



ANDRÉ VITO SCATIGNA

MOLECULAR PHYLOGENY AND CONSERVATION GENETICS OF *Philcoxia* P.TAYLOR &
V.C.SOUZA (PLANTAGINACEAE)

FILOGENIA MOLECULAR E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE Philcoxia P. TAYLOR &
V.C.SOUZA (PLANTAGINACEAE)

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANDRÉ VITO SCATIGNA

**MOLECULAR PHYLOGENY AND CONSERVATION GENETICS
OF *Philcoxia* P.TAYLOR & V.C.SOUZA (PLANTAGINACEAE)**

**FILOGENIA MOLECULAR E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE
Philcoxia P.TAYLOR & V.C.SOUZA (PLANTAGINACEAE)**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pelo candidato

André Vito Scatigna

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertation presented to the Biology Institute
of the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements of the degree of
Master in Plant Biology.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. André Olmos Simões

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Scatigna, André Vito, 1989-
Sca84m Molecular phylogeny and conservation genetics of *Philcoxia* P.Taylor &
V.C.Souza (Plantaginaceae) / André Vito Scatigna. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: André Olmos Simões.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Taxonomia vegetal. 2. Evolução. 3. Microsatélites (Genética). 4. Plantas -
Conservação. 5. Scrophulariaceae. I. Simões, André Olmos. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Filogenia molecular e genética da conservação de *Philcoxia* P.Taylor
& V.C.Souza (Plantaginaceae)

Palavras-chave em inglês:

Plant taxonomy

Evolution

Microsatellites (Genetics)

Plant conservation

Scrophulariaceae

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

André Olmos Simões [Orientador]

Vinicius Castro Souza

Wellington Forster

Data de defesa: 01-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

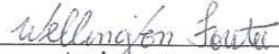
Campinas, 01 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

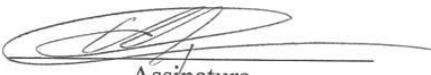
Prof. Dr. André Olmos Simões (orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Wellington Forster


Assinatura

Prof. Dr. Vinicius Castro Souza


Assinatura

Dra. Mayara Krasinski Caddah

Assinatura

Prof. Dr. João Semir

Assinatura

ABSTRACT

Philcoxia is a recently described genus, composed of four currently recognized species and one additional new species, endemic to the Brazilian sandy formations of the Cerrado and Caatinga. Due to its rarity and the vulnerability of the formation where it occurs, this genus could be treated as critically endangered. Recent evidences from molecular phylogenetics support the inclusion of the genus within the tribe Gratioleae (Plantaginaceae). The affinities of *Philcoxia* within the tribe, however, have been controversial since it was first described. Here, we present a phylogenetic analysis of Gratioleae, focusing on the test of the monophyly of *Philcoxia*, its interspecific relationships and its placement. Phylogenetic analyses were conducted using Maximum Parsimony and Bayesian approaches. Sequence data from *rpl16*, *rps16* and *trnL* introns and *trnL-trnF* intergenic spacer were analysed, including 31 samples representing four species of *Philcoxia*, 23 additional Gratioleae species and four outgroup taxa from Plantaginaceae. *Philcoxia* species form a strongly supported clade, sister of *Stemodia stellata*. *Philcoxia minensis* is closely related to *P. rhizomatosa* and *P. bahiensis* is closer to *P. tuberosa*. The clade *Philcoxia* plus *S. stellata* is related to clades formed by *Achetaria*, *Scoparia* and *Stemodia* representatives. We also developed and characterized new microsatellite markers as tools for further studies in population genetics aiming the conservation of *P. minensis*. Primer pairs were developed for 27 microsatellite loci and validated in 30 individuals of *P. minensis* from a natural population and tested in four individuals from a natural population of *P. bahiensis*. Seventeen loci successfully amplified, twelve of which were polymorphic. The 12 polymorphic markers are suitable for studies concerning mating system and genetic diversity of *P. minensis* and also may be useful tools to study similar issues regarding its related species, *P. bahiensis*. In addition, the new species *Philcoxia rhizomatosa* is described and illustrated. It has bigger leaves than other species in the genus and presents a conspicuous and branched rhizome. This new taxa is possibly endemic to a sand patch in the transition vegetation between the Cerrado and the Caatinga in Botumirim, Minas Gerais, Brazil. Tests for carnivory were

performed and showed activity of phosphatase, suggesting that *P. rhizomatosa* is a carnivorous plant.

RESUMO

Philcoxia é um gênero recentemente descrito, composto por quatro espécies reconhecidas e uma nova espécie, endêmicas das formações arenosas do Cerrado e Caatinga. Por conta de sua raridade e da vulnerabilidade de seu habitat, o gênero pode ser considerado criticamente ameaçado de extinção. Recentes evidências filogenéticas sustentam a inclusão do gênero na tribo Gratioleae (Plantaginaceae). Entretanto, as relações de *Philcoxia* dentro da tribo continuam controversas desde sua descrição. Apresentamos, aqui, estudos filogenéticos de Gratioleae, focados no teste do monofiletismo de *Philcoxia*, suas relações interespecíficas e seu posicionamento. As análises filogenéticas foram feitas pelos métodos de Máxima Parcimônia e inferência Bayesiana. Sequências dos íntrons *rpl16*, *rps16* e *trnL* e do espaçador *trnL-trnF*, todas do DNA cloroplastidial, foram analisadas, incluindo 31 amostras, entre as quais quatro espécies de *Philcoxia*, 23 outras espécies de Gratioleae e mais quatro táxons (grupo externo) de Plantaginaceae. As espécies de *Philcoxia* formam um clado fortemente sustentado, irmão de *Stemodia stellata*. *Philcoxia minensis* é mais próxima de *P. rhizomatosa* e *P. bahiensis* é mais próxima de *P. tuberosa*. O clado que inclui *Philcoxia* e *S. stellata* é relacionado aos clados formados por *Achetaria*, *Scoparia* e alguns representantes de *Stemodia*. Realizamos, também, o desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites inéditos para estudos em genética de populações voltados para conservação de *P. minensis*. Pares de iniciadores foram desenhados para 27 locos de microssatélites e testados em 30 indivíduos de uma população de *P. minensis* e em quatro indivíduos de *P. bahiensis*. Dezesete locos foram amplificados com sucesso, doze dos quais se mostraram polimórficos. Os 12 marcadores polimórficos serão usados em futuros estudos relacionados ao sistema de reprodução e à diversidade genética de *P. minensis* e são potenciais ferramentas para esses estudos com *P. bahiensis*. Além disso, a nova espécie *Philcoxia rhizomatosa* é descrita e ilustrada. Ela apresenta folhas maiores que outras espécies do gênero e também possui um rizoma bastante conspicuo e ramificado. Esta nova espécie é aparentemente endêmica de um areal em Botumirim, Minas Gerais,

em vegetação de transição entre Cerrado e Caatinga. Testes de carnivoría positivos sugerem que *P. rhizomatosa* é uma planta carnívora.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Sistemática filogenética	1
Genética da conservação	10
Espécie nova	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 1.....	21
Phylogenetic relationships of <i>Philcoxia</i> (PLANTAGINACEAE) based on four chloroplast DNA sequences.....	21
INTRODUCTION.....	22
MATERIAL AND METHODS	25
<i>Taxon sampling</i>	25
<i>DNA isolation, amplification and sequencing</i>	25
<i>Sequence assembly, alignment and phylogenetic analysis</i>	26
<i>Maximum parsimony</i>	26
<i>Model selection</i>	27
<i>Bayesian analysis</i>	27
RESULTS.....	30
DISCUSSION	36
Angelonieae	36
<i>Anamaria</i>	36
Placement of <i>Philcoxia</i>	37
Relationships within <i>Philcoxia</i>	38
<i>Stemodia</i>	38
CONCLUSIONS.....	39
LITERATURE CITED	39
CAPÍTULO 2.....	44
Microsatellite markers for studies with the carnivorous plant <i>Philcoxia minensis</i> (Plantaginaceae)	44
INTRODUCTION.....	45
METHODS AND RESULTS	45
CONCLUSIONS.....	48

LITERATURE CITED	50
CAPÍTULO 3.....	52
<i>Philcoxia rhizomatosa</i> (Plantaginaceae) a new carnivorous species from Minas Gerais State, Brazil	52
Abstract	52
Resumo.....	53
Introduction.....	53
<i>Philcoxia rhizomatosa</i> Scatigna & V.C. Souza, <i>sp. nov.</i>	54
Type.....	54
Distribution and habitat	55
Phenology.....	55
Etymology.....	55
Additional specimens examined (paratypes)	55
Taxonomic notes.....	58
Morphologic notes.....	58
Ecology	58
Test for carnivory	58
References.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
DIREÇÕES FUTURAS	63
Sistemática	63
Genética da conservação	63
Esforço de coleta.....	64

Dedico este trabalho à minha mãe,
Elizete, ao meu pai, Antonio, e às minhas avós,
Dona Durvalina e Dona Myriam.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Olmos Simões (Zé do Brejo) pela orientação e pelo companheirismo no laboratório, no campo e também no bar.

Ao Prof. Dr. Vinicius Castro Souza pela co-orientação informal, pela doação de grande parte das amostras utilizadas na filogenia e por toda a ajuda no meu trabalho.

À Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, pela parceria no projeto, principalmente na parte de genética de populações, e por me aceitar no Laboratório de Análises Genéticas Moleculares.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. João Semir, Dra. Renata Oliveira e Prof. Dr. Vinicius Castro Souza, pelas enormes contribuições intelectuais e importantes sugestões.

Aos membros da pré-banca Dr. Gustavo Mori, Profa. Dra. Mayara Caddah e Prof. Dr. Vinicius Castro Souza pelas correções e valiosas sugestões que contribuíram enormemente na melhora do texto final.

Aos membros da banca de defesa de Mestrado, Prof. Dr. André Olmos Simões, Prof. Dr. Vinicius Castro Souza, Prof. Dr. Wellington Forster, Prof. Dr. João Semir e Profa Dra. Mayara Caddah

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida e à FAPESP pelo auxílio regular à pesquisa (processo 2012/12927-9).

Ao Programa de Pós-Gaduação em Biologia Vegetal pela bolsa de mestrado da CAPES. E à secretária Maria Roseli pela grande ajuda desde o meu ingresso no mestrado até agora!

Ao Departamento de Biologia Vegetal do IB/Unicamp pela utilização dos laboratórios e casa de vegetação.

Aos curadores e funcionários dos herbários DIAM, SPF e BHCB por permitirem e orientarem a consulta às coleções.

Ao Instituto Chico Mendes (SISBIO/ICMbio) pela concessão de licença de coleta em Unidades de Conservação federais e pelo apoio, principalmente nos Parques Nacionais da Serra do Cipó e das Sempre Vivas.

Ao Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF-MG) pela concessão da licença de coleta em Unidades de Conservação estaduais e pelo apoio, principalmente nos Parques Estaduais da Serra do Cabral e do Rio Preto.

Aos funcionários do Parque Estadual do Rio Preto pelo apoio nas atividades de campo e estadia, principalmente ao Deco, que nos acompanhou na descoberta de uma nova população de *Philcoxia*.

Ao Ivan e ao Celso pelo apoio durante as estadias no Parque Nacional da Serra do Cipó.

À Irene Rodrigues do Parque Estadual da Serra do Cabral e Andréa Nascimento, ex-secretária do Meio Ambiente de Joaquim Felício pelo suporte e pelos contatos.

Ao Marcos Aurélio Sartori pela oportunidade de participar do Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Cabral e por financiar completamente a primeira viagem de coleta da espécie nova que estamos descrevendo.

Ao Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira por me levar para as primeiras viagens de campo da minha vida, que, com certeza, definiram muitas das minhas escolhas na graduação e obrigado também pela enorme ajuda na idealização deste projeto.

Ao João Carlos “Galvanzim” pelo companheirismo e pela grande ajuda no campo e no laboratório.

Ao Idimá Costa pelas amostras cedidas.

Ao Hari Lorenzi, Antônio Campos e Mauro Peixoto, do Instituto Plantarum, pelas importantes amostras cedidas.

Ao Nilber e ao Ruy Valka pelas informações sobre a nova população de Goiás.

Ao Caio Guilherme Pereira pela ótima parceria no projeto e pela grande ajuda tanto no campo quanto no laboratório.

À Fernanda Ancelmo, Camila Mantello e Patrícia Francisco pela ajuda no desenvolvimento dos microssatélites.

Aos colegas Elídio Guarçoni, Felipe Henrique Crivellari e Patricia Brito pela companhia e ajuda em coletas.

À Patrícia (Dona Pati) e à Dona Marlene que cuidaram de mim como um filho, me deram cama, comida e roupa lavada, além de uma boa prosa com cachaça em Joaquim Felício, no pé da Serra do Cabral.

Aos queridos colegas Gustavo Shimizu, Paulo Baleeiro, Paulo Gonela, Igor Lins e Fernando Rivadavia pela ótima companhia e ajuda em uma das mais importantes expedições da minha dissertação e da minha vida.

À Dra. Nara e ao Dr. Pedrinho, que me receberam em BH durante visita ao herbário da UFMG e durante o Congresso Nacional de Botânica. Pessoas muito queridas pelas quais tenho enorme admiração!

A todos os amigos do laboratório de taxonomia, Padre, Suzana, Tamires, Marcela, Deise, Milena, Rose, Mayara, Nicoll, Fabricio, Nállarett, João Carminho, Gu, Marcelinho, Fernanda e Nath, pela convivência e companheirismo dentro e fora do lab.

Aos queridos amigos Marcelinho, João Carminho e Gustavo Shimizu pela amizade dentro e fora do laboratório e pela companhia em diversas viagens e aventuras! Sem vocês, meu mestrado não teria sido uma fase tão feliz!

Aos queridos professores Jorge Tamashiro, João Semir e Luiza Kinoshita pelo carinho e companhia nesses anos no laboratório e por me ajudarem de forma muito divertida na minha formação como botânico!

Aos atuais e ex-moradores da república Cafofo do Estrela, Marcelinho, Feno, Pati, André, Juliano, Wolverine, Tio Mike, Maris, Bruna, Nayara, Zona e Estrela pelo enriquecedor convívio e por me acolherem durante meu mestrado.

Aos meus irmãos Bruno e Gustavo pelo amor e apoio incondicionais.

À Anna, minha companheira, que me apoiou e me fez uma pessoa muito mais feliz e melhor desde a graduação, e a qual eu quero por perto por um bom tempo ainda! Também me ajudou na formatação final do trabalho!

Aos meus amados pais Elizete e Antonio Carlos, os maiores patrocinadores e apoiadores da minha vida. Sem o amor e suporte (em todos os sentidos) constante destes dois, eu jamais seria capaz de realizar o sonho de me tornar Biólogo.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento este trabalho e na minha formação enquanto botânico.

INTRODUÇÃO GERAL¹

Sistemática filogenética

O grupo das Lamiídeas compõe um dos dois principais clados dentro das Asterídeas, que, por sua vez, representam uma das principais linhagens dentro das Eudicotiledôneas (FIGURA 1; APGIII, 2009). As Lamiídeas compreendem quatro clados maiores – 1) Boraginaceae (grupo da erva-baleeira e do miosótis); 2) Gentianales (grupo do café, das gencianas e das perobas); 3) Solanales (grupo do tomate, tabaco e batata-doce); e 4) Lamiales (grupo do manjeriço, do boldo e de diversas plantas carnívoras) – além das linhagens que formam um grado mais basal (Garryales, Icacinaceae, Metteniusiaceae, Oncothecaceae e Vahliaceae), segundo Refulio-Rodriguez & Olmstead (2014).

Lamiales, como reconhecida atualmente, é a maior ordem das Lamiídeas e uma das maiores entre as Angiospermas, compreendendo mais de 23.000 espécies em 25 famílias, distribuídas por todo o globo (APG III, 2009; Schäferhoff *et al.* 2010; Refulio-Rodriguez & Olmstead, 2014). Por algum tempo, a filogenia de Lamiales mostrou-se de difícil resolução, pois, apesar de ser fortemente sustentada como um grupo monofilético, análises baseadas em até 17 genes (Soltis *et al.*, 2011) não foram capazes de gerar uma filogenia totalmente resolvida. Recentemente, Schäferhoff *et al.* (2010) apresentaram o primeiro estudo a contemplar as 25 famílias reconhecidas dentro da ordem (APG III, 2009; Reveal, 2011) com base em três regiões do genoma plastidial, mas deixou em aberto o relacionamento entre algumas famílias. Refulio-Rodriguez & Olmstead (2014) foram os últimos a incluir as mesmas 25 famílias em um estudo filogenético adicionando mais sete marcadores, além dos previamente utilizados por Schäferhoff *et al.* (2010), melhorando ainda mais a resolução da ordem, mas deixando ainda algumas dúvidas, principalmente em clados mais distantes da base. Algumas famílias pertencentes a Lamiales sofreram grandes mudanças depois dos estudos filogenéticos baseados em dados moleculares,

¹ A ordem dos capítulos não segue a ordem de submissão dos manuscritos, mas sim a dos objetivos iniciais do projeto. Assim, os capítulos 2 e 3 devem ser submetidos antes do capítulo 1. Por isso, o nome *Philcoxia rhizomatosa* é citado no primeiro capítulo, mas sua descrição é apresentada apenas no terceiro.

principalmente Scrophulariaceae e Plantaginaceae (Olmstead & Reeves, 1995; Olmstead *et al.*, 2001; Oxelman *et al.*, 2005; Albach *et al.*, 2005).

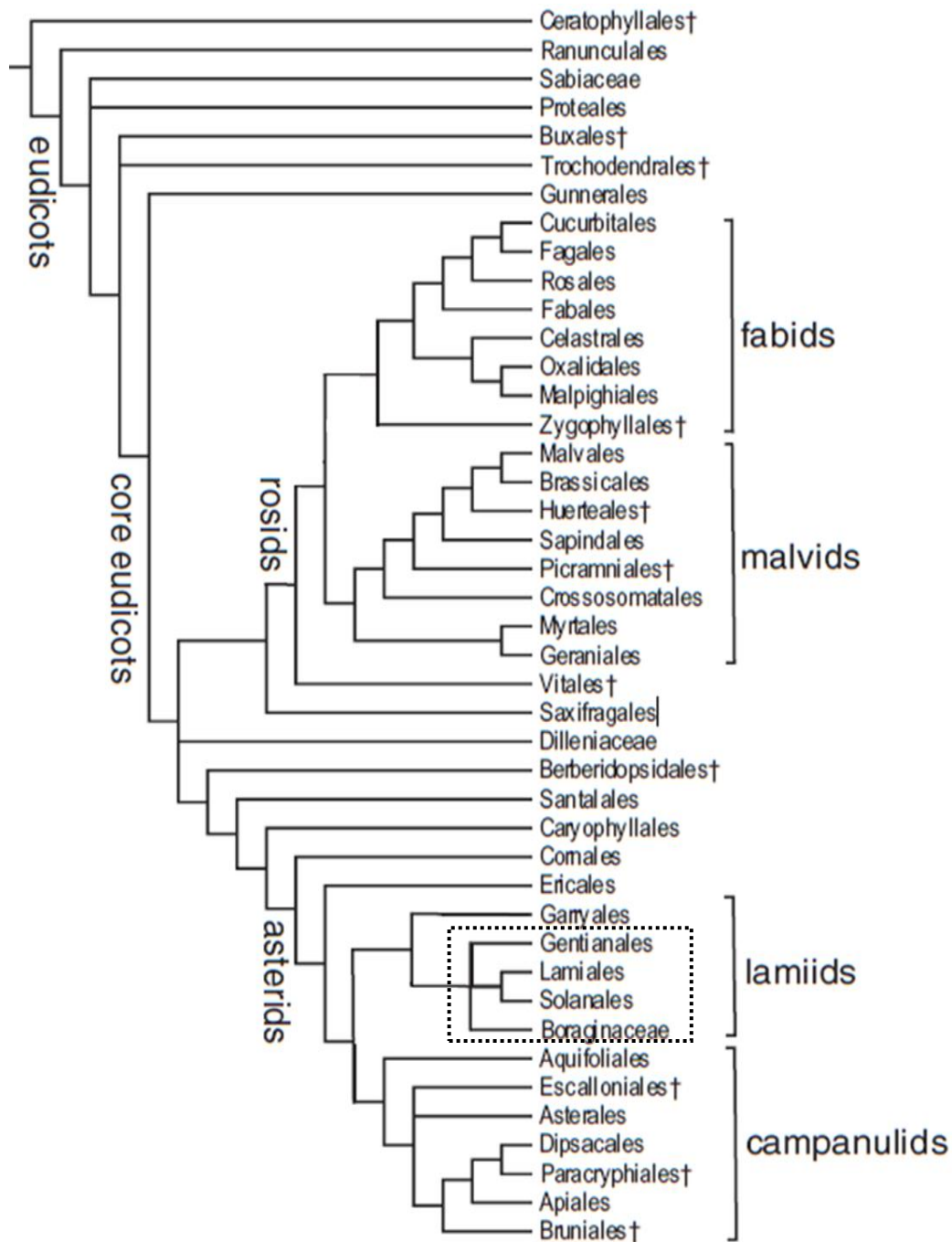


Figura 1. Filogenia das Angiospermas evidenciando os principais clados das Eudicotiledôneas. Adaptado de APGIII (2009). Em destaque, os quatro principais clados das Lamiídeas.

Plantaginaceae é uma família de distribuição cosmopolita, com aproximadamente 100 gêneros e 1900 espécies (Mabberley, 2008) que apresenta enorme diversidade. Seus gêneros mais representativos são *Veronica* L., com cerca de 450 espécies; *Plantago* L. e *Penstemon* Schmidel, ambos com cerca de 280 espécies; e *Linaria* Mill., com cerca de 150 espécies (Stevens, 2001). Seus representantes podem ter desde flores bastante reduzidas, anemófilas, como em *Plantago*, ou hidrófilas, como *Callitriche* L., até flores bastante coloridas e vistosas, melitófilas, como as espécies de *Angelonia* Bonpl., e ornitófilas como *Russelia* Jacq. (Albach et al. 2005; Souza & Lorenzi, 2012). No Brasil, são reconhecidos 16 gêneros e 111 espécies (Souza & Hassemer, 2014) distribuídas por todo o país, principalmente em formações abertas, como campos sulinos, campos rupestres e áreas periodicamente alagáveis do Brasil central e também da Caatinga (Souza & Lorenzi, 2012). De acordo com Souza & Giulletti (2009), os maiores representantes da família no Brasil são *Bacopa* Aubl. (27 spp.), *Angelonia* (18 spp.) e *Stemodia* L. (14 spp.), ao passo que *Plantago* apresenta 14 espécies, sendo apenas 11 nativas (Hassemer & Souza, 2014), e *Veronica* apresenta apenas cerca de 20 espécies, todas introduzidas. Devido à grande diversidade da família, é muito difícil identificar sinapomorfias morfológicas, embora Judd et al. (2002) tenham sugerido considerar como tais a ausência de divisões longitudinais nos tricomas e o desenvolvimento precoce do androceu em relação à corola. Assim, é possível fazer apenas uma descrição bastante vaga da família: hábito herbáceo a arbustivo; folhas opostas a alternas, às vezes em rosetas; flores com cálice dialissépalo e corola gamopétala, bilabiada, às vezes sacada, gibosa ou apresentando calcar (esporão); e ovário súpero, bicarpelar e bilocular com placentação axilar e vários óvulos por lóculo (Albach et al. 2005). De acordo com Schäferhoff et al. (2010), a família teve sua circunscrição ampliada nos últimos anos após sua segregação das Scrophulariaceae *sensu stricto* (s.s.). Em sua classificação atual, Plantaginaceae passa a incluir diversos gêneros posicionados anteriormente em Scrophulariaceae *sensu lato* (s.l.) como *Achetaria* Cham. & Schldl., *Bacopa*, *Gratiola* L., *Philcoxia* P.Taylor & V.C.Souza e *Stemodia* entre outros da tribo *Gratiroleae* Benth. (*sensu* Wettstein, 1891)=; *Antirrhinum* L., *Cymbalaria* Hill, *Linaria* e outros da tribo *Antirrhineae* Chav. (*sensu* Wettstein, 1891); *Angelonia*, *Basistemon* Turcz.

e *Monopera* Barringer da tribo Angelonieae Benth. (*sensu* Albach *et al.*, 2005), além das espécies posicionadas anteriormente em Callitrichaceae e de alguns gêneros pertencentes a Globulariaceae, Hippuridaceae e Pedaliaceae em classificações pregressas (Mabberley 2008). Plantaginaceae está incluída na ordem Lamiales, como grupo-irmão do núcleo superior (“higher core”) das Lamiales que inclui pelo menos 18 famílias, entre elas, Scrophulariaceae s.s. (Schäferhoff *et al.*, 2010; FIGURA 2).

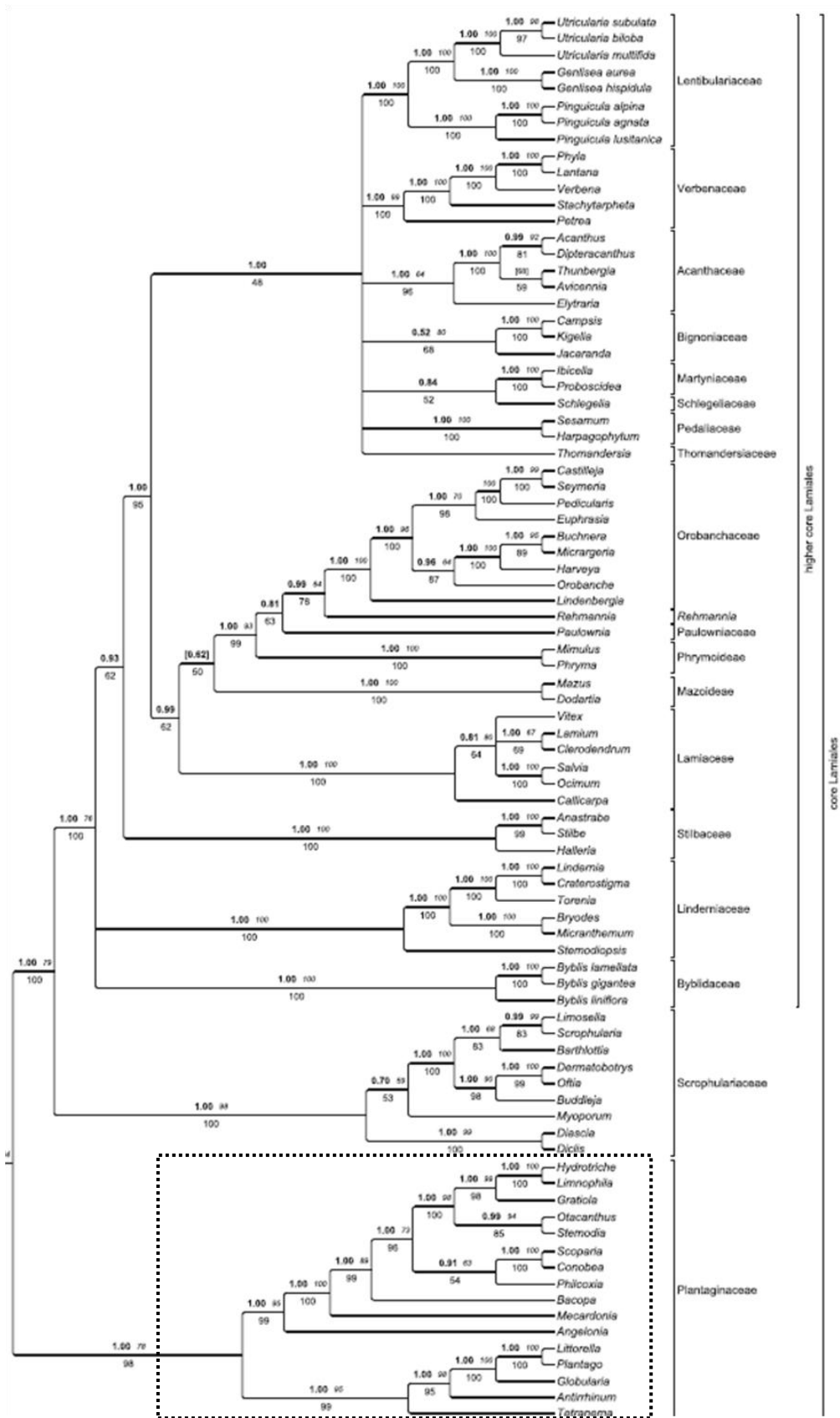


Figura 2. Filogenia de Lamiales evidenciando o núcleo Lamiales e núcleo superior de Lamiales. Em destaque, o clado formado por representantes de Plantaginaceae. Adaptado de Schäferhoff *et al.* (2010).

A tribo Gratioleae Benth., tradicionalmente, compreendia 37 gêneros e cerca de 300 espécies (Bentham & Hooker, 1876). Sua circunscrição sofreu diversas modificações e, após recentes estudos moleculares (Beardsley & Olmstead, 2002; Albach *et al.*, 2005; Oxelman *et al.*, 2005; Rahmanzadeh *et al.*, 2005), diversos gêneros foram excluídos da tribo. Graças a esses estudos, o posicionamento de Gratioleae em relação a outros representantes de Plantaginaceae é mais bem compreendido, porém sua circunscrição ainda não é definitiva, incluindo, atualmente, entre 16 e 40 gêneros e aproximadamente 320 espécies (Estes & Small, 2008). Seus maiores representantes são *Bacopa* (60 spp.), de distribuição pantropical; *Stemodia* (56 spp.), também pantropical; e *Limnophila* R. Br. (36 spp.), que ocorre nas áreas tropicais da África e Ásia. Esta tribo tem se apresentado monofilética com forte sustentação em estudos filogenéticos baseados em dados moleculares (Albach *et al.*, 2005; Schäferhoff *et al.*, 2010), apesar de alguns gêneros, como *Stemodia*, apresentarem-se polifiléticos (Fritsch *et al.*, 2007; Estes & Small, 2008). Rahmanzadeh *et al.* (2005) sugeriram o reconhecimento de Gratiolaceae como uma família distinta de Plantaginaceae, já que estes dois grupos formaram clados independentes em suas análises, embora a relação entre eles não fosse clara. Além disso, sugerem a subdivisão de Gratiolaceae em três tribos: Gratioleae, Stemodieae Benth. e Limoselleae Dumort., seguindo a proposta de Fischer (2004). Os resultados apresentados na filogenia de Estes & Small (2008), entretanto, apontam para o parafilético destas subdivisões e, segundo Schäferhoff *et al.* (2010), os representantes de Limoselleae pertencem a Scrophulariaceae s.s. e não a Plantaginaceae. Mais recentemente, Souza & Lorenzi (2012) propuseram a elevação de Gratioleae ao nível de família. Segundo estes autores, o reconhecimento dessas duas famílias separadas é necessário para que Plantaginaceae seja um grupo monofilético (Souza *et al.*, dados não publicados). Apesar disso, dois recentes estudos – que incluíram diversos representantes dentre todas as famílias atualmente reconhecidas em Lamiales – sugeriram que tanto o reconhecimento das duas famílias separadas como o tratamento de Plantaginaceae como uma única família contendo duas ou três principais tribos são possíveis (Schäferhoff *et al.*, 2010; Refulio-Rodriguez & Olmstead, 2014). Dessa maneira, nesta dissertação, Gratioleae –

incluindo membros de *Stemodieae* sensu Fischer (2004) – será tratada como uma tribo de *Plantaginaceae*.

Philcoxia (FIGURA 3) é um gênero relativamente novo para a ciência, descrito há menos de 15 anos por Taylor *et al.* (2000). São reconhecidas, até o momento, quatro espécies, morfológicamente únicas dentro da família. Três espécies foram nomeadas de acordo com o estado do qual cada uma é endêmica: *Philcoxia bahiensis* V.C.Souza & Harley ocorre na região da Chapada Diamantina, próximo ao município de Piatã, na Bahia; *P. minensis* V.C.Souza & Giul. é endêmica de uma área de areia branca na Serra do Cabral, no município de Joaquim Felício, Minas Gerais; fora da Cadeia do Espinhaço, no Cerrado próximo ao município de Posse, em Goiás, ocorre *P. goiasensis* P.Taylor. *Philcoxia tuberosa* M.L.S.Carvalho & L.P.Queiroz, endêmica de Morro do Chapéu, também na região da Chapada Diamantina, foi nomeada assim por conta de estruturas subterrâneas que se assemelham a tubérculos (Carvalho & Queiroz, 2014). Além das quatro espécies já reconhecidas, uma nova espécie está sendo descrita por Scatigna *et al.* (em preparação)². As características que tornam *Philcoxia* um gênero particular dentro de *Plantaginaceae* são o caule subterrâneo e as folhas peltadas, subterrâneas ou ao nível do solo (Fritsch *et al.*, 2007; Souza & Giuletta, 2009). Outra característica que torna o gênero único em sua família é a síndrome de carnivoría, descrita em *P. minensis* por Pereira *et al.* (2012), que consiste no uso de folhas subterrâneas como armadilhas para capturar e digerir nematódeos. As principais características diagnósticas entre as espécies atualmente de *Philcoxia* são relacionadas, principalmente, às estruturas subterrâneas, como a presença de tubérculos em *P. tuberosa*; o tamanho do pecíolo – cerca de 4mm em *P. goiasensis* e de 10mm a 24mm nas outras espécies; e a presença de rizoma em *P. minensis*, aparentemente ausente em *P. goiasensis* e *P. bahiensis*.

Originalmente, Souza (1996), em sua Tese de Doutorado, chamando *Philcoxia* informalmente de *Arenicola*, posicionou o gênero na tribo *Scrophularieae* sensu Thieret

² Esta nova espécie, *Philcoxia rhizomatosa*, ocorre em um areal no Município de Botumirim, MG. Sua descrição é apresentada no terceiro capítulo desta dissertação.

(1967) de Scrophulariaceae baseado na morfologia da flor, com os lobos posteriores da corola sobrepondo-se aos laterais e a inflorescência em cimeira. Taylor *et al.* (2000), ao publicarem o gênero *Philcoxia*, discutem este posicionamento, porém, com base na interpretação da inflorescência de *P. goiasensis* como sendo racemosa, mencionam uma possível afinidade com os gêneros *Gratiola* L. e *Dopatrium* Buch.-Ham. ex Benth., gêneros estes predominantemente aquáticos da tribo Gratioleae *sensu* Wettstein (1891), sugerindo que ainda não havia evidências suficientemente conclusivas para seu posicionamento dentro de Scrophulariaceae. Fischer (2004) posicionou *Philcoxia* na subtribo Dopatriinae, dentro de Gratioleae, junto com os gêneros *Deinostema* Yamazaki, *Dopatrium*, *Hydrotriche* Zucc., e *Limnophila*, também aquáticos em sua maioria, porém não discutiu os critérios para tal decisão. Souza & Lorenzi (2012) incluíram *Philcoxia* em Gratiolaceae, baseados em estudo filogenético ainda não publicado (Souza *et al.*, em preparação). O primeiro estudo filogenético tratando do posicionamento de *Philcoxia* foi o de Fritsch *et al.* (2007), segundo o qual *P. minensis* é fortemente sustentada como a segunda linhagem em ordem de divergência em Gratioleae. Este estudo também aponta um possível relacionamento de *Philcoxia* com o clado formado por representantes dos gêneros *Dopatrium*, *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Limnophila*, *Otacanthus* Lindl. e *Stemodia*. Todavia, a amostragem relativamente pequena em Gratioleae usada por Fritsch *et al.* (2007) e o filograma apresentando longo ramo conectando *Philcoxia* ao clado em questão sugerem um posicionamento ainda incerto do gênero dentro da tribo. Mais recentemente, Schäferhoff *et al.* (2010) publicaram novo estudo filogenético com Plantaginaceae, no qual *P. minensis* forma um clado fortemente sustentado com os gêneros *Conobea* Aubl. e *Scoparia* L., que por sua vez apresenta-se como grupo irmão do clado formado por representantes de *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Limnophila*, *Otacanthus* e *Stemodia* com alto grau de sustentação. Os estudos de Fritsch *et al.* (2007) e Schäferhoff *et al.* (2010), embora corroborem o posicionamento de *Philcoxia* em Gratioleae, não permitem análises conclusivas sobre suas relações com outros gêneros da tribo. Além disso, nenhum deles amostrou mais que uma espécie do gênero, impossibilitando a realização de inferências quanto a seu monofiletismo. Outros importantes estudos de

filogenia molecular em Plantaginaceae publicados na última década não incluíram representantes do gênero *Philcoxia* (Olmstead *et al.*, 2001; Albach 2005; Oxelman *et al.*, 2005). A última publicação tratando da filogenia de membros de Gratioleae tampouco incluiu *Philcoxia* nas análises (Estes & Small 2008). Tendo em vista os poucos estudos e a amostragem relativamente pequena em Gratioleae, é possível afirmar que este é um grupo ainda muito pouco conhecido.

Nesse sentido, um dos principais objetivos deste trabalho é gerar uma filogenia baseada em marcadores moleculares para testar o monofiletismo do gênero *Philcoxia* e auxiliar na compreensão de suas relações interespecíficas e com os outros gêneros da tribo Gratioleae. O estudo filogenético desenvolvido é apresentado no Capítulo 1 desta dissertação, no formato de manuscrito, seguindo as normas do periódico *American Journal of Botany*, com adaptações para o formato de dissertação. Os *primers* internos desenvolvidos durante a execução deste estudo serão submetidos em um manuscrito independente no formato de *primer notes* para o periódico *AoBPlants*.

Genética da conservação

O conhecimento atual sobre as cinco espécies de *Philcoxia* nos permite inferir que elas são extremamente raras. Ocorrem nas formações de areia branca dos campos rupestres e da Caatinga de Minas Gerais, da Bahia e de Goiás, formando populações relativamente pequenas e bastante isoladas. Sua distribuição é claramente disjunta (FIGURA 5). Há uma população de *P. minensis* na Serra do Cabral (MG), uma de *P. rhizomatosa* em Botumirim (MG), duas de *P. bahiensis* próximas ao município de Piatã, na Chapada Diamantina (BA) e uma de *P. tuberosa*, restrita às dunas de Morro do Chapéu, também na Chapada Diamantina, todas essas localidades pertencentes à Cadeia do Espinhaço. A estruturação das populações de *P. goiasensis* em seu habitat, por sua vez, é totalmente desconhecida, visto que a última coleta botânica desta espécie ocorreu há mais de uma década (*Silva, M.A. et al. 4907* – SPF!), no município de Posse (GO) e, antes disso, do material tipo em 1966 (*H.S. Irwin et al. 14397* – UB, K, NY). Esse reduzido número de registros parece decorrer tanto da raridade das espécies, quanto da dificuldade em sua localização e coleta

no ambiente natural. Além disso, não só as populações são raras, como ocorrem em ambientes bastante vulneráveis (FIGURA 4), sujeitos a alterações por conta de garimpo de diamantes e cristais e extração de areia para construção civil (Souza & Giulietti, 2009; Sartori, comunicação pessoal). Portanto, a conservação dessas espécies é assunto de grande preocupação.

Um paradigma central da genética da conservação é de que populações pequenas e isoladas geralmente estão sujeitas a dois processos distintos, a deriva genética e o endocruzamento (Ouborg *et al.*, 2006; Ouborg *et al.*, 2010). A deriva genética pode levar à extinção de um ou mais alelos adaptativos e/ou fixação de alelos deletérios, o que é prejudicial para a população, enquanto o cruzamento entre indivíduos aparentados pode levar à diminuição no nível de heterozigose, ou seja, perda de diversidade genética (Ouborg *et al.*, 2010). As relações entre tamanho de população, aptidão e diversidade genética intrapopulacional são fundamentais dentro da ecologia, evolução e conservação de espécies (Leimu *et al.*, 2006).

Como as populações das espécies de *Philcoxia* aparentam ser restritas a áreas relativamente pequenas, seria importante analisar a estrutura genética de cada população e procurar outras populações em áreas próximas e semelhantes às conhecidas para testar a ocorrência de fluxo gênico, entre outros processos.

Para se estimarem parâmetros relacionados a esses processos, podem ser utilizados diversos marcadores moleculares, em especial os microsatélites, cuja técnica já está bem estabelecida (Primmer, 2009; Avise, 2010; Ouborg, 2010; Ouborg *et al.*, 2010). Os microsatélites ou SSRs (“simple sequence repeats”) são pequenas sequências (2-5pb) que se repetem em *tanden*, presentes no genoma da maioria dos eucariotos (Schlötterer, 2000). Graças à grande variabilidade no número de repetições na maioria dos *loci*, os microsatélites podem ser bons marcadores moleculares para estudos de ecologia molecular com enfoque em processos evolutivos recentes ou contemporâneos (Ortí *et al.* 1997). São considerados os marcadores que mais se aproximam do ideal para esses estudos devido a algumas características: são abundantes e uniformemente distribuídos pelo

genoma; são codominantes; são geralmente multialélicos; costumam apresentar alto grau de heterozigose; são marcadores de baixo custo e fácil aplicação à análise de um grande número de plantas, uma vez que a técnica esteja estabelecida para a espécie (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os microssatélites podem ser úteis na análise de diversos parâmetros populacionais, como tamanho efetivo da população, fluxo gênico, estruturação populacional e diversidade genética, permitindo um maior conhecimento do atual estado de conservação das espécies de *Philcoxia*.

Tendo em vista que estudos em genética de populações podem ajudar a gerar políticas de conservação e manejo que venham a proteger áreas tão ameaçadas quanto os campos rupestres, onde ocorrem os representantes de *Philcoxia*, desenvolvemos marcadores do tipo SSR inéditos a partir do DNA de *P. minensis*. Um manuscrito contendo a caracterização genética dos marcadores microssatélites desenvolvidos é apresentado no Capítulo 2, seguindo as normas do periódico *Applications in Plant Sciences*.

Espécie nova

Em uma viagem de campo ao município de Botumirim, MG, Marcos Aurélio Sartori encontrou e fotografou uma planta que aparentemente era um exemplar de *Philcoxia*. As fotos foram enviadas para mim e, a partir delas, foi possível confirmar tratar-se de uma *Philcoxia*, porém com morfologia aparentemente diferente das espécies até então descritas para o gênero: as folhas pareciam bem maiores que as das espécies conhecidas e a parte subterrânea parecia muito mais robusta e ramificada que o normal.

Em uma segunda viagem, com o objetivo de coletar material da planta em questão, pude observá-la em ambiente natural e confirmar que se tratava de uma espécie nova. Foi coletado material para exsicata, material fixado em FAA (Formaldeído, Ácido acético e Álcool etílico) e etanol para futuros estudos morfoanatômicos e material em sílica para extração de DNA.

A espécie nova de *Philcoxia* é aqui descrita e ilustrada. Além disso, foram feitos testes de carnivoría. O manuscrito fornecendo a descrição, ilustração, imagens e resultados positivos dos testes de carnivoría é apresentado no terceiro capítulo desta dissertação. Nesse capítulo, o formato segue as normas do periódico *Phytotaxa*.



FIGURA 3. Fotos de espécies de *Philcoxia* em seu ambiente natural. *P. minensis*. **A.** Hábito. **B.** Flor. *P. bahiensis*. **C.** Hábito. **D.** Detalhe das folhas com grãos de areia aderidos aos tricomas glandulares. *Philcoxia* sp. **E.** Hábito. **F.** Sistema subterrâneo com tubérculos. **G.** Flor.



FIGURA 4. Ambientes arenosos onde ocorrem as espécies de *Philcoxia*. **A.** Areal escavado por garimpo de diamantes em Piatã, BA, onde ocorre uma das populações de *P. bahiensis*. **B.** Areal não explorado onde ocorre outra população de *P. bahiensis*, também em Piatã, a cerca de 20 km da área A. **C.** Areal bastante degradado por conta de extração de areia para construção em Botumirim, MG, onde ocorre a única população conhecida de *P. rhizomatosa*. **D.** Areal onde ocorre *P. minensis*, no Parque Estadual da Serra do Cabral; note as marcas de veículo sobre a população de *Philcoxia*. **E.** Duna no Parque Estadual do Morro do Chapéu, BA, onde ocorre *Philcoxia* sp. **F.** Cerrado em Goiás onde foi encontrada uma população de *Philcoxia*, possivelmente uma nova espécie. Fotos: **A.** Marcos A. Sartori; **B. – E.** André Vito Scatigna; **F.** Nilber Silva.

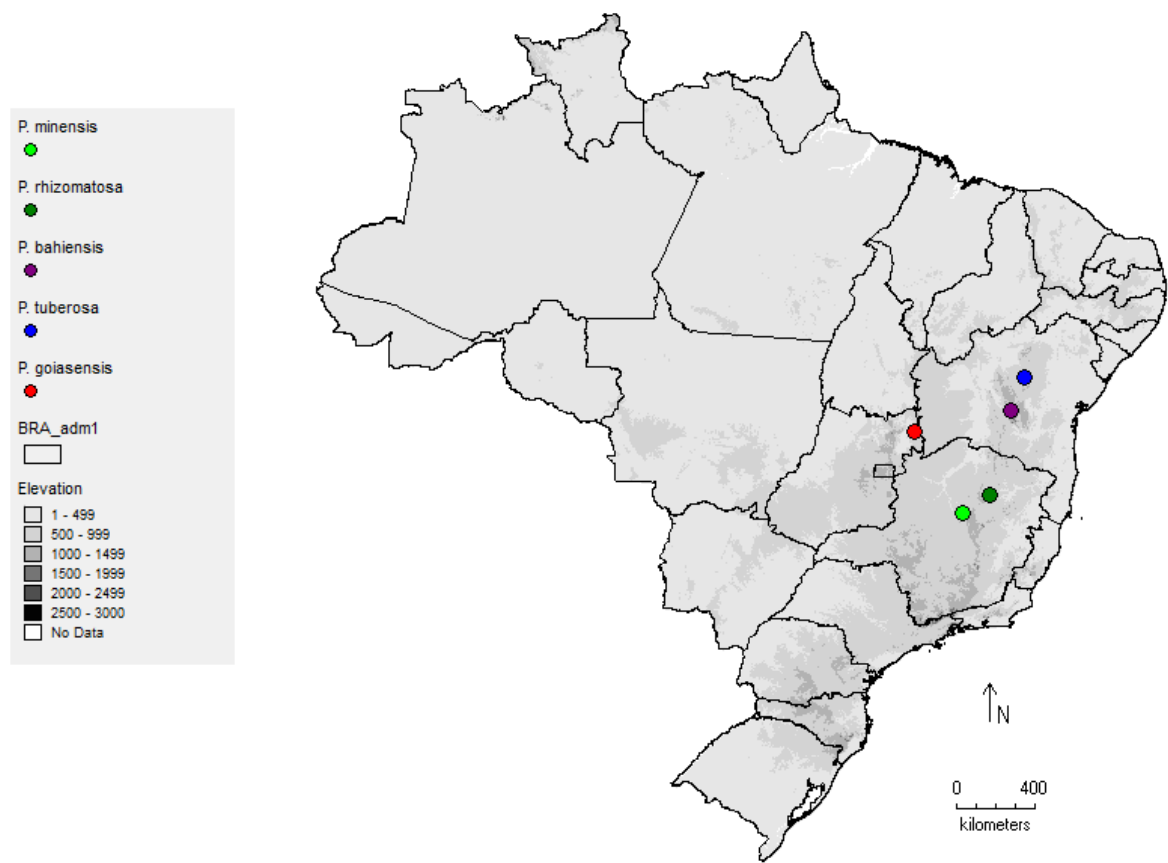


Figura 5. Distribuição geográfica das espécies de *Philcoxia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albach, D. C., Meudt, H. M. & Oxelman, B. (2005) Piecing together the “new” Plantaginaceae. *American Journal of Botany* 92, 297-315.

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

Avise, J. C. (2010) Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conservation Genetics* 11, 665–669.

Beardsley, P.M. & Olmstead, R.G. (2002) Redefining Phrymaceae: the placement of *Mimulus*, tribe Mimuleae, and *Phryma*. *American Journal of Botany* 89, 1093-1102.

Bentham, G. & Hooker, J.D. (1876) Scrophulariaceae *in* Bentham, G. & Hooker, J.D. (eds.). *Genera Plantarum* 2, 913-926.

Carvalho, M.L.S. & Queiroz, L.P. (2014) *Philcoxia tuberosa* (Plantaginaceae), a new species from Bahia, Brazil. *Neodiversity* 7, 14-20.

Estes, D. & Small, R. L. (2008) Phylogenetic relationships of the monotypic genus *Amphianthus* (Plantaginaceae tribe Gratiolae) inferred from chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany* 33, 176-182.

Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética 3 ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.

Fischer, E. (2004) Scrophulariaceae. Kadereit J.W., ed., *The Families and Genera of Flowering Plants, Volume VII. Flowering Plants. Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)*, 333–432.

Fritsch, P. W., Almeda, F., Martins, A. B., Cruz, B. C. & Estes, D. (2007) Rediscovery and phylogenetic placement of *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae), with a test of carnivory. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 58, 447-467.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. (2002) *Plant systematics—a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

Leimu, R., Mutikainen, P., Koricheva, J. & Fischer, M. (2006) How general are positive relationships between plant population size, fitness, and genetic variation? *Journal of Ecology* 94, 942–952.

Mabberley, D.J. (2008) *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. 3ed. Cambridge University Press.

Olmstead, R. G. & Reeves, P. A. (1995) Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* sequences. *Annals of Missouri Botanical Garden* 88, 348–361.

Olmstead, R. G., dePamphilis, C. W., Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisens, W. J. & Reeves, P. A. (2001) Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88, 348–361.

Ortí, G., Pearse, D. E. & Avise, J. C. (1997) Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94, 10745-10749.

Ouborg, N. J. (2010) Integrating population genetics and conservation biology in the era of genomics. *Biology Letters* 6, 3–6.

Ouborg, N. J., Vergeer, P. & Mix, C. (2006) The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. *Journal of Ecology* 94, 1233–1248.

Ouborg, N. J., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Bijlsma, R. & Hedrick, P.W. (2010) Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* 26, 177-187.

Oxelman, B., Kornhall P., Olmstead, R.G. & Bremer, B. (2005) Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* 54, 411-425.

Pereira, C. G., Almenara, D. P., Winter, C. E., Fritsch, P. W., Lambers, H. & Oliveira, R. S. (2012) Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1154-1158.

Primmer, C. R. (2009) From conservation genetics to conservation genomics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1162, 357–368.

Rahmanzadeh, R., Müller, K.F., Fischer, E., Bartels, D. & Borsch, T. (2005) Linderniaceae and Gratiolaceae (Lamiales) are further lineages distinct from Scrophulariaceae. *Plant Biology* 7, 67-78.

Refugio-Rodriguez, N. F. & Olmstead, R.G. (2014) Phylogeny of Lamiidae. *American Journal of Botany* 101 (2), 287-299.

Reveal, J. L. (2011) Summary of recent systems of Angiosperm classification. *Kew Bulletin* 66, 5-48.

Schäferhoff B., Fleischmann, A., Fischer, E., Albach, D., Borsch, D., Heubl, G. & Müller, K.F. (2010) Towards resolving Lamiales relationships: Insights from rapidly evolving chloroplast sequences. *BMC Evolutionary Biology* 10, 352.

Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371.

Soltis, D. E., Smith, S. A., Cellinese, N., Wurdack, K. J., Tank, D. C., Brockington, S. F., Refulio-Rodriguez, N. F., et al. (2011) Angiosperm phylogeny: 17-genes, 640 taxa. *American Journal of Botany* 98, 704-730

Souza, V. C. (1996) Levantamento das espécies de Scrophulariaceae nativas do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Souza, V. C. & Giulietti, A. M. (2009) Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. *Pesquisa Botânica* 60, 7-288.

Souza, V. C. & Hassemer, G. (2014) *Plantaginaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB191>>. Acesso em: 04 Mai. 2014.

Souza, V. C. & Lorenzi, H. (2012) *Botânica Sistemática*. 3ed. Instituto Plantarum.

Stevens, P.F. (2001) Angiosperm Phylogeny Website. <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Version 12, July 2012. Acesso em: 23 Set. 2014.

Taylor, P., Souza, V. C., Giulietti, A. M. & Harley, R. M. (2000) *Philcoxia*: A new genus of Scrophulariaceae with three new species from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 55, 155-163.

Thieret, J. W. (1967) Supraspecific classification in the Scrophulariaceae: A review. *Sida* 3, 87–106.

Wettstein, R. V. (1891) Scrophulariaceae. In Engler, A., Prantl, K., eds., *Dienatürlichen Pflanzenfamilien* IV, 3, 39-107.

CAPÍTULO 1

Phylogenetic relationships of *Philcoxia* (PLANTAGINACEAE) based on four chloroplast DNA sequences

André V. Scatigna^{1,3}; Vinicius C. Souza² & André O. Simões¹

¹Laboratório de Taxonomia, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

²Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

³Author for correspondence: andre_vs13@hotmail.com

- **Premise of the study:** *Philcoxia* is a recently described carnivorous genus, endemic to the Brazilian sandy formation of the Cerrado and Caatinga. It comprises four recognized species and one additional new species. Recent evidence from molecular phylogenetics supports the inclusion of the genus within the tribe Gratioleae (Plantaginaceae). The affinities of *Philcoxia* within the tribe, however, have been controversial since it was first described. Here, we present a phylogenetic analysis of the Gratioleae, focusing on testing the monophyly of *Philcoxia*, its interspecific relationships and its placement within the tribe.
- **Methods:** Phylogenetic analyses were conducted using maximum parsimony and Bayesian approaches. Sequence data from four plastid DNA regions (*rpl16*, *rps16* and *trnL* introns and the *trnL-trnF* intergenic spacer) were analysed isolated and combined, including 31 samples representing four species of *Philcoxia*, 23 additional Gratioleae species and four outgroup taxa from Plantaginaceae.
- **Key results:** All four species of *Philcoxia* form a strongly supported clade, sister of *Stemodia stellata* with maximum support. *Philcoxia minensis* is closely related to *P. rhizomatosa* and *P. bahiensis* is apparently closer to *P. tuberosa*. The clade

Philcoxia plus *S. stellata* is related to clades formed by *Achetaria*, *Scoparia* and *Stemodia* representatives.

- **Conclusions:** Our phylogenetic analysis of *Philcoxia* and its related species within Gratioleae reveal the first evidences of monophyly and interspecific relationships within the genus. Increased resolution was also obtained for the placement of *Philcoxia* within the tribe, but additional sampling is needed for more conclusive information.

INTRODUCTION

Plantaginaceae is a cosmopolitan family comprising ca. 100 genera and 1900 species (Mabberley, 2008). In Brazil, 16 genera and 111 species are currently recognized (Souza & Hassemer, 2014). The family had its circumscription greatly expanded after its segregation from the Scrophulariaceae *s.l.* (Olmstead *et al.*, 2001; Albach *et al.*, 2005; Oxelman *et al.* 2005). As currently delimited, Plantaginaceae includes several genera traditionally placed in Scrophulariaceae such as *Angelonia* Bonpl., *Bacopa* Aubl. and *Stemodia* L., in addition to representatives of Callitrichaceae and some genera of Globulariaceae, Hippuridaceae and Pedaliaceae in former classifications (Mabberley, 2008; APGIII, 2009). Olmstead *et al.* (2001), Albach *et al.* (2005) and Oxelman *et al.* (2005) provided molecular evidence supporting the inclusion of many genera of Gratioleae *sensu* Wettstein (1891) of Scrophulariaceae *s.l.* within Plantaginaceae. This tribe currently comprises ca. 16–40 genera (depending on the generic circumscription) and 320 species. Gratioleae is characterized by the following set of characters: herbaceous habit; simple, often opposite leaves; flowers solitary axillary or in racemes, rarely cymes; calyx diallisepalous, corolla slightly to strongly zygomorphic, more or less bilabiate; stamens (2)–4–(5); ovary superior with 2 carpels and 2 locules, ovules numerous; stigma mostly distinct or 2-lobed and flattened; and capsules 2–4 valved, septicidal or sometimes loculicidal (Estes & Small, 2008; Souza & Lorenzi, 2012). Even though Gratioleae is strongly supported as monophyletic in previous phylogenetic studies (Albach *et al.*, 2005; Estes & Small, 2008; Schäferhoff *et al.*, 2010), intergeneric relationships and the monophyly of some genera,

such as *Stemodia* (Fritsch *et al.*, 2007; Estes & Small, 2008), remain unresolved. Therefore, new studies including additional sampling and molecular markers are required to resolve these unclear relationships.

Philcoxia P.Taylor & V.C.Souza is a recently described genus (Taylor *et al.* 2000). So far, it comprises, four described species and one new species with description ongoing (Scatigna *et al.*, in prep). Three of the described species is named after the state of Brazil to where it is endemic: *P. bahiensis* V.C.Souza & Harley from Chapada Diamantina in Bahia; *P. minensis* V.C.Souza & Giul., endemic to a sand patch at Serra do Cabral in Minas Gerais; and *P. goiasensis* P.Taylor, which type was collected in a Cerrado area near the municipality of Posse in Goiás. *Philcoxia tuberosa* M.L.S.Carvalho & L.P.Queiroz is named after its subterraneous structures that resemble tubers (Carvalho & Queiroz, 2014). The new species will be here informally called *P. rhizomatosa* Scatigna & V.C.Souza, from Botumirim, Minas Gerais. All species of *Philcoxia* are herbs with subterranean stems and petioles, usually orbicular peltate leaves situated at or below the soil surface, flowers arranged on a helicoid cyme, two adaxial and included stamens with monothealous glabrous anthers oriented transversely to the filament, staminodes absent, and a 4-valved capsule (Fritsch *et al.*, 2007; Souza & Giulietti, 2009). The peltate leaves and underground stems are very specialized characteristics that make *Philcoxia* a unique genus among Plantaginaceae members. Other remarkable feature only found in *Philcoxia* is the carnivory, recently described in *P. minensis* (Pereira *et al.* 2012) but not yet confirmed for the remaining species of the genus.

The systematics of *Philcoxia* have been controversial since it was first described due to its highly specialized vegetative features. Originally, Souza (1996) informally named the genus *Arenicola* and placed it in the tribe Scrophularieae *sensu* Thieret (1967) of Scrophulariaceae *s.l.*, based on the morphology of the corolla with posterior lobes overlapping the lateral ones and the inflorescence being a helicoid cyme. Taylor *et al.* (2000) also discussed Souza's (1996) hypothesis but interpreted the inflorescence as being racemous, suggesting that *Philcoxia* is better placed within Gratioleae *sensu* Wettstein

(1891). They also suggested a closer affinity of *Philcoxia* to *Gratiola* L. and *Dopatrium* Buch.-Ham. ex Benth., two mostly aquatic genera. Fischer (2004), agreed in most part with Taylor *et al.* (2000) and placed *Philcoxia* within the subtribe Dopatriinae of Gratioleae also containing the predominantly aquatic genera *Deinostema* Yamazaki, *Dopatrium*, *Hydrotriche* Zucc., and *Limnophila* R. Br. Souza & Lorenzi (2012) included *Philcoxia* within Gratiolaceae based on unpublished data (Souza *et al.*, in prep). The first phylogenetic placement of *Philcoxia* based on molecular data was published by Fritsch *et al.* (2007), after the placement of Gratioleae within Plantaginaceae. According to this study, the placement of *Philcoxia* within Gratioleae is corroborated. It also indicates possible affinity with a clade formed by representatives of *Dopatrium*, *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Limnophila*, *Otacanthus* Lindl. and species of *Stemodia*. Even though this relationship is strongly supported, the limited sampling used by Fritsch *et al.* (2007) and the long branch connecting *Philcoxia* to that clade suggested that relationships with other genera of Gratioleae remained unclear. More recently, Schäferhoff *et al.* (2010) included *Philcoxia minensis* in their phylogenetic analysis of Lamiales. They found out *P. minensis* close to *Conobea* Aubl and *Scoparia* L., forming a strongly supported clade, sister to a clade formed by *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Limnophila*, *Otacanthus* and *Stemodia*. Due to the limited sampling and the divergence of results between these two studies, the specific placement of *Philcoxia* is far from being conclusive. The last phylogenetic study of Gratioleae did not include *Philcoxia* in the analysis (Estes & Small, 2008). In addition, the remaining species of the genus were not included in any phylogenetic studies, therefore, the monophyly of *Philcoxia* was never tested.

Given the confusion regarding the relationship of *Philcoxia* to other genera of Gratioleae, the aims of this study are: (1) test the monophyly of the genus *Philcoxia*; (2) investigate the interspecific relationships within *Philcoxia*; and (3) infer the specific phylogenetic placement of *Philcoxia* within the Gratioleae.

MATERIAL AND METHODS

Taxon sampling – Taxon sampling consisted of 31 taxa including four species of *Philcoxia* – *P. bahiensis*, *P. minensis*, *P. rhizomatosa* and *Philcoxia tuberosa* – and 23 taxa representing other nine genera of tribe Gratioleae. Four taxa were chosen as outgroups – *Angelonia goyazensis* Benth., *A. tomentosa* Moric. Ex Benth., *Monopera perennis* (Chodat & Hassl.) Barringer and *Veronica javanica* Blume – based on previous studies that showed tribe Angelonieae *sensu* Benth (1846) as sister to Gratioleae (Estes & Small, 2008), and *Veronica* L. to be part of the sister group of Gratioleae plus Angelonieae clade (Estes & Small, 2008; Schäferhoff *et al.*, 2010). *Monopera* Barringer, a genus possibly related to *Angelonia*, is here included in a phylogeny for the first time. *Philcoxia goiasensis* was not included because we couldn't find it on field. Sampling was concentrated on testing the monophyly of *Philcoxia* and placing it among other genera within Gratioleae. A list of included taxa, voucher information and GenBank accession numbers of the sequences used in this study is provided in Table 2.

DNA isolation, amplification and sequencing – Total genomic DNA was extracted from leaves – and inflorescence of *Philcoxia* – preserved in silica gel using NucleoSpin® Plant II extraction kit (Macharey-Nagel, Germany) following manufacturer's protocol with one modification – one hour instead of 15min at incubating step. Four plastid markers were sequenced (Shaw *et al.*, 2005), including introns *rpl16*, *rps16* and *trnL* and the intergenic spacer *trnL-trnF*; primer information and references in Table 1. Amplification by PCR (Polymerase Chain Reaction) of selected regions were run according to the following steps: *rps16* intron – initial denaturation at 95° C for 3min, followed by 35 cycles of denaturation at 95° C for 30s, annealing at 55° C for 60s and extension at 72° C for 90s, followed by final extension at 72° C for 5min; *rpl16* intron – initial denaturation at 94° C for 3min, followed by 35 cycles of denaturation at 94° C for 30s, annealing at 52° C for 60s and extension at 72° C for 90s, followed by final extension at 72° C for 5 min; *trnL* intron and *trnL-trnF* spacer – initial denaturation at 95° C for 4min, followed by 35 to 40 cycles of denaturation at 95° C for 30s, annealing at 60° C for 60s and extension at 72° C for 90s,

followed by final extension at 72° C for 8min. When markers were unable to amplify as a whole unit, amplifications of two or more fragments were done with internal primers (Table 1) and then were assembled after separated sequencing. Reactions were performed with a final volume of 25 µL and consisted of the following components: 1 µL template DNA, 1× buffer (Invitrogen, Life Technologies), 200 µmol/L of each dNTP, 3.0 mmol/L of MgCl₂, 0.1 mol/L of each primer, 0.2 µg/µL of bovine serum albumin (BSA), and 1.25 units of Platinum Taq DNA polymerase (*Invitrogen, Life Technologies*). PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Sequencing reactions were conducted at Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), University of Campinas (Unicamp) with a volume of 5 µL; reactions were performed using 0.5 µL of DNA, 1 µL of primer with a concentration of 1.6 ng/µL, 1.5 µL of Big Dye buffer 5 ×, 0.25 µL of ABI Prism Big Dye Terminator vers. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), and 1.75 µL of distilled water. Cycle sequencing products were cleaned with sephadex reusing PERFORMA DTR V3 96-Well Short Plates (EdgeBioSystems, Gaithersburg, Maryland, USA). Sequencing products were visualized on an ABI 3100 or 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Sequence assembly, alignment and phylogenetic analysis – Sequences were assembled and edited using ChromasPro (Technelysium Pty Ltd., Australia) e Geneious Pro (Biomatter, Ltd., Auckland, NZ). Initial automated alignments of the individual markers were made using MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) with MUSCLE algorithm (Edgar, 2004). Subsequent manual eye-based alignment was made on MESQUITE (Maddison & Maddison, 2011). All four matrices were also concatenated on MESQUITE.

Maximum parsimony – Maximum parsimony (MP) analyses were performed for each marker separately and combining all four markers using PAUP* (version 4.0b10; Swofford, 2002). A heuristic search for most parsimonious trees (MPT) included an initial round of tree searches with 1000 random addition sequence replicates (RASR), holding 10 trees at each step, tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping with MULTREES and

steepest descent in effect, saving a maximum of 100 trees at each replicate. All shortest trees retained in memory were then included in a second round of searches involving TBR branch swapping. Relative support for each node was estimated using the bootstrap resampling procedure (Felsenstein, 1985) as implemented in PAUP employing a full heuristic search with 1000 replicates, 250 RASR, three trees held at each step, TBR branch swapping with steepest descent and MULTREES in effect, saving 10 trees at each RASR.

Model selection – Best-fit nucleotide substitution models for each gene were selected using the Bayesian Information Criterion (BIC) in jModelTest (Posada, 2008).

Bayesian analysis – Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC; Yang & Rannala, 1997) posterior probabilities (PP) were calculated with MrBayes vers. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). One matrix for each marker separately and one data matrix combining all four markers were employed. The sequence data were partitioned by gene regions. Two parallel runs with four MCMC chains were run for 20,000,000 generations and sampled every 2,000 generations. The first 25% of samples were discarded as burn-in (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Majority-rule consensus trees were saved with TreeAnnotator (BEAST; Drummond & Rambaut, 2007) with a burn-in of 25% and a limit of 0.5 of PP. Tree files were then opened and edited with FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Table 1. Sequences and references of primer used in the analysis

Marker	primer	Primer sequences (5' - 3')	Reference
<i>rlp16</i>	rplF71	GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG	Baum <i>et al.</i> , 1998
	rplR1516	CCCTTCATTCTCCTCTATGTTG	Baum <i>et al.</i> , 1998
<i>rps16</i>	rpsF	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	Oxelmann <i>et al.</i> , 1997
	rpsR2	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	Oxelmann <i>et al.</i> , 1997
	rpsiF1	AAAAATCAAGAGCTTCGAGYCAA	Scatigna <i>et al.</i> , in prep
	rpsiF4	VGATTMTGAGCTCCGTTG	Scatigna <i>et al.</i> , in prep
	rpsiF3	TVGATTMTGAGCTCCGTTG	Scatigna <i>et al.</i> , in prep
	rpsiR1	TTCRCGGGCGAATATTKA	Scatigna <i>et al.</i> , in prep
	rpsiR3	CRCGGGCGAATATTKACT	Scatigna <i>et al.</i> , in prep
	<i>trnL</i>	tabC	CGAAATCGGTAGACGCTACG
tabD		GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
<i>trnL-trnF</i>	tabE	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
	tabF	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991

Table 2. Included taxa, voucher information and GenBank accession numbers of the sequences used in this study

included taxa	colection	GenBank accessior nº
Angelonieae		
<i>Angelonia goyazensis</i> Benth.	Scatigna, A.V. 48 (UEC)	-
<i>Angelonia tomentosa</i> Moric. ex Benth.	Scatigna, A.V. 117 (UEC)	-
<i>Monopera perennis</i> (Chodat & Hassl.) Barringer	Farinaccio, M.A. 958 (CGMS)	-
Gratioleae		
<i>Achetaria erecta</i> (Spreng.) Wettst.	Souza, V.C. 28935 (ESA)	-
<i>Achetaria ocymoides</i> (Cham. & Schltdl.) Wettst.	Souza, V.C. 32002 (ESA)	-
<i>Achetaria platychila</i> (Radlk.) V.C.Souza	Peixoto, M. 73002 (Cultivated) ³	-
<i>Achetaria scutellarioides</i> (Benth.) Wettst.	Scatigna, A.V. 110 (UEC)	-
<i>Anamaria heterophylla</i> (Giul. & V.C.Souza) V.C.Souza	Souza, V.C. 28741 (ESA)	-
<i>Bacopa aquatica</i> Aubl.	Souza, V.C. 28715 (ESA)	-
<i>Bacopa arenaria</i> (J.A.Schmidt) Edwall	Scatigna, A.V. 272 (UEC)	-
<i>Bacopa lanigera</i> (Cham. & Schltdl.) Wettst.	Costa, I.G. 150 (GFJP)	-
<i>Bacopa myriophylloides</i> (Benth.) Wettst.	Scatigna, A.V. 270 (UEC)	-
<i>Bacopa salzmännii</i> (Benth.) Wettst. ex Edwall	Scatigna, A.V. 277 (UEC)	-
<i>Bacopa stricta</i> (Schrad.) Wettst. ex Edwall	Scatigna, A.V. 404 (UEC)	-
<i>Conobea scoparioides</i> (Cham. & Schltdl.) Benth.	Scatigna, A.V. 99 (UEC)	-
<i>Gratiola peruviana</i> L.	no Voucher	-
<i>Mecardonia procumbens</i> (Mill.) Small	Mayer, F.S. 1356 (UEC)	-
<i>Philcoxia bahiensis</i> V.C.Souza & Harley	Scatigna, A.V. 107 (UEC)	-
<i>Philcoxia rhizomatosa</i> Scatigna & V.C.Souza	Scatigna, A.V. 319 (UEC)	-
<i>Philcoxia tuberosa</i> M.L.S.Carvalho & L.P.Queiroz	Scatigna, A.V. 121 (UEC)	-
<i>Philcoxia minensis</i> V.C.Souza & Giul.	Scatigna, A.V. 42 (UEC)	-
<i>Scoparia dulcis</i> L.	Scatigna, A.V. 102 (UEC)	-
<i>Scoparia ericacea</i> Cham. & Schltdl.	Rodrigues, C.D.N. 102 (ESA)	-
<i>Scoparia montevidensis</i> (Spreng) R.E.Fr.	Souza, V.C. 32411 (ESA)	-
<i>Stemodia foliosa</i> Benth.	Scatigna, A.V. 382 (UEC)	-
<i>Stemodia maritima</i> L.	Souza, V.C. 28674 (ESA)	-
<i>Stemodia microphylla</i> J.A.Schmidt	Souza, V.C. 28444 (ESA)	-
<i>Stemodia stellata</i> B.L.Turner	Souza, V.C. 28747 (ESA)	-
<i>Stemodia verticillata</i> (Mill.) Hassl.	Scatigna, A.V. 81 (UEC)	-
<i>Tetraulacium veroniciforme</i> Turcz.	Souza, V.C. 28919 (ESA)	-
Plantaginaceae (s.s.)		
<i>Veronica javanica</i> Blume	Scatigna, A.V. 384 (UEC)	-

³ Cultivated at Mauro Peixotos's personal collection; no voucher in Herbaria collections.

RESULTS

The analyses included 31 taxa, four of which were outgroups. The length of separated data matrices and parsimony scores of the four isolated markers are provided in Table 3. Combined data matrix consists of 3319 base pairs. Of these, 2400 were constant, 397 variable and 522 were parsimony informative. For all markers, a few taxa were missing, as follows: *rpl16* (10), *rps16* (3), *trnL* (4) and *trnL-trnF* (1). The nucleotide substitution models obtained for each marker were *rpl16* (TVM+G), *rps16* (GTR+G), *trnL* (TIM1+G) and *trnL-trnF* (TPM1uf+G).

Table 3. Data matrices lengths and parsimony scores for the four cpDNA sequences. PI = parsimony informative characters; CI = consistence index; RI = retention index.

	<i>rpl16</i>	<i>rps16</i>	<i>trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>combined</i>
total characters	916	1165	672	585	3319
constant	670	799	532	420	2400
variable	112	155	61	68	397
Tree length	273	483	147	188	1121
PI	136	211	79	97	522
CI	0.667	0.625	0.748	0.665	0.640
RI	0.789	0.754	0.853	0.811	0.769

Trees generated from MP and Bayesian inference approaches for the four markers separately are depicted in Figures 1 and 2, respectively. Tree topologies varied among the four markers, but it occurred only on poorly supported nodes, therefore, only the results from the combined matrix analyses will be discussed. The strict consensus of most parsimonious trees (Figure 3) provided an overall lower support than the majority-rule consensus tree of Bayesian inference (Figure 4), specially in bigger clades. The latter tree was completely resolved and most nodes were strongly supported with Posterior Probability values (PP) ≥ 0.95 . The outgroups *Veronica javanica* and Angelonieae members (*Angelonia goyazensis*, *A.tomentosa* and *Monopera perennis*) formed a weakly supported

clade (PP=0.26), sister to the clade formed by the remaining taxa. Angelonieae members formed a well supported clade (PP=1; BS=100%) and *A. goyazensis* was closer to *M. perennis*. *Anamaria heterophylla* was sister to all other Gratioleae taxa with low support values (PP=0.5). All sampled species of Gratioleae excluding *Anamaria* form a strongly supported clade (PP=1) with four major clades (Figure 4. A – D) plus *Mecardonia procumbens*. *Mecardonia* was the first divergent branch, sister to the rest of tribe. The sampled representatives of *Bacopa* plus *Conobea scoparioides* form the next divergent clade (clade A) with maximum support (PP=1.00; BS=100%), sister to the remaining Gratioleae. The third lineage is a weakly supported clade (PP=0.65; BS<50%) formed by *Tetraulacium veroniciforme*, *Stemodia stellata* and all *Philcoxia* representatives (clade B). This clade is sister to other clade formed by the remaining two major clades. Clade C (PP=1.00; BS=98%) is formed by *Stemodia foliosa*, followed by *S. veticillata* and all representatives of *Scoparia*. The last clade (clade D) is strongly supported (PP=1.00; BS<50%) and is formed – in order of divergence – by *Gratiola peruviana*, *Stemodia microphylla*, *S. maritima* and all *Achetaria* representatives.

Within clade B, *Stemodia stellata* is sister to the clade formed by the four *Philcoxia* representatives with maximum PP support and high BS value (95%). Within the clade *Philcoxia* (PP=1.00; BS=100%), *P. minensis* is closely related to *P. rhizomatosa* with high PP value (0.99) and almost moderate BS support (74%), while the other two species (*P. bahiensis* and *Philcoxia tuberosa*) form a sister clade with low support value of PP (0.68) and high BS (81%).

The only disagreement between the two approaches was *Stemodia maritima*, which was sister to *Anamaria heterophylla* in the strict consensus tree of MP with low bootstrap (BS<50%), but was placed within clade D with high support at the Bayesian inference (PP=0.99).

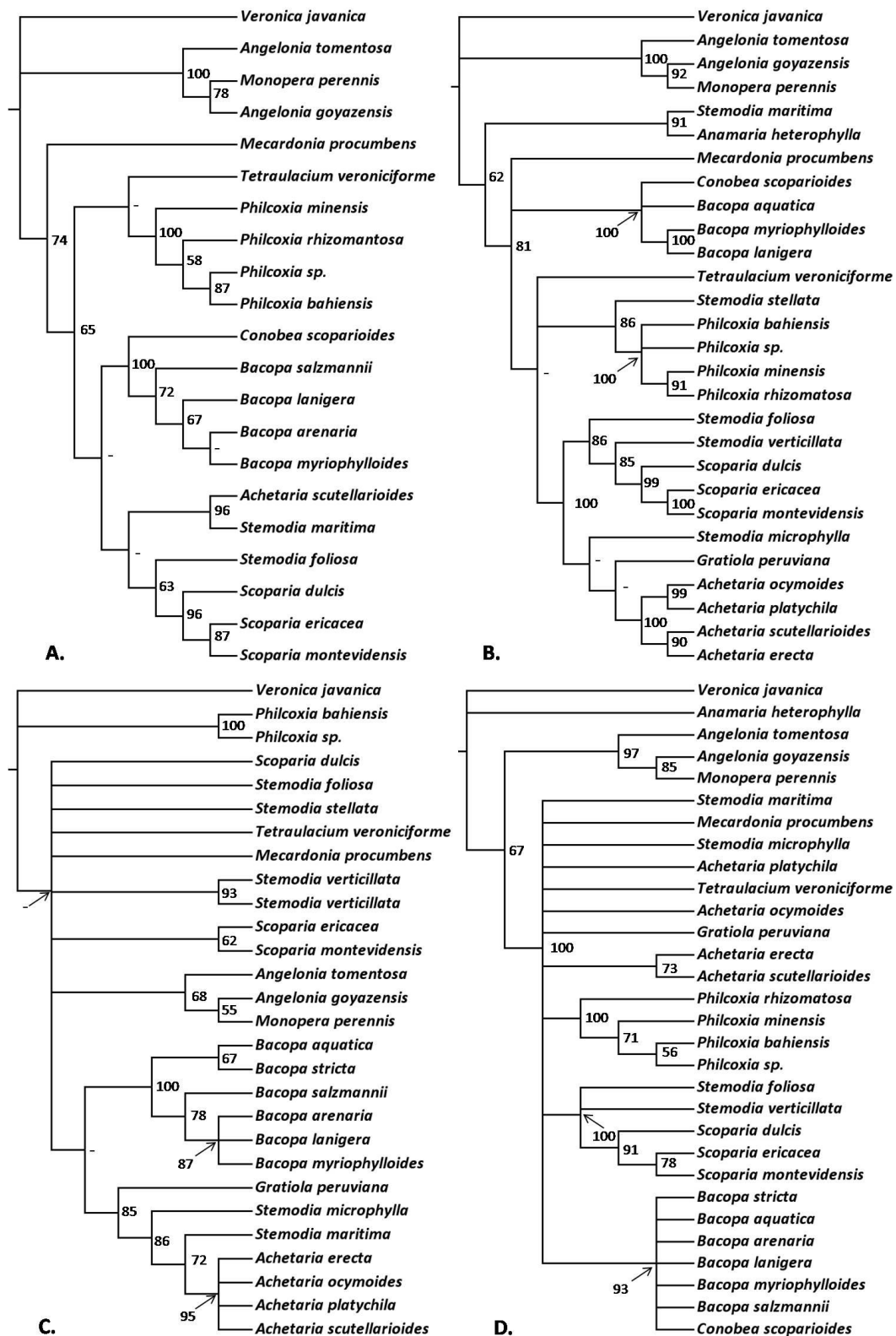


FIGURE 1. Strict consensus of most parsimonious trees obtained from Maximum Parsimony analyses of four separate cpDNA sequences. **A.** *rp16* intron. **B.** *rps16* intron. **C.** *trnL* intron. **D.** *trnL-trnF* intergenic spacer. Numbers next to nodes indicate Bootstrap (BS) values > 50%. “-” indicate values of BS lower than 50%.

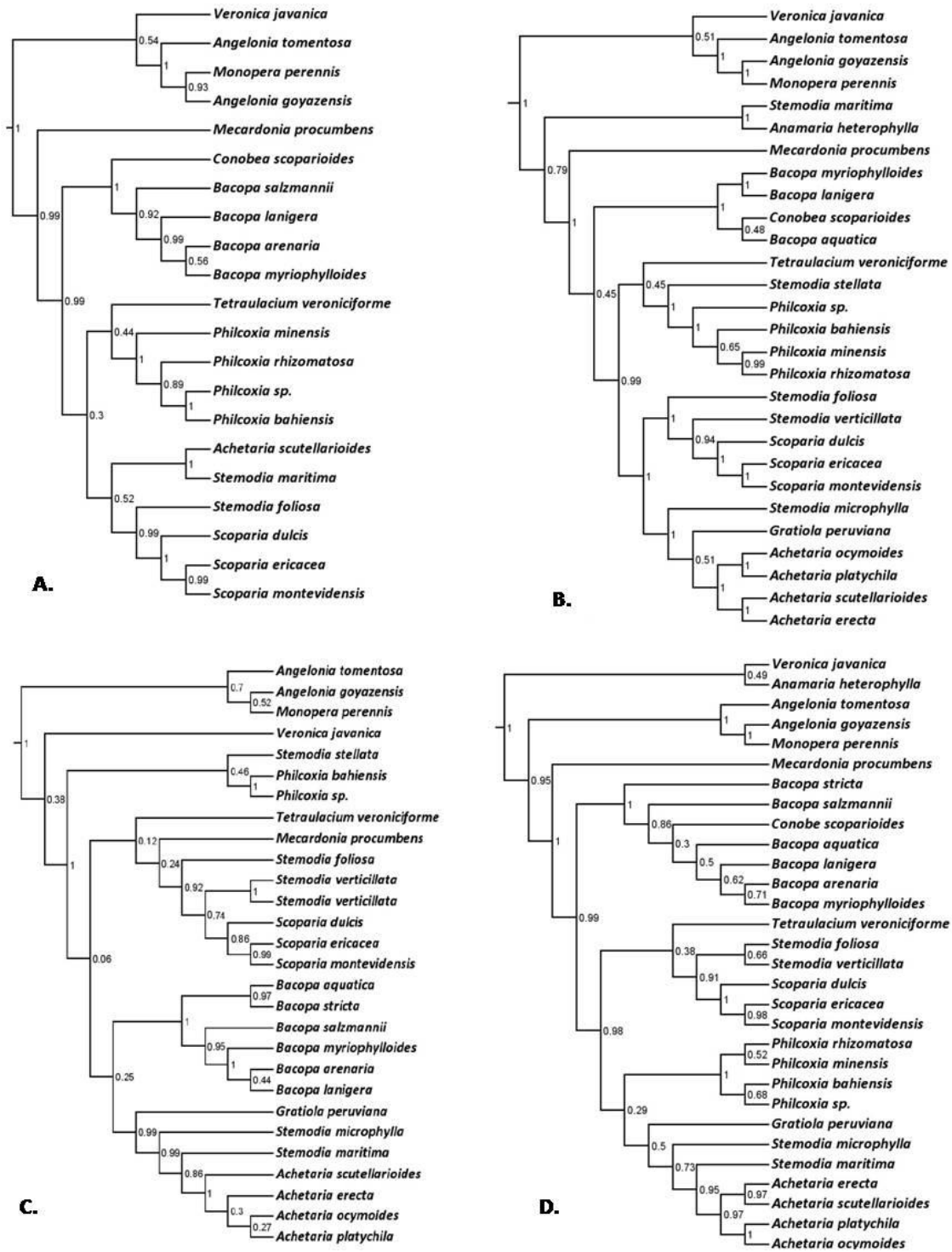


FIGURE 2. Majority-rule consensus trees of Bayesian inference of four separate cpDNA sequences. **A.** *rpl16* intron. **B.** *rps16* intron. **C.** *trnL* intron. **D.** *trnL-trnF* intergenic spacer. Numbers next to nodes indicate posterior probabilities (PP).

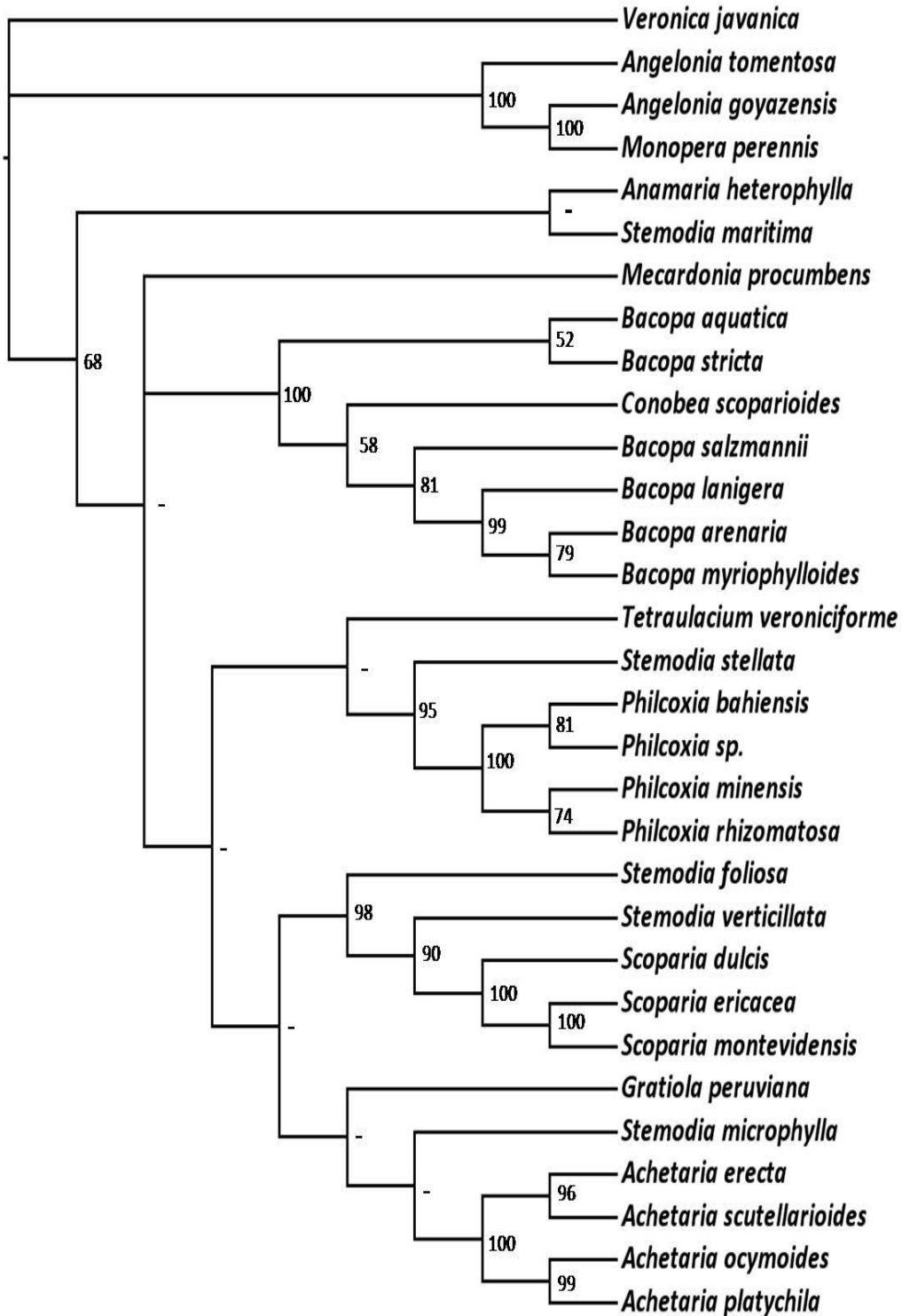


FIGURE 3. Strict consensus of the two most parsimonious trees obtained from Maximum Parsimony analysis of four combined cpDNA sequences – *rp16*, *rps16* and *trnL* introns and *trnL-trnF* intergenic spacer. Numbers next to nodes indicate Bootstrap (BS) values > 50%. “-” indicates values of BS lower than 50%.

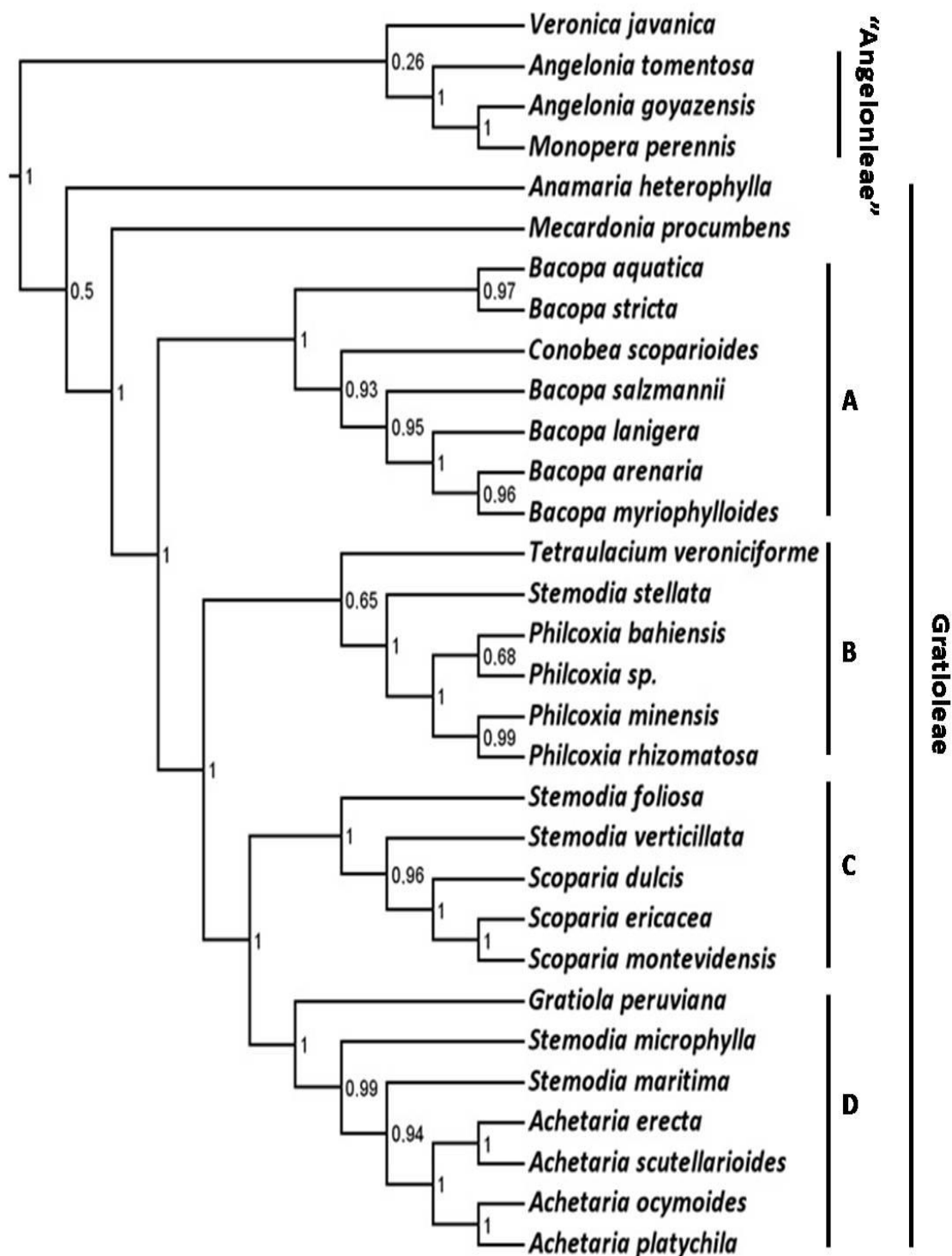


FIGURE 4. Majority-rule consensus obtained from Bayesian inference of four combined cpDNA sequences – *rp16*, *rps16* and *trnL* introns and *trnL-trnF* intergenic spacer. Numbers next to nodes indicate posterior probabilities. A – D are the four main clades of Gratiolleae.

DISCUSSION

This is the first effort to comprehend more deeply the evolutionary relationships of *Philcoxia* within Gratioleae. Our analysis are consistent with previous studies in Plantaginaceae (Olmstead *et al.*, 2001; Albach *et al.*, 2005; Oxelman *et al.*, 2005; Rahmanzadeh *et al.* 2005; Estes & Small, 2008) and, even though the focus of our study was the phylogenetics of *Philcoxia*, we were able to provide new and valuable information for taxa within Gratioleae and closest relatives.

Angelonieae – the placement of this clade as sister to the Gratioleae had maximum support values (PP=1.00) in Estes & Small (2008) studies with *ndhF* sequences data and also in Schäferhoff *et al.* (2010) phylogeny with combined data from *trnK/matK*, *trnL-F* and *rps16* sequences. Our results, on the other hand, do not allow us to infer precisely the relative position of Angelonieae, although they formed a clade with maximum support value in both MP and BI approaches, sister to *Veronica javanica* with weak support (PP=0.26) This is the first time that a representative of *Monopera* is included in a phylogeny. *Monopera perennis*, in our analysis, formed a clade with *Angelonia goyazensis* (PP=1.00; BS=100%), sister to *Angelonia tomentosa* with high support value (PP=1.00; BS=93%). Even though we had a limited sampling within Angelonieae, our results suggest that *Angelonia*, as currently circumscribed, is a paraphyletic group. Therefore, additional sampling of Angelonieae members in further studies in Plantaginaceae are fundamental to resolve whether *Monopera* and *Angelonia* should remain as two separate genera or united in a single genus.

Anamaria – the only species of this genus, *A. heterophylla*, was first described in the genus *Stemodia* (Giulietti & Souza, 1990), of the tribe Gratioleae, due to the stipitate thecae and calyx with equal sepals. However, the particular morphology of inflorescence and habit would be sufficient features to consider it a separate new genus (Souza, 2001). According to this author, *Anamaria* would be better placed within tribe Scrophularieae, although it would remain a divergent member among the other genera of this tribe (Souza & Giulietti, 2009). *Anamaria* is currently recognized as a member of the Gratiolaceae

(Souza & Lorenzi, 2012), but, since no other phylogenetic studies included this genus and our results are inconclusive, it is clear that broader sampling is needed to better understand the relationships of *Anamaria* among the Plantaginaceae.

Placement of *Philcoxia* – traditionally recognized as a member of Scrophularieae (Souza, 1996), the genus was included in Plantaginaceae as a member of Gratiioleae in recent phylogenies (Fritsch *et al.*, 2007; Schäferhoff *et al.*, 2010) with strong support. According to Schäferhoff *et al.* (2010), *P. minensis* is closely related to *Conobea* and *Scoparia* L., forming a strongly supported clade, sister to a clade formed by representatives of *Gratiola*, *Hydrotriche*, *Limnophila*, *Otacanthus* and *Stemodia*. This hypothesis is not consistent with our analyses. In our study, not only *Conobea* was closely related to representatives of *Bacopa* with strong support (Fig. 4 clade A), but also *Scoparia* was closer to the clade formed by *Achetaria*, *Gratiola* and part of *Stemodia* than to *Philcoxia*. In comparison with Fritsch *et al.* (2007), we found *Philcoxia* within other divergent group, sister to a clade formed by two major clades, one containing *Scoparia* representatives plus *Stemodia* (Fig. 4 clade C) and *Achetaria* members plus *Gratiola* and *Stemodia* (Fig. 4 clade D).

Philcoxia and *Stemodia stellata* formed a strongly supported clade (PP=1.00; BS=95%). *Stemodia stellata* – here included for the first time in a phylogeny – is a rare species, endemic to Pico do Itambé, in Minas Gerais. It is characterized by stellate trichomes, a unique feature in the tribe.

Tetraulacium veroniciforme is related to the clade *Philcoxia* plus *S. stellata* with low support value (PP=0.65). This is another genus included in a molecular phylogeny for the first time in this study. Its placement is not conclusive in our study, although it is possible to infer that *Tetraulacium* is related to the three major clades that contain representatives of *Stemodia*, *Philcoxia*, *Scoparia*, *Gratiola* and *Achetaria*. This general placement within the core Gratiioleae is consistent with the traditional classification made by Bentham (1846). According to Souza & Giulietti (2009), the closest taxon to *Tetraulacium* is *Dizygostemon floribundum*, due to androecium morphology. This may be a clear example

of unclear relationships due to lack of sampling within Gratioleae. It is possible that the placement of *Tetraulacium* could be resolved if further studies that include *Dizygostemon* in the analyses.

Relationships within *Philcoxia* – the four species of *Philcoxia* included in our analyses formed a clade with maximum support values, as expected. *Philcoxia minensis* is closely related to *P. rhizomatosa*, forming a strongly supported clade (PP=0.99; BS=74%). Both species occur in Minas Gerais. Sister to this clade are the two other species from Bahia, *P. bahiensis* and *P. tuberosa*, that formed a clade with low PP (0.68) but with high Bootstrap support (81%). Morphologically, the two species from Minas Gerais and *P. tuberosa*, from Bahia, share a rhizome that is delicate – similar to petioles – in *P. minensis* and *P. tuberosa*, but is thicker and very conspicuous, with evident nodes in *P. rhizomatosa*. These three species present vegetative propagation. In contrast, *P. bahiensis* presents a branched upright stem and apparently do not propagate vegetatively. *Philcoxia tuberosa* is the only species to present tuberous underground structures. We did not include *P. goiasensis* in our analysis because we were not able to find it on field. According to our analyses it is possible to infer that *Philcoxia* is a monophyletic group. It is also possible to infer morphological synapomorphies such as the peltate leaves, underground petioles and the cymous inflorescence and the ecological novelty of carnivory.

Stemodia – the first author to propose the desintegration of the genus was Minod (1918), based on gynoecium morphology. In the last review of the genus, however, Turner & Cowan (1993) considered *Stemodia* as a monophyletic group, based on nine morphological characters. On the other hand, recent phylogenies based on molecular data reinforce that this genus, as currently delimited, may be paraphyletic (Fritsch *et al.*, 2007; Estes & Small, 2008). Our analysis are consistent with these phylogenetic studies. We found *Stemodia* representatives in three major clades. *S. stellata* is sister of *Philcoxia* clade (Fig. 4 clade B); *S. foliosa* and *S. verticillata* form the two first divergent branches within the clade formed by representatives of *Scoparia* (Fig. 4 clade C); and *S. microphylla* and *S.*

maritima as second and third divergent lineages within the clade formed by *Gratiola* and *Achetaria* members (Fig. 4 clade D). It is clear that further investigation with expanded sampling of *Stemodia* and other Gratioleae representatives is essential to fully understand the systematics of this genus and the relationships within the tribe.

CONCLUSIONS

We were able to answer to the main questions proposed by this study: 1) *Philcoxia* is a monophyletic genus; 2) *P. minensis* is closer to *P. rhizomatosa* and *P. bahiensis* is probably closer to *P. tuberosa*; and 3) *Stemodia stellata* is sister of *Philcoxia*, forming a strongly supported clade that is related to clades formed by representatives of *Scoparia* and *Stemodia* in part and by *Achetaria* representatives and *Stemodia* in part. To fully understand the intergeneric relationships within Gratioleae, it is fundamental that the sampling be expanded and molecular data from different markers be combined.

LITERATURE CITED

Albach, D. C., Meudt, H. M. & Oxelman, B. (2005) *Piecing together the "new" Plantaginaceae*. American Journal of Botany. 92, 297-315.

APGIII. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. Botanical Journal of the Linnean Society. 161, 105-121.

Baum, D. A., Small, R.L. & Wendel, J. F. (1998) Biogeography and floral evolution of Baobabs (*Adansonia*, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets. Systematic Biology 47, 181-207.

Bentham, G. (1846) Scrophulariaceae in DeCandolle, A. Prodrum 10, 186-201.

Carvalho, M.L.S. & Queiroz, L.P. (2014) *Philcoxia tuberosa* (Plantaginaceae), a new species from Bahia, Brazil. Neodiversity 7, 14-20.

Drummond, A. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.

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

Estes, D. & Small, R. L. (2008) Phylogenetic relationships of the monotypic genus *Amphianthus* (Plantaginaceae tribe Gratiolae) inferred from chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany* 33, 176-182.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

Fischer, E. (2004) Scrophulariaceae. Kadereit J.W., ed., *The Families and Genera of Flowering Plants, Volume VII. Flowering Plants. Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)*, 333–432.

Fritsch P. W., Almeda F., Martins A. B., Cruz B. C. & Estes D. (2007) Rediscovery and phylogenetic placement of *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae), with a test of carnivory. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 58, 447-467.

Giulietti, A. M. & Souza, V. C. (1990) *Stemodia heterophylla*, nova espécie de Scrophulariaceae do Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 12, 181-184.

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

Mabberley, D.J. (2008) *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. 3ed. Cambridge University Press.

Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2011) Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.75.

Minod, M. (1918) Contributions à l'étude du genre *Stemodia* et du groupe des Stemodiees em Amerique. Bulletin de La Société bontanique de Genève. ser. 2.10, 155-252.

Olmstead, R. G., dePamphilis, C. W., Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisens, W. J. & Reeves, P. A. (2001) Disintegration of the Scrophulariaceae. American Journal of Botany 88, 348–361.

Oxelman, B., Kornhall P., Olmstead, R.G. & Bremer, B. (2005) Further disintegration of Scrophulariaceae. Taxon 54, 411-425.

Oxelman, B., Liden, M. & Berglund, D. (1997) Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Carophyllaceae). Plant Systematic and Evolution 206, 393-410.

Pereira, C. G., Almenara, D. P., Winter, C. E., Fritsch, P. W., Lambers, H. & Oliveira, R. S. (2012) Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 1154-1158.

Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution 25, 1253-1256.

Rahmanzadeh, R., Müller, K.F., Fischer, E., Bartels, D. & Borsch, T. (2005) Linderniaceae and Gratiolaceae (Lamiales) are further lineages distinct from Scrophulariaceae. Plant Biology 7, 67-78.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19, 1572-1574

Schäferhoff B., Fleischmann, A., Fischer, E., Albach, D., Borsch, D., Heubl, G. & Müller, K.F. (2010) Towards resolving Lamiales relationships: Insights from rapidly evolving chloroplast sequences. BMC Evolutionary Biology Biol 10, 352.

Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B. et al. (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92, 142-166.

Souza, V. C. (1996) Levantamento das espécies de Scrophulariaceae nativas do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Souza, V. C. (2001) *Anamaria*: um novo gênero de Scrophulariaceae do Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 19, 43-44.

Souza, V. C. & Giulietti, A. M. (2009) Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. *Pesquisa Botânica* 60, 7-288.

Souza, V. C. & Hassemer, G. (2014) *Plantaginaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB191>>. Acesso em: 04 Mai. 2014.

Souza, V. C. & Lorenzi, H. (2012) *Botânica Sistemática*. 3ed. Instituto Plantarum.

Swofford, D. L. (2000) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

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

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Hilipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

Taylor P., Souza V. C., Giulietti A. M. & Harley R. M. (2000) *Philcoxia*: A new genus of Scrophulariaceae with three new species from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 55, 155-163.

Thieret, J. W. (1967) Supraspecific classification in the Scrophulariaceae: A review. *Sida* 3, 87–106.

Thiers, B. (2013) Index herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Garden's Virtual Herbarium. Available from: <http://sweetgum.nybg.org/ih/herbarium.php?irn=174420> (accessed 14 December 2013).

Turner, B.L. & Cowan, C.C. (1993) Taxonomic overview of *Stemodia* (Scrophulariaceae) for South America. *Phytologia* 75(4), 281-324.

Wettstein, R. V. (1891) Scrophulariaceae. Engler, A., Prantl, K., eds., *Die natürlichen Pflanzenfamilien* IV, 3, 39-107.

Yang, Z. & Rannala, B. (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14, 717-724 .

CAPÍTULO 2.

Microsatellite markers for studies with the carnivorous plant *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae)

André V. Scatigna^{1, 3}; Fernanda A. Oliveira²; Camila C. Mantello²; Patrícia M. Francisco²; Anete P. Souza² & André O. Simões¹

¹Laboratório de Taxonomia, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

²Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

³Author for correspondence: andre_vs13@hotmail.com

- **Premise of the study:** Microsatellite markers were developed for the rare and critically endangered carnivorous species *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae) for further population genetics studies aiming its conservation.
- **Methods and Results:** We identified 29 clones containing 40 microsatellites from a genomic library enriched for (CT)₈ and (GT)₈ motifs. Primer pairs were developed for 27 microsatellite loci and validated in 30 individuals of a natural *P. minensis* population and tested in four individuals from a natural population of *P. bahiensis*. Seventeen markers successfully presented amplification products within the expected size range, of which 12 were polymorphic. The expected and observed heterozygosities ranged from 0.03 to 0.65 and from 0.00 to 0.77 respectively.
- **Conclusions:** The 12 microsatellite markers identified as polymorphic loci are suitable for studies in genetic diversity and structure, mating system, and gene flow in *P. minensis* and also may be useful molecular tools to study similar issues regarding the related species *P. bahiensis*.

Key words: “campo-rupestre”; Espinhaço Range; SSR; conservation genetics; Gratioleae.

INTRODUCTION

Philcoxia P.Taylor & V.C.Souza is a carnivorous plant genus, endemic to the Brazilian “campo rupestre” formation (Pereira *et al.*, 2012). The genus is composed by terrestrial herbs with underground stems and leaves under or on the soil surface. It comprises five species, three of them named after the Brazilian state from which they are endemic: *P. bahiensis* V.C.Souza & Harley, from Bahia; *P. goiasensis* P.Taylor, from Goiás; and *P. minensis* V.C.Souza & Giul., from Minas Gerais (Taylor *et al.*, 2000). *Philcoxia tuberosa* M.L.S.Carvalho & L.P.Queiroz is named after its underground structures that resemble tubers (Carvalho & Queiroz, 2014). And a new species with description ongoing (Scatigna *et al.*, in prep.). Up to date, only a small population of *P. minensis* is known from a sand patch at the Serra do Cabral State Park, in Minas Gerais State (Souza & Giulietti, 2009). Due to its rarity and the vulnerability of the formation where it occurs, this species could be treated as critically endangered. In addition, very little is known about the general biology of *P. minensis*. One important step for studies aiming its conservation is the characterization of genetic diversity and structure, gene flow, breeding ratio of populations and mating system of that species. The use of microsatellite markers for population genetics aiming biodiversity conservation increased in the past decade (Ouborg *et al.*, 2010) and is now a well established technique. Therefore, the purpose of this study was to develop simple sequence repeats (SSR) or microsatellite markers, aiming to elucidate questions concerning aspects of *P. minensis* biology, such as its genetics variation and structure and its mating system.

METHODS AND RESULTS

Silica-gel dried inflorescence of a single individual of *P. minensis* was used in the initial DNA extraction, using the NucleoSpin Plant II kit (Macharey and Nagel), following manufacturers protocol. Voucher specimen of that individual (Scatigna, A.V. 42) was deposited at the UEC herbarium at the University of Campinas, Brazil. A microsatellite-enriched genomic library was constructed following the protocol proposed by Billotte *et al.* (1999), with slight modifications. Genomic DNA was digested with *AfaI* enzyme

(Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for 3h incubation at 37° C and ligated to the double-stranded adapters 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3' for 2h incubation at 20° C. Enrichment was performed using a hybridization-based capture with (CT)₈ and (GT)₈ biotin-linked probes and streptavidin-coated magnetic beads (MagneSphere Magnetic Separation Products, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). The enriched fragments were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and the amplification products were cloned into pGEM-T Easy Vector® (Promega Corporation) which were then used to transform XL1-Blue *Escherichia coli* competent strain (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Eighty recombinant colonies were selected using blue/white screening and sequenced in an automated ABI 3500xL Genetic Analyzer (Perkin Elmer–Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using T7 and SP6 primers and the BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer–Applied Biosystems). Sequences containing microsatellites were identified using the SSR Identification Tool (SSRIT; Temnykh *et al.*, 2001). As a criterion for the SSR selection, sequences that showed at least five dinucleotide repeats; four trinucleotide repeats; and three tetra-, penta- and hexanucleotide repeats were selected. 40 SSRs were identified in 29 of 80 generated sequences, representing a 36.25% rate of enrichment success. The most abundant motifs in the sequences of microsatellites were dinucleotide (70%), followed by tetra (17.5%), tri and penta (5% each) and hexanucleotide (2.5%). Most of the SSRs found were classified as perfect (67.5). Twenty seven primer pairs, complementary to the genomic sequences flanking the microsatellite region, were designed using Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) according to the following criteria: size of primers preferably between 18 and 22 bp; melting temperature (T_m) between 45° C and 60° C; amplified product length between 100 and 300 bp; and GC content between 40% and 60%. PCR was conducted with a final volume of 15 µL containing 2.5 ng of template DNA, 1 × PCR buffer (20 mM Tris HCl [pH 8.4] and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 10 mg/ml BSA (bovine serum albumin), 0.5 mM of each primer, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The PCR program for all loci amplification consisted of 2min30s of initial

denaturation at 94° C followed by 35 cycles of denaturation at 94° C for 1min, annealing at 60° C for 1 min (except locus Pm11 – 55° for 1min), extension at 72° C for 1min, and a final extension at 72° C for 8min (Table 1). Amplification products were checked preliminary checked in TBE 0.5x 3% agarose gels prior to genotyping using TBE 1x 6% denaturing polyacrylamide gels silver-stained. The product sizes were determined using a 10-bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). For polymorphism evaluation in *P. minensis*, we sampled a total of 30 specimens from the only population in Serra do Cabral, Municipality of Joaquim Felício, Minas Gerais State, Brazil (17°42'S, 44°11'W). Furthermore, four specimens of *P. bahiensis* from a population in Chapada Diamantina, near the municipality of Piatã, Bahia State, Brazil (13°02'S, 41°57'W), were used to evaluate the transferability of the markers. All loci were tested under the same PCR conditions used for *P. minensis*. Statistical analyses were performed using Microsatellite Toolkit v.3.1.1 (Park, 2001) to calculate the expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_o) and polymorphism information content (PIC). FSTAT program (Goudet, 2002) was used to estimate the adherence to Hardy-Weinberg equilibrium and possible linkage disequilibrium (LD). Additionally, FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007) was used to identify the possible occurrence of null alleles. Of 27 markers tested, 12 loci were polymorphic, five were monomorphic and ten did not amplify after PCR optimization (Table 1). All polymorphic markers successfully cross-amplified with *P. bahiensis* samples. Number of alleles per locus ranged from two to five, with an average of 3.5; the observed and expected heterozygosities ranged from 0.00 to 0.77 and from 0.03 to 0.65, respectively (Table 2). The PIC values of these markers ranged from 0.032 to 0.577, showing medium levels of polymorphism (Table 2). No evidence of null alleles was found, and no departure from Hardy-Weinberg equilibrium was observed. No significant linkage disequilibrium (LD) between loci was detected when applying Bonferroni correction (P value for 5% = 0.000758). This was not consistent with our expectations, since the population is apparently small and isolated, and the individuals present vegetative propagation. The apparent breeding ratio was calculated and a value of 94% was obtained. There is more outcrossing than expected for a plant with asexual reproduction,

suggesting that this species may present a mixed type of mating system. Our results preliminarily indicate that the evaluated population of *P. minensis* from Serra do Cabral does not face the negative genetic consequences of its small size and isolation.

CONCLUSIONS

The SSR markers herein described are the first developed for *P. minensis*. These microsatellites are important tools for genetic studies in *P. minensis* and may be used to evaluate the genetic variability of related species *P. bahiensis*, aiming to elucidate questions on genetic diversity, spatial genetic structure, mating system and gene flow. Data from such studies may contribute to conservation and management plans for *Philcoxia* species.

Table 1. Characteristics of 17 microsatellite loci that amplified successfully in *P. minensis* samples.

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Size (bp)	T _a °C	GenBank accession n ^o
Pm1	F: CCAACAGAAAAGCCCTAACG R: GCCCACAGTCCCTTGAGTAT	(GA) ₁₇	234	60	-
Pm2	F: AAGACGTTTGCCAGCCTTA R: TGCATTTATCCCCACAGACA	(TAG) ₄ (TGTA) ₃	173	60	-
Pm3	F: CCCAGCTTCACCTCACTCTC R: CGTTAGGGCTTTTCTGTTGG	(TCC) ₅	161	60	-
Pm4	F: AGTTGCCTTCCATCATCGTT R: TGGCTGAGAATCACTGACAAA	(GT) ₅ (CT) ₈	156	60	-
Pm8	F: TGAAAACCCCAATCCCATAA R: CACAGGCGTATCAAGGAAGA	(GT) ₈	232	60	-
Pm9	F: TTGCTTTCCTCTCGGTGTTT R: CATTACTGCACCAAGCCTGA	(CT) ₁₉	214	60	-
Pm10	F: TGGCCCTTCTCAGATCTTTC R: ACATAGACCATTCCGGGAGAGA	(AC) ₉	239	60	-
Pm11	F: CATTTCGTTGTTCCCACA R: TACATGCGTTCCAAGCCTAA	(CA) ₁₁ (TC) ₇	183	55	-
Pm13	F: GCGTTCCTTTTTTCGATCTGT R: AGCCATGGATATGTTCTCACC	(CA) ₁₀	213	60	-
Pm15	F: TCCTAATTGCTTCACGAGCAT R: AGCTTTGTCAGGCAGCTCA	(AC) ₅ (GA) ₅	216	60	-
Pm16	F: CCAAAGCTACACACCCAACA R: TCATATGCTGGGCATACCTG	(AC) ₅ (ACAAA) ₃	244	60	-
Pm18	F: AGTCACTGCTTTCAGCCTGTC R: ATGAGATTGCTGAGCCTCGT	(AG) ₂₆	161	60	-
Pm20	F: ACTCATAGAGGACACACACAC R: TTATTTAGGGGACGGAGAG	(AG) ₁₀ (AC) ₁₀	199	60	-
Pm21	F: ATCGCTTCCTCCTCCTCTTC R: AACAAAGCTCGCTCGTTCTC	(CA) ₁₀	181	60	-
Pm22	F: TGATCGACTTCATGGACACC R: CGGGATTCTCTTGCTTAACG	(TC) ₁₀ (CA) ₉	181	60	-
Pm26	F: CTGGCGCTATCCTTCTCAAT R: TGGAGGATGTCTGTTTGTCTG	(AC) ₁₀	246	60	-
Pm27	F: TTTTCCAAGAGTCTCTGCAC R: GAGTGAAAGGGTGGTTTGTGA	(CAAGC) ₄	225	60	-

T_a = specific annealing temperature

Table 2. Results of initial polymorphic microsatellite marker screening in the population of *P. minensis* (N=30).

Locus	A	Size (bp)	H _O	H _E	PIC	A _e
Pm02	3	163–181	0.300	0.264	0.233	1.36
Pm03	2	163–165	0.033	0.033	0.032	1.03
Pm04	4	146–166	0.500	0.417	0.379	1.72
Pm09	4	192–220	0.640	0.634	0.552	2.73
Pm10	4	239–269	0.067	0.098	0.095	1.11
Pm11	3	177–185	0.448	0.402	0.361	1.67
Pm13	4	109–215	0.367	0.434	0.389	1.77
Pm15	4	214–220	0.364	0.518	0.418	2.07
Pm16	2	242–244	0.000	0.089	0.083	1.10
Pm20	4	189–201	0.552	0.591	0.527	2.45
Pm21	5	155–185	0.773	0.655	0.577	2.90
Pm27	3	221–227	0.455	0.502	0.391	2.01

A = number of alleles; H_O = observed heterozygosity; H_E = expected heterozygosity; PIC = polymorphism information content; A_e = number of effective alleles; N = sample size

LITERATURE CITED

Billotte, N., Lagoda, P. J. L., Risterucci, A. M. & Baurens, F. C (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54, 277-288.

Carvalho, M.L.S. & Queiroz, L.P. (2014) *Philcoxia tuberosa* (Plantaginaceae), a new species from Bahia, Brazil. *Neodiversity* 7, 14-20.

Chapuis, M.P. & Estoup, A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631

Goudet, J. (2002) FSTAT (version 2.9.3.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.

Ouborg, N. J., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Bijlsma, R. & Hedrick, P.W. (2010) Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* 26, 177-187.

Park, S.D.E. (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. PhD. thesis. University of Dublin. Ireland.

Pereira, C. G., Almenara, D. P., Winter, C. E., Fritsch, P. W., Lambers, H. & Oliveira, R. S. (2012) Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1154-1158.

Souza, V. C. & Giulietti, A. M. (2009) Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. *Pesquisa Botânica* 60, 7-288.

Taylor, P., Souza, V. C., Giulietti, A. M. & Harley, R. M. (2000) *Philcoxia*: A new genus of Scrophulariaceae with three new species from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 55, 155-163.

Temnykh, S., Clerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S. & McCouch, S. (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency length variation transposon associations and genetic marker potential. *Genome Research* 11, 1441-1452.

Untergasser, A., Nueven, H. Ao, X. R., Bisseling, T., Geurts, R. & Leunissen, J. A. M. (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 35, 71-74 .

CAPÍTULO 3.

***Philcoxia rhizomatosa* (Plantaginaceae) a new carnivorous species from Minas Gerais State, Brazil**

ANDRÉ VITO SCATIGNA¹, VINICIUS CASTRO SOUZA², CAIO GUILHERME PEREIRA³, MARCOS AURÉLIO SARTORI⁴ & ANDRÉ OLMOS SIMÕES¹

¹*Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Postal Code 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: andre_vs13@hotmail.com; andreosimoes@gmail.com*

²*Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil. E-mail: vcsouza@usp.br*

³*School of Plant Biology, The University of Western Australia, Crawley 6009, WA, Australia. E-mail: caio.guilhermepereira@research.uwa.edu.au*

⁴*Biopreservação Consultoria e Emp. Ltda, 36525-000, Guiricema, MG, Brazil. E-mail: biopresevar@biopreservar.com.br*

Abstract

Philcoxia rhizomatosa, a new species of the carnivorous genus *Philcoxia* of tribe Gratioleae (Plantaginaceae), is described and illustrated. The species has bigger leaves than other species in the genus and presents a conspicuous and branched rhizome. This new taxa is possibly endemic to a sand patch in the transition vegetation between the Cerrado and the Caatinga in the municipality of Botumirim, Minas Gerais State, Brazil. Tests for carnivory were performed and showed the presence of nematodes and activity of phosphatase on leaf surface, suggesting that *P. rhizomatosa* is a carnivorous plant.

Resumo

Philcoxia rhizomatosa é descrita e ilustrada como uma nova espécie do gênero de plantas carnívoras *Philcoxia* da tribo Gratioleae (Plantaginaceae). A espécie possui folhas maiores que outras espécies do gênero e apresenta um rizoma conspícuo e ramificado. Esta nova espécie é, aparentemente, endêmica de um areal em vegetação de transição entre Cerrado e Caatinga, no município de Botumirim, estado de Minas Gerais, Brasil. Testes de carnívoros evidenciaram presença de nematódeos e atividade de fosfatase na superfície das folhas, o que sugere que *P. rhizomatosa* é uma planta carnívora.

Key words: carnivory, Espinhaço Range, Gratiolaceae, quartzite sand, nematodes

Introduction

Philcoxia P. Taylor & V.C. Souza is a recently described genus comprising four species – *P. bahiensis* V.C.Souza & Harley, *P. goiasensis* P.Taylor, *P. minensis* V.C.Souza and *P. tuberosa* M.L.S.Carvalho & L.P.Queiroz – endemic to the Brazilian sandy formations of the Cerrado and Caatinga (Taylor *et al.* 2000; Carvalho & Queiroz, 2014). The genus is characterized by having underground stems, peltate leaves at or below the soil surface, flowers arranged in a helicoid cyme and androecium with two stamens and monothealous anthers (Fritsch *et al.* 2007, Souza & Giulietti 2009), rare features among the angiosperms and some of them unique within Plantaginaceae. Another special feature found in this genus is the carnivory, described in *Philcoxia minensis* by Pereira *et al.* (2012). All species of *Philcoxia* are endemic to quartzite sand patches, a rare formation that is highly threatened by human activity such as mining for diamonds and crystals and growing eucalyptus areas (Souza & Giulietti, 2009). During a field trip to a eucalyptus farm in the municipality of Botumirim, on the northern portion of the Espinhaço Range in the state of Minas Gerais, M.A.S. found specimens of *Philcoxia* with apparently larger leaves and different underground structures in a sand patch, similar to where other species of *Philcoxia* occur. This new species is described and illustrated and a table with diagnostic features is provided. The

following herbaria were visited in search of previously collected material: BHCB, DIAM, ESA, SPF and UEC; abbreviations from Thiers (2013).

All *Philcoxia* species are found in nutrient-poor, well drained soil, where plants are expected to present strategies to better assimilate those scarce nutrients (Pereira *et al.* 2012). Carnivorous plants like most *Drosera* (Droseraceae), *Drosophyllum* (Drosophyllaceae) and *Roridula* (Roridulaceae), tend to present high phosphatase activity on the surface of the secretory structures (Juniper *et al.* 1989; Plachno *et al.* 2009). External phosphatase activity is present in digestive structures in carnivorous plants (Plachno *et al.* 2006). Following the protocols of Pereira *et al.* (2012), we performed a test for carnivory, including Scanning Electronic Microscopy (SEM) and phosphatase activity detection with fluorescence labelling (Plachno *et al.*, 2006; 2009).

Philcoxia rhizomatosa Scatigna & V.C. Souza, *sp. nov.* (Figs. 1 and 2)

Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Botumirim, Fazenda Sobrado, 16°54'S, 42°53'W, 820m, Dec 08 2012, fl., *Scatigna* 319 (holotype: UEC!; isotype ESA!, K!).

Philcoxia rhizomatosa is similar to *Philcoxia minensis* due to presence of rhizome; differing from other species by bigger leaves, achieving up to 7 mm diam.; thicker, well-branched rhizome; inflorescence, pedicel and calyx completely glabrous.

Perennial herb, ascending to erect, ca. 25 cm tall, rhizomatous. Rhizome conspicuous, branched, 1.4–2.5 mm thick. Leaves alternate, underground when immature and aerial when mature; stipules absent; petiole 0.4–3.7 cm long, glabrous, subterranean; underground blade, immature, conduplicate; aerial blade, mature, orbicular to reniform, peltate, 0.2–0.7 cm diam.; adaxial surface glandulous-pubescent; abaxial surface glabrous, except for some rare trichomes at the margins. Inflorescence a helicoid cyme, 15–30 cm long, glabrous; pedicel 0.5–2.5 cm long at anthesis, glabrous; bracts 1–1.45 mm long, persistent. Calyx with 5 sepals, free, oval, subequal, 0.95–1.1 mm x 0.65–0.69 mm, apex lilac at anthesis, glabrous. Corolla 5-lobed; corolla lobes oboval to orbicular, slightly

emarginated, lateral lobes 4.3-4.5 mm x 3.6-3.7 mm, upper lobe 3.3–3.5 mm x 3.5–3.6 mm, lower lobes 3.9–4.1 mm x 2.9–3.0 mm; tube ca. 6 mm long, externally sparsely pubescent at dorsal portion, wider at base, internally glandulous-pubescent. Stamens 2, adaxial, inserted on corolla tube, included; filaments slightly sigmoid, flattened, ca. 0.5 mm long, puberulent on proximal; anthers positioned just below stigma in tube, oriented transverse to filament, dorsifixed, monothealous. Ovary superior, syncarpous, 2-carpellate, 2-locular, globose or ovoid, ca. 1 mm long, surrounded by an annular nectary disk; placentation axilar, ovules numerous; style terminal, solitary, filiform at base 1.25 mm long, abruptly expanded and laterally compressed, apex claviform or deltoid, 0.75 mm long, caducous; stigma bilabiate. Fruits and seeds unknown.

Distribution and habitat:— *Philcoxia rhizomatosa* is only known from a sand patch inside a *Eucalyptus* farm, in the municipality of Botumirim, State of Minas Gerais. Specimens are distributed at the border of a deep quartzite sand patch with an area of approximately 2000 m². Although it is difficult to isolate a single individual from a population - since they are plants with branched rhizomes - ten individuals were found in the area.

Phenology:— Plants were collected with flowers in December and March. The population was vegetative in October.

Conservation status:— According to the IUCN Red List (IUCN 2011), this species should be characterized as critically endangered (CR, criterion D2 – very small or restricted population) due to few individuals known from only one place. The only population is found at a constantly disturbed sand patch where local people extract sand for housing constructions. Also, the increasing *Eucalyptus* growing area is a threat to this population.

Etymology:— The specific epithet refers to the conspicuous rhizome, a feature not found in the other species of the genus.

Additional specimens examined (paratypes):—BRAZIL. Minas Gerais: Botumirim, Fazenda Sobrado, 16°54'S, 42°53'W, 820m Mar 30 2013, fl., *Scatigna* 374 (UEC!).

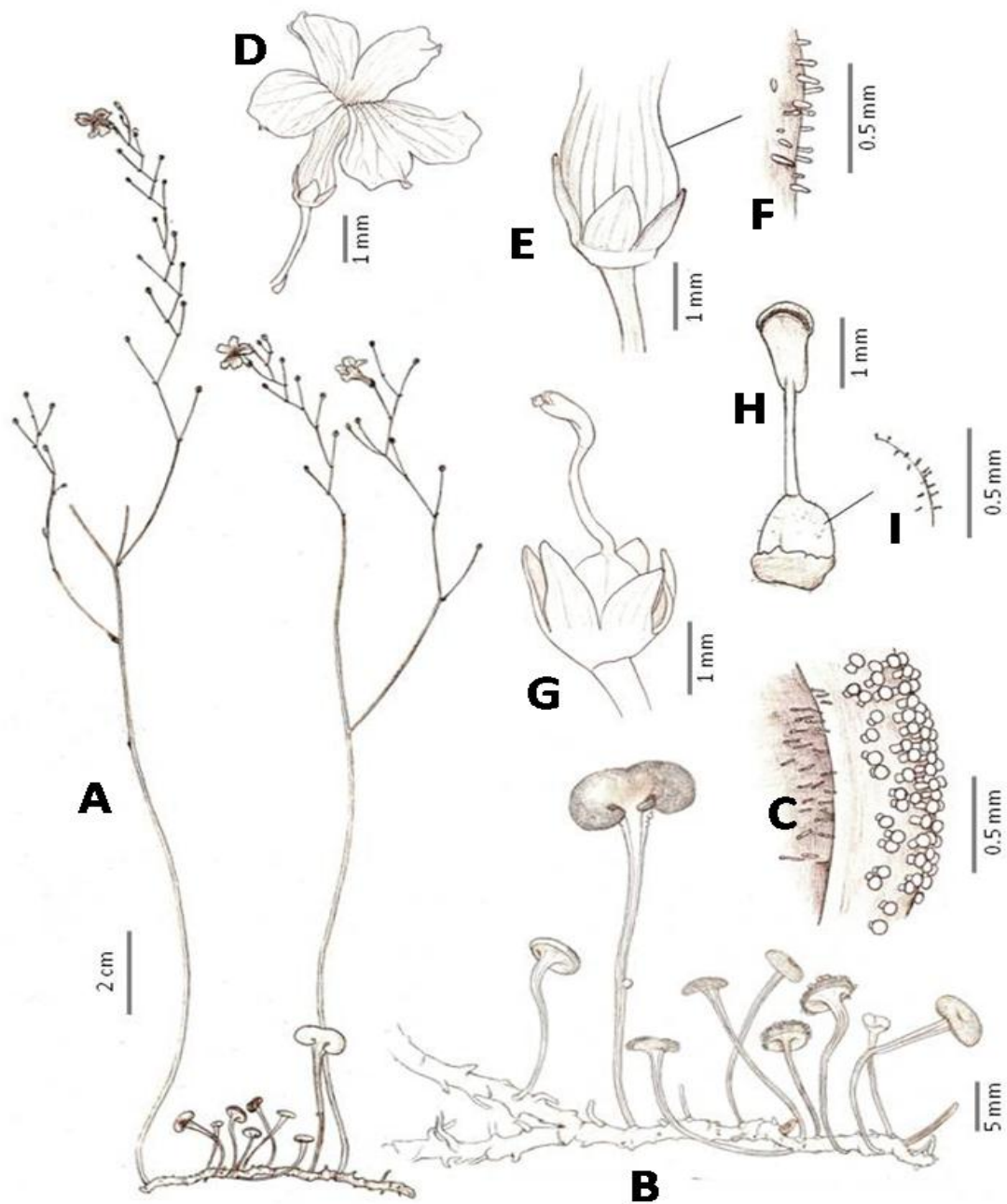


FIGURE 1. *Philcoxia rhizomatosa*. **A.** Habit. **B.** Rhizome and peltate leaves. **C.** Leaf abaxial surface (left) and adaxial surface (right). **D.** Flower. **E.** Lower portion of corolla tube and calyx. **F.** Indument on external lower portion of corolla tube. **G.** Lateral view of gynoecium and calyx. **H.** Gynoecium with clavate stigma. **I.** Indument on external ovary surface. Drawn by Samira Rolim, after *Scatigna 319*.

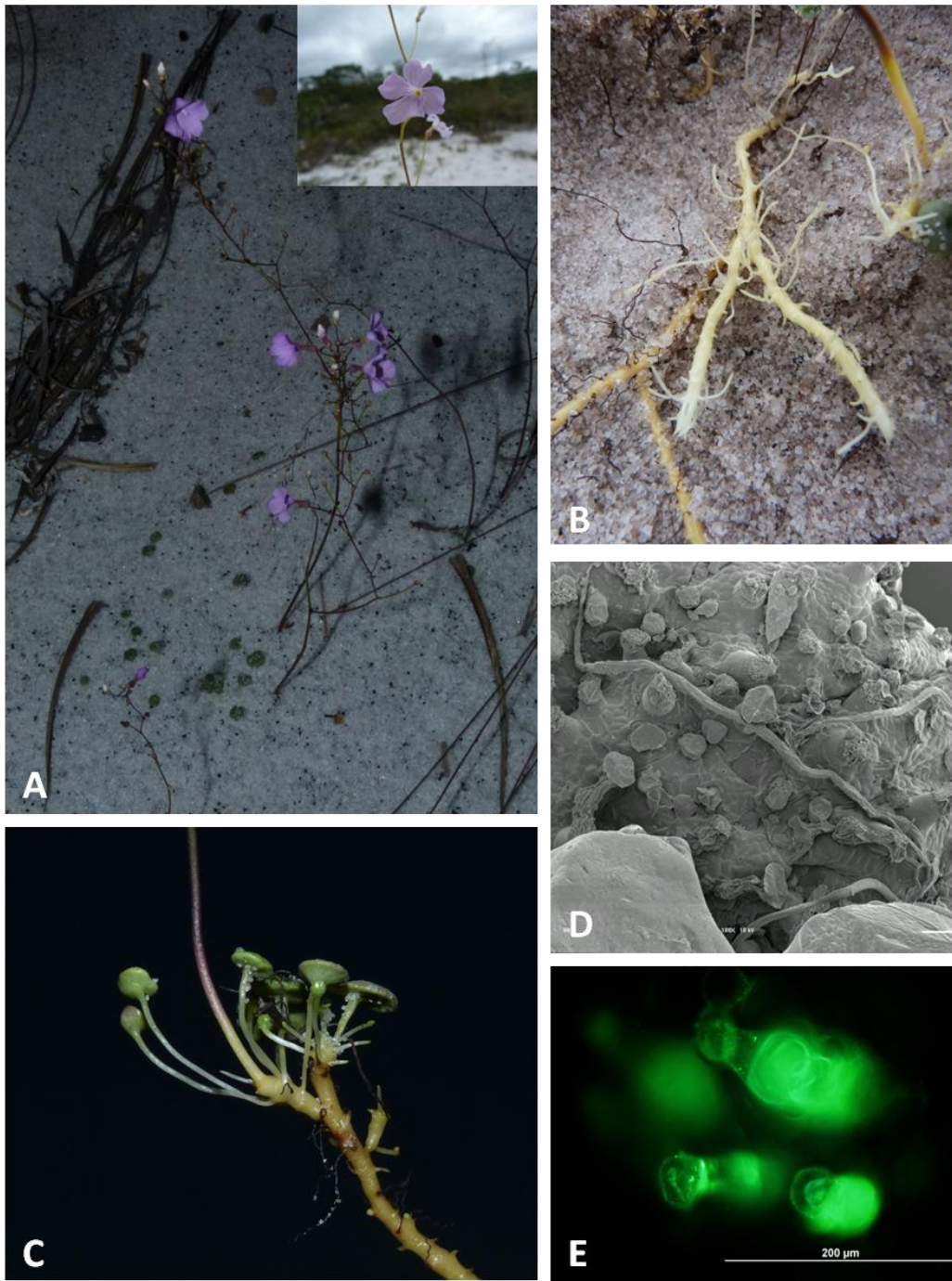


FIGURE 2. *Philcoxia rhizomatosa*. **A.** Habit on natural habitat and flower detail. **B.** Branched rhizome. **C.** Peltate leaves emerging from rhizome. **D.** Scanning Electron Microscopy image of adaxial surface of mature leaf with nematodes in evidence. **E.** Fluorescence microscopy image showing positive phosphatase activity. All photos A.V. Scatigna.

Taxonomic notes:— *Philcoxia rhizomatosa* is easily recognized by the large leaves, bigger than the leaves from other species of the genus, and its conspicuous and thick rhizome. Also, *P. rhizomatosa* is the only species within the genus with entirely glabrous inflorescence, pedicel and calyx (Table 1).

Morphologic notes:— All species comprising the genus *Philcoxia* have a particular morphology, with underground stems, branches and what is considered to be petioles. However, the petioles of *P. minensis*, *P. tuberosa* and *P. rhizomatosa* present vegetative buds and, sometimes, branches, which is consistent with the morphology of a stem. It is actually unclear what the root system, stems and petioles really are, since no anatomic studies have been done so far. Therefore, it is important that new studies aim to these questions and help understanding the underground system of *Philcoxia* species.

Ecology:— Reproduction of *Philcoxia* is unknown, although we have observed that *P. minensis*, *P. tuberosa* and *P. rhizomatosa* propagate vegetatively by rhizomes.

Test for carnivory:— Leaves of *P. rhizomatosa* were kept intact and assayed with ELF97 phosphatase substrate (Invitrogen Molecular Probes) as described in previous studies (Pereira *et al.* 2012; Plachno *et al.* 2006; Plachno *et al.* 2009; Nedoma *et al.* 2003). Mature leaf samples were incubated in a substrate solution of 250 μ M ELF97 phosphatase substrate in milli-Q water at room temperature for 15 minutes. Then, these samples were screened for green fluorescence in an epifluorescence microscope [Optiphot-2 with UV-2A filter (Nikon); excitation, 330-380 nm; dichromatic mirror, DM 400 nm; emission filter, BA 420 nm]. Finally, fluorescence was registered with a Nikon FDX-35 camera. For contra-proof, we applied the same exact method to unstained leaves to check for autofluorescence. For images from SEM, leaves of *P. rhizomatosa* were fixed in FAA and then dehydrated by ethanol series followed by the critical point method in a Balzers CPD 030 drier. The samples were placed on aluminum stubs and then covered with gold in a Bal-Tec SCD 050 sputter coater for 220 seconds. Finally, images were observed and documented in a Scanning Electron Microscope (LEO VP435, 10kV operation). Activity of phosphatase on the leaves of *P. rhizomatosa* was detected, which is coherent with a

digestive function and indicates that prey is most likely digested by the plant itself and not due to some mutualistic relationship, as in the case of several pitcher plants (Adams & Smith, 1977). Also, the presence of several glands that resemble those encountered in the leaves of *P. minensis* (Pereira *et al.* 2012) and the abundance of nematodes over the leaf blades of *P. rhizomatosa* also suggest that this species is carnivorous.

TABLE 1. Main diagnostic characters between *P. rhizomatosa* and the other species of *Philcoxia*.

Character	<i>P.rhizomatosa</i>	<i>P.minensis</i>	<i>P.bahiensis</i>	<i>P.goiasensis</i>	<i>P.tuberosa</i>
Rhizome	Thick, branched	Delicate, unbranched	Absent	Absent	Delicate and tuberous
Upright stem	underground	underground	underground or aerial	underground	underground
Leaf blade diam. (mm)	2.0–7.0	1.5	2.5–3.0	2	1.2–2.5
Inflorescence length (cm)	15–30	17–21	14–25	10–15	6–9
Inflorescence indument	Glabrous	Sparsely glandulous-pubescent	Sparsely glandulous-pubescent	Sparsely glandulous-pubescent	Glabrous to sparsely glandulous-pubescent
Pedicel indument	Glabrous	Sparsely glandulous-pubescent	Glandulous-pubescent	Sparsely glandulous-pubescent	Sparsely glandulous-pubescent
Calix indument	Glabrous	Sparsely glandulous-pubescent	Glandulous-pubescent	Glandulous-pubescent	Sparsely glandulous-pubescent

References

Adams, R.M. & Smith, G.W. (1977) An SEM survey of the carnivorous pitcher plant genera. *American Journal of Botany* 64, 256-272.

Fritsch, P. W., Almeda, F., Martins, A. B., Cruz, B. C. & Estes, D. (2007) Rediscovery and phylogenetic placement of *Philcoxia minensis* (Plantaginaceae), with a test of carnivory. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 58, 447-467.

IUCN (2011) Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 11.0. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee. Available from: <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf> (accessed: 6 June 2014).

Juniper, B.E., Robins, R.J. & Joel, D.M. (1989) *The Carnivorous Plants*. Academic Press, London.

Nedoma, J.S., Strojsová, A., Vrba, J., Komárková, J. & Simek, K. (2003) Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELF97 phosphate: Fluorescence quantification and labelling kinetics. *Environmental Microbiology* 5, 462-472.

Pereira, C. G., Almenara, D. P., Winter, C. E., Fritsch, P. W., Lambers, H. & Oliveira, R. S. (2012) Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1154-1158.

Přachno, B.J., Adamec, L., Lichtscheidl, I. K., Peroutka, M., Adlassnig, W. & Vrba, J. (2006) Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. *Plant Biology* 8, 813-820.

Přachno, B.J., Adamec, L. & Huet, H. (2009) Mineral nutrient uptake from prey and glandular phosphatase activity as a dual test of carnivory in semi-desert plants with glandular leaves suspected of carnivory. *Annals of Botany* 104, 649-654.

Souza, V. C. & Giuliatti, A. M. (2009) Levantamento das espécies de Scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. *Pesquisa Botânica* 60, 7-288.

Taylor, P., Souza, V. C., Giuliatti, A. M. & Harley, R. M. (2000) *Philcoxia*: A new genus of Scrophulariaceae with three new species from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 55, 155-163.

Thiers, B. (2013) Index herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Garden's Virtual Herbarium. Available from: <http://sweetgum.nybg.org/ih/herbarium.php?irn=174420> (accessed 14 December 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos estudos filogenéticos em *Philcoxia* revelaram as primeiras evidências do monofiletismo e das relações interespecíficas do gênero. Também forneceram melhor resolução no posicionamento de *Philcoxia* dentro das Gratioleae. As quatro espécies de *Philcoxia* incluídas nas análises formaram um clado com forte sustentação, o que permite concluir que este é um gênero monofilético. *P. minensis* é mais próxima filogeneticamente de *P. rhizomatosa*, enquanto *P. bahiensis* e *P. tuberosa* são aparentemente mais próximas entre si, sugerindo uma correspondência entre proximidade filogenética e geográfica. *Stemodia stellata* aparece como grupo-irmão de *Philcoxia*. *Philcoxia* e *S. stellata* estão mais proximamente relacionadas com *Tetraulacium* e com os clados formados por representantes de *Gratiola*, parte de *Stemodia* e *Achetaria* e por *Scoparia* e parte de *Stemodia*. A inclusão de taxons inéditos em filogenias melhorou a resolução das relações em Gratioleae.

O desenvolvimento dos marcadores moleculares do tipo microsatélites para *Philcoxia minensis* gerou a descrição e caracterização dos primeiros 17 locos para o gênero, dos quais 12 mostraram-se polimórficos nos indivíduos de *P. minensis* e também amplificaram nas amostras de *P. bahiensis*. A baixa taxa de fixação ($F_{is} = 0,031$) e a alta taxa de cruzamento aparente (94%) obtidas, são apenas dados preliminares que sugerem que a população amostrada não está sofrendo as consequências genéticas esperadas devido ao isolamento e reduzido tamanho da população. Os marcadores aqui descritos e caracterizados são potenciais ferramentas para estudos futuros em genética de populações visando à conservação das espécies desse gênero tão ameaçado.

Foi possível ainda, durante o desenvolvimento desta dissertação, descobrir e descrever uma espécie nova de *Philcoxia*, gênero central neste estudo. Este trabalho mostra o quão pouco conhecido é este grupo. Talvez sua diversidade ainda esteja longe de ser totalmente compreendida, haja vista as duas novas espécies que estão sendo descritas além de três novas populações, possivelmente de novas espécies, descobertas, uma em Minas Gerais, uma em Goiás e outra no Maranhão.

DIREÇÕES FUTURAS

Sistemática

Os resultados apresentados no Capítulo 1 desta dissertação contribuem para um melhor entendimento das relações filogenéticas não só de *Philcoxia*, mas de boa parte de Gratioleae e táxons relacionados. Por outro lado, deixa em aberto novas e importantes questões relacionadas à sistemática do grupo que devem ser ainda estudadas: 1) polifiletismo de *Stemodia*; 2) possível parafiletismo de *Angelonía*; 3) posicionamento incerto de *Anamaria*; e 4) amostragem limitada de representantes de Gratioleae. A filonegia gerada serve ainda de base para estudos de evolução de caracteres que possivelmente estejam relacionados à carnivoría em *Philcoxia*. Assim, poderiam ser feitas inferências sobre a origem deste gênero e sua peculiar morfologia e ecologia.

Genética da conservação

Philcoxia é claramente um dos gêneros botânicos mais ameaçados de extinção no Brasil. Apenas *Philcoxia minensis* ocorre em área protegida, no Parque Estadual da Serra do Cabral. Apesar disso, o areal em que ela ocorre já serviu de campo de futebol para a comunidade local no passado e, atualmente, encontra-se bastante vulnerável, pois está em uma das áreas mais visitadas do Parque. Se isso ocorre dentro de uma área de Proteção Integral, a ameaça é muito maior em áreas não protegidas. Por isso, estudos que sirvam de base para políticas de manejo e conservação dessas áreas são fundamentais para a manutenção de nossa biodiversidade.

Os marcadores moleculares desenvolvidos nesta dissertação serão usados em estudos genéticos com populações de *Philcoxia* voltados para sua conservação. Além destes marcadores, outros marcadores microsatélites estão sendo desenvolvidos com DNA de *Philcoxia bahiensis*. Assim, será possível acrescentar mais locos nas análises e dar mais robustez aos dados obtidos.

Esforço de coleta

Em pouco mais de dois anos de estudos, foi possível relatar a existência de duas espécies novas e de três novas populações, uma delas, a do Maranhão, representando um novo Estado de ocorrência do gênero *Philcoxia* no Brasil. Uma nova população, aparentemente de *P. minensis*, foi encontrada no Parque Estadual do Rio Preto, em uma área já bastante coletada e não muito distante da portaria da Unidade de Conservação.

Fica claro que expedições em busca de novas populações renderiam muitos resultados positivos, além de serem de fundamental importância para os estudos de genética da conservação e também para se ter um melhor entendimento da diversidade desse gênero tão especial e tão ameaçado.