dr. Eduardo Gomes Gonçalves e co-orientação Profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti.

Brasília

Julho de 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

B333f Batista, Adriana Ribeiro Silva.

Filogenia do complexo Caladieae-zomicarpeae (araceae) baseada em seqüências do DNA plastidial / Adriana Ribeiro Silva Batista. – 2007.
92 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2007.
Orientação: Eduardo Gomes Gonçalves
Co-orientação: Rosane Garcia Collevatti

1. Botânica. 2. Plantas - filogenia I. Gonçalves, Eduardo Gomes, orient. II. Collevatti, Rosane Garcia, co-orient. III. Título.

CDU 575.8

Ficha elaborada pela Coordenação de Processamento do Acervo do SIBI – UCB.

Trabalho desenvolvido junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, sob orientação do professor Eduardo Gomes Gonçalves.

Aprovado por:

Dr. Eduardo Gomes Gonçalves (Orientador)
Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia
Universidade Católica de Brasília

Dr Renato Caparroz (Examinador Externo)
Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia
Universidade Católica de Brasília

Dr David Jonh Bertioli (Examinador Interno)
Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia
Universidade Católica de Brasília

Apoio Financeiro:

- Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília
- SIGEP-UCB
- Programa institucional de bolsas da UCB “*Teacher Assistant*”
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Dedico esta dissertação aos meus pais que sempre apoiaram as minhas escolhas, mesmo quando não concordavam.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, em primeiro lugar.

Aos meus pais, por não medirem esforços na minha formação e, principalmente, por acreditarem no que eu acredito.

Aos meus irmãos Luiz Antônio e Wanderson pelo carinho.

Ao meu orientador Eduardo Gonçalves pela paciência e pela oportunidade de conhecer um mundo da botânica, até então por mim negligenciado.

A minha orientadora Rosane Garcia Collevatti pela confiança e principalmente pela amizade.

Aos professores Renato pela compreensão e amizade, Leonardecz pelo apoio de recursos computacionais na análise dos resultados e o Rinaldo pelo acompanhamento na minha iniciação acadêmica.

Ao Evandro, um grande amigo e companheiro inesgotável.

A todos os meus tios e tias sem exceção pelo carinho e diversão. A minha madrinha que foi uma mãe pela preocupação e atenção constante. As minhas primas: Binha, Gabi, Gege, Jack, Kell, Manu, Mone, Sil e Sônia pela pelos momentos de distração e euforia.

Aos meus amigos: Dani, Ângela, Betty, Luiz, Marcos e Gustavo por toda a confiança e dedicação.

Aos todos os meus colegas do laboratório, por proporcionar um ambiente de trabalho bastante descontraído. Em especial o Virgílio, que acabou se tornando um bom amigo.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na execução deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	9
Abstract.....	12
Capítulo 1: Introdução.....	15
1.1 Família Araceae.....	16
1.1.1 Complexo Caladieae-Zomicarpeae.....	20
1.1.2 Importância econômica do Complexo Caladieae-Zomicarpeae.....	24
1.2 Inferência Filogenética.....	27
• <i>matK</i>	30
• <i>trnL-trnF</i>	31
1.2.1 Métodos Filogenéticos.....	32
Capítulo 2: Objetivos.....	38
Capítulo 3: Materiais e Métodos.....	40
Capítulo 4: Resultados.....	47
Capítulo 5: Discussão.....	59
Referências Bibliográficas.....	73
Anexos.....	83

Resumo

Resumo

O complexo Caladieae-Zomicarpeae é composto pelos gêneros *Zomicarpa*, *Zomicarpella*, *Ulearum*, *Filarum*, *Hapaline*, *Scaphispatha*, *Caladium*, *Jasarum*, *Xanthosoma*, *Chlorospatha* e *Syngonium* e tem uma distribuição especialmente neotropical, com exceção do gênero asiático *Hapaline*. O grupo contém elementos de razoável importância econômica, tanto para fins ornamentais (*Caladium* e *Syngonium*) quanto para fins alimentícios (*Xanthosoma*), mas a sua taxonomia ainda é confusa. Atualmente, a classificação aceita admitiu a divisão deste complexo em duas tribos distintas: Caladieae e Zomicarpeae. Entretanto, a circunscrição das tribos do complexo é problemática, assim como a própria circunscrição dos gêneros envolvidos. O gênero *Xanthosoma* é considerado promissor como fonte de alimento em países em desenvolvimento, mas programas de melhoramento genético estão hoje impossibilitados pela carência de conhecimentos básicos sobre as relações evolutivas entre as espécies cultivadas e seus parentes silvestres. Além disso, os limites genéricos entre *Xanthosoma*, *Caladium* e *Chlorospatha* permanecem em debate há cerca de 30 anos. Para a reconstrução filogenética do complexo, seqüências nucleotídicas dos marcadores: *matK*, íntron *trnK* e o espaçador *trnL-trnF* foram analisadas para 58 acessos pertencentes ao complexo, incluindo três grupos externos (*Amorphophallus bulbifer*, *Typhonium roxburghii* e *Orontium aquaticum*). Os métodos de análise filogenética foram Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana, com resultados essencialmente similares. Nossos resultados indicam que o complexo Caladieae-Zomicarpeae é parafilético, compondo clados que reúnem *Caladium* e *Zomicarpeae*, contradizendo a classificação atual, já que elementos de diferentes tribos mesclam-se no mesmo cladograma. Isto sugere que a tribo Caladieae seja expandida para incluir os gêneros da tribo Zomicarpeae. Os gêneros *Xanthosoma* e *Chlorospatha* não surgiram como grupos monofiléticos isoladamente, mas juntos formaram um clado bem suportado. Tal resultado sugere que o aspecto compartilhado do grão de pólen

em tétrades tenha surgido somente uma vez no complexo. Já as semelhanças entre *Caladium* e *Xanthosoma* parecem ter surgido por convergência evolutiva, já que os clados contendo esses grupos mostraram-se claramente independentes. Nossos resultados apontam para uma origem evolutiva relativamente recente da maioria das espécies cultivadas de *Xanthosoma* e pode subsidiar programas de melhoramento genético. *Caladium lindenii*, uma espécie amplamente cultivada do grupo, mostrou-se completamente distinta das outras espécies supostamente congêneres, surgindo próxima às espécies de *Syngonium*, devendo ser posteriormente recombinada em um outro gênero. O gênero *Scaphispatha* não parece ser segregável de *Caladium* nas nossas análises. Nossos resultados apontam informações importantes que podem contribuir para a classificação do complexo Caladieae-Zomicarpeae, indicando uma necessidade de redefinição das tribos e de ajustes nas próprias circunscrições genéricas, incluindo uma ampliação no gênero *Xanthosoma* para incluir *Chlorospatha*.

|

Abstract

Abstract

The complex Caladieae-Zomicarpeae is composed by the genera *Zomicarpa*, *Zomicarpella*, *Ulearum*, *Filarum*, *Hapaline*, *Scaphispatha*, *Caladium*, *Jasarum*, *Xanthosoma*, *Chlorospatha* and *Syngonium*. The complex has an essentially Neotropical distribution, with the sole exception of the Asian genera *Hapaline*. The group contains elements of moderate economic importance, as ornamental species (*Caladium* and *Syngonium*), or food crops (*Xanthosoma*), but its taxonomy still is confused. The accepted classification divides complex in two distinct tribes: Caladieae and Zomicarpeae. However, the circumscription of the tribes of the complex is problematic, as well as circumscription of each involved genera. *Xanthosoma* is considered a promising as food source in developing countries, but programs of genetic improvement are now impossible because of the absence of basic knowledge about evolution and relationships between the cultivated species and its wild relatives. Moreover the generic limits between *Xanthosoma*, *Caladium* and *Chlorospatha* remained in debate more than thirty years. We used nucleotide sequences of the markers *matK*, intron *trnK* and the spacer *trnL-trnF*. We analyzed 58 accessions, three of them outgroups (*Amorphophallus bulbifer*, *Typhonium roxburghii* and *Orontium aquaticum*). We used two phylogenetic approaches: Maximum Parsimony and Bayesian Inference, essentially with similar results. Our results indicate that the Caladieae-Zomicarpeae complex is paraphyletic. Moreover, elements of both tribes appeared interleaved in the cladogram. This suggests that the tribe Caladieae should be expanded to include the genera of the tribe Zomicarpeae. The genera *Xanthosoma* and *Chlorospatha* are not monophyletic groups if taken separately, but formed a well-supported clade together. Such result suggests that the shared aspect of the grain of pollen in tetrads has only appeared a time in the complex. The similarities between *Caladium* and *Xanthosoma* seem to have appeared for convergent evolution since the clades for these groups had are clearly independent. Moreover our results point to a relatively recent origin of the majority of

the cultivated species of *Xanthosoma* and should be of relocate programs of genetic improvement. *Caladium lindenii*, a widely cultivated species of the group, appeared as distinct from the other supposedly congeneric species, nesting in the same clade as analyzed species of *Syngonium*. *Scaphispatha* seem to be inseparable from *Caladium* in our analyses. Our results can contribute with important guidelines in the elaboration of classification system for the Caladieae-Zomicarpeae complex, indicating the need for redefinition of the tribal concept and adjustments in the circumscription of genera, including an expansion of *Xanthosoma* to include *Chlorospatha*.

Capítulo 1
Introdução

1.1 Família Araceae

As Araceae são monocotiledôneas, representadas por ervas e ocasionalmente arbustos, pertencentes à ordem Alismatales (APG 2003). A família consiste em, aproximadamente, 3700 espécies em 108 gêneros (Govaertz e Frodin 2002; Gonçalves *et al.* 2004a; Gonçalves e Bogner 2005). Embora a família ocorra em todos os continentes, com exceção da Antártica, é predominantemente tropical. Muitos dos gêneros das *Araceae* ocorrem na região tropical da Ásia, mas são os gêneros neotropicais que apresentam 50% de diversidade da família (Grayum 1990). É um grupo notável pela sua amplitude ecológica de ocorrência desde o nível do mar até 4.500 metros de altitude (e.g. *Gorgonidium* e *Spathantheum*, nos Andes). Além disso, os membros desta família são altamente diversos nas formas de vida, em morfologia da folha e em características da inflorescência. Entre as formas de vida podemos identificar desde plantas aquáticas submersas (*Jasarum*, *Cryptocorne*) a plantas de deserto (*Eminium*), como também plantas livre-flutuantes a terrestres (às vezes tuberosas), além de plantas trepadeiras, hemiepífita e epífitas verdadeiras. As folhas variam de simples a compostas, e podem ser sésseis ou pecioladas. Já com relação ao caule, este pode ser aéreo ou subterrâneo, na forma de: corno, rizoma ou túbera. Em relação a esta imensa diversidade, o diagnóstico da família é dado pela presença de uma inflorescência constituindo um espádice bissexual ou unissexual guarnecido por uma espata solitária (Mayo *et al.* 1997).

O uso econômico mais conhecido para a família é o ornamental. Baseado nas diversas formas de folhas e textura, no mundo inteiro, representantes da família são usualmente vistos em jardins públicos ou privados (Mayo *et al.* 1997). Economicamente, são cultivados pelas folhagens (*Philodendron*, *Monstera*, *Aglaonema*) e flores de corte (*Anthurium* e *Zantedeschia*) (Junqueira e Peetz 2002). O uso alimentício é menos conhecido,

mas não menos importante. Várias espécies apresentam o acúmulo de amido entre outros carboidratos nos caules, que são bastante utilizados como fonte de alimento, por exemplo, a *Colocasia esculenta* (L.) Schott, popularmente conhecidos como “taro” nos paleotrópicos, e *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott também conhecida como “yautía” ou “cocoyam” nos neotrópicos (Plowman 1969).

Em relação a história da sistemática Araceae, vários autores tentaram compreender, de acordo com as suas concepções, a classificação desta família. Dos muitos contribuintes para a taxonomia de Araceae, o primeiro pesquisador que merece destaque é Carolus Linnaeus, pai da classificação binomial (1753). Linnaeus não pode ser considerado um especialista em Araceae, mas ele foi o primeiro a reconhecer a família como uma unidade taxonômica peculiar descrevendo quatro gêneros: *Arum*, *Dracontium*, *Calla*, e *Pothos*. O primeiro monografar da família Araceae foi o botânico austríaco Heinrich Wilhelm Schott, sendo primeiro a fazer estudos comparativos com inflorescências, flores e frutos. Schott descreveu cerca de um terço dos gêneros atuais em uso e criou a base da taxonomia de Araceae, muito do qual foi mantida pelas gerações seguintes. Em 1832, Schott publicou um trabalho com quase 40 gêneros, organizando os taxa em nível seccional e subfamiliar. Além disso, em 1860, Schott também descreveu muitas espécies novas e criou a primeira grande classificação natural desta família, “*Prodromus Systematis Aroidearum*”.

O segundo grande especialista de Araceae foi Adolf Engler, autor este que já sugeria um sistema evolutivo de ordenamento das espécies na classificação da família, “*Das Pflanzenreich*”. Neste trabalho, ele subdividiu a família Araceae em oito subfamílias: Pothoideae, Monsteroideae, Calloideae, Lasioideae, Philodendroideae, Colocasioideae, Aroideae e Pistioideae. Este trabalho resume uma boa compreensão anatômica, morfológica e de processos de desenvolvimento em Araceae. Juntos Engler e Kurt Krause (um freqüente

colaborador) publicaram aproximadamente o dobro de espécies anteriormente descritas por Schott.

Em 1982, Nicolson publicou, em inglês, uma tradução da classificação de Engler incluindo todos os gêneros aceitos na classificação de 1920. Posteriormente, Grayum (1990) apresentou uma classificação da família sugerindo apenas quatro subfamílias: Pothoideae, Calloideae, Colocasioideae e Aroideae. Ainda neste trabalho, Grayum sugere que pesquisas futuras explorem novos campos taxonômicos, com o intuito de resolver questões problemáticas como circunscrições entre algumas tribos. A classificação desta família foi retomada por Nicolson e Bogner (1991), com a publicação de uma revisão de toda a família levando em consideração um número importante de incorporações feitas desde as concepções de Engler. Em 1995, French e colaboradores utilizando como recurso material genético de cloroplasto (cpDNA), reconstruíram a primeira filogenia molecular da família (Fig. 1). Esta filogenia não gerou uma classificação, mas apresentou suporte necessário para sugerir diversas alterações nos conceitos taxonômicos vigentes.

A classificação mais atualizada da família e aceita pela comunidade científica foi realizada em 1997, com a publicação do livro “The Genera of Araceae” por Mayo Bogner e Boyce. Esta atualização foi baseada em áreas como: anatomia, citologia, fisiologia, paleontologia entre outras como, por exemplo, a biologia molecular e estudos de polinização. Apesar de utilizar algumas informações obtidas por French (1995), Mayo e colaboradores preferiram utilizar a filogenia molecular apenas como mais uma fonte de evidência. Assim, não foram aceitos alguns grupos monofiléticos de French quando fortes evidências morfológicas eram inquestionáveis. A classificação resultante compreende sete subfamílias: *Gymnostachydoideae*, *Orontioideae*, *Pothoideae*, *Monsteroideae*, *Lasioideae*, *Calloideae*, e *Aroideae*. Mais recentemente, uma atualização da sistemática da família foi proposta por Keating (2000), que não teve uma boa aceitação pela comunidade científica pela

argumentação insuficiente para justificar as novas circunscrições. Aparentemente, ele só recircunscreeu os clados obtidos por French (1995).

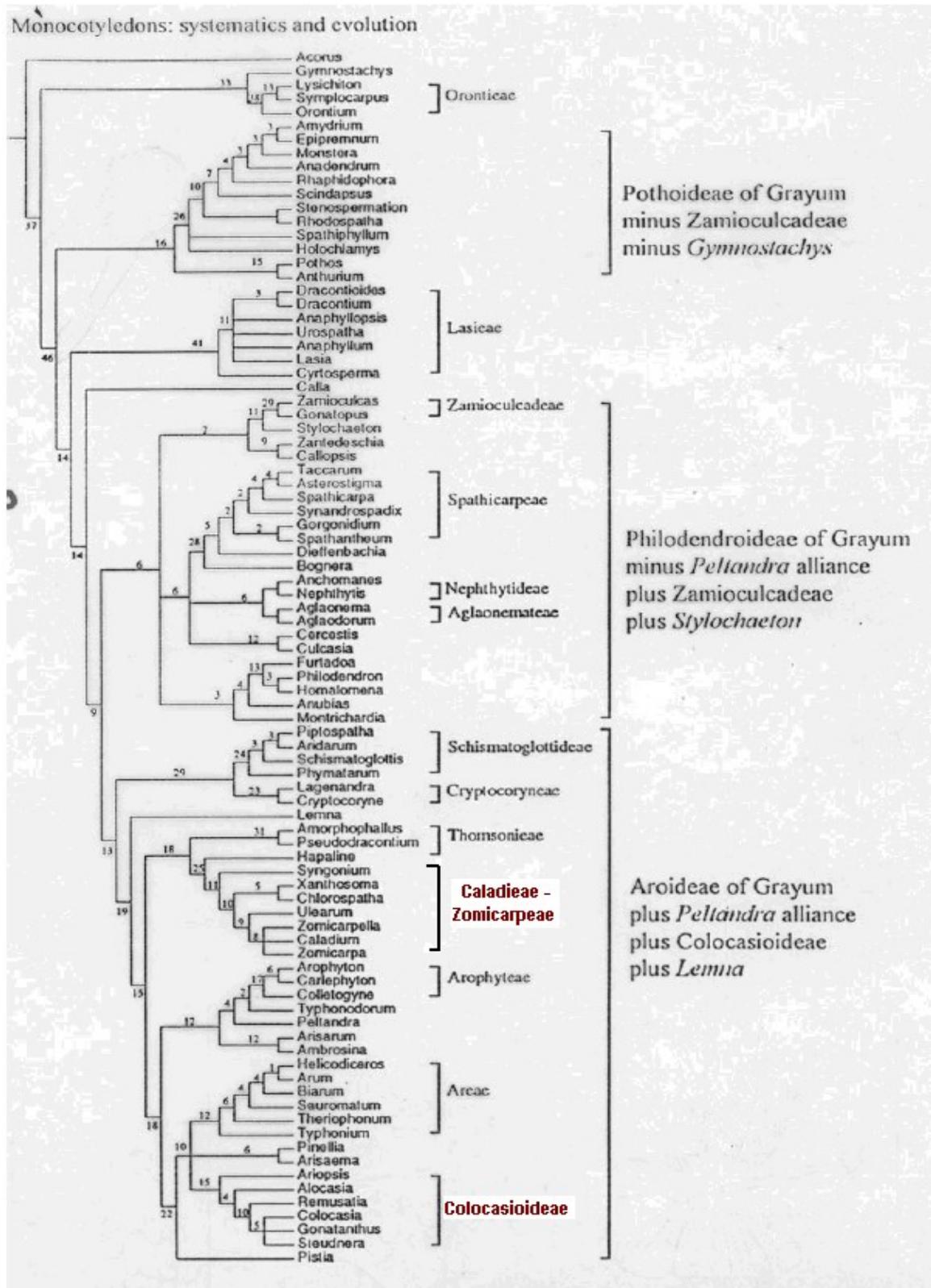


Fig. 1 Cladograma de French e colaboradores (1995) utilizando dados moleculares de cloroplasto. Árvore de consenso estrito com números de sítios de restrição calculado pelo MacClade.

1.1.1 Complexo Caladieae-Zomicarpeae

A história do complexo Caladieae-Zomicarpeae tem suas raízes tão profundas quanto os próprios sistemas de classificação para as Araceae. Schott, em 1856, estabeleceu a tribo Caladieae para acomodar uma série de gêneros neotropicais e incluiu o gênero *Zomicarpa* na tribo Zomicarpeae. Para tanto, estabeleceu também subtribos, que incluía a subtribo Syngoninae onde estavam acomodados os gêneros *Xanthosoma* Schott, *Caladium* Vent., e *Syngonium* Schott, além do gênero *Acontias* Schott (posteriormente sinonimizado em *Xanthosoma* por Engler em 1920). Em 1860, Schott expandiu sua subtribo Syngoninae com a inclusão dos gêneros paleotropicais *Hapaline* Schott e *Typhonodorum* Schott.

Na Flora Brasiliensis, Engler (1878) manteve a tribo Zomicarpeae (apenas com o gênero *Zomicarpa*) conforme já estabelecido por Schott e criou o “subordo” Colocasioideae, incluindo três tribos: Steudnereae, Caladieae e Colocasieae. A tribo Caladieae incluía somente *Caladium* e *Xanthosoma*, enquanto *Syngonium* tinha sido por ele segregado na tribo Montrichardieae, em outro “subordo”. Também excluiu *Typhonodorum*, que nunca mais voltou a ser associado ao complexo Caladieae-Zomicarpeae. Tal classificação foi novamente modificada na obra de Engler “Das Pflanzenreich”(1920). Neste trabalho, Engler & Krause alteraram “sobordo” para subfamília Colocasioideae, que agrupava tanto *Xanthosoma* quanto *Caladium*, além de gêneros recém-descritos como: *Caladiopsis* Engler, *Aphyllarum* S.Moore e *Chlorospatha* Engler na subtribo Caladineae (tribo Colocasieae). *Syngonium* foi colocado na mesma subfamília e tribo, mas isolado na subtribo Syngonineae. Outro grupo incluído nesta subfamília e tribo foi o gênero asiático *Hapaline* Schott. Já a tribo Zomicarpeae foi mantida na subfamília Aroideae e teve os gêneros *Ulearum* Engl., *Scaphispatha* Brongn. ex Schott e *Zomicarpella* N.E.Br. incorporados.

A tribo Caladieae foi posteriormente retomada por Nicolson (1984) e, desde então, apenas pequenas modificações foram feitas nas duas tribos Caladieae e Zomicarpeae. Entre as modificações os gêneros *Filarum* Nicolson e *Jasarum* Bunting foram incorporados nas tribos Zomicarpeae e Caladieae, respectivamente. Além disso, Bogner (1980) transferiu *Scaphispatha* de Zomicarpeae para Caladieae. Grayum (1990), dentro da subfamília Colocasioideae, aceitou a tribo Caladineae e cinco subtribos envolvendo todos os gêneros neotropicais conhecidos até agora, mais o gênero *Hapaline*. Este também foi o primeiro a sugerir a fragmentação da subfamília entre as linhas geográficas, ou seja, grupos do velho mundo e grupos do novo mundo, pois admitia que a subfamília fosse parafilética.

Em 1995, French e colaboradores reconstruíram a primeira filogenia para a família Araceae usando fragmentos de restrição para cpDNA (Fig 1) e obtiveram os seguintes resultados: primeiramente, a tribo Colocasieae mostrava-se suficientemente distinta da tribo Caladieae para justificar o abandono completo da subfamília Colocasioideae. Além disso, o complexo Caladieae-Zomicarpeae formava um grupo monofilético, mas cada uma das tribos separadamente não. O gênero asiático *Hapaline* surge na base do cladograma, seguido por *Syngonium*. Em seguida, três linhagens evolutivas se estabelecem. A primeira mostrava a divergência de *Ulearum* + *Filarum*, seguida de um clado com *Xanthosoma* + *Chlorospatha* e um segundo clado com *Zomicarpa* + *Zomicarpella* + *Caladium*. A associação mais estreita de *Caladium* com dois outros gêneros da tribo Zomicarpeae do que com *Xanthosoma* (com quem se assemelha morfológicamente), mostrou-se surpreendente, mas foi ignorada por Mayo e colaboradores (1997), que mantiveram as tribos Caladieae e Zomicarpeae distintas baseado em características morfológicas, que eles acreditavam ser irrefutáveis. Nesta classificação, complexo Caladieae-Zomicarpeae mantém as tribos separadas com base na morfologia da inflorescência. Na tribo Zomicarpeae, por exemplo, os estames são livres e o espádice apresenta um prolongamento estéril apical, enquanto que na tribo Caladieae, os estames são

fundidos em um sinândrio e o espádice não apresenta um prolongamento estéril apical visível (Fig. 2) (Mayo *et al.* 1997). No entanto, o único caráter morfológico que unir as tribos em provável grupo monofilético é a presença de laticíferos anastomosados. Ainda nesta classificação, as tribos Caladieae e Zomicarpeae foram ambas incluídas na subfamília Aroideae, pela presença exclusiva de flores unisexuais (Mayo *et al.* 1997).

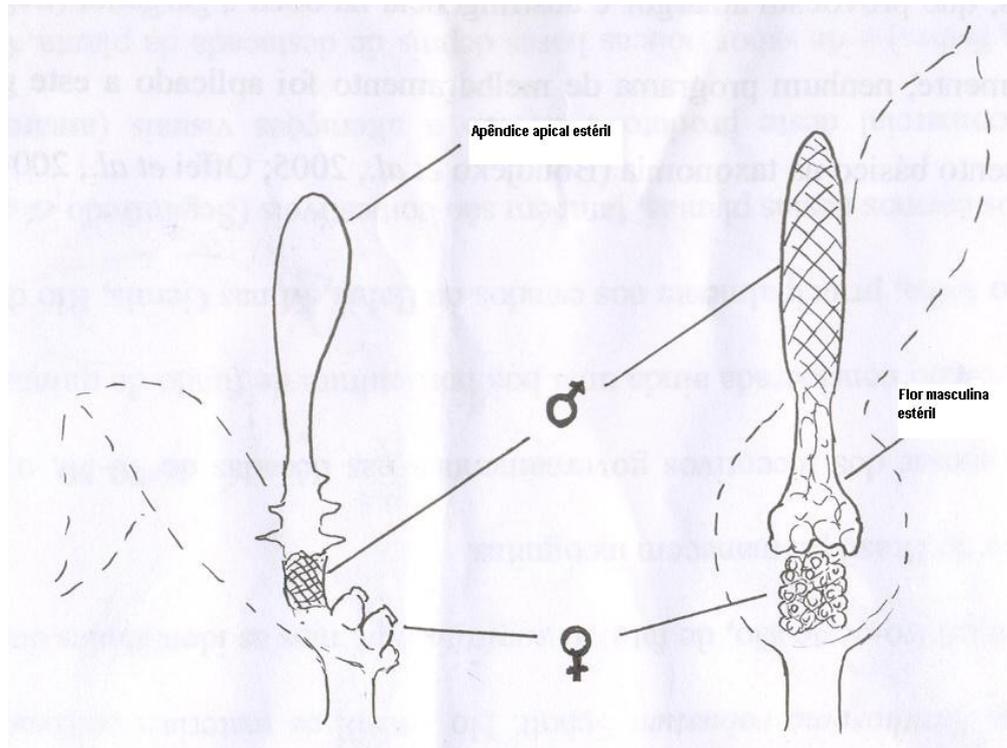


Fig. 2. Ilustração esquemática de uma inflorescência “típica” da tribo Zomicarpeae (*Zomicarpa*, à esquerda), e uma da tribo Caladieae (*Xanthosoma*, à direita).

Os membros da tribo Caladieae são predominantes no sul da América (Brasil, Peru, Colômbia entre outros países) com exceção de *Xanthosoma* que se expande desde a América central (Panamá) a América do Norte (México), mas o centro de diversidade deste gênero e dos outros pertencentes à tribo Caladieae é a região dos Andes (Madison 1981). Diversos autores tentaram avaliar as coleções desta área, mas as concepções genéricas com relação à circunscrição de alguns gêneros é bastante nebulosa dentro da tribo Caladieae. Mayo e Bogner (1988) sugeriram uma remodelação da circunscrição da tribo Caladieae em relação à separação de *Xanthosoma* e *Caladium* estabelecida no estudo de Engler e Krause em 1920.

Madison (1981) e Mayo e Bogner (1988) concordam em sugerir que há apenas uma diferença morfológica invariável capaz de manter os gêneros separados. De acordo com estes autores, o grão de pólen maduro apresenta-se como tétrades em *Xanthosoma* e mônades em *Caladium*, conseqüentemente, o grão de pólen é agora o caráter fenotípico diagnóstico para a circunscrição. Apesar desta evidência, Madison (1981) afirma que o gênero *Caladium* deriva evolutivamente de *Xanthosoma*, defendendo a hipótese que a ausência de grão de pólen em tétrede em *Caladium* seria uma reversão. Essa hipótese tornar-se ainda mais plausível pela suposta descoberta de duas espécies de *Xanthosoma* (*X. mariae* e *X. latestigmatum*) com o grão de pólen em mônade (Bogner e Gonçalves 2005). Para maioria das hipóteses sugeridas, *Xanthosoma* e *Caladium* formariam um grupo monofilético, sustentado por sua similaridade floral. A semelhança morfológica nas inflorescências é tão marcante que Crisci (1971) sugeriu que *Caladium* e *Xanthosoma* deveriam ser sinonimizados.

A própria circunscrição interna dos gêneros teve mudanças significativas durante os últimos cem anos. O gênero *Xanthosoma*, por exemplo, foi originalmente descrita por Schott em uma ordem que agrupava a espécie *Arum sagittaeifolium* descrita por Linneus em 1753. Schott (1832), além de criar o gênero *Xanthosoma*, criou também o gênero de *Acontias*, que representava as espécies tuberosas. Mais tarde, Engler uniu *Xanthosoma* com *Acontias*, mas preservou a segregação das espécies em duas secções: secção *Xanthosoma* (=“*Euxanthosoma*”) e secção *Acontias* Schott. Com relação à circunscrição original, esta união também leva em consideração a revisão realizada por Engler e Krause (1920) sobre a então subfamília Colocasioideae. Nesta mesma classificação, Engler mantém os gêneros *Caladium* e *Aphyllarum* na subtribo Caladineae baseado apenas na forma dos estames. Esta classificação foi posteriormente retomada por Madison (1981), que sugeriu a expansão do gênero *Caladium* para acomodar as espécies de *Aphyllarum*.

Ainda na tribo Caladieae, observa-se que o gênero *Chlorospatha* também apresenta grão de pólen em tetrade, uma possível sinapomorfia de um provável grupo entre *Xanthosoma* e *Chlorospatha* (Mayo e Bogner 1988). Entretanto, *Chlorospatha* apresenta um número razoável de caracteres distintos (Madison 1981; Grayum 1990) que separa satisfatoriamente de *Xanthosoma*. Mesmo assim, Mayo e colaboradores (1997) sugeriram que algumas espécies de *Chlorospatha* (e.g. *Chlorospatha longipoda*) apresentariam caracteres intermediários entre este gênero e *Xanthosoma*. Assim, neste cenário, *Xanthosoma* seria parafilético e deveria incorporar as espécies de *Chlorospatha* (Mayo e Bogner 1988; Gonçalves *et al.* 2004b).

1.1.2 Importância Econômica do complexo Caladieae-Zomicarpeae

As *Araceae* são melhores conhecidas pelo seu uso ornamental e estão entre as mais importantes folhagens ornamentais cultivadas e vendidas no mundo (Junqueira e Peetz 2002). São bonitas e usualmente apresentam uma diversidade na forma e na textura das folhas. Um exemplo ornamental bem característico é o gênero *Caladium* cujas espécies apresentam uma coloração variada de folhagem. Entre as espécies de *Caladium*, o *C. bicolor* apresenta-se como um dos cultivares mais colorido (Loh *et al.* 2000), entre outras espécies comumente cultivadas como *C. humboldtii* Schott, tão incomum por nunca ter tido flores observadas ao longo da história dos cultivares. O gênero *Syngonium* também se presta para fins ornamentais, sendo uma das plantas mais vendidas no mundo e usadas para forração em canteiros excessivamente sombreados.

Por outro lado, as *Araceae* tuberosas vêm sendo usadas como uma fonte de amido por cerca de 7000 anos no sudeste asiático, e na América do Sul desde os tempos pré-colombianos (Gonçalves 2000). O material já usado pelos incas e astecas inclui o gênero

Xanthosoma Schott, que é exclusivamente neotropical, ocorrendo da Flórida até o norte da Argentina (Gonçalves, 2000). Espécies de *Xanthosoma* são utilizadas como importante fonte alimentar de pelo menos 400 milhões de pessoas no mundo, especialmente na África Ocidental e Caribe (Towle 1961). Estudos recentes têm mostrado que as espécies de *Xanthosoma* (taiobas ou mangaritos) são fontes importantes de ferro, potássio, cálcio e manganês (Pinto *et al.* 1999), além de apresentarem níveis relativamente baixos de fatores antinutricionais (Pinto *et al.* 2001). Apesar da importância nutricional, as *Xanthosoma* também são importantes do ponto de vista estratégico, pois as taiobas podem garantir a segurança alimentar durante períodos de carência sazonal das culturas comerciais (Longhurst e Lipton, 1989), com também podem crescer e produzir em ambiente sombreado. Assim, as taiobas são culturas possíveis de serem desenvolvidas em áreas de reflorestamento.

Entre as *Xanthosoma*, o consumo é dado tanto pela folhas quanto pelo corno rico em amido (Pinto *et al.* 2001). Os cormos de taiobas estão entre as estruturas tuberosas comestíveis mais ricas em proteínas, se comparado, por exemplo, à mandioca (Onokpise *et al.* 1999). Em alguns países da África, o cultivo de *Xanthosoma* é feito consorciado com palmeiras oleíferas, como o dendê (Salako *et al.* 1995), aproveitando seu denso sombreamento. Por esses motivos, o cultivo de *Xanthosoma* tem sido fortemente recomendado pela FAO como uma das mais promissoras na luta contra a fome no terceiro mundo. No Brasil, entretanto, o cultivo de taioba é bastante pequeno, mesmo após os incentivos governamentais entre as décadas de 40-50 ao cultivo, ainda é considerada uma boa horticultura de fundo de quintal. A taioba é consumida como folha, principalmente nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santos (Seganfredo *et al.* 2001).

Apesar da recomendação, a cultura de taiobas apresenta alguns obstáculos sérios para que se estabeleça de forma definitiva. O primeiro problema seria a podridão negra das raízes, usualmente causada pelo fungo *Pythium myriotylum*, considerada a maior causa do

declínio na cultura da taioba na África (Onokpise *et al.* 1999) e Sri Lanka (Tojo *et al.* 2005). O outro fator limitante para o consumo de folhas e rizomas de taioba é a ocorrência de cristais de oxalato de cálcio nos tecidos, que provocam amargor e adstringência na boca e garganta (Seganfredo *et al.* 2001). Em relação a tantos obstáculos, nenhum programa de melhoramento foi aplicado a este grupo. Este fato pode estar diretamente relacionado a falta de, conhecimento básico da taxonomia do grupo (Offei *et al.* 2004).

A primeira denotação da espécie cultivada foi reconhecida como *Xanthosoma sagittifolium*, no entanto, existem outras espécies de *Xanthosoma* que são utilizadas como fonte de alimento, por exemplo: *X. violaceum*, *X. atrovirens*, *X. maffafa* (usada especialmente na Nigéria), *X. brasiliense*, *X. cacacu* e *X. robustum*. Apesar da importância, a taxonomia das espécies cultivadas é considerada inclusiva pela maioria dos autores. O nome pelo qual, formas cultivadas são conhecidas é usualmente *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, ainda que nenhuma análise crítica tenha sido feita em nível mundial. O material cultivado na África foi re-determinado como *Xanthosoma maffafa* Schott, depois de anos referido como *X. sagittifolium*. Recentemente, o material amplamente cultivado na Flórida como *X. sagittifolium* foi determinado como *Xanthosoma robustum* Schott (Gonçalves, com. pess.). No Brasil, os materiais cultivados no sul, sudeste, nordeste e centro-oeste são, de fato, *X. sagittifolium*, mas as identidades dos materiais cultivados no norte do Brasil permanecem incógnitas.

Uma vez que o gênero *Xanthosoma* é um dos recomendados para aumentar a produção de alimentos em países assolados pela fome (Giacometti e León 1994; Pinto *et al.* 1999), um melhor conhecimento da diversidade do gênero pode subsidiar programas de melhoramento genético.

1.2 Inferência Filogenética

Para entendermos a inferência filogenética, recorreremos primeiramente à proposta da sistemática que é descrever e interpretar a diversidade biológica, bem como sintetizar estas informações em um sistema de classificação (Judd *et al.* 1999). De acordo com Swofford e colaboradores (1996), a classificação é uma forma organizada de representar o agrupamento dos espécimes, constituindo a identidade do taxa. Com relação às informações acima, a inferência filogenética propõe classificar os espécimes, de forma, a reconstituir a história evolutiva do grupo. Quando tratamos da história evolutiva temos que compreender que a evolução não é uma simples descendência com modificação, mas envolve um processo de diversificação de linhagens atribuído à seleção natural, deriva genética ou especiação (Judd *et al.* 1999). As características diagnósticas que descrevem a diversificação de linhagens são tratadas como caracteres. Cada caráter pode apresentar diferentes estados de caráter, que de certa forma, podem contribuir como informações filogenéticas (Swofford *et al.* 1996). No entanto, é importante esclarecer aqui, que nem todo caráter atribui uma informação filogenética, mas toda a informação filogenética é dada por caráter homólogo. A identificação de um caráter homólogo nem sempre é atribuído a formas e funções semelhantes, mas esta diretamente ligado às bases ontogenéticas e a correlação de mesma posição (Nei e Kumar 2000).

Hoje, as principais linhas de classificação evolutiva estão baseadas na teoria da anagênese (mudança direcional dentro de uma única linhagem) com também da cladogênese (ramificação da árvore filogenética através da especiação) (Swofford *et al.* 1996). Entretanto, o maior problema da inferência filogenética é agrupar entidades em grupos monofiléticos que reflitam a ancestralidade comum, como também a de identificar o caráter homólogo

informativo sem ser confundido pelo caráter homoplástico. Henning (1979) esteve entre os primeiros a afirmar que a chave para o conhecimento de um grupo monofilético é que seus membros compartilhem estados de caracteres unicamente derivados, o que ele considerou como sinapomorfias. O caráter sinapomórfico é uma seqüência linear de estados de caracteres originado de uma condição ancestral (plesiomorfia) até a condição mais derivada (apomorfia) na linhagem de um mesmo grupo (Nei e Kumar 2000). Para determinar se a condição é plesiomórfica ou apomórfica, comparam-se os dados do grupo em questão com grupos externos pré-estabelecidos.

Os grupos externos são táxons que não estão dentro do grupo estudado, mas ao mesmo tempo não devem estar muito longe filogeneticamente (Swofford *et al.* 1996). A idéia de polarização, ou melhor, enraizamento da árvore filogenética foi inicialmente direcionada a relações evolutivas, que estão diretamente ligadas ao registro fóssil, mas raramente este é o caso. Para maioria dos grupos, especialmente aquele que não são facilmente fossilizados, o registro paleontológico é fragmentado demais para tornar-se útil como informação (Swofford *et al.* 1996). Acredita-se também que espécies fósseis não são necessariamente ancestrais diretos de espécies mais recentes, mas sim uma linhagem aparentada que se extinguiu (Swofford *et al.* 1996). Desta forma, o registro fóssil pode fornecer informações úteis, mas ainda há necessidade da utilização de um grupo externo para interpretar os dados.

Em relação às informações acima, a filogenia molecular surge como uma ferramenta fundamental em estudos evolutivos, definindo-se como uma metodologia objetiva para reconstruir a história evolutiva de um grupo. Esta ferramenta trabalha com avaliação de níveis de parentesco entre espécies envolvidas a partir de informações incompletas dos compartimentos genômicos (Felsestein 2004). Para tanto, se utiliza recursos computacionais para tentar estabelecer grupos que compartilham ancestrais comuns exclusivos. O primeiro passo para utilizar este método é estabelecer homologia entre os caracteres comparados.

Quando seqüências de DNA são objetos de estudo, tal procedimento presume que, ao decorrer do tempo à divergência entre as seqüências de uma mesma região aumentam em relação ao antepassado comum (Zuckerkandl e Pauling 1965). Estas diferenças podem ser utilizadas no agrupamento de entidades, partindo do pressuposto que o seu ancestral comum esteja presente como raiz da árvore filogenética, ainda que hipotético, pois a delimitação de um ancestral comum é essencial para o reconhecimento de um grupo monofilético (Swofford *et al.* 1996).

A evolução molecular pode ocorrer, em longos períodos de tempo, numa taxa aparentemente constante. Tal afirmação define o relógio molecular, cujo principal objetivo é colocar uma escala de tempo sobre a história de vida (Bromham e Penny 2003). Com relação às taxas evolutivamente constantes, Kimura e Ohta (1971) propuseram que as mutações vantajosas poderiam ser relativamente raras, em grandes populações, e as deletérias removidas rapidamente por seleção natural. Desta forma, a teoria neutra prevê que as mutações puramente neutras são substituídas em uma população em equilíbrio em uma taxa igual à taxa de mutação por geração (Bromham e Penny 2003). Em relação à teoria neutral observa-se que, se uma evolução molecular é constante entre as linhagens que se divergiram a um curto período de tempo, nota-se uma aproximação filogenética maior entre este grupo, do que com grupos que divergiram há muito tempo. A partir destas informações podem-se inferir graus de parentesco por métodos filogenéticos (Bromham e Penny 2003). No entanto, os processos evolutivos não são contínuos necessariamente, pois há fatores como deriva genética ou até mesmo a seleção natural, além da radiação adaptativa que podem afetar diretamente o número de substituições por intervalo de tempo. Logo, a taxa de evolução não é constante, e este aspecto é refletido na confiabilidade do relógio molecular, o qual é atribuído uma alta variância de quantificação a partir da frequência acumulada, assim, pode-se discernir que esta taxa evolutiva está diretamente vinculada ao tamanho efetivo da população (Bromham e Penny 2003).

Seria muito fácil trabalhar com uma taxa constante de evolução molecular. No entanto, o que se observa ao longo da evolução, é que taxas evolutivas podem variar tanto em nível de compartimentos celulares de uma mesma célula ou mesmo em diferentes regiões do mesmo compartimento genômico. Além disso, organismos distintos podem apresentar taxas evolutivas diferentes para mesma região. Ou seja, um determinado organismo pode apresentar uma taxa evolutiva mais lenta do que o esperado, enquanto o outro pode ter uma evolução tão rápida que os pontos de homologia entre eles possam ser perdidos (Kelchener 2000). Como conseqüências diversas hipótese filogenéticas não equivalentes são formuladas para explicar os dados. Com relação a este problema, há uma cautela na escolha da região ou do fragmento para inferir filogenia, pois se sabe que não existem marcadores absolutamente melhores ou piores, mas sim aqueles que são mais adequados para um estudo filogenético em determinado nível do que outros (Swofford *et al.*1996).

O critério de escolha do marcador envolve necessariamente a busca da região que mantém uma característica conservada (e garante a provável homologia), como também alguns segmentos variáveis de caráter informativo (Swofford *et al.*1996). Com relação ao grau de variação desejado, vai depender do nível taxonômico que se deseja reconstruir filogeneticamente. Quando a filogenia proposta envolve uma avaliação intra-espécies é aconselhável um marcador de evolução rápida, segundo Kelchener (2000) seria um espaçador intergênico ou íntron. No entanto, filogenias ao nível de ordem ou mesmo famílias aderem a uma taxa de evolução mais lenta, assim, um marcador gênico seria a melhor escolha.

Entre os muitos marcadores disponíveis, não é de relevância deste trabalho descrever todos de forma minuciosa, mas cabe aqui a necessidade de estabelecer uma prévia identificação sobre os marcadores que foram selecionados para reconstrução filogenética do complexo *Caladieae-Zomicarpeae*.

- *matK*

O marcador *matK* (anteriormente conhecido como *orfK*), é popularmente conhecido para estudos de sistemática de plantas, desde nível interespecífico até o nível ordinal (Young e Pamphilis 2000). A região (~1,500bp) consiste de uma ORF (“Open Reading Frame”) flanqueada por um trecho com pouco menos que 100bp do íntron de grupo II (“lariat-forming”) do gene *trnK* (Shaw *et al.* 2005). Esta ORF provavelmente codifica uma maturase, que pode estar associada ao “splincing” de íntron de grupo II (Young e Pamphilis 2000). A presença desta região na espécie parasita *Ephifagus*, um taxa que perdeu 65% dos genes de cloroplasto, sugere uma função significativa em plantas (Hilu e Liang 1997).

A região *matK* geralmente apresenta mais polimorfismo do que outros prováveis genes (Hilu e Liang 1997) e a taxa de mutação é três vezes maior do que o marcador de cpDNA mais comumente utilizado *rbcL* (Soltis *et al.* 1996). Com tais resultados, podemos utilizar este marcador em estudos filogenéticos a diferentes níveis, desde intragenérico (Gravendeel e Eurlings 2004; Grob *et al.* 2002) ao nível ordinal (Hilu *et al.* 2003). Além disso, a filogenia das angiospermas baseadas em *matK* é considerada a mais bem resolvida dentre aquelas baseadas em uma única região (Hilu *et al.* 2003), sendo considerada a melhor opção quando apenas uma região pode ser escolhida. Recentemente, *matK* tem se tornado uma região potencial para código de barras de DNA em plantas (Kress *et al.* 2005).

Segundo Hilu e Liang (1997), a região *matK* é uma ferramenta molecular poderosa que apresenta um forte potencial em resolver questões sistemáticas e evolutivas envolvendo vários níveis taxonômicos. Tal afirmação é confirmada pela capacidade da região em envolver uma porção relativamente conservada 5’ e uma outra mais variável 3’. Isso reflete em diversas resoluções sistemáticas entre diferentes famílias (Hilu e Alice 1999). Dentro da família Araceae, esta região mostrou-se eficiente na reconstrução filogenética da tribo Paleotropical Thomsonieae (Grob *et al.* 2002) como também na tribo Neotropical Spathicarpeae (Gonçalves

et al. 2006). Entre varias regiões de cpDNA, esta foi escolhida para reconstrução filogenética da família (Salazar, com. pess.).

- *trnL-F*

Acredita-se que regiões não-codificantes sejam capazes de fixar mutações em uma taxa mais alta por não sofrerem seleção. Quando tais regiões são flanqueadas por trechos bem conservados, torna-se possível o desenvolvimento de primers que permitem o sequenciamento destas. O trecho em copia única do cpDNA entre os genes *trnK* (UGU) e *trnF* (GAA) (que inclui também a região *trnL* (UAA) é notória por apresentar um sucessão de genes conservados de RNA transportador e uma centena de bases na região não-codificante (Taberlet 1991). Em tal trecho, a ausência de rearranjos de segmentos dentro de um amplo espectro taxonômico e as altas taxas de evolução molecular se torna uma excelente candidato para estudos filogenéticos em grupos de evolução recente. Especialmente a região entre os dois genes *trnL* e do gene *trnF*, mostra-se tão variável, que podem ser usadas para comparar populações de uma mesma espécie (Collevatti *et al.* 2003) ou funcionar como “código de barra de DNA” (Kress *et al.* 2005).

1.2.1 Métodos Filogenéticos

Em linhas gerais vários métodos foram propostos e desenvolvidos para elucidar a história evolutiva de um grupo. Na primeira metade do século XX, por exemplo, Mayr (1974), o principal representante da escola Gradista ou Evolutiva, tentou inferir informações filogenéticas em suas classificações baseado em um conjunto de características adaptativas. Entretanto, a escola Gradista não foi capaz de prover métodos objetivos para medir tais aspectos. Ao contrário desta, a Escola Fenética propõem métodos estatísticos de inferência bastante elaborados, mas falham em excluir o aspecto de evolução. Em 1966, Willii Henning

propôs análise das estruturas homólogas como propósito de classificação, surgindo assim a Escola Cladista ou Filogenética. O maior objetivo desta escola é estudar as relações entre os táxons utilizando métodos objetivos para obter uma classificação biológica que reflita o conhecimento atual sobre as relações de parentesco (Henning 1966). A Escola Cladista sustenta que a classificação deva expressar relações de ramificações entre as espécies não importando o grau global de semelhança ou diferença. Como resultado da classificação observa-se um cladograma que não está baseado na similaridade global, mas em uma topologia que assume que cada táxon deva ser estritamente monofilético (Swofford *et al.* 1996).

Com base na proposta de Henning (1966) e em dados moleculares pode-se inferir relações filogenéticas a partir da seleção de um método apropriado capaz de conduzir a informação contida na região molecular escolhida. No entanto, observa-se que não há um método absolutamente capaz de elucidar a hipótese correta, mas boa parte dos pesquisadores admite o princípio da parcimônia como um fator universal. O princípio da parcimônia envolve basicamente a busca de árvores com o menor número de passos evolutivos (Henning 1996). Com base neste princípio, alguns métodos filogenéticos foram estabelecidos. Entre estes observa uma divisão entre métodos baseados exclusivamente em um algoritmo e métodos baseados em um critério (Swofford *et al.* 1996). Entre os métodos baseados em um critério destacam-se duas vertentes: uma no qual o critério compara filogenias alternativas e escolhe a melhor topologia (Swofford *et al.* 1996) (dentro desta categoria há o método da Parcimônia) e a outra vertente envolve a busca da melhor topologia, comparando os dados obtidos com modelo evolutivo: Máxima Verossimilhança (MV) e a Inferência Bayesiana (Holder e Lewis 2003).

Os métodos que são exclusivamente baseados em um algoritmo foram introduzidos por Cavalli-Sforza e Edwards (1967) e por Fitch e Margoliash (1967) e são conhecidos como

Métodos de Distância. A idéia fundamental deste método é trabalhar com uma matriz que represente numericamente as distâncias evolutivas. No entanto, o diferencial deste método está relacionado à escolha da árvore filogenética, que é atribuída exclusivamente por um algoritmo. Diante desta proposta, diversos algoritmos foram propostos para elucidar as informações contidas nos dados. O método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*), por exemplo, constitui o algoritmo mais simples. Neste algoritmo, as taxas evolutivas são mais ou menos constantes dentro de uma mesma linhagem (Felsenstein 2004). Quando as taxas evolutivas de substituição variam, UPGMA frequentemente atribui uma topologia incorreta. Neste caso, o método de quadrados mínimos (*Least Squares*) pode resolver o problema da inferência filogenética, baseando-se em estimativas diferentes sobre ramificações alternativas (Nei e Kumar 2000). Entretanto, este método não apresenta um parâmetro específico para estimar uma provável topologia. Assim, a Evolução Mínima (*Minimum Evolution*) surge envolvendo métodos computacionais e uma justificativa biológica. Este método tem como princípio a soma de todas as estimativas de comprimento de ramo, no qual a topologia que apresentar o menor valor estimado é a escolhida (Nei e Kumar 2000). Embora este método tenha propriedades estatísticas bem elaboradas quando comparada aos métodos até aqui descritos é estritamente susceptível ao número excedente de táxons, requerido assim, um acúmulo substancial de tempo computacional. Então, o método Neighbor Joining (NJ) surge resgatando uma versão simplificada da ME (Felsenstein 2004). Uma concepção importante deste método é que dois táxons estão conectados por um único ancestral dentro de uma árvore enraizada. O algoritmo deste trabalho adotando que inicialmente não há táxons agrupados.

Das abordagens baseadas em um critério hoje disponíveis, a Máxima Parcimônia é a mais utilizada em filogenia, tanto para dados moleculares quanto morfológicos. Tal método opera escolhendo o cladograma que contém o menor número de passos evolutivos (Swofford

et al. 1996). Frequentemente a parcimônia encontra muitas árvores mais parcimoniosas com diferentes topologias. Para resgatar as informações contidas em todas as topologias, utiliza-se como recurso um consenso (Judd *et al.* 1999). A árvore de consenso estrito contém apenas grupos monofilético que são comuns em todas as topologias. No entanto, se houver um interesse em conhecer os clados que estão distribuídos em 50% das árvores, basta um consenso de maioria (Judd *et al.* 1999). Quando comparamos filogenias com diferentes taxa terminais, usamos um consenso semi – estrito que indica o suporte de relações sem contradição. Um outro problema que a parcimônia tenta resolver é o uso de caracteres de multiestados. A parcimônia de Wagner, por exemplo, estabelece uma análise filogenética admitindo uma escala de intervalos entre os multiestados, ou seja, é aceito uma série de eventos ordenados (Swofford *et al.* 1996). Quando tratamos de caracteres não ordenados temos a parcimônia de Fitch (Fitch 1971) que postula uma única mudança entre dois estados. Entretanto, quando duas topologias apresentam reversão e paralelismo, respectivamente, com o menor número de passos iguais cabe a parcimônia de Dollo construir dentro deste processo uma árvore que some mais ganhos do que perdas (Judd *et al.* 1999).

Uma vez utilizado o critério de parsimônia, podemos medir o suporte da árvore. O índice de decaimento, ou suporte de Bremer é uma medida relativa que mede quantos passos a mais (além do número mínimo) seria necessário aceitar até que cada clado se colapse. No entanto, este suporte não é estatístico (Judd *et al.* 1999). Já a análise de bootstrap, provavelmente a mais utilizada, é uma técnica randômica de pseudo-replicatas com repetição. Este método calcula topologias de uma nova matriz extraída pelo sorteio de caracteres isoladamente, analisando uma topologia de consenso entre todas as matrizes sorteadas (Swofford *et al.* 1996).

Por outro lado, a parcimônia não nos permite aplicar o que sabemos sobre a probabilidade de que determinadas mutações são mais prováveis do que outras. Para isso,

métodos probabilísticos foram desenvolvidos como a Máxima Verossimilhança (MV) e a Inferência Bayesiana. Em MV, a hipótese julgada por quanto melhor ela prediz os dados observados é a árvore escolhida é a que tiver a mais alta probabilidade de produzir as seqüências observadas (Holder e Lewis 2003). Este método demanda de três elementos: uma árvore de referência, um modelo explícito e uma base de dados (matriz de alinhamento) (Swofford *et al.* 1996). O objetivo deste método é calcular a probabilidade de cada dado a ser colocado na árvore filogenética.

Para execução do método de MV são requeridos modelos evolutivos capazes de calcular as probabilidades de uma série de dados na constituição de uma árvore filogenética. Estes modelos podem variar de simples como Jukes e Cantor, 1969 (modelo de 1 parâmetro) a complexos como GTR (Rodriguez 1990). O modelo “Jukes e Cantor” trabalha com a probabilidade de converter uma base nucleotídica em outra, atribuindo pesos iguais a qualquer tipo de mutação (Nei e Kumar 2000). Já o GTR é um modelo que calcula diferentes probabilidades para cada substituição e considera as taxas simétricas (Felsenstein 2004). Uma das maiores vantagens da verossimilhança além de funcionar bem com pequenas seqüências, é a capacidade em considerar o realismo da evolução molecular refletida em apenas uma árvore obtida. Este também permite estudar se o relógio molecular é aplicável ao banco de dados. Entretanto, o principal obstáculo ao uso do MV é computacional, muitas vezes demandando muito tempo para analisar a maioria das espécies.

A filogenética Bayesiana é relativamente nova, mas tem mostrado se promissora. Esta obtém simultaneamente em uma análise padrão, uma estimativa de árvore e de medidas de incertezas para cada um dos clados (Holder e Lewis 2003). O campo da estatística Bayesiana é bastante similar ao método de MV, pois também utiliza métodos probabilísticos de evolução molecular. Esta conexão apresenta um caminho mais rápido tanto para os acessos das topologias por métodos probabilísticos quanto para o suporte dos clados. A hipótese a ser

escolhida é o que maximiza a probabilidade posterior (Huelsenbeck *et al.* 2001). A probabilidade posterior permite que, além das probabilidades prévias, o método “aprenda” algo sobre os dados. Computacionalmente, as dificuldades no cálculo das probabilidades posterior são contornadas pelo uso do algoritmo “Cadeia de Markov – Monte Carlo”, (Huelsenbeck *et al.* 2001). Entre as desvantagens, este é um método que demanda de modelos (mesmo problema de verossimilhança), ou seja, o modelo pode ser equivocado à análise.

Capítulo 2
Objetivos

A proposta deste trabalho é determinar a circunscrição do Complexo Caladieae-Zomicarpeae, como também analisar as relações entre os gêneros componentes, especialmente *Caladium* e *Xanthosoma* que apresentam problemas de circunscrição. Para avaliar relações filogenéticas será utilizado o gene plastidial *matK*, uma porção do íntron *trnK* que flanqueia esta região e o espaçador intergênico *trnL-trnF*.

Objetivos específicos:

- Avaliar, utilizando segmentos de cpDNA, a topologia obtida por French (1995) que apresenta o Complexo Caladieae-Zomicarpeae como um grupo monofilético e não segregado em duas tribos constituintes, como atualmente aceito pela maioria da comunidade científica (Mayo *et al.* 1997).
- Testar a hipótese de Mayo e Bogner (1988) que separa o gênero *Caladium* de *Xanthosoma* baseado exclusivamente no caráter grão de pólen.
- Verificar a aproximação filogenética de *Clorospatha* em relação à *Xanthosoma*, já que ambas possuem o grão de pólen tétrade, mas divergem com relação à morfologia da inflorescência.
- Verificar o posicionamento taxonômico de algumas espécies de posição dúbia, como *Caladium lindenii* e *Xanthosoma mariae*.

Capítulo 3
Materiais e Métodos

3.1 Estudos de seqüências de DNA

3.1.1 Seleção dos taxa

Um total de 58 acessos foi incluído na análise de dados de seqüências (Tabela 1), de forma a representar todo o complexo Caladieae-Zomicarpeae, com exceção de *Jasarum*. Este gênero, em particular, ficou fora da análise, pois o único material obtido era herborizado e não conseguimos sequer amplificar o DNA “template”. As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) são definidas como coleções e não como espécies. Tentou-se incluir não só todos os gêneros aceitos, como também grupos anteriormente vistos como gêneros à parte. Material adequado de *Caladium tuberosum* (anteriormente *Aphyllarum tuberosum*) foi recentemente obtido, mas não houve tempo para o sequenciamento. Em adição, nós incluímos três espécies como grupo externo representando clados que estabelecem relações próximas ao complexo. A escolha do grupo externo foi baseada na filogenia da família proposta por French e colaboradores (1995). Os grupos externos são: *Amorphophallus bulbifer*, *Orontium aquaticum* e *Typhonium roxburgkii*.

Tabela 1: lista de acessos utilizados para o complexo *Caladieae-Zomicarpeae*

<i>Espécimes</i>	<i>Voucher</i>	<i>Origem</i>
<i>Orontium aquaticum</i> Schott	Acesso: AF543744	América do Norte
<i>Amorphophallus bulbifer</i> Schott	Gonçalves 742 (UB)	China
<i>Typhonium roxburghii</i>	Gonçalves s.n.	Ruderal em Fortaleza (CE)
<i>Caladium bicolor</i> Ventenat	Gonçalves 820 (UB)	Serra de Baturité (CE)
<i>Caladium lindenii</i> (André) Madison	Gonçalves s.n.	Cultivada no Sítio Burle-Marx (RJ)
<i>Caladium sp.nov.1</i>	Gonçalves 1114 (UB)	Medicilândia (PA)
<i>Caladium sp.nov.2</i>	Gonçalves s.n.	Bolívia
<i>Caladium schomburgkii</i> Schott	Gonçalves s.n.	Manaus (AM)
<i>Chlorospatha atropurpurea</i> Engler	Hannon 97-052 (MO)	Equador, Esmeraldas.
<i>Chlorospatha croatianae</i> Engler	Croat s.n. (MO)	Costa Rica
<i>Chlorospatha dodsonii</i> (G.S. Bunting) Madison	Dodson 6755 (SEL)	Equador, Pichincha
<i>Chlorospatha longipoda</i> (K. Krause) Madison	Croat & Hannon 86607 (MO)	Equador, Pastaza
<i>Filarum manserichense</i> Nicolson	Hetterscheid H.AR.130 (L)	Peru
<i>Hapaline benthamiana</i> Schott	Hetterscheid H.AR. 56 (L)	Tailândia
<i>Scaphispatha gracilis</i> Brongn. ex Schott	Gonçalves 646 (UB)	Arraias (TO)
<i>Scaphispatha gracilis</i> Brongn. ex Schott	Gonçalves 1210 (UB)	Abreulândia (TO)
<i>Scaphispatha robusta</i> E.G. Gonç.	Gonçalves 681 (UB)	Arraias (TO)
<i>Scaphispatha robusta</i> E.G. Gonç.	Gonçalves 1128 (UB)	Canaã dos Carajás (PA)
<i>Syngonium angustatum</i> Schott	Gonçalves 743 (UB)	Cultivado em São Paulo (SP)
<i>Syngonium auritum</i> (L.) Schott	Gonçalves 764 (UB)	Cultivado em São Paulo (SP)
<i>Syngonium vellozianum</i> Schott	Gonçalves1110 (UB)	Medicilândia (PA)
<i>Syngonium yurimaguense</i> Engl	Gonçalves s.n.	Tefé (AM)
<i>Ulearum donburnsii</i> Croat	Croat 84834 (MO)	Equador, Morona Santiago
<i>Ulearum sagittatum</i> var. <i>sagittatum</i> Engler	Jangoux s.n. (M)	Rio Moa (AC)
<i>Ulearum sagittatum</i> var. <i>viridispatum</i> Bogner	Bogner 1947 (INPA)	Rio Moa (AC)
<i>Xanthosoma pedatissectum</i> E.G.Gonç. sp.nov. ined.	Gonçalves 691 (UB)	Arraias (TO)
<i>Xanthosoma appendiculatum</i> Schott	Gonçalves s.n.	Cultivado em Belém (PA)
<i>Xanthosoma aristeguietae</i> (Bunting) Madison	Gonçalves 202 (UB)	Miranda (MS)
<i>Xanthosoma atrovirens</i> K. Koch & C.D. Bouché	Gonçalves s.n.	Cultivado no Sítio Burle Marx (RJ)
<i>Xanthosoma atrovirens</i> var. <i>panduriforme</i> Engl.	Gonçalves s.n.	Cultivado em São Paulo (SP)
<i>Xanthosoma atrovirens</i> "Albomarginatum"	Gonçalves s.n.	Cultivado em Brasília (DF)
<i>Xanthosoma blandum</i> Schott	Gonçalves 891 (UB)	Manaus (AM)
<i>Xanthosoma brasiliense</i> (Desf.) Engl	Boos s.n.(MO)	Trinidad
<i>Xanthosoma caulotuberculatum</i> G.S. Bunting	Gonçalves 1236 (UB)	Serra do Navio (AP)
<i>Xanthosoma hyleae</i> Engl. & K.Krause	Gonçalves 962 (UB)	Bujari (AC)
<i>Xanthosoma wendlandii</i> (Schott) Standl.	Gonçalves s.n.	Cultivado no Sítio Burle Marx (RJ)
<i>Xanthosoma mafaffa</i> Schott	Gonçalves 1019 (UB)	Cultivado em Brasília (DF)
<i>Xanthosoma mariae</i> Bogner & E.G.Gonç.	Sizemore s.n. (M)	Peru
<i>Xanthosoma maximilianii</i> Schott	Gonçalves 419 (UB)	Uruçuca (BA)
<i>Xanthosoma meridionalis</i> E.G.Gonç.sp.nov. ined.	Gonçalves 392 (UB).	Cotia (SP)
<i>Xanthosoma meridionalis</i> E.G.Gonç.sp.nov. ined.	Gonçalves s.n.	Florianópolis (SC)
<i>Xanthosoma pentaphyllum</i> Engl.	Gonçalves 837 (UB)	Ipu (CE)
<i>Xanthosoma poecile</i> (Schott) E.G. Gonç., comb. ined.	Gonçalves s.n.	Itajaí (SC)
<i>Xanthosoma plowmanii</i> Bogner	Gonçalves 690 (UB)	Monte Alegre de Goiás (GO)
<i>Xanthosoma pottii</i> E.G.Gonç.	Pott et al. 7685 (CPAP)	Fazenda Nhumirim (MS)
<i>Xanthosoma pulchrum</i> E.G.Gonç.	Gonçalves 267 (UB)	Comodoro (MT)
<i>Xanthosoma pubescens</i> Poepp.	Gonçalves s.n.	Equador
<i>Xanthosoma mexicanum</i> Liebm.	Gonçalves s.n.	Costa Rica
<i>Xanthosoma riedelianum</i> (Schott) Schott	Gonçalves 764 (UB)	Cultivado em Belo Horizonte (MG)
<i>Xanthosoma riparum</i> E.G.Gonç.	Gonçalves 360 (UB)	Mossâmedes (GO)
<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott	Gonçalves 911 (UB)	Areias (PB)
<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott	Gonçalves 1088 (UB)	Placas (PA)
<i>Xanthosoma striolatum</i> Mart. ex Schott	Gonçalves 1076 (UB)	Rurópolis (PA)
<i>Xanthosoma syngoniifolium</i> Rusby	Gonçalves 667 (UB)	Arraias (TO)
<i>Xanthosoma violaceum</i> Schott	Gonçalves 184 (UB)	Cultivada em Brasília (DF)
<i>Zomicarpa steigeriana</i> Schott	Gonçalves 742 (UB)	Uruçuca (BA)
<i>Zomicarpella amazonica</i> Bogner	Bogner 1985 (UB)	Tabatinga (AM)

3.1.2 Obtenção, Amplificação e Seqüenciamento de DNA

Todo o material foliar foi coletado fresco e desidratado em gel de sílica, mantido no mesmo até o momento da extração. Para extração foi utilizado o protocolo CTAB de Doyle e Doyle (1987).

Para este estudo só foram utilizados acessos com dados completos (*matK*, íntron 3' *trnK* e o espaçador *trnL-trnF*). A amplificação do DNA foi realizada em uma reação de 20 μ l. Cada região continha 0.15 μ M de cada oligonucleotídeo, 0.20 μ M de cada dNTP, 1X "Reaction buffer" (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 0.20mg/ml de BSA, 1.5 unidades de Taq DNA polymerase (Phoneutria, BR), e 0.15ng de DNA "template". A temperatura de anelamento variou entre 56° a 58°C. A amplificação foi realizada no Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA) com as seguintes condições: 96°C por 2' minutos (1 ciclo), 94°C por 1', 56°C por 1', 72°C por 2' (a cada ciclo acrescenta-se 5'') (35 ciclos) e 72°C por 10' (1 ciclo). Para o marcador *trnL-trnF*, os primers "E-F" (Taberlet *et al.* 1991) foram combinados para amplificação do espaçador intergênico. Para o marcador *matK* o primer -19F (Gravendeel *et al.* 2001) e 2R (Steele e Vilgalys 1994) foram usados na amplificação da porção inteira da ORF incluindo o íntron 3' do íntron *trnK* (~1900bp). Os produtos de PCR foram purificados com a ação de duas enzimas: Exonuclease I e a Fosfatase Alcalina de Camarão (ou SAP, "Shrimp Alkaline Phosphatase"), que combinadas originam o produto comercial EXOSAP-IT (USB Corporation), cuja principal objetivo é degradar material de fita simples e dNTPs.

Os produtos de PCR foram seqüenciados no ABI Prism 377 seqüenciador automático de DNA (Applied Biosystems, CA) usando o "kit" de seqüenciamento DYEnamic™ ET terminator (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), de acordo com as instruções do fabricante. Para o seqüenciamento completo da região *matK* foram utilizados tanto o primers

-19F quanto o 2R. No entanto, houve a necessidade de utilizar primers internos que fossem capazes de sobrepor toda esta região para estabelecer uma maior confiabilidade dos dados. Neste propósito, foram selecionados os primers 390F e 1326R (Cuénoud *et al.* 2002) que estavam disponíveis na literatura. Entretanto, observou-se que estes oligonucleotídeos não eram suficientes para sobrepor toda a região. Então, foram desenvolvidos dois novos primers internos (1034F e 533R) (Batista *et al.* submetido) (Anexo 1) com intuito aumentar a sobreposição da região. A análise das seqüências e a obtenção da fita consenso foi realizada utilizando o programa SeqScape 2.5 (Applied Biosystems).

Para região *matK* foi analisado filogeneticamente toda região codificante, juntamente com uma parte do íntron *trnK* que foi seqüenciado parcialmente. Primeiramente, os 18bp da ORF foram excluídos por causa do pobre seqüenciamento e aproximadamente os 15bp upstream do stop códon também foram excluídos devido ao alinhamento dúbio causados por eventos de “indels”.

3.1.3 Alinhamento de seqüências e análise filogenética

O alinhamento múltiplo foi realizado pelo “software” ClustalW (Thompson *et al.* 1994). Para ambos os marcadores, a penalidade de abertura do “gap” foi definida como 25 e a para extensão do “gap” de 10, de acordo com o trabalho do Gonçalves (2007). O alinhamento foi otimizado manualmente. Para esta análise, os fragmentos ambíguos foram excluídos.

3.2 Análise de Máxima Parcimônia (MP)

O software PAUP v.4.0b8 (© Smithsonian Institution) foi utilizado para análise de Máxima Parcimônia. Os caracteres tiveram pesos iguais e foram tratados de forma não

ordenada (parcimônia de Fitch) para cada partição individualmente. A análise consistiu de 1000 réplicas usando a adição randômica de seqüências. A troca de ramos foi realizada pelo algoritmo (TBR), salvando apenas as primeiras 30.000 árvores mais parcimoniosas e usando um caráter de transformação acelerada (ACCTRAN). O suporte dos clados foi obtido por meio de 1000 replicas de bootstrap usando os mesmos parâmetros da busca heurística acima, porém permitindo que o programa salvasse apenas as 100 primeiras árvores mais parcimoniosas, para reduzir o tempo computacional. Valores de bootstrap com menos de 70% foram considerados de baixo suporte, valores entre 70% e 90% foram considerados com suporte moderado e valores acima de 90% foram de forte suporte de acordo com a sugestão de Shaffer e colaboradores (1997).

Posteriormente, de acordo com os parâmetros acima, foi testado a compatibilidade das partições usando o teste “Incongruence Distance Length” (IDL) (Farris *et al.* 1994), como implementado no software PAUP v.4.0b10 (Swofford 2002). As partições definidas neste teste foram: (1) ORF *matK*, (2) uma porção do íntron *trnK* e (3) espaçador intergênico *trnL-trnF*. Caracteres não informativos foram excluídos a priori para análise (Lee 2001) que consiste de 1000 replicas. A significância de rejeição foi de P menor ou igual a 0.010, como sugerido por Cunningham (1997).

3.3 Análise de Inferência Bayesiana

Para este método foi selecionado o modelo evolutivo que melhor se ajusta aos dados com auxílio do programa ModelTest2.2 (© Nylander 2004), usando o teste “Likelihood Ratio Test” ou LRT (Huelsenbeck e Crandall 1997). Posteriormente, o programa MrBayes 2.01 (© Huelsenbeck e Ronquist 2001) inferiu prováveis topologias com base no modelo evolutivo selecionado. Para esta análise usamos 1.000.000 gerações, amostrando cada 10 gerações e

quatro simulações da cadeia de “Monte Carlo” utilizando as condições “default”. Uma árvore de consenso de maioria foi obtida aceitando-se apenas clados com probabilidades posteriores acima de 90%. Para determinar o limiar de “burn-out”, isto é, as árvores que deveriam ser excluídas do consenso, os valores dos logaritmos naturais da verossimilhança ($\ln L$) foram plotados ao longo das gerações, observando-se o ponto de estabilização. Excluiu-se todas as árvores obtidas anteriormente a este ponto.

Capítulo 4
Resultados

4.1 Modelos de evolução

O modelo selecionado pelo MrModelTest2.2 para o gene *matK* foi o GTR+I+G, que é o modelo “General Time Reversible” (Rodriguez *et al.* 1990), aceitando sítios invariáveis e aceitando também uma distribuição gama para sítios heterogêneos (Yang 1994). Com relação ao íntron, o modelo escolhido foi o F81+G, que o modelo de Felsenstein (Felsenstein 1981) também aceitando uma distribuição gama para sítios invariáveis. O GTR foi escolhido como melhor modelo de evolução para o espaçador *trnL-trnF*.

4.2 Congruência entre os dados

O teste IDL mostrou valores de P entre 0,020 a 0,040, não rejeitando a combinabilidade total das partições aceitando o limiar de $P \leq 0,01$. Todas as análises par-a-par também se mostraram congruentes, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de “P” para o Teste de Incongruência (IDL) par-a-par

	<i>matK</i>	Íntron <i>trnK</i>	Espaçador <i>trnL-F</i>
<i>matK</i>	-	0.0400	0.0200
Íntron <i>trnK</i>	-	-	0.0400
Espaçador <i>trnL-F</i>	-	-	-

4.3 Limiar de “Burn-out” para análises Bayesianas

Os valores de $\ln L$ plotados ao longo das gerações para cada análise estão apresentados na Fig. 3. Em todos os casos, a estabilização ocorreu entre 8000 e 13000 gerações. Optou-se por excluir as 20.000 primeiras árvores (20%) para a montagem do consenso.

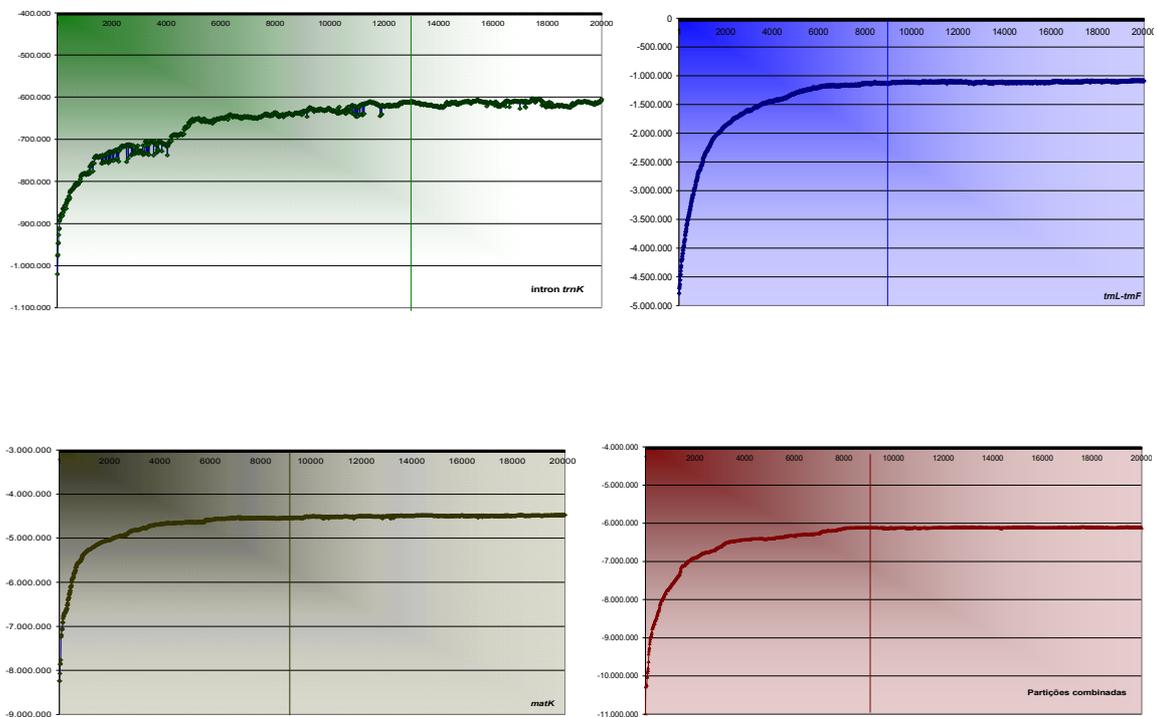


Fig 3. Comportamento do logaritmo natural da verossimilhança ao longo das gerações, para cada uma das partições. As linhas verticais indicam um ponto seguro de corte, o qual há a mesma probabilidade para a mesma árvore. O gráfico em verde: íntron *trnK*; azul: *trnL-trnF*; cinza: *matK*; vermelho: partições combinadas.

Tabela 3: Sumário filogenético de todos os dados usados neste estudo

Dados	Nº de caracteres alinhados	Nº de caracteres variáveis/informativos para Parcimonia	Nº de árvores mais parcimoniosas	Nº de passos	CI/RI	RC/ HI	Nº de nós internos	Nº de clados com bootstrap >90%	Nº de clados com probabilidade >99%
<i>matK</i>	1429	116/97	170	307	0.752/0.873	0.636/0.263	29	19	17
<i>trnL-F</i>	308	35/32	+30.000	63	0.933/0.961	0.897/0.670	18	3	9
Íntron <i>trnK</i>	179	18/13	+ 30.000	41	0.795/0.859	0.684/0.205	11	3	4
Todas as evidências combinadas	1914	160/138	7791	428	0.75/0.862	0.625/0.266	31	19	20

4.3.1 *matK*

Um sumário contendo as principais características filogenéticas para esta e todas outras análises deste estudo estão presentes na Tabela 3.

Para análise de MP, a árvore de consenso estrito com os valores de bootstrap (BP) estar representada na Fig. 4. O complexo Caladieae-Zomicarpeae aparentemente é monofilético, com um valor de suporte de bootstrap forte (BP 100). De acordo com a filogenia obtida, o gênero asiático *Hapaline* surge na base deste cladograma seguida por um clado contendo *Caladium lindenii* juntamente com os acessos de *Syngonium*. Ainda em relação a este marcador, podem-se identificar três linhas evolutivas internas. Na primeira linha evolutiva observa-se um grupo monofilético compondo *Zomicarpella* + *Zomicarpa* + *Caladium* + *Scaphispatha* fortemente suportado (BP 93). Enquanto, *Filarum* + *Ulearum*, atualmente classificado na tribo Zomicarpeae, formam uma segunda linha evolutiva fortemente suportada (BP 100) e bem resolvida internamente, com o gênero peruano *Filarum* surgindo na base deste grupo monofilético (BP 90). E a terceira linha também fortemente suportada (BP 93) reúne em um único clado os gêneros: *Xanthosoma* e *Chlorospatha*.

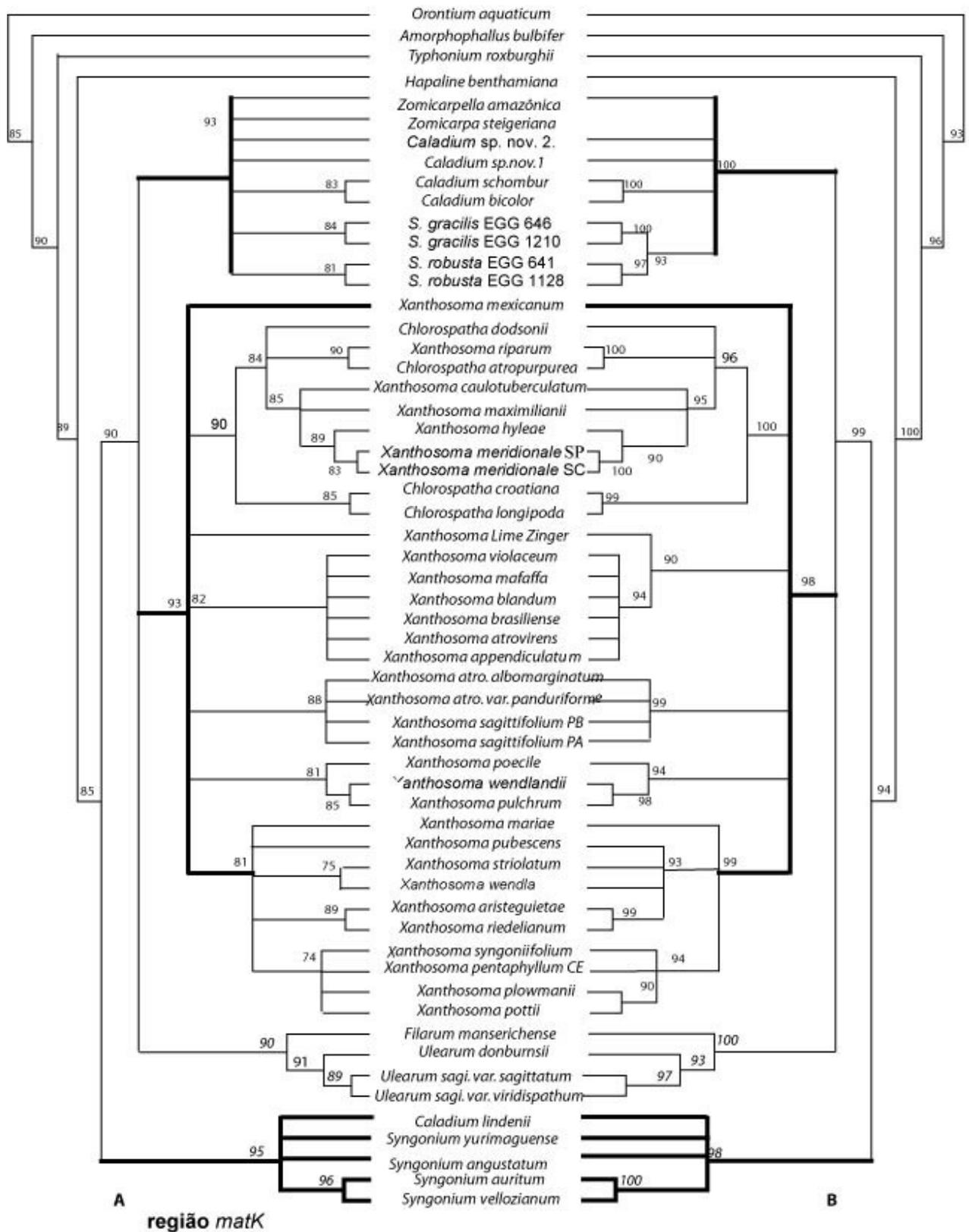


Fig 4. Reconstrução filogenética para o complexo Caladieae-Zomicarpeae para o marcador *matK* usando Máxima Parcimônia (MP) (A) e Inferência Bayesiana (B). Em MP os valores de bootstrap foram inseridos na topologia de consenso estrito. E o suporte de máxima probabilidade a posterior e dado em porcentagem.

O clado que contém todos os acessos de *Xanthosoma* deste trabalho juntamente com *Chlorospatha* apresenta uma resolução interna parafilética, e o mais surpreendente é que os acessos de *Chlorospatha* surgem mais de uma vez no cladograma. O exemplo disso, *Chlorospatha atropurpurea* é aparentemente grupo irmão de *Xanthosoma riparum*, com forte suporte de bootstrap (BP 91), enquanto as espécies (*Chlorospatha croatica*, *Chlorospatha longipoda* e *C. dodsonii*) surgem em pontos distintos deste clado, intercaladas com espécies consideradas “típicas” de *Xanthosoma*. Ainda com relação à resolução interna do clado das *Xanthosoma* observamos que há uma politomia basal entre alguns espécimes, que de acordo com as considerações morfológicas fogem a classificação genérica do gênero *Xanthosoma*. As demais espécies de *Xanthosoma* estão distribuídas em dois grupos internos fortemente suportados (BP 81 e BP 90).

O marcador aparentemente é eficiente na constituição dos clado, no entanto, observa-se que metodologia adota de MP é bastante “dura” com os dados, é isso reflete na resolução interna dos mesmos. Na mesma topologia da Fig 4 utilizou-se uma outra metodologia baseada em uma árvore de consenso de regra de maioria IB, que mostrou-se essencialmente similar a árvore filogenética de MP, diferendi apenas em relação aos índices de suporte internos dos clados.

4.3.2 Íntron *trnK*

A região utilizada do íntron *trnK* consistiu de 179 posições alinhadas e apenas 13 se mostraram filogeneticamente informativas para parcimônia. O resultado da análise mostrou um cladograma com uma vasta politomia (Fig. 5), refletindo o baixo potencial informativo para região, em análises isoladas (Tabela 3). A análise de máxima parsimônia produziu essencialmente à mesma topologia da análise de inferência bayesiana.

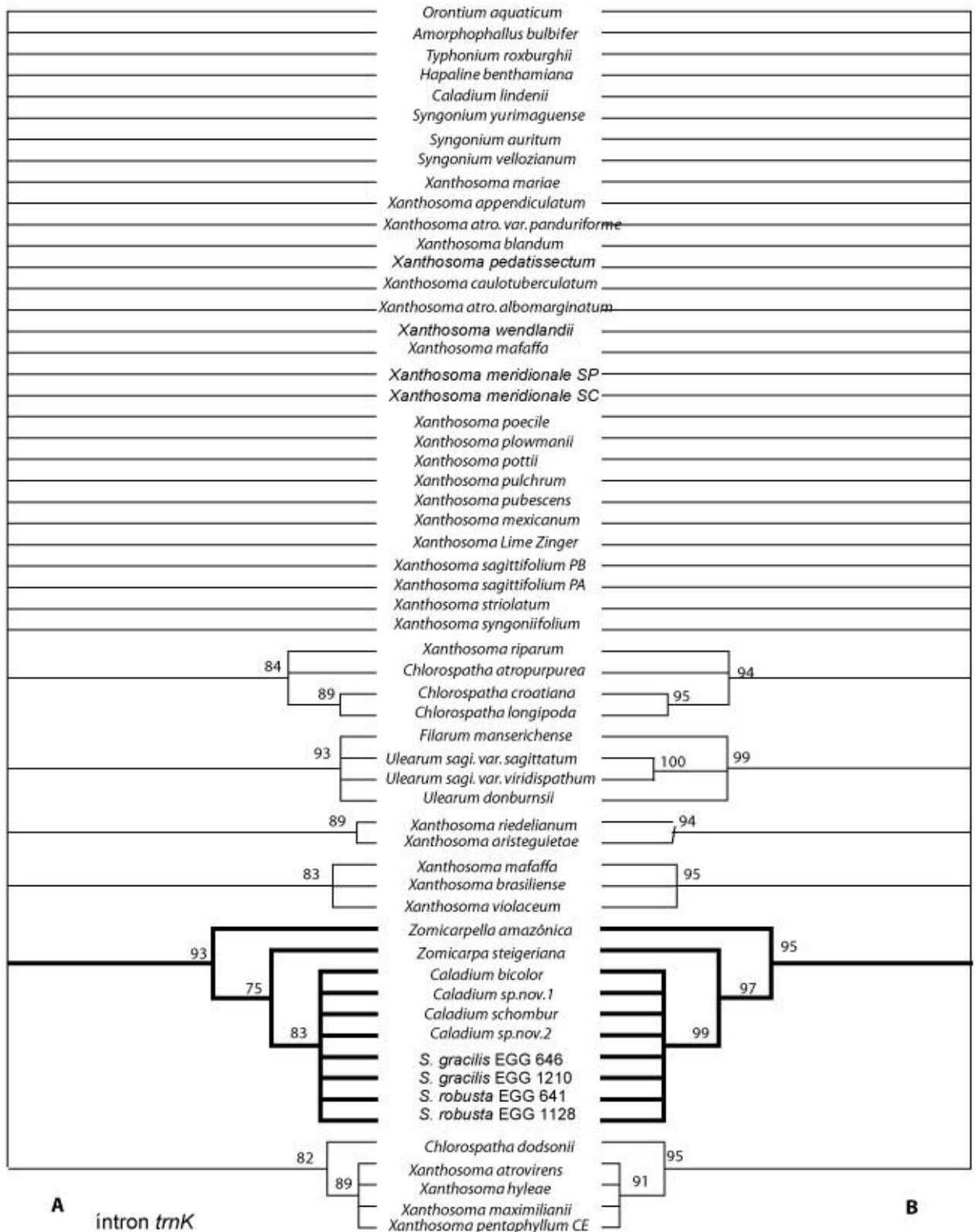


Fig 5. Reconstrução filogenética para o complexo Caladieae-Zomicarpeae para o marcador íntron *trnK* usando Máxima Parcimônia (MP) (A) e Inferência Bayseiana (B). Em MP os valores de bootstrap foram inseridos na topologia de consenso estrito. E o suporte de máxima probabilidade a posterior e dado em porcentagem.

Este marcador não foi capaz de resolver o complexo Caladieae-Zomicarpeae como monofilético, já que os grupos externos *Typhonium* e *Amorphophallus* surgiram junto com gêneros do complexo em uma politomia basal. Entretanto, a resolução na base do clado *Zomicarpella* + *Zomicarpa* + *Caladium* + *Scaphispatha*, mostrou-se maior. Neste clado, *Zomicarpella* surge na base, seguido de *Zomicarpa* e de um clado contendo todas as espécies testadas de *Caladium* (exceto *C. lindenii*) e *Scaphispatha*. Apenas outros dois grupos moderadamente suportados formam-se nesta análise. O primeiro clado (BP 82) consiste em algumas espécies de *Xanthosoma* enquanto o outro clado inclui boa parte das espécies de *Xanthosoma* e também os gêneros *Ulearum* e *Filarum*.

4.3.3 Espaçador *trnL-trnK*

O espaçador *trnL-trnF* compreende 308 posições nucleotídicas alinhadas para o complexo Caladieae-Zomicarpeae, com 35 caracteres variáveis e 32 destes informativos para a parsimônia.

Para análise de MP esta região mostrou um alto índice de homoplasia (Tabela 3) e proporcionalmente baixos valores de bootstrap (Fig. 6.) Entre os grupos internos formados para esta região, não podemos inferir que o complexo Caladieae-Zomicarpeae seja monofilético, já que *Hapaline* encontra-se na base e os outros grupos externos (*Typhonium* + *Amorphophallus*) estão mais internos. No entanto, observamos mais uma evidência de que *Caladium* está filogeneticamente mais próximo de *Zomicarpella*, *Zomicarpa* e *Scaphispatha*, com um suporte alto (BP 97). Da mesma forma, podemos destacar que outro clado fortemente sustentado (BP 92) incorpora algumas espécies de *Xanthosoma* e todas as espécies de *Chlorospatha*. Um terceiro clado bem sustentado inclui *Filarum* e *Ulearum*. As três topologias com sustentação acima de 90 corroboram os resultados com a região *matK*.

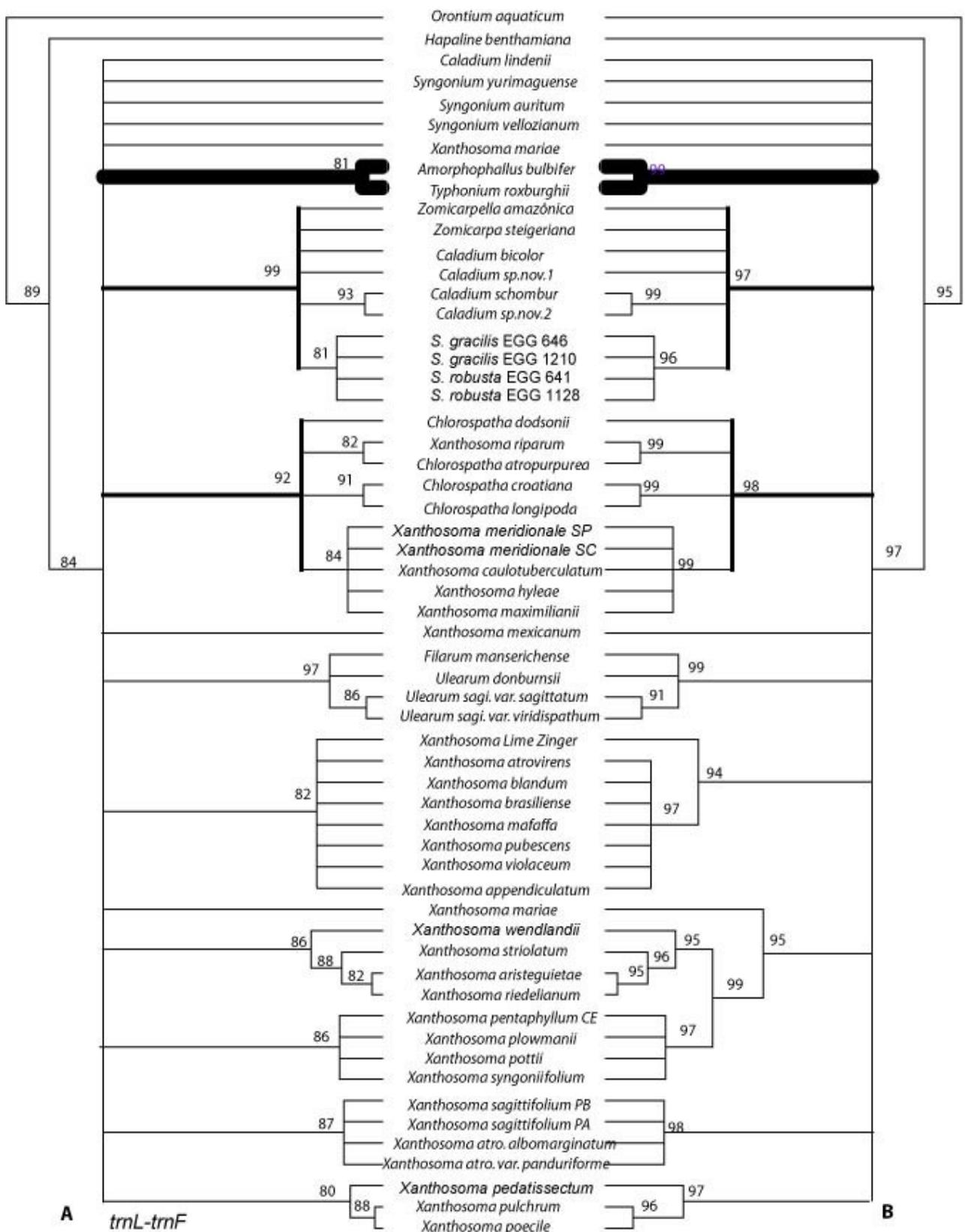


Fig 6. Reconstrução filogenética para o complexo Caladieae-Zomicarpeae para o marcador *trnL-trnF* usando Máxima Parcimônia (MP) (A) e Inferência Bayseiana (B). Em MP os valores de bootstrap foram inseridos na topologia de consenso estrito. E o suporte de máxima probabilidade a posterior e dado em porcentagem. Os ramos em negrito destacam que os grupos externos foram incorporados na topologia como um clado interno.

4.3.4 Dados combinados (*matK* + íntron *trnK* + espaçador *trnL-trnF*)

A combinação das partições genotípica (*matK* + *trnL-trnF* + íntron *trnK*) consiste em matriz de 160 caracteres polimórficos e 138 potencialmente informativos para parcimônia (Tabela 3).

Tanto na análise de MP quanto na de IB, a matriz genotípica combinada atribui à circunscrição do complexo Caladieae-Zomicarpeae como grupo monofilético e fortemente suportado (BP 90 PP 99%) (Fig. 7). A resolução interna da matriz combinada foi maior que qualquer uma das análises dos dados isolados. Entre os grupos internos observamos a posição de *Hapaline bethamiana* na base do clado fortemente suportada (BP 90 e PP 99%), seguida da divergência de grupo monofilético composto pelas espécies testadas de *Syngonium* e *Caladium lindenii* também fortemente suportado (BP 100 PP 100%). Os demais espécimes do complexo estão distribuídos em um clado fortemente suportado (BP 90 e PP 99%), que diverge em três linhagens evolutivas distintas: o clado *Zomicarpella*+*Zomicarpa*+*Caladium* +*Scaphispatha*, o clado *Filarum*+*Ulearum* e o clado *Xanthosoma* +*Chlorospatha*.

Em relação às três linhagens evolutivas internas, o clado contendo *Zomicarpella* na base, seguido por *Zomicarpa* (ambos tradicionalmente incluídos na tribo Zomicarpeae) com grupo irmão de *Caladium* + *Scaphispatha* (atualmente pertencentes à tribo Caladieae) é fortemente suportado (BP 100 e PP 100%). O mesmo ocorre com *Filarum* e *Ulearum* que se mantêm juntos e fortemente suportados (BP 100 e PP 100%) com descrito para região *matK*. Em relação à terceira linhagem, o clado composto pelas espécies amostradas de *Xanthosoma* e *Chlorospatha* apresentam um forte suporte (BP 95 PP 97%). Dentro deste clado observamos cinco grupos internos fortemente suportados por máxima probabilidade a posteriori (%). É em nenhum deste clados podemos observar os espécimes de *Chlorospatha* como um grupo monofilético, mas sempre combinado com *Xanthosoma*.

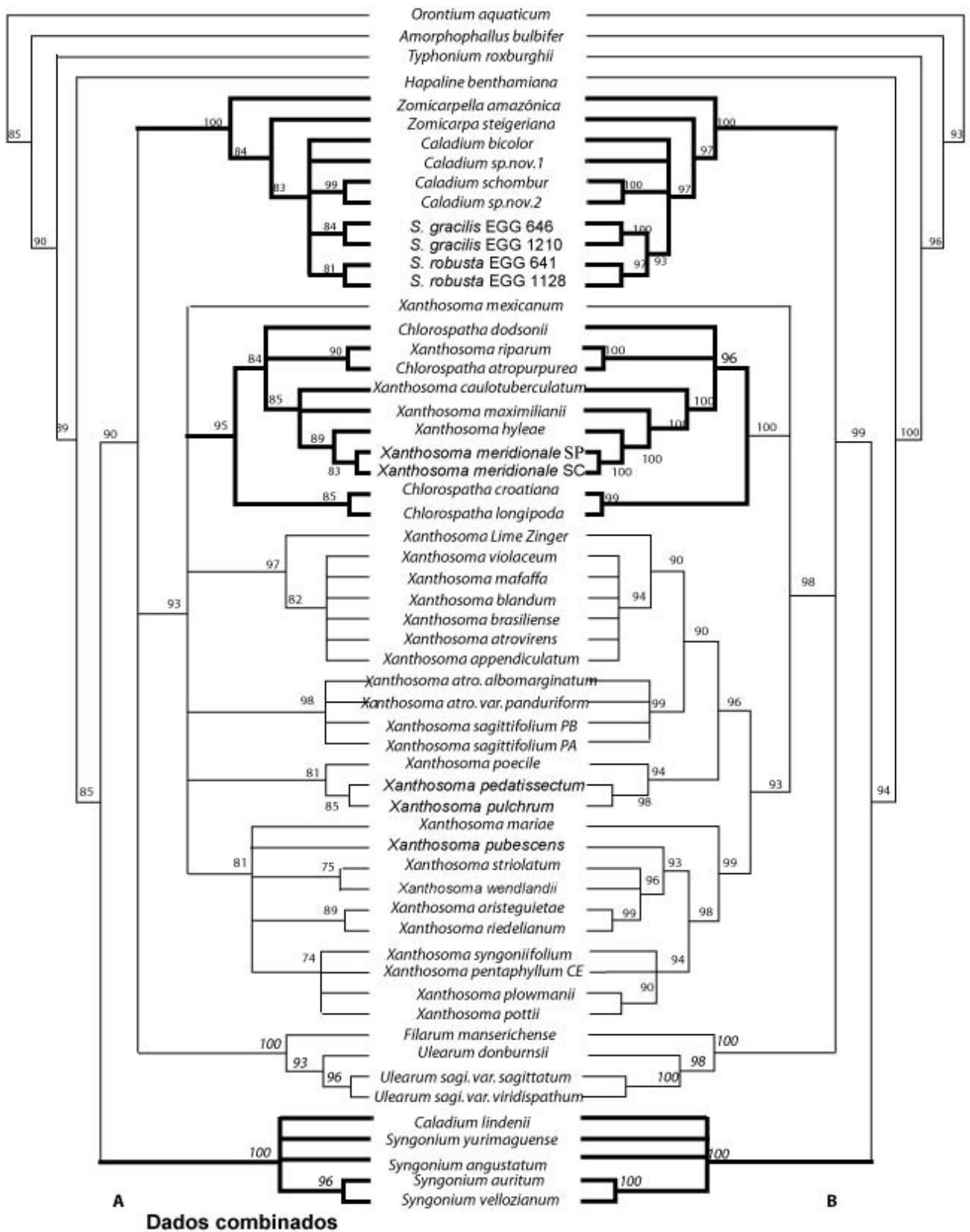


Fig 7. Reconstrução filogenética para o complexo Caladieae-Zomicarpeae para a combinação de marcadores *matK*, íntron *trnK* e espaçador *trnL-F* usando Máxima Parcimônia (MP) (A) e Inferência Bayseiana (B). Em MP os valores de bootstrap foram inseridos em topologia de consenso estrito. E o suporte de máxima probabilidade a posteriori e dada em porcentagem.

Capítulo 5
Discussão

5.1 O paradigma evolutivo para o complexo Caladieae-Zomicarpeae

A proposta inicial deste trabalho foi tentar resolver a circunscrição do complexo Caladieae-Zomicarpeae a partir da análise filogenética de três marcadores de cpDNA (*matK*, espaçador *trnL-trnF* e a porção 3' do íntron *trnK*). O teste de IDL (Farris *et al.* 1994) aceitou a combinabilidade destas partições. Entretanto, as filogenias moleculares obtidas para o espaçador *trnL-trnF* bem como para o íntron *trnK* não mostraram-se muito resolvidas. O íntron *trnK* não contradiz a hipótese que o complexo é monofilético, mas também não fornece subsídios filogenéticos concordantes. No entanto, a baixa resolução deste compartimento provavelmente estar relacionado ao um número reduzido de caracteres informativos para a parsimônia (13). Já o espaçador *trnL-trnF* contradiz o monofiletismo do complexo, já que *Hapaline* encontra-se na base do cladograma e os grupos externos (*Typhonium* + *Amorphophallus*) são constituídos como um grupo interno. Entretanto, a análise deste compartimento mostrou um alto índice de homoplasia (Tabela 3), além dos dados saturação (informação não mostrada). No entanto, a associação de todos os compartimentos em uma única matriz genotípica aumentou substancialmente a definição interna dos clados, o que já pode ser considerado uma justificativa para combinar matrizes (De Queiróz 1993). Assim, optamos por discutir as implicações filogenéticas, utilizando a árvore de dados combinados como uma hipótese evolutiva para o grupo.

A pequena diferença entre os resultados da análise bayesiana e da análise de máxima parcimônia demonstra que o padrão obtido não é sensível ao método aplicado.

5.2 A circunscrição do complexo Caladieae-Zomicarpeae

Um importante impacto destes resultados é, sem dúvida, o posicionamento dos gêneros da tribo Zomicarpeae (*Zomicarpella* + *Zomicarpa* + *Ulearum* + *Filarum*), que não se mantêm como um grupo monofilético no cladograma de consenso estrito para as evidências combinadas. O mesmo acontece com os gêneros usualmente considerados como representantes da tribo Caladieae (*Hapaline* + *Syngonium* + *Caladium* + *Scaphispatha* + *Xanthosoma* + *Chlorospatha*). Assim, nossos resultados corroboram com a hipótese de French e colaboradores (1995) que o complexo Caladieae-Zomicarpeae é monofilético como um todo, mas as tribos tradicionalmente reconhecidas são parafiléticas. Ambas as análises (a nossa e a de French *et al.* 1995) sugerem que a tribo Caladieae seja expandida para acomodar os quatro gêneros anteriormente incluídos na tribo Zomicarpeae. Assim, a tribo seria caracterizada pela presença de laticíferos articulados anastomosados, único caractere morfológico atribuído a ambas as tribos.

Desde que as tribos Caladieae e Zomicarpeae foram criadas (no séc. XIX), ambas foram essencialmente mantidas distintas, sofrendo pequenas alterações ao longo de todas as classificações. De fato, na maior parte das classificações do século XX, cada tribo era posicionada em uma subfamília diferente (Engler e Krause, 1920). A principal característica para tal separação era a inflorescência, que podia ter flores masculinas estéreis na porção central (Caladieae) ou possuir um apêndice estéril apical (Zomicarpeae). Além disso, os gêneros da tribo Caladieae têm flores masculinas unidas em sinândrio, enquanto os gêneros da tribo Zomicarpeae têm estames livres (Madison 1981; Mayo *et al.* 1997). Entretanto, nossos dados sugerem que tais aspectos podem ter surgido várias vezes de forma independente na evolução do grupo, talvez em resposta aos polinizadores disponíveis.

Apesar de o nosso trabalho contar com uma amostragem bem mais abrangente, a topologia encontrada é essencialmente congruente com a apresentada por French e colaboradores (1995). O gênero *Hapaline* surge na base do cladograma, seguido pelo clado que contém as espécies de *Syngonium* (onde também se agrupou com *Caladium lindenii*). Em seguida, três linhagens podem ser notadas. A primeira agrupa todas as espécies que contém grão de pólen em tétrade (Madison 1981; Mayo e Bogner 1988), destacando assim uma aproximação filogenética entre *Xanthosoma* e *Chlorospatha*. A segunda linhagem contém os gêneros *Filarum* e *Ulearum*, aproximação esta inicialmente sugerida no trabalho de Mayo e colaboradores (1997) em relação ao número cromossomal. A terceira linhagem mostra que os gêneros *Zomicapella*+*Zomicarpa*+*Caladium*+*Scaphispatha* formam um grupo monofilético. Embora nossos resultados moleculares sejam fortemente suportados, a existência desta terceira linhagem não é nada óbvia à luz da morfologia floral, reforçando a natureza potencialmente homoplástica de dados fenotípicos.

5.3 Circunscrição de *Caladium* e *Xanthosoma*

Em 1976, Michael Madison publicou uma lista de caracteres que ele acreditava que pudesse ser usado para distinguir *Xanthosoma* de *Caladium*. A lista se fez necessária, já que era comum que espécies descritas em um dos gêneros fossem transferida para o outro. Entretanto, trabalhos posteriores envolvendo a descrição de novas espécies (ver Grayum 1986) dos gêneros acima violaram todas as regras impostas. Em 1981, Madison definiu *Caladium* pela presença de caule tuberoso, crescimento sazonal, grão de pólen mônade e ovários com mais ou menos vinte óvulos distribuídos em cada placentação. De acordo com esta classificação, nem todos os caracteres eram exclusivos de *Caladium*. Com exceção ao grão de pólen monade, todas as outras características eram ocasionalmente encontradas no

gênero *Xanthosoma*. Desta forma, Madison foi forçado a admitir que o único caráter inflexível de separação era o grão de pólen tétrade em *Xanthosoma* e mônade em *Caladium*.

Trabalhos posteriores como o de Mayo e Bogner (1989), confirmaram que o único caráter morfológico capaz de manter os gêneros *Xanthosoma* e *Caladium* separados é o grão de pólen tétrade e monade, respectivamente. Em 1990, Grayum preferiu não entrar acerca desta discussão, mas sugeriu uma revisão dos gêneros utilizando outros campos taxonômicos. No entanto, French (1995) propôs em sua filogenia a separação de *Caladium* e *Xanthosoma* em grupos monofileticamente distintos. Mas estas informações foram desconsideradas por que a única característica capaz de unir *Caladium* e *Zomicarpa* é um óvulo usualmente unilocular com placentação basal e o grão de pólen monade (Mayo *et al* 1997). Com base nestas indicações, juntamente com os nossos resultados, somos capazes de afirmar que *Caladium* e *Xanthosoma* jamais poderiam ser sinonimizados como sugerido por Crisci (1971), pois ambos os gêneros são distintos tanto a nível morfológico (grão de pólen) quanto molecular. A única exceção confirmada por nossos estudos seria a espécie *Xanthosoma mariae*, do Peru, que apresenta grão de pólen em mônade (Bogner e Gonçalves 2005), que provavelmente trata-se uma reversão.

Devido a estreita aproximação morfológica entre os gêneros *Caladium* e *Xanthosoma*, o próprio Madison (1981) traz uma discussão acerca da provável conexão entre o tipo de polinizador e a morfologia de Caladieae. A maioria dos gêneros de Caladieae, incluindo *Xanthosoma* e *Caladium*, são polinizados por besouros Scarabaeidae (Mayo *et al.* 1997). Estes besouros são grandes e são atraídos por um suave odor ao fim da tarde emitidos pelas flores masculinas estéreis, permanecendo na inflorescência por aproximadamente 24 horas (Mayo *et al.* 1997; Garcia-Robledo *et al.* 2004; Gibernau 2003). Sabe-se que os grupos polinizados por tais besouros têm a tendência a possuírem flores com tubo da espata dilatado (Gonçalves e Maia 2006). Acreditamos que a similaridade morfológica encontrada entre

Caladium e *Xanthosoma* reflita um caso de convergência evolutiva pelo compartilhamento do mesmo tipo polinizador. Ou seja, estes gêneros seguem uma evolução paralela, que provavelmente em algum momento descenderam de um mesmo ancestral comum que continha grão de pólen maduro em monade.

5.4 Circunscrição de *Chlorospatha* e *Xanthosoma*

French e colaboradores (1995), ao descreverem a primeira filogenia da família Araceae, sugeriram que *Chlorospatha* fosse grupo irmão de *Xanthosoma*, e não *Caladium*, que detinha uma maior similaridade global. Com relação a esta hipótese, o único caráter morfológico capaz de suportar esta evidência é o grão de pólen tétrade em *Xanthosoma* e *Chlorospatha* (Madison 1981; Mayo e Bogner 1988), que é única dentro de Araceae. No entanto, os caracteres florais de *Chlorospatha* são bastante diferentes dos caracteres de *Xanthosoma*. A diferença é tão significativa que Engler se aceitou *Chlorospatha* como gênero após observar a inflorescência, pois inicialmente ele acreditava que *Chlorospatha kolbii* era uma possível *Xanthosoma helleborifolium* (Jacq) Schott.

O gênero *Chlorospatha* foi introduzido por Engler (1878). Em 1920, Engler revisou o gênero *Chlorospatha* incluindo-o na subtribo Caladineae (tribo Colocasieae) da subfamília Colocasioideae, juntamente com *Xanthosoma*, *Caladium* e outros dois grupos recentes: *Caladiopsis* Engler e *Aphyllarum* S. Moore. Este gênero foi considerado monotípico durante muito tempo, até 1981, quando Madison fundiu-o com o gênero *Caladiopsis* Engler. Ao mesmo tempo, Madison incorporou ao gênero *Chlorospatha* duas espécies previamente descritas como *Xanthosoma mirabilis* Master e *Caladium longipodum* Krause, além de descrever novas espécies. Ambas as espécies, *Xanthosoma mirabilis* e *Caladium longipodum*

apresentavam uma inflorescência estreita e alongada, assim como as características diagnósticas para o gênero *Chlorospatha*.

Nossos resultados fortemente indicam que os gêneros *Chlorospatha* e *Xanthosoma*, se mantidos de acordo com a circunscrição atual, são ambos parafiléticos, com *Chlorospatha* surgindo mais de uma vez dentro do clado que inclui as espécies com grãos de pólen em tétrades. Baseado na filogenia proposta neste estudo o grão de pólen em tétrede aparentemente surgiu apenas uma única vez na evolução do grupo, tendo sofrido pelo menos uma reversão confirmada em *Xanthosoma mariae*. Esta evidência suporta uma aproximação filogenética entre os gêneros. O clado *Xanthosoma*+*Chlorospatha* não mantém o gênero *Chlorospatha* como um infragrupo monofilético. Pelo contrário, observamos que *Chlorospatha atropurpureae* é grupo irmão de *Xanthosoma riparum*, enquanto *C. longipoda* + *C. croatica* formam um grupo monofilético distinto dos demais espécimes do gênero. De acordo com esta divergência podemos sugerir uma sinonimização de *Chlorospatha* em *Xanthosoma*.

As características florais mais notáveis para descrever *Chlorospatha* são um pedúnculo frágil, alongado, pêndulo esguio acompanhado por um tubo de espata fino e alongado (Mayo *et al.* 1997). As flores femininas são esparsas, com uma distribuição irregular de flores estéreis. Observações em campo sugerem que esta inflorescência é provavelmente polinizada por besouros Staphylinidae (Madison 1981) ou moscas, entre outros pequenos besouros durante o dia por uma breve abertura na ponta da espata. Para *Xanthosoma* o pedúnculo é robusto a espata consiste na forma um tubo globoso, como uma espádice central bem caracterizada como uma contração alongada na região central (flores estéreis), sendo polinizada por Scarabaeidae (normalmente Dynastineae). Mais uma vez, é possível que a diferenciação morfológica extrema seja resposta a uma transição de polinizadores.

5.5 *Xanthosoma*

No clado que contém as espécies com grãos de pólen em tétrades, observamos 5 linhas evolutivas principais. A primeira linhagem é representada por uma aproximação filogenética entre algumas espécies caulescentes de *Xanthosoma* e *Chlorospatha*. A segunda envolve um grupo monofilético compondo a maior parte das espécies cultivadas, todas desconhecidas em estado selvagem (com exceção de *Xanthosoma blandum*). A descrição da terceira linhagem provavelmente inclui as espécies descritas como secção *Acontias* por Engler (1920), ou seja, espécies que apresentam um corno globoso e curto, normalmente ocorrente em plantas fortemente sazonais. Dentro desta linhagem observamos a organização taxonômica das espécies comestíveis inclusas em um grupo monofilético bem suportada. Além disso, um grupo de espécies bastante peculiares para o gênero (*X. pulchrum*, *X. poecile* e *X. pedatissectum* sp. nov. ined.) formaram a quarta linhagem fortemente suportada. E por fim, a espécie *Xanthosoma mexicanum* não atribui nenhuma relação aos grupos monofilético estabelecidos, sugerindo assim uma quinta linhagem para acomodá-la.

5.6 *Scaphispatha*

Nossos estudos claramente mostram *Caladium* mais próximo de *Scaphispatha* do que com o gênero *Xanthosoma*. Em nossa análise combinada, o gênero monotípico *Scaphispatha* surge como um clado interno no grupo de *Caladium*.

Em 1860, Schott criou *Scaphispatha*, e acomodou este gênero na tribo Caladieae na subtribo “Problematicae”. No tratamento “Das Pflanzenreich” Engler colocou *Scaphispatha* na tribo Zomicarpeae, que posteriormente em relação ao número cromossômico e tipo de pólen retornou a tribo Caladieae Bogner (1980). Entretanto, nenhum trabalho atribui o

posicionamento taxonômico, propriamente dito, de *Scaphispatha* em relação aos outros gêneros da tribo Caladieae. Em 2005, Gonçalves sugeriu a inclusão de *Scaphispatha* em análise filogenética para poder esclarecer a relação deste gênero com os demais espécimes da tribo Caladieae. No presente momento, sabemos que *Scaphispatha* seja indistinguível de *Caladium*. Os caracteres que sustentam *Scaphispatha* enfraqueceram-se nos últimos anos. A única espécie, *S. gracilis*, apresentava uma inflorescência bastante frágil e flores femininas com óvulos basais característicos, não aproximando de nenhuma outra espécie de *Caladium*. Entretanto, a descrição de *S. robusta* (Gonçalves, 2005), que apresenta inflorescências maiores, diminuiu essa distância morfológica. Recentemente, uma espécie de *Caladium* descoberta na porção sul da Amazônia e aqui referida como *Caladium* sp.nov.1, apresenta uma flor feminina intermediária entre *Caladium* e *Scaphispatha*. De tal forma, os possíveis limites genéricos tornam-se demasiado tênues. Assim, é possível sugerir uma sinonimização de *Scaphispatha* em *Caladium*.

5.7 Caladium lindenii

Nossos estudos confirmaram uma antiga suspeita entre os especialistas em Araceae: que a espécie *Caladium lindenii* seja significativamente distinta das outras espécies supostamente congêneres. Em nossas análises, *C. lindenii* faz parte de um clado basal no complexo, que inclui todas as espécies testadas de *Syngonium*. Tal aproximação filogenética foi surpreendente e não é fortemente suportada pela morfologia. Plantas do gênero *Syngonium* são sempre hemiepífitas e com caule escandente (Croat 1981), enquanto, *Caladium lindenii* é uma planta terrestre com caule rizomatoso parcialmente ou inteiramente enterrado (Madison 1981). Além disso, *C. lindenii* não apresenta o caráter diagnóstico de *Syngonium*, que é a fusão das flores femininas (Croat 1981).

Caladium lindenii foi inicialmente descrita como *Phyllotaenium lindenii* por André (1872), um gênero monotípico. Uma alternativa seria reerguer tal gênero, mas o suporte filogenético é frágil. Algumas topologias (não mostradas) admitem que o *Phyllotaenium lindenii* se posicione na base deste clado. Na verdade, sugere-se aqui uma exploração de outro marcador para tentar resolver politomia existente entre *Phyllotaenium lindenii* e os demais acessos de *Syngonium*, ainda que os resultados filogenéticos associados a aspectos morfológicos sejam suficientes para a aceitação deste gênero.

5.8 *Xanthosoma mariae*

Em 2005, Bogner e Gonçalves publicaram duas espécies de *Xanthosoma* que, de acordo com estes autores, teriam grãos de pólen em mônade. Uma dessas espécies (*Xanthosoma mariae*, do Peru) foi por nós testada e mostrou-se perfeitamente inserida no clado contendo todas as espécies com grãos de pólen em tétrade. Isso mostra que tal aspecto sofreu pelo menos uma reversão no grupo. Uma perspectiva interessante é testar a segunda espécie com grão de pólen em mônade (*X. latestigmatum*, da Venezuela) para saber se a reversão ocorreu só uma única vez.

5.9 Aspectos biogeográficos no complexo Caladieae-Zomicarpeae

A filogenia obtida abre caminho para uma interessante avaliação das tendências biogeográficas no grupo. Essencialmente, o complexo Caladieae-Zomicarpeae é neotropical, com apenas o gênero mais basal *Hapaline* ocorrendo no sudeste asiático (Mayo *et al.* 1997). Tal disjunção, ainda que desconcertante, é bastante comum na família, ocorrendo também em *Spathiphyllum*, *Homalomena* e *Schismatoglottis* (Mayo *et al.* 1997). Já nos grupos

neotropicais, o clado *Syngonium+Phyllotaenium* distribuiu-se ao longo das florestas do norte da América do Sul, estendendo-se até o México (Croat 1981), com apenas uma espécie (*Syngonium vellozianum*) ocorrendo de forma disjunta Amazonia-Floresta Atlântica.

Após a divergência de *Hapaline* e do clado *Syngonium+Phyllotaenium*, três linhagens são detectáveis. Uma delas, representada pelo clado *Filarum + Ulearum*, tornou-se restrita às florestas úmidas da Amazônia ocidental, em uma pequena área faixa que vai do Leste do Equador até a região da Serra do Divisor, no Acre. A segunda linhagem, o clado *Zomicarpella+Zomicarpa+Caladium+Scaphispatha*, mostra um padrão mais interessante. Os dois grupos basais neste clado estão restritos a ambientes essencialmente florestais (*Zomicarpella* na Amazônia ocidental e *Zomicarpa*, nas florestas do sul da Bahia). Por outro lado, os grupos mais recentes deste clado mostram uma clara tendência a ocuparem ambientes com forte sazonalidade, ocorrendo normalmente em bordas de florestas ou em áreas de Cerrado ou Caatinga. Tal padrão foi encontrado em um outro grupo neotropical de Araceae, a tribo Spathicarpeae (Gonçalves et al., 2007) e parece responder aos mesmos eventos paleoclimáticos ocorrentes na América do Sul. É possível que pulsos de glaciação ocorrendo especialmente no pleistoceno (Prado & Gibbs, 1993) tenha gerado tal padrão. O mesmo parece ter ocorrido na terceira linhagem, já que espécies de *Xanthosoma* alternam nos cladogramas adaptações para ambientes bastante sazonais (*X. pentaphyllum*, *X. syngoniifolium*) e padrões para ambientes bastante estáveis (grupos referidos como *Chlorospatha*).

Nossos dados sugerem que os componentes neotropicais do complexo originaram-se na América do Sul e tenham migrado para as Américas Central e do Norte apenas após o fechamento do Istmo do Panamá, há cerca de 3,5 milhões de anos atrás (Coates et al, 1992). Tal aspecto é corroborado pela existência apenas de grupos amplamente dispersos e bem sucedidos nas áreas centro americanas e norte americanas.

5.10 Impactos deste trabalho no melhoramento das espécies cultivadas de

Xanthosoma

O gênero *Xanthosoma* é hoje visto como uma cultura promissora, não só pelo valor alimentício, mas também pela possibilidade de cultivo em áreas equatoriais. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o gênero é de origem relativamente recente dentro da tribo, mas distribuiu-se em uma vasta gama de ambientes, permitindo que genes de resistência a pragas e a condições ambientais mais severas possam ter sido selecionados em tais condições. De posse dessas informações e dos estudos em andamento com a citogenética do grupo (Sales, com. pess.), será possível o desenvolvimento de estratégias de melhoramento dos cultivares hoje utilizados.

Outro aspecto importante é a possível definição de um dos parentais para *X. riedelianum*. Esta espécie, também conhecida como “mangarito”, é considerada a espécie com o corno alimentício mais saboroso para a família, pelo levemente sabor amanteigado da porção amilácea (Gonçalves, com. pess.). Dados inéditos (Salves, com. pess.), mostram que essa espécie é triploide. Tal material é de difícil acesso e é considerado em risco de extinção, por ser facilmente perdido pelos produtores. Por outro lado, nunca foi possível encontrá-la em estado selvagem. Nossos dados sugerem que um dos parentais sejam a espécie selvagem amplamente dispersa *Xanthosoma aristeguietae*, que cresce vigorosamente em cultivo (ainda que não seja considerada comestível). Tal informação abre perspectiva para projetos de melhoramento genético, talvez pela busca do outro parental (ou a definição da autotriploidia) e a produção de novos híbridos sintéticos com maior variabilidade.

5.11 Conclusão

A proposta inicial deste trabalho foi tentar resolver a circunscrição do complexo Caladieae-Zomicarpeae tendo como ferramenta a filogenia molecular. Para tanto, utilizamos como recursos as regiões *matK*, o íntron *trnK* e o espaçador *trnL-F*. Como resultado obtivemos que o complexo Caladieae-Zomicarpeae é monofilético, corroborando assim com a proposta de French (1995).

Sugerimos uma reavaliação do gênero *Phyllotaenium*, visando uma possível reabilitação deste. Além disso, sugerimos que *Scaphispatha* poderia, sem prejuízo, ser imersa em *Caladium*.

Nossos dados sustentam a manutenção a separação dos gêneros *Xanthosoma* e *Caladium* e inclusão de *Chlorospatha* em *Xanthosoma*, resolvendo mais de trinta anos de discussão. Abordamos também que a provável aproximação entre *Caladium* e *Xanthosoma* é dada por uma convergência evolutiva pelo mesmo tipo de polinizador, ainda que para corroborar esta afirmação, caberá futuro trabalho mais minucioso acerca do tema sobre a polinização.

Com a relação à circunscrição interna do gênero *Xanthosoma*, sugerimos que a utilização de uma amostragem maior juntamente com a exploração de outras regiões moleculares que possa esclarecer a taxonomia inconclusiva de alguns clados.

Esperamos que o conhecimento filogenético aqui apresentado pudesse contribuir para um programa de melhoramento para as espécies cultivadas que por muito tempo foram negligenciadas. Genes de resistência podem ser procurados não só nas espécies selvagens até então incluídas em *Xanthosoma*, mas também em espécies anteriormente incluídas em *Chlorospatha*, ampliando as possibilidades.

Em relação ao posicionamento taxonômica de *Caladium lindenii* e *Xanthosoma mariae* que até então era duvidoso, podemos afirmar de acordo com os nossos resultados que temos dois casos bastante interessantes. *C. lindenii*, por exemplo, não faz parte do grupo monofiletico que contem os demais acessos de *Caladium*, no entanto, pertence a um clado mais basal. Já com relação ao posicionamento taxonômico da *X. mariae*, confirma-se que esta espécie esta inserida dentro do clado das *Xanthosoma*. O interessante deste posicionamento é que nos deparamos com o primeiro caso de reversão dentro deste grupo.

Por fim, sugerimos uma expansão da tribo Caladieae para acomodar todos os gêneros da tribo Zomicarpeae.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- APG II (2003) An up date of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399-436.
- André, E (1872). *Phyllotaenium lindenii*. III. Hort. 19:3-5.
- Bogner, J (1980). The genus *Scaphispatha* Brongn. Ex: Schott. *Aroideana* 3(1):4 - 12.
- Bogner, J and Gonçalves EG (2005). Two new species of *Xanthosoma* (Araceae) from South America and notes on the tribe Caladieae. *Willdenowia* 35:333-344.
- Boudjeko T, Andème-Onzighi C, Vicré M, Balangué A, Ndoumou DO, Driouich A (2005) Loss of pectin is an early event during cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. *Planta*. 223:271-282.
- Bromham L and Penny D (2003) The modern Molecular Clock. *Nature*. 4: 216-224.
- Cavalli-Sforza LL and Edwards AWF (1967) Phylogenetics analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Gent.* 19:233-257
- Coates AG, Jackson JBC, Collins LS, Cronim TM, Dowsett LM, Jung P, Obando JA. (1992). Closure of the Isthmus of Panamá: the near shore marine record of Costa Rica and Western Panamá. *Geol. Soc. Am. Bull.* 104:814-828.
- Crisci JV (1971) Flora Argentina: Araceae. *Revista Mus. La Plata, Secc. Bot.* 11:193-284.
- Croat TB (1981) A revision of *Syngonium* (Araceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 565-651.

- Collevatti RG, Grattapaglia D and Hay JD (2003) Evidences for multiple maternal lineage origin of *Caryocar brasiliense* populations in Brazilian cerrado based on the analysis chloroplast DNA sequences and microsatellites haplotypes. *Molecular Ecology* 112:105-115.
- Cuénoud P, Savolainen V, Chatrou LW, Powell M, Grayer RJ and Chase MW (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB and matK DNA sequences. *American Journal of Botany*. 89:132-144.
- Cunningham CW (1997). Can three incongruence tests predict when data should be combined. *Molecular Biology Evolution* 14:733-740.
- De Queiróz A (1993) For consensus (sometimes). *Syst. Biol.* 42:368-372.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Engler A (1878) Araceae. C. F. P. von Martius (ed.), Flora Brasiliensis, 3(2), fasc. 76. *F. Fleischer, Leipzig*.
- Engler A (1920) Araceae-Colocasioideae. Das Pflanzenreich IV. 23A (Heft 71). pp 1-139.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG and Bult C (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315-319.
- Felsenstein J (1981) A likelihood approach to character weighting and what it tells us about parsimony and compatibility. *Biological Journal of the Linnean Society*. 16:183-196.
- Felsenstein J (2004) *Inferring Phylogenies* ed: Sinauer Associates, Inc.

- Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for specific tree topology. *Syst. Zool.* 20:406-416.
- Fitch WM and Margoliash E (1967) Construction of phylogenetic trees. *Science* 155:279-284.
- French JC, Chung MG and Hur YK (1995) Chloroplast DNA Phylogeny of the Ariflorae. *Monocotyledons systematics and evolution*. pp. 255-275.
- Garcia-Robledo C, Kattan G, Murcia C and Quinttero-marín (2004) Beetle pollination and fruit predation of *Xanthosoma daguense* (Araceae) in na Andean cloud forest in Colômbia. *Journal of Tropical Ecology* 20:459–469.
- Giacometti, D.C. & León, J. 1994. Tannia, Yautia. In Hernando-Bermejo, J.E. & León, J. (eds). Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. Plant Production and Protection Series no. 26. FAO, Rome, Italy, p. 253-258.
- Gibernau M (2003) Pollinators and visitors of Aroid inflorescences. *Aroideana* 26: 66-83.
- Gonçalves EG (2000) *Xanthosoma riparium* (Araceae), a new species from Goiás, Brasil. *Novon.* 10:26-28.
- Gonçalves EG, Paiva EAS and Nadruz-Coelho MA (2004a) A preliminary survey of petiolar collenchyma in the Araceae. *Ann. Misosuri. Bot. Gard.* 91:473-484.
- Gonçalves EG, Diener PSA, Sousa C, Grazielle A and Pima GO (2004b) A preliminary Survey of Gynoecium Morphology in *Xanthosoma*. *Aroideana.* 27:182-189.
- Gonçalves EG and Maia ACD (2006). New evidence of pollination in *Gearum brasiliense* (Araceae – Spathicarpeae). *Aroideana* 29:148-151.
- Gonçalves EG, Mayo SJ, Van-Sluy MA and Salatino A (2007) A combined genotypic-phenotypic phylogeny for the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent invasion to Andean areas. *Molecular Phylogenetics Evolution* 43:1023-1034.

- Govaerts R and Frodin D (2002). World (Checklist) and Bibliography of Araceae (and Acoraceae). *The Royal Botanic Gardens, Ken.*
- Grayum MH (1990) Evolution and Phylogeny of the Araceae. *Annals of The Missouri Botanical Garden*, 77 (4):628-769.
- Gravendell GBJ, Chase MW, Vogel EF, Roos MC, Mes THM and Bachmann R (2001) Molecular Phylogeny of *Coelogyne* (Epidendroideae: Orchidaceae) based on plastid RFLP, matK and nuclear ribosomal ITS sequences: evidence for polyphyly. *American J. Bot.* 88(10):1915-1927.
- Gravendeel GBJ and Eurlings MCM (2004) Potential phylogenetic utility of the nuclear Floricaula/Leafy second intron: comparison with three chloroplast DNA regions in Amorphophalus (Araceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:13–23
- Grob GBJ, Gravendeel B, Eurlings MCM and Hettterscheid WLA (2002) Phylogeny of the Tribe Thomsonieae (Araceae) Based on Chloroplast matK and trnL Intron Sequences. *Systematic Botany*. 27(3) 453-467.
- Hennig W (1966) Phylogenetic systematics. Urbana, III. *University of Illinois*.
- Hennig W (1979) Phylogenetic systematics. Urbana, *University of Illinois*.
- Hillis DM and Bull JJ (1993) An empirical teste of bootstrap as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol* 42 (2):182-192.
- Hilu KW and Liang H (1997) The matK gene: sequence varitaion and application in plant sistematics. *American Journal of Botany*. 84:830-839.

- Hilu KW and Alice LA (1999) Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae. *American Journal of Botany*. 86(12):1735-1741.
- Hilu KW, Borsch T, Müller K, Soltis DE, Soltis PS, Savolainen V, Chase MW, Powell MP, Alice LA, Evans R, Sauquet H, Neinhuis C, Slotta TAB, Rohwer JG, Campbell CS, Chatrou LW (2003) Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany*. 90:1758-1776.
- Holder M and Lewis Paul O (2003) Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. *Nature*. 4: 275-284.
- Huelsenbeck JP and Crandall KA (1997) Phylogeny estimation and hypothesis test using maximum likelihood. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28: 437–446.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R and Bollback JP (2001) Bayesian Inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Juckles TH and Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In Mamalian protein metabolism. *H. N. Munro*. 21-132. Academic, New York.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA and Steven PF (1999) Plant systematics, a phylogenetic approach. *Sinauer Associates*, Sunderland.
- Junqueira AH & Peetz MS (2002) Os pólos de produção de flores e plantas ornamentais do Brasil: uma análise do potencial exportador. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 8: 25-47.
- Keating RC (2000) The Anatomy of the Monocotyledons Acoraceae and Araceae. Oxford Univ. Pr.

- Kelchener SA (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87: 482-498.
- Kimura M and Ohta T (1971) On the rate of molecular evolution. *Jornal Mol. Ev.* 1: 1-17.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS.* 102: 8369–8374.
- Lee MSY (2001) Uninformative characters and apparent conflict between molecules and morphology. *Molecular Biology Evolution.* 18:676-680.
- Linnaeus C (1753) Araceae. *Species Plantarum. Stockholm* 1st. Ed. 964-680.
- Loh JP, Kiew R, Hay A, Kee A, Gan LH and Gan YY (2000) Intergeneric and Interspecific Relationships in Araceae Tribe Caladieae and Decelopment of Molecular Markes usin Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), *Annais of Botany* 85:371-378.
- Longhurst R and Lipton M (1989) The role of agricultural research and secondary food crops in reducing seasonal food insecurity. In Sahn, D.E. (ed.). *Seasonal Variability in Third World Agriculture: The consequences for food security.* IFPRI/*Johns Hopkins University Press*, London.
- Madison M (1981) Notes on *Caladium* (Araceae) and its allies. *Selbyana* 5(3-4): 342-377.
- Mau B, Newton MA and Larget B (1999) Baysian Phylogenetic Inference via Markov Chain Carlo Methods. *Biometrics* 55:1-12.
- Mayr E (1974) Cladistic Analysis and Cladistic Classification. *Zool. Syst. Evol.- Forsch.* 12: 94-128.
- Mayo SJ and Bogner J (1988) A new species of *Caladium* (Araceae) with notes on generic delimitation in the *Colocasioideae-Caladieae.* *Willdenowia* 18: 231-242.
- Mayo SJ, Bogner J and Boyce PC (1997) The Genera of Araceae. *Royal Botanic Gardens, Kew.*

- Mayr E (1974) Cladistic analysis and cladistic classification. *Zoll. Syst. Evol. – Forsch* 12: 94-128.
- Nei M and Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford*.
- Nicolson DH (1982) Translation of Engler's classification of Araceae with updating. *Aroideana* 5 (3):67-88.
- Nicolson DH (1984) Suprageneric names attributable to Araceae. *Taxon* 33: 680-690.
- Nicolson DH and Bogner (1991) Annotated list of aroid publications. *Aroideana* 12: 20-23.
- Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP and Nieves-Aldrey JL (2004) Bayesian analysis of combined data. *Syst. Biol.* 53: 47-67.
- Offei SK, Asante IK & Danquah EY (2004) Genetic structure of seventy cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*, Linn. Schott) accessions in Ghana based RAPD. *Hereditas* 140:123-128.
- Onokpise OU, Wutoh JG, Ndzana X, Tambong JT, Meboka MM, Sama AE, Nyochembeng L, Aguegia A, Nzietchueng S, Wilson JG & Burns M. (1999) Evaluation of Macabo cocoyam germplasm in Cameroon. in Janick, J. (ed.). Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, *Alexandria*.
- Pinto NAVD, Boas BMV & Carvalho VD (1999) Caracterização mineral das folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Ciênc. e Agrotec. Lavras*, 23(1):57-61.
- Pinto NAVD, Carvalho VD, Corrêa AD & RiosI AO (2001) Avaliação de fatores antinutricionais das folhas da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Ciênc. agrotec. Lavras* 25(3): 601-604.
- Plowman T (1969) Folk uses of New World aroids. *Econ. Bot.* 23: 94-122.
- Prado, D.E. & Gibbs, P.E. (1993). Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80:902-927.

- Rodriguez F, Oliver JL, Marín A & Medina JR (1990) The general stochastic method of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142:485-501.
- Seganfredo R, Finger FL, Barros RS and Mosquim PR (2001) Influência de colheita sobre a deterioração pós-Colheita em folhas de taioba. *Horticultura Brasileira*. 19 (3): 184-187.
- Schott HW (1832) Araceae. *Meletemata Botanica*. C. Gerold, Vienna. 16-22.
- Schott HW (1856) Synopsis aroidearum complectens. Enumerationem Systematicum Generum et Specierum hujus ordinis Vindobonae. *Wien*.
- Schott HW (1860) Prodromus Systematis Aroidearum. *Mechitarists Vienna*.
- Salako FK, Lal R and Swift MJ (1995) Intercropping oil palm (*Elaeis guineensis*) with cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) on windrows and non-windrows in southern Nigeria. *J. Sust. Agric.* 6(1):47-60.
- Shaff HB, Meylan P, Mcnight ML (1997) Test of turtle phylogeny: molecular, morphological and paleontological approaches. *Syst. Biol.* 46: 235-268.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*. 92(1): 142-166.
- Soltis PS, Soltis DE, Weller SG, Sakai AK, Wagner WL (1996) Molecular phylogenetic analysis of the Hawaiian endemics *Schiedea* and *Alsinidendron* (*Caryophyllaceae*). *Systematic Biology*. 21:365-379.
- Steele KP and Vilgalys R (1994) Phylogenetic analysis of Polemoniaceae using nucleotide sequences of plastid gene *matK*. *Systematic Biology*. 19: 126–142.
- Swofford D, Olsen G, Waddel P and Hillis DM (1996) Phylogenetic inference. Pages in (Molecular systematics, 2nd edition (D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

- Swofford DL (2002) Paup*; Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. Ver 4.0 beta 10. *Sinauer, Sunderland*.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, and Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.
- Tojo M, Ono H, Nakashima C, Yoneyama S and Jayakody JAS (2005) First report of root rot of cocoyam caused by *Pythium myriotylum* in Sri Lanka. *Plant Dis.* 89:1132.
- Towle MA (1961) The ethnobotany of precolumbian Peru. *Aldine Publ. Co., Chicago*.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucl. Acid. Res.* 22: 4673-4680.
- Young ND and Pamphilis CW (2000) Purifying Selection detected in the Plasid Gene *matK* and flanking Ribozyme regions a group II intron of Nonphotosynthetic Plants, *Mol. Biol. Evol.* 17(12): 1933-1941.
- Yang Z (1994) Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *Jornal Molecular Evolution* 39:306-314.
- Yang ZH, and Rannala B (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Mol. Biol. Evol.* 14: 717-724.
- Zuckerkandl E and Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In Bryson, V. & Vogel, H.J. eds. *Evolving Genes and Proteins*. pp 97-166. *Academic Press, New York*.

Design of internal primers for *matK* sequencing in Araceae and other families

Adriana R. S. Batista; Rosane G. Collevatti and Eduardo G. Gonçalves*

Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

***Send correspondence to:** Eduardo G. Gonçalves. Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Botânica, Universidade Católica de Brasília, Prédio São Gaspar Bertoni, sala M-206, QS 7, Lote 1, EPTC CEP 72030-170, Taguatinga – DF – Brazil. email: eduardog@ucb.br

Key words : *matK*, phylogeny, Araceae, primer design

Abstract

The *matK* sequence has been successfully used for both phylogenetic and populational studies in many families. The primers current available for Araceae may amplify fragments with low overlap between forward and reverse sequences, or between contiguous fragments compromising throughout put quality and contig finishing. In the present work we designed internal primers for *matK* amplification and sequencing on Araceae (533R and 1034F), based on sequences from GenBank, annealing respectively with the previously designed primers 19F and 2R.

The ORF *matK* (~1,500pb) is located within the intron of the gene *trnK*, on the large single copy section of the chloroplast genome (Shaw *et al.* 2005). The *matK* generally presents more

polymorphisms than other protein-like genes (Hilu & Liang 1997) and mutation rate three times higher than *rbcL* (Soltis *et al.* 1996). Hence, it may be useful for phylogenetic studies on different levels, from infrageneric and infraspecific (Gravendeel *et al.* 2001; Grob 2002; Gonçalves *et al.*, in press) to ordinal level (Hilu *et al.* 2003). Additionally, this chloroplast region provided the most resolved single-region phylogenetic hypothesis for Angiospermae (Hilu *et al.* 2003). Recently, *matK* has been raised as a potential region for plant DNA barcoding (Kress 2005). We are interested in study the phylogeny and understand the circumscription of the Caladieae-Zomicarpeae (Araceae) complex, based on *matK* sequence. This region has proven to be useful to reconstruct the phylogeny of the Paleotropical tribe Thomsonieae (Grob *et al.* 2002) as well as the Neotropical tribe Spathicarpeae (Gonçalves *et al.* 2007). Nevertheless, primers currently available from both studies may amplify fragments with low overlap between forward and reverse sequences, or between contiguous fragments compromising throughout put quality and contig finishing. Therefore, we designed internal primers for *matK* amplification and sequencing on Araceae, annealing with primers -19F (Gravendeel *et al.* 2001) and 2R (Steele & Vilgalis 1994). Primers were designed based on *matK* sequences currently available on Genbank. Three sequences were selected from Genbank: *Hapaline* sp. (Araceae, Accession number AF387431.1), *Filarum manserichense* (Araceae, AF387429.1), and *Phalaenopsis* sp. (Orchidaceae, gi: 78103230). Sequences were aligned using ClustalW (Thompson *et al.* 1994) and a consensus sequence was obtained with BioEdit. Two internal primers were designed with Primer3 software (Krawetz & Misener 2000). Primer 533R (TGCAAAGAGGGAACATCTTG) was design for amplification with -19F (Gravendeel *et al.* 2001), and 1034F (ACGCGGTTAGGAGTCAAAG) with 2R (Steele & Vilgalis 1994) (Fig 1). Each pair of primers was analyzed with Autodimer software (Vallone & Butler, 2004) to verify the formation of dimmers, hairpin and annealing temperature. Primers were tested in four species of Araceae from distantly related genera (French 79 *et al.* 1995). DNA was extracted from leaves following the CTAB 2% protocol (Doyle & Doyle 1987). DNA amplification was performed in 20 μ l reaction mix containing 0.15 μ M of each primer

200 μ M, of each dNTP, 1X reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), and 0.20mg of BSA, 1.5 unit Taq DNA polymerase (Pharmacia, BR), and 3.0 ng of template DNA. Amplifications were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA) with the following conditions: 96°C for 2 min (1 cycle), 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, 72°C for 2 min (30 cycles); and 72°C for 10 min (1 cycle). Further, the full length *matK* sequence was obtained using primers -19F and 2R for amplification and the former primers plus the primers developed in the present work (533R and 1034F), 390F and 1326R developed by Cuénoud and co-workers (Cuénoud *et al.* 2002, see Fig 1). PCR products were sequenced on an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, CA) using DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), according to manufacturer's instructions. The four tested Araceae were consistently amplified and sequenced using the new primers. Additionally, the designed primers were tested for amplification in other species from different families (Table 1), following the same protocol described above. Even distantly related groups like Musci (*Sphagnum*) and gymnosperms (*Podocarpus*) were successfully amplified using our new primers. The designed primers presented a consistent amplification in all analyzed species. When these primers were used to obtain full length *matK* sequence (plus part of the *trnK* intron) a full complementarily was obtained for all fragments and an overlap between contiguous fragments allowed to precisely contig the fragments. In our lab the primers 533R and 1034F are both currently in use to sequence the *matK* region in Caladieae-Zomicarpeae complex.

Acknowledgments

This study is part of the MSc Thesis of the first author, and has been supported by the Universidade Católica de Brasília and a competitive grant from CNPq whose assistance we gratefully acknowledge.

References

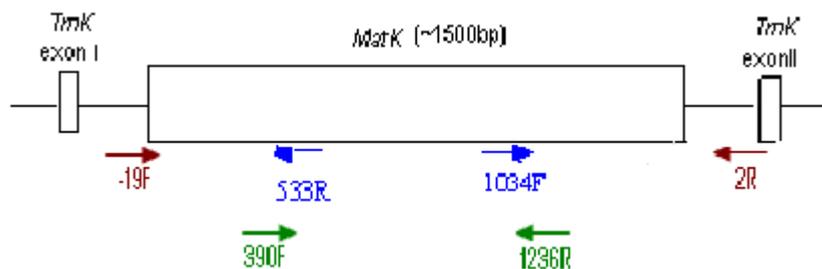
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13-15.
- Cuénoud P, Savolainen V, Chatrou LW, Powell M, Grayer RJ, Chase MW (2002) Molecular Phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear *18S* rDNA and plastid *rbcL*, *atpB* and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany*, **89**, 132-144.
- French JC, Chung MG, Jur YK (1995) Chloroplast DNA phylogeny of the AriXorae. In: Rudall, P., Cribb, P.J., Cuttler, D.F., Humphries, J. (Eds.), *Monocotyledons. Systematic and Evolution*, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 255–275.
- Gonçalves EG, Mayo SJ, Van-Sluys MA, Salatino A (2007) Combined genotypic-phenotypic phylogeny of the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent events of invasion to Andean regions. *Molecular phylogenetics and evolution* (in Press)
- Gravendeel B, Chase MW, Vogel EF, Roos MC, Mes THM, Bachmann K (2001) Molecular phylogeny of Coelogyne (Epidendroideae; Orchidaceae) based on plastid RFLPS, *matK*, and nuclear ribosomal ITS sequences: Evidence for polyphyly. *American Journal of Botany*, **88**, 1915–1927.
- Grob GBJ, Gravendeel B, Eurlings MCM, Hettterscheid WLA (2002) Phylogeny of the tribe Thomsonieae (Araceae) based on chloroplast *matK* and *trnL* intron sequences. *Systematic Biology*, **27** (3), 453-467.
- Hilu KW, Liang H (1997) The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany*, **84** (6), 830-839.
- Hilu KW, Borsch T, Müller K, Soltis DE, Soltis PS, Savolainen V, Chase MW, Powell MP, Alice LA, Evans R, Sauquet H, Neinhuis C, Slotta TAB, Rohwer JG, Campbell CS, Chatrou LW (2003) Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany*, **90**, 1758-1776. Krawetz S, Misener S (eds) (2000)

- Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. *Humana Press*, Totowa, NJ, 365-386.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS*, **102**, 8369–8374.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, **92**(1): 142-166.
- Steele KP, Vilgalys R (1994) Phylogenetic analysis of Polemoniaceae using nucleotide sequences of plastid gene *matK*. *Systematic Biology*, **19**, 126–142.
- Soltis PS, Soltis DE, Weller SG, Sakai AK, Wagner WL (1996) Molecular phylogenetic analysis of the Hawaiian endemics *Schiedea* and *Alsinidendron* (*Caryophyllaceae*). *Systematic Biology*, **21**, 365-379.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids*, **22**, 4673-4680.
- Vallone PM, Butler JM (2004) AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*, **37**, 226-231.

Table 1. Species tested and positively amplified by the primer pairs 533R and 19F, 1034F and 2R.

Ordem	Family	Species
	Araceae	<i>Anaphyllopsis cururuana</i> A. Hay
Alismatales	Araceae	<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott
	Araceae	<i>Philodendron cardosoi</i> Gonçalves, E. G
	Araceae	<i>Anthurium scandens</i> (Aubl.) Engl
Asterales	Asteraceae	<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray
Fabales	Fabaceae	<i>Arachis duranensis</i> Krapov. & W.C. Gregory
Lamiales	Bignoniaceae	<i>Tabebuia aurea</i> (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore
Malpighiales	Caryocaraceae	<i>Caryocar brasiliens</i> Cambess
Magnoliales	Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.
Asparagales	Orchidaceae	<i>Epidendrum</i> sp.
Pinales	Podocarpaceae	<i>Podocarpus macrophyllus</i> (Thunb.) Sweet
Polypodiales	Aspleniaceae	<i>Asplenium nidus</i> L.
Sphagnales	Sphagnaceae	<i>Sphagnum</i> sp.

Fig 1. Relative position of new primer 533R combined with -19F and 1034F with 2R in the region *matK*. The internal pairs of primers 390F and 1236R (Cuénoud *et al.* 2002) were used to overlap the entire region.



Anexo 2: Imagens selecionadas de espécies do complexo *Caladieae-Zomicarpeae*



Caladium bicolor



Caladium lindenii



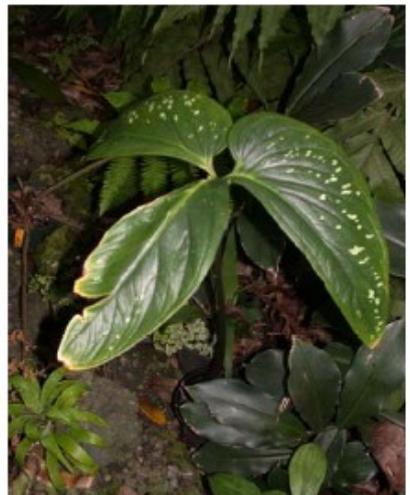
Caladium sp. nov. 1



Chlorospatha croatiana



Chlorospatha croatiana



Chlorospatha mirabilis



Filarum manserichense



Hapaline benthamiana



Scaphispatha gracilis



Scaphispatha robusta



Scaphispatha robusta



Syngonium yurimaguense



Ulearum donburnsii



Ulearum sagittatum var. *virdispadix*



Xanthosoma pedatissectum sp. nov.



Xanthosoma plowmanii



Xanthosoma aristeguietae



Xanthosoma sagittifolium



Xanthosoma atrovirens



Xanthosoma maximilianii



Xanthosoma riparium



Xanthosoma aristeguitae



Xanthosoma violaceum



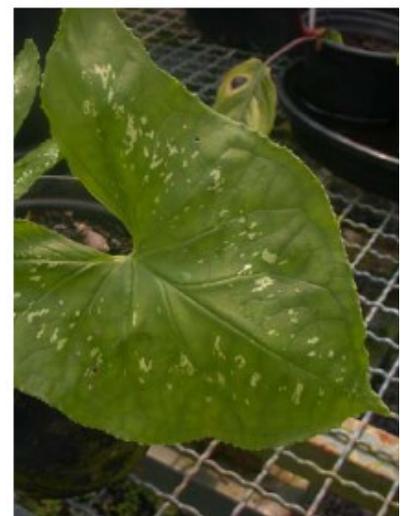
Zomicarpa steigeriana



Zomicarpa steigeriana



Zomicarpella amazonica



Zomicarpella amazonica

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)