



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**JOÃO PAULO SARDIN NASÁRIO**

**Cariótipos e evolução cromossômica do clado**

**Spermacoce e diversidade genética de *Psyllocarpus laricoides***

**Mart. & Zucc. (Rubiaceae)**

**CAMPINAS**

**2018**

JOÃO PAULO SARDIN NASÁRIO

**Cariótipos e evolução cromossômica do clado  
Spermacoce e diversidade genética de *Psyllocarpus  
laricoides* Mart. & Zucc. (Rubiaceae)**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do Título de Doutor em Biologia Vegetal.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO JOÃO PAULO SARDIN NASÁRIO E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ELIANA  
REGINA FORNI MARTINS.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Regina Forni Martins**

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES; CNPq, 140154/2017-5  
**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4229-8215>

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

N17c Nasário, João Paulo Sardin, 1990-  
Cariótipos e evolução cromossômica do clado Spermacoce e diversidade genética de *Psyllocarpus laricooides* Mart. & Zucc. (Rubiaceae) / João Paulo Sardin Nasário. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Eliana Regina Forni Martins.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Repetições de microssatélites. 2. Estrutura genética. 3. Citogenética. 4. Número cromossômico. 5. Rubiaceae. I. Forni-Martins, Eliana Regina, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Karyotypes and chromosome evolution of the clade Spermacoce and genetic diversity of *Psyllocarpus laricooides* Mart. & Zucc. (Rubiaceae)

**Palavras-chave em inglês:**

Microsatellite repeats  
Genetic structure  
Cytogenetics  
Chromosome numbers  
Rubiaceae

**Área de concentração:** Biologia Vegetal

**Titulação:** Doutor em Biologia Vegetal

**Banca examinadora:**

Eliana Regina Forni Martins [Orientador]  
Ricardo Augusto Lombello  
Ingrid Koch  
Prianda Rios Laborda  
Neiva Izabel Pierozzi

**Data de defesa:** 14-12-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Eliana Regina Forni Martins (orientadora)

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello

Prof.(a) Dr(a). Ingrid Koch

Prof.(a) Dr(a). Prianda Rios Laborda

Prof.(a) Dr(a). Neiva Izabel Pierozzi

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

*Dedico este trabalho à minha amada mãe, Sueli, que sempre acreditou em mim, até mesmo quando eu não mais acreditava, por ser a inspiração e a pedra fundamental em minha vida.*

## **Agradecimentos**

Agradeço à UNICAMP, ao Instituto de Biologia, ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Laboratório de Biossistemática e Polinização, pelo sincero acolhimento e suporte.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade e por fornecer os subsídios necessários para uma ampla formação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001.

Agradeço também ao CNPq também pelo apoio na realização deste trabalho.

Agradeço imensamente à minha querida orientadora, Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins, pela confiança, carinho e paciência durante os últimos sete anos, por compartilhar seu conhecimento, me orientando em cada novo desafio, sendo exemplo de integridade profissional e uma inspiração como pesquisadora.

Agradeço à Profa. Dra. Anete Pereira de Souza pelo acolhimento em seu laboratório, por permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa, sendo de fundamental importância em meu crescimento como pesquisador.

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. André Olmo Simões, Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello e Profa. Dra. Maria Fernanda Calió.

Agradeço aos membros da banca de Análise Prévia, Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello, Profa. Dra. Ingrid Koch e Dra. Prianda Laborda, pelas sábias sugestões.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, que de alguma forma contribuíram em minha formação e elaboração deste estudo.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Taxonomia Vegetal, em especial ao João do Carmo e André Scatigna, por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem com as coletas de material vegetal.

Agradeço, de maneira especial às minhas queridas colegas de trabalho e amigas do grupo de Citogenética, Amanda Mesquita, Raquel Machado, Victoria Romero, Luana Tacuatiá e Thaíssa Engel, por estarem sempre ao meu lado sendo pilares fundamentais em minha formação profissional.

Agradeço ao Laboratório de Análise Genética e Molecular pelo acolhimento, em especial a Fabio Alves por ter me acompanhado desde o início, Thamires Deo, Carla Silva, Fernanda Ancelmo, Patrícia Messias e todos que não mediram esforços para me ajudar a compreender o mundo dos microssatélites.

Agradeço à Alessandro Alves Pereira, pela amizade e apoio nas análises estatísticas.

Agradeço aos técnicos do LAGM, Danilo, Aline, Patrícia, Carlos e Juverlandi, pelo sincero apoio e por compartilharem seu conhecimento sem medir esforços.

Agradeço à Ana Andrade, Cristiane Zanin, Max Tsunada, Raquel Machado e Pedro Alves (*in memoriam*), pessoas que dividiram comigo a morada e a vida, que compartilharam de um lar e se tornaram família. Obrigado pelo carinho, pelo incentivo, por acreditarem em mim, por rir e chorar comigo e por mostrar que família é onde o nosso coração está.

Agradeço a Família Nunes-Pereira, que me acolheu desde que cheguei em Campinas, por serem a família presente de que tanto necessitei, sendo carinho constante e a confiança sempre. Em especial Selma Nunes, por me dar o maior presente da minha vida, meu afilhado Vinícius.

Agradeço aos meus amigos, Abel Garcia, Max Tsunada, André Alvin, Matheus Bofinger e David Almeida por terem sido o carinho e a alegria necessários para esta caminhada.

Agradeço aos amigos de longa data, que sempre se fizeram presentes na minha vida, Carlos Milanezi, Allison Xavier, Antonio Lima, Augusto Souza, Joyce Azambuja, Juliana Ronchi e Paula Antunes, sempre dando forças e mostrando a verdadeira essência da amizade.

Agradeço ao meu companheiro Diego Zanetti, por estar sempre ao meu lado, por compartilhar a vida comigo, por ser meu amigo, amante e parceiro. Por ter enxugado minhas lágrimas nos momentos mais difíceis dessa jornada e por ser a alegria diária da minha existência. Por ser um exemplo de ser humano, honestidade, pelo seu amor e paciência.

Agradeço aos meus pais, Jacinto Nasario e Sueli Gomes S. Nasario, pelo apoio constante durante a caminhada, por acreditarem e confiarem em mim. A minha amada mãe, por ser o suporte de todos os dias, por ser a ligação certa do fim do dia, por nunca me deixar desanimar, por sempre acreditar que eu posso chegar mais longe. E ao meu pai, obrigado pelos abraços apertados, pelo silêncio que sempre tinha muito a dizer, por nunca deixar que eu perdesse a fé ou esquecesse as minhas origens. Agradeço pela educação e integridade que me deram e por cada gota de suor derramada em prol da realização dos meus sonhos.

Agradeço á minha família como um todo, por estarem sempre ao meu lado, sempre demonstrando a importância de uma família, em especial ao meu irmão José Luis Nasário, por ser exemplo de integridade e humildade, às minhas tias Rosinei e Roseli, pelo carinho e força constante e a minha avó Elisa, que em sua simplicidade nunca deixou de me incentivar e apoiar.

Gratidão a todos!

## Resumo

A família Rubiaceae apresenta ampla distribuição mundial, de modo que a grande diversidade se concentra nos trópicos e subtropicais. Os dados cromossômicos associados a estudos de sistemática vegetal são pouco utilizados, diante da grande diversidade vegetal. Os representantes herbáceos da família Rubiaceae (subfamília Rubioideae), estão reunidos em sua maioria na Tribo Spermaceae *sensu stricto* (s.s.). As relações taxonômicas no “Complexo *Psyllocarpus laricoides*” não são claras e apresentam algumas diferenças a nível populacional. A espécie é endêmica dos Campos Rupestres da Serra do Espinhaço. Desse modo, objetivamos fazer o levantamento dos dados cromossômicos disponíveis na literatura para a Tribo Spermaceae, acrescido de 4 contagens inéditas aqui obtidas, além de traçar o panorama e ampliar o conhecimento cromossômico na tribo, além de investigar a evolução cariotípica à luz da sistemática da tribo Spermaceae s.s *sensu* Karehed *et al.* (2008) e sob nova proposta filogenética. A diversidade e estrutura genética do complexo *P. laricoides* também foi investigada a fim de melhor compreender os processos envolvidos na sua diversificação. Cinco espécies do Clado Spermaceae (*Hexasepalum teres*, *Psyllocarpus asparagoides*, *P. laricoides*, *Staelia domingosii* e *S. hatschbachii*) apresentaram número cromossômico  $2n=28$  e *Remija ferruginea* (Spermaceae s.l) apresentou  $2n=22$ . Todas as espécies possuem o cariótipo composto por cromossomos metacêntricos. O clado Spermaceae possui uma grande variabilidade no número cromossômico apresentado na literatura ( $2n=14, 28, 30, 42, 56, 64, 84$ ). A evolução cromossômica da tribo Spermaceae s. l. parece seguir a ordem de  $x = 9, 11$ , enquanto para o clado Spermaceae foi majoritariamente  $x=14$ . As análises de estrutura e de variação genética do Complexo *P. laricoides* sugeriram a formação de dois grupos genéticos. O primeiro grupo G1, geneticamente distinto do G2, correspondendo as regiões oeste e leste. Estes resultados podem servir para ressaltar a capacidade de adaptação dessas plantas ao longo da evolução perante as divergências de fatores abióticos encontrados na cadeia da Serra do Espinhaço.

**Palavras-chave:** Marcadores Microssatélites, estrutura genética, citogenética, número cromossômico, Tribo Spermaceae

## Abstract

The Rubiaceae family has a wide distribution worldwide, so the great diversity is concentrated in the tropics and subtropics. The chromosomal data associated to studies of plant systematics are rarely used, due to the great vegetal diversity. The herbaceous representatives of the family Rubiaceae (subfamily Rubioideae), are reunited in their majority in the Tribe Spermaceae *sensu stricto* (s.s.). The taxonomic relationships in the "*Psyllocarpus laricoides* complex" are not clear and present some differences at the population level. The species is endemic to Campos Rupestres of the Serra do Espinhaço. In this way, we aimed to survey the available chromosomal data in the literature for the Spermaceae tribe, to trace the panorama and increase the chromosomal knowledge in the tribe, in addition to investigate the karyotype evolution in light of the systematics of the Spermaceae s.s *sensu* Karehed tribe. (2008) and under a new phylogenetic proposal, the diversity and genetic structure of the *P. laricoides* complex was also investigated in order to better understand the processes involved in its diversification. Five species of the Spermaceae clade (*Hexasepalum teres*, *Psyllocarpus asparagoides*, *P. laricoides*, *Staelia domingosii* and *S. hatschbachii*) presented chromosome number  $2n = 28$  and *Remija ferruginea* (Spermaceae s.l) presented  $2n = 22$ . All species have the karyotype composed of metacentric chromosomes. The Spermaceae clade has a great variability in the chromosome number ( $2n = 14, 28, 30, 42, 56, 64, 84$ ). The chromosomal evolution of the Spermaceae s. l. tribe seems to follow the order of  $x = 9, 11$ , while for the Spermaceae clade it was mostly  $x = 14$ . Analysis of structure and genetic variation suggested the formation of two genetic groups. The first group, G1, genetically distinct from G2, corresponding to the western and eastern regions. These results may serve to emphasize the adaptive capacity of these plants throughout the evolution due to the divergences of abiotic factors found in the chain of Serra do Espinhaço.

**Keywords:** SSR marks, genetic structure, cytogenetic, chromosome number, Tribe Spermaceae

## Lista de Figuras

### Introdução Geral

- Figura 1:** Filogenia da Ordem Gentianales, disponível em Angiosperm Phylogeny Website (< <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> >) .....21
- Figura 2:** Filogenia da família Rubiaceae, com subfamílias e tribos. Adaptada de Bremer e Ericksson (2009) .....22
- Figura 3:** Representantes herbáceos da Tribo Spermacoceae. ....26
- Figura 4:** Representantes do gênero *Psyllocarpus*.....34

### Capítulo I – Panorama dos estudos citogenéticos na Tribo Spermacoce (Rubiaceae)

- Figura 1:** Ideograma das espécies da tribo Spermacoceae. Grupo externo: *Remija ferruginea*.....60
- Figura 2:** Cromossomos mitóticos, com bandamento CMA/DAPI e flores do Clado Spermacoce, Tribo Spermacoceae, Rubiaceae.....61
- Figura 2:** (Continuação) Cromossomos mitóticos, com bandamento CMA/DAPI e flores do Clado Spermacoce, Tribo Spermacoceae, Rubiaceae.....63
- Figura 3:** Frequência de registros de números cromossômicos (2n) na tribo Spermacoceae s.l.....64
- Figura 4:** A – Frequência de números cromossômicos (2n) na tribo Spermacoceae s. l., com exceção do clado Spermacoce. B – Frequência de números cromossômicos (2n) no clado Spermacoce.....64

### Capítulo II – Tendências na evolução do número cromossômico na Tribo Spermacoceae sensu strictu (Rubiaceae)

- Figura 1:** Evolução do número cromossômico diploide (2n) e o nível de ploidia (x) do clado Spermacoce (Rubiaceae) sensu Karehed et al. (2008) .....92
- Figura 2:** Evolução do número básico do clado Spermacoce (Rubiaceae) sensu Karehed et al. (2008), com probabilidades.....93
- Figura 3:** Árvore de estrito consenso do clado Spermacoce gerada pela análise de Má. Parcimônia (MP) com os valores de bootstrap plotados nos nós (valores >70,0).....95
- Figura 4:** Árvore de consenso do clado Spermacoce de maioria gerada por Inferência Bayesiana (BI) com os valores de nós de probabilidade posterior (PP).....96

**Figura 5:** Evolução do número básico mais parcimonioso para o clado Spermacoce, de acordo com o proposto no presente trabalho pela análise de Inferência Bayesiana, com probabilidades.....98

### **Capítulo III – Diversidade genética e estrutura populacional do Complexo *Psyllocarpus laricoides* (Clado Spermacoce, Rubiaceae) na Serra do Espinhaço**

**Figura 1:** Distribuição do complexo *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. na Serra do Espinhaço (MG e BA) e localidades das populações coletadas.....123

**Figura 2:** Análise do programa Structure realizada para o complexo *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. da Serra do Espinhaço, Brasil.....126

**Figura 3:** Análise discriminante de componentes principais para populações do complexo *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. Com base em 14 marcadores microssatélites.....128

**Figura 4:** Análise de coordenadas principais (PcoA) entre as populações do complexo *P. laricoides* Mart. & Zucc. Com base em 14 marcadores microssatélites.....129

**Figura 5:** Dendrograma *neighbor-joining* construído com base em distâncias genéticas de Nei (1978) entre indivíduos das populações *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc.....130

## Lista de Tabelas

### Capítulo I – Panorama dos estudos citogenéticos na Tribo Spermacoce (Rubiaceae)

<b>Tabela 1:</b> Lista de espécies da Tribo Spermacoce coletadas com identificação, voucher e local de coleta.....	56
<b>Tabela 2:</b> Características cariotípicas de espécies do clado Spermacoce.....	59
<b>Tabela 3:</b> Gêneros de Spermacoce s.s. (Rubiaceae) ou Clado Spermacoce reconhecidos por Sallas <i>et al.</i> (2015) onde se encontram dados cromossômicos.....	65

### Capítulo II – Tendências na evolução do número cromossômico na Tribo Spermacoceae *sensu strictu* (Rubiaceae)

<b>Tabela 1:</b> Matriz de dados cromossômicos utilizada para a reconstrução de caráter ancestral do clado Spermacoce baseado na hipótese filogenética <i>sensu</i> Karehed <i>et al.</i> 2008.....	85
<b>Tabela 2:</b> Espécies da tribo Spermacoceae s.s. amostradas e vouchers do Genbank.....	86
<b>Tabela 3:</b> Matriz de dados cromossômicos utilizada para a reconstrução de caráter ancestral do clado Spermacoce baseado na árvore filogenética proposta pelo presente trabalho.....	90

### Capítulo III – Diversidade genética e estrutura populacional do Complexo *Psyllocarpus laricoides* (Clado Spermacoce, Rubiaceae) na Serra do Espinhaço

<b>Tabela 1:</b> Identificação e características dos pares de <i>primers</i> microssatélites desenvolvidos para <i>Psyllocarpus laricoides</i> . %GC = porcentagem de GC.....	122
<b>Tabela 2:</b> Estimativas de diversidade genética e coeficiente de endogamia com base em 14 locos microssatélites avaliados em <i>Psyllocarpus laricoides</i> da região da Serra do Espinhaço, considerando cada loco, os grupos de indivíduos definidos pelo programa Structure e para o conjunto total dos 93 indivíduos avaliados.....	124
<b>Tabela 3:</b> Transferabilidade de microssatélites desenvolvidos para <i>Psyllocarpus laricoides</i> para outras espécies do gênero <i>Psyllocarpus</i> .....	125

<b>Tabela 4.</b> Estimativas de diversidade genética e coeficiente de endogamia para grupos de indivíduos <i>Psyllocarpus lariooides</i> da região da Serra do Espinhaço definidos pelo programa Structure, com base em 14 locos microssatélites.....	127
<b>Tabela 5:</b> Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de grupos de <i>Psyllocarpus lariooides</i> Mart. & Zucc. definidos pela análise no programa Structure.....	128

## Sumário

1. Introdução Geral.....	18
1.1. A Família Rubiaceae Juss.....	18
1.2.1. A Tribo Spermaceae.....	24
1.2. Estudos de número cromossômico em Rubiaceae.....	27
1.3. Diversidade e estrutura genética.....	30
1.3.1. Local de estudo: Os campos rupestres.....	30
1.3.2. Modelo de estudo: <i>Psyllocarpus laricoides</i> Mart. & Zucc.....	33
1.3.3. Ferramenta de estudo: Marcador Molecular – Microssatélites.....	36
2. Objetivos Gerais.....	39
2.1. Objetivos específicos.....	39
3. Referências Bibliográficas.....	40

### **Capítulo I – Panorama dos estudos citogenéticos na Tribo Spermaceae (Rubiaceae).....**

Resumo.....	51
1. Introdução.....	52
2. Material e Métodos.....	55
2.1. Análises cromossômicas.....	55
2.1.1. Coleta de material vegetal.....	55
2.1.2. Análises citogenéticas.....	56
2.1.3. Análise de morfometria do cariótipo.....	57
2.2. Banco de dados cromossômicos.....	58
2.2.1. Análise de banco de dados de número cromossômico.....	58
3. Resultados.....	58
3.1. Análises cromossômicas.....	58
3.2. Análise de banco de dados de número cromossômico.....	63
4. Discussão.....	66
4.1. Análises cromossômicas.....	66
4.2. Panorama dos estudos cromossômicos.....	69
5. Considerações finais.....	70
6. Referências bibliográficas.....	71

<b>Capítulo II – Tendências na evolução do número cromossômico na Tripo Spermacoceae <i>sensu strictu</i> (Rubiaceae)</b> .....	80
Resumo.....	81
1. Introdução.....	82
2. Material e Métodos.....	84
2.1. Evolução cromossômica baseada na hipótese filogenética <i>sensu</i> Karehed <i>et al.</i> (2008).....	84
2.2. Evolução cromossômica proposta a partir de nova filogenia.....	86
2.3. Banco de dados moleculares.....	86
2.4. Análise de Máxima Parcimônia (MP).....	89
2.5. Inferências Bayesianas (IB).....	89
2.6. Evolução cromossômica proposta a partir de nova filogenia.....	90
3. Resultados.....	91
3.1. Evolução cromossômica baseada na hipótese filogenética <i>sensu</i> Karehed <i>et al.</i> (2008) .....	91
3.2. Sistemática filogenética.....	94
3.3. Evolução cromossômica proposta a partir de nova filogenia.....	94
4. Discussão.....	99
4.1. Evolução cromossômica do clado Spermacoce.....	99
5. Considerações finais.....	104
6. Referências bibliográficas.....	105

<b>Capítulo III – Diversidade genética e estrutura populacional do Complexo <i>Psyllocarpus laricoides</i> (Clado Spermacoce, Rubiaceae) na Serra do Espinhaço</b> .....	114
Resumo.....	115
1. Introdução.....	116
2. Material e Métodos.....	118
2.1. Coleta do material vegetal e extração de DNA.....	118
2.2. Desenvolvimento de marcadores microsatélites.....	118
2.3. Análise de sequências.....	119
2.4. Validação e caracterização dos marcadores microsatélites.....	119
2.5. Análise de diversidade populacional.....	120

3. Resultados.....	121
3.1. Caracterização genética dos locos SSR e transferabilidade.....	121
3.2. Diversidade e estruturação genética.....	126
4. Discussão.....	131
4.1. Caracterização dos locos e transferabilidade.....	131
4.2. Diversidade e estruturação genética.....	133
5. Considerações finais.....	133
6. Conclusões gerais.....	134
7. Referências bibliográficas.....	135
<b>Anexos.....</b>	<b>141</b>
<b>Anexo 1:</b> Números cromossômicos da tribo Spermaceae s.l., Rubiaceae.....	141
<b>Anexo 2:</b> Números cromossômicos do clado Spermaceae ( <i>Spermaceae sensu strictu</i> ), Rubiaceae.....	151
<b>Anexo 3:</b> Declaração de Bioética.....	154
<b>Anexo 4:</b> Declaração de direitos autorais.....	155

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 A família Rubiaceae Juss.

Rubiaceae apresenta mais de 13.000 espécies, distribuídas por cerca de 620 gêneros (Govaerts *et al.*, 2006). Segundo estimativas, Rubiaceae é a quarta família de Angiospermas em número de espécies, depois de Asteraceae, Orchidaceae e Leguminosae (Mabberley, 2008). A família apresenta ampla distribuição mundial, com maior diversidade nos trópicos e subtropicais, porém chegando até as regiões subpolares do Ártico e da Antártica, sendo menos frequente e diversa em regiões temperadas (Davis *et al.* 2009). Algumas de suas espécies apresentam distribuição restrita e considerável nível de endemismo, evidenciando que parte da família se encontra vulnerável frente às mudanças ambientais globais e influência antrópica em escala local (Davis *et al.* 2009).

No Brasil, Rubiaceae é representada por 126 gêneros (16 endêmicos) e cerca de 1.415 espécies (733 endêmicas) (Flora do Brasil, 2016-2020), ocorrendo em todos os estados e domínios fitogeográficos e praticamente em todos os tipos de vegetação do país (Barbosa *et al.*, 2013). Os domínios fitogeográficos nos quais a família é mais diversa são a Floresta Amazônica, com 754 espécies, e a Mata Atlântica, com 584 espécies. As regiões com maior diversidade de representantes são a região Norte, com 1.408 espécies, e a região Sudeste, com 1.152 espécies. Segundo Davis *et al.* (2009), estas regiões ocupam a quarta e sexta posições, respectivamente, entre as regiões mais diversas do mundo para Rubiaceae em números totais de espécies. Estes dados corroboram a importância dessas regiões em termos de diversidade para a

família e demonstram o caráter emergencial da conservação de seus remanescentes vegetais, principalmente na região Sudeste, que segundo estes autores, é a sexta região em número bruto de espécies endêmicas do mundo.

Segundo Robbrecht (1988), os principais agentes polinizadores da família são, borboletas, mariposas, abelhas, moscas ou pássaros, que têm como recompensa o néctar produzido em discos nectaríferos epíginos. Muitos representantes de Rubiaceae produzem frutos comestíveis que são uma importante fonte de alimentação para pássaros tropicais, que junto a pequenos mamíferos, são os principais agentes dispersores de seus frutos carnosos (Bremer & Eriksson, 1992; Robbrecht, 1988).

A abundância, diversidade, a grande variabilidade de hábitos e a presença das Rubiaceae em diversos estratos vegetais são fatores importantes que corroboram a inclusão da família em estudos de cunho ecológico e evolutivo.

A família Rubiaceae apresenta o maior número de espécies e de gêneros heterostílicos dentre todas as famílias nas quais é conhecida a heterostilia, apresentando mais espécies heterostílicas do que todas as outras famílias reunidas (Machado, 2007). No gênero *Palicourea* a heterostilia está presente em praticamente todas as espécies. A heterostilia trata-se de um polimorfismo floral complexo controlado geneticamente, onde as populações são compostas por dois ou três morfos florais que diferem na altura relativa de seus estigmas e anteras e cada morfo floral é produzido em um indivíduo diferente. Barret 1992, Coelho & Barbosa 2003, Machado 2007). A maioria dos trabalhos sobre biologia reprodutiva em Rubiaceae tem sido realizado com espécies heterostílicas (Souza *et al.*, 2007). Este polimorfismo está ligado a um sistema dialélico de auto-incompatibilidade esporofítica, onde somente cruzamentos intermorfos

produzem frutos e sementes viáveis (Barrett & Richards 1990, Coelho & Barbosa 2004).

Rubiaceae foi tradicionalmente incluída em uma ordem própria, Rubiales (Cronquist, 1981). Entretanto, análises filogenéticas posicionam a família na ordem Gentianales, que inclui também Apocynaceae *s.l.* (incl. Asclepiadaceae), Gelsemiaceae, Gentianaceae e Loganiaceae (Struwe *et al.*, 1994; Bremer, 1996; Backlund *et al.*, 2000), com as quais compartilha características morfológicas, como folhas opostas, inteiras, com estípulas (algumas exceções), coléteres e formação de endosperma nuclear (Backlund *et al.*, 2000). O posicionamento de Rubiaceae em Gentianales é adotado nos sistemas APG I, II, III e IV (1998, 2003, 2009 e 2016).

Em Gentianales (Figura 1), Rubiaceae é um grupo monofilético, irmão do clado que reúne as demais famílias (Struwe *et al.*, 1994; Bremer *et al.*, 1995; Bremer, 1996; Backlund *et al.*, 2000). Distingue-se das demais famílias da ordem pela ausência de floema interno, e pela presença de ovário ínfero, obturador e estrias de Caspary (Backlund *et al.*, 2000). Bremer & Eriksson (2009), utilizando filogenias moleculares calibradas com datações de carbono de alguns fósseis, estimaram que Rubiaceae teve sua origem há cerca de 90 milhões de anos, possivelmente no sudeste da Ásia.

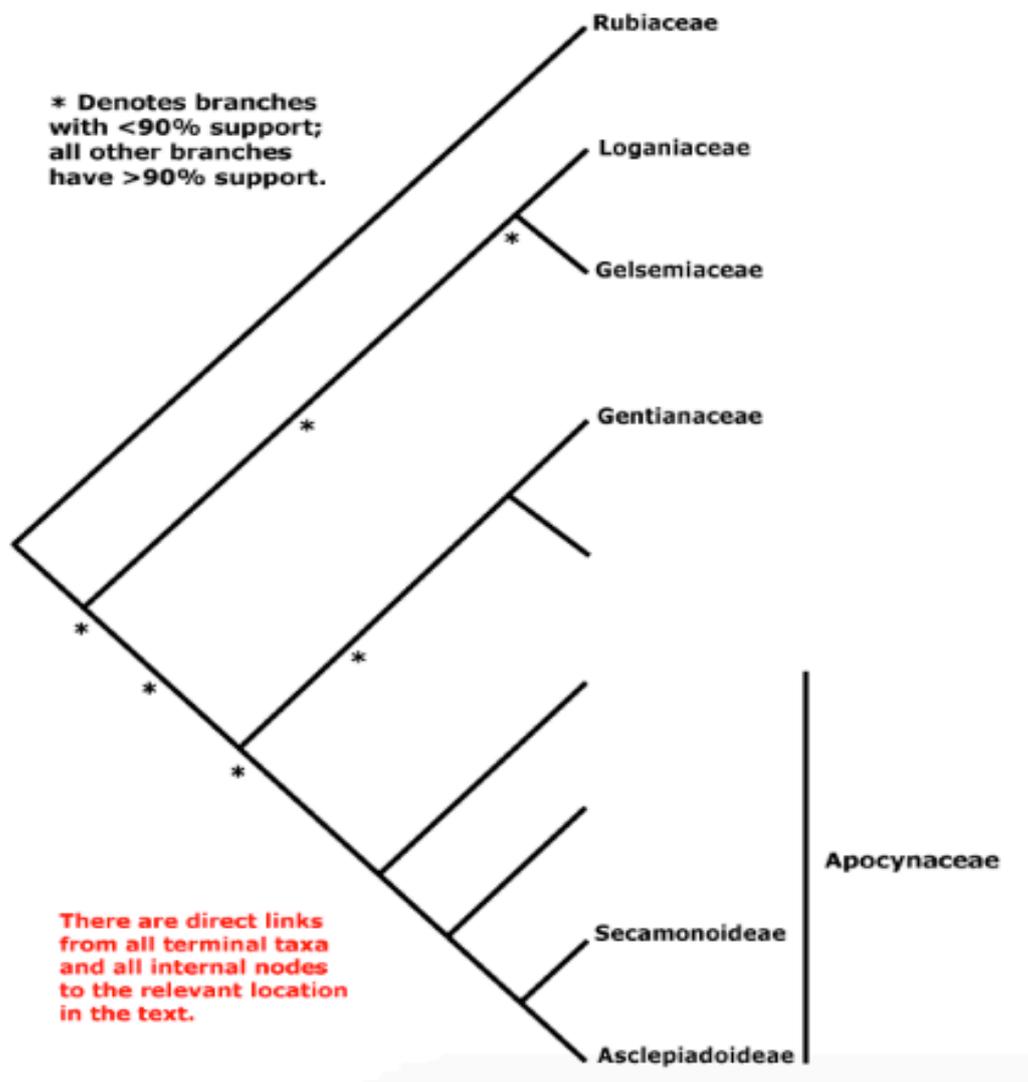
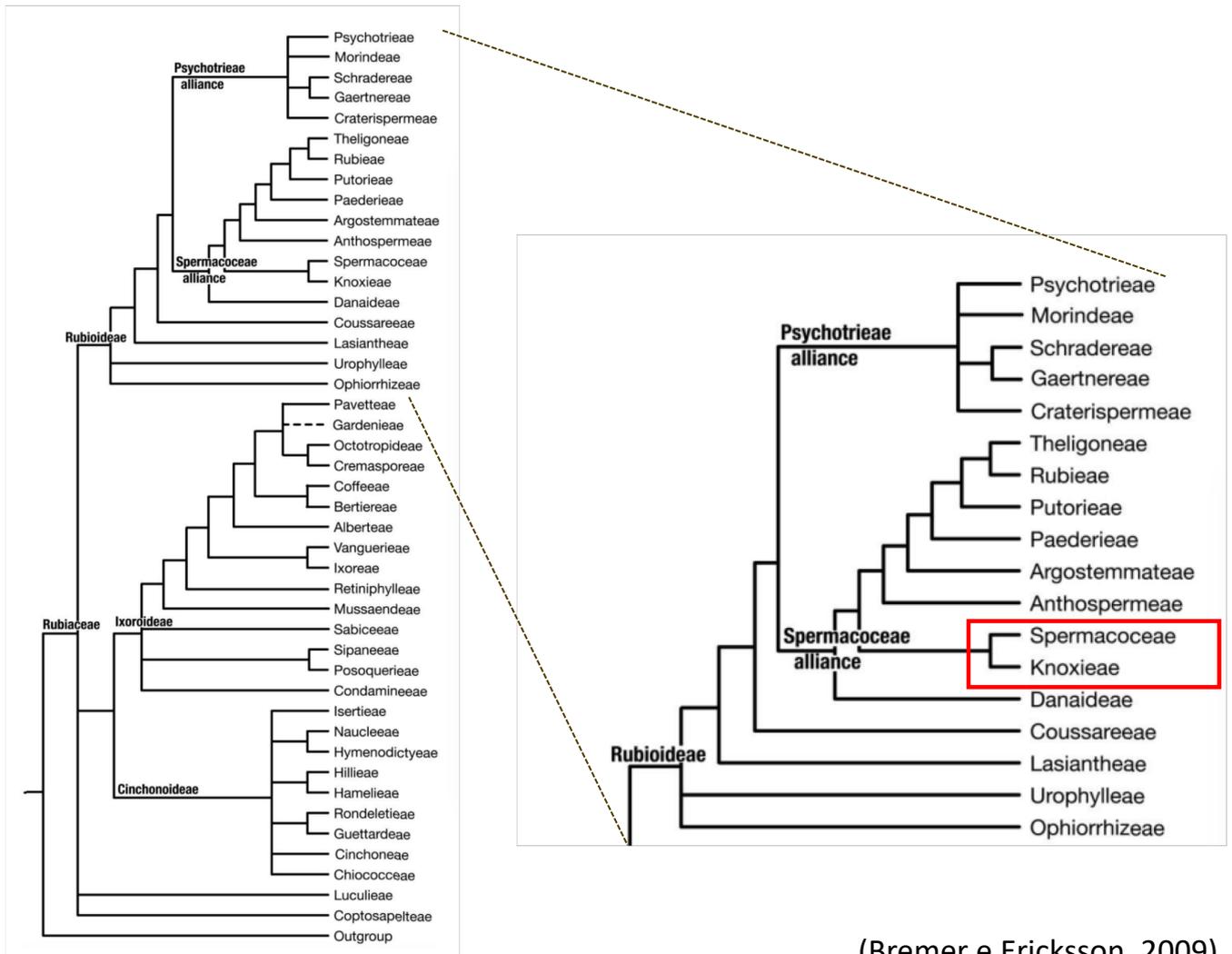


Figura 1: Filogenia da Ordem Gentianales, disponível em Angiosperm Phylogeny Website (< <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> >).



(Bremer e Ericksson, 2009)

Figura 2: Filogenia da família Rubiaceae, com subfamílias e tribos.

Adaptada de Bremer e Ericksson (2009).

A divisão de Rubiaceae em subfamílias (Figura 2) foi objeto de vários estudos (Schumann, 1891; Verdcourt, 1958; Bremekamp, 1966; Robbrecht, 1988; Bremer & Jansen, 1991; Bremer *et al.*, 1995; Bremer, 1996; Robbrecht & Manen, 2006; Bremer & Eriksson, 2009), divergindo de autor para autor. Segundo Robbrecht (1988) o reconhecimento de subfamílias em Rubiaceae é necessário, devido ao fato de que a classificação e evolução de uma família tão diversa só poderão ser entendidas a partir de uma classificação principal aplicável, na qual várias tribos são agrupadas em subfamílias naturais, as quais eventualmente serão priorizadas para pesquisa taxonômica detalhada.

A partir da última década do século XX, iniciaram-se em Rubiaceae estudos filogenéticos baseados em dados moleculares (Delprete, 1999). Bremer (2009) estima que de 1991 a 2005, cerca de 50 reconstruções filogenéticas foram publicadas para a família. De acordo com Delprete & Jardim (2012), estes estudos demonstraram que caracteres utilizados anteriormente para a definição de subfamílias e tribos são facilmente mutáveis, diferentemente do que se pensava. Entretanto, estes autores alegam que tais caracteres não devem ser abandonados, e sim reavaliados, para que sejam de fato compreendidos do ponto de vista evolutivo e taxonômico.

De acordo com os resultados obtidos por Bremer *et al.* (1995) e Bremer (1996), Rubiaceae se subdivide em três grupos, parcialmente correspondentes com as subfamílias Rubioideae, Ixoroideae e Cinchonoideae de Robbrecht (1988). Robbrecht & Manen (2006), baseados em análises de superárvores (“supertree”), propuseram uma classificação em duas subfamílias, Cinchonoideae e Rubioideae, e 40 tribos. Posteriormente, Bremer & Eriksson (2009) produziram uma árvore com alta resolução, e sugeriram a subdivisão da

família novamente em três subfamílias, Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae, e 44 tribos. Delprete & Jardim (2012) observaram que a maioria dos grupos reconhecidos nas análises filogenéticas de Robbrecht & Manen (2006) e Bremer & Eriksson (2009) são similares.

A classificação mais aceita atualmente por pesquisadores da família é a proposta por Bremer & Eriksson (2009), que caracteriza as três subfamílias da seguinte maneira: Cinchonoideae - geralmente são árvores ou arbustos de pequeno porte, com prefloração da corola imbricada ou valvar (contorta para a direita em Hillieae e Hamelieae); Ixoroideae - são árvores ou arbustos, com prefloração da corola geralmente contorta para a esquerda e apresentação secundária de pólen; Rubioideae - são ervas ou arbustos com ráfides, prefloração da corola valvar e indumento formado por tricomas septados.

### **1.1.2 A Tribo Spermaceae**

Os representantes herbáceos da família Rubiaceae, especificamente da subfamília Rubioideae, não têm suas relações sistemáticas estabelecidas de forma clara, não apresentando características morfológicas diagnósticas consistentes para os gêneros, nem para espécies (Robbrecht & Manen 2006; Groeninckx *et al.* 2009). Mesmo as circunscrições em tribos têm sido motivo de discussões entre os especialistas.

Durante os últimos 20 anos, a circunscrição da tribo Spermaceae (Subfamília Rubioideae) (Figura 2) vem sendo consideravelmente modificada. Atualmente são aceitos três conceitos diferentes para o grupo (Salas *et al.* 2015), sendo eles: 1) A definição clássica adotada por Robbrecht, (1988), com base em

caracteres morfológicos, que inclui cerca de 20 gêneros circunscritos por Terrell & Wunderlin (2002) e ainda aceita por alguns autores, 2) Um conceito mais amplo sugerido por Bremer (1996), baseado em caracteres moleculares, que inclui as tribos Knoxieae, Triainolepideae, Hedyotideae e Manettieae, 3) A definição de Anderson & Rova (1999) que reconhece Knoxieae como uma tribo separada, é a mais aceita atualmente, muitas vezes citada como Spermacoceae *sensu lato* (s.l.) (Dessein 2003; Robbrecht & Manen 2006; Groeninckx *et al.* 2009), esta última é aceita também, no presente trabalho.

A tribo Spermacoceae *s.l.* reúne aproximadamente 1235 espécies que são distribuídas em 61 gêneros, de acordo com trabalhos recentes (Robbrecht & Manen 2006, Groeninckx *et al.* 2009 e Salas *et al.* 2015). Embora não existam sinapomorfias morfológicas que suportem a tribo, novos gêneros vêm sendo inseridos no grupo, baseados em uma combinação de dados morfológicos e moleculares (Groeninckx *et al.* 2009 e Salas *et al.* 2015).

Spermacoceae *sensu stricto* (s.s.), reconhecido como clado Spermacoce em estudos filogenéticos, é tradicionalmente delimitado por vários autores (Hooker 1873; Bremekamp 1952, 1966; Verdcourt 1958; Robbrecht 1988, 1993) pela presença de ráfides, estípulas fimbriadas, ovários biloculares com uma semente por lóculo, sementes com uma ranhura adaxial aparente e ocorrência frequente de grãos de pólen pluriaperturados (Groeninckx *et al.* 2009), sendo, geralmente, plantas herbáceas (Salas *et al.* 2015) (Figura 3).

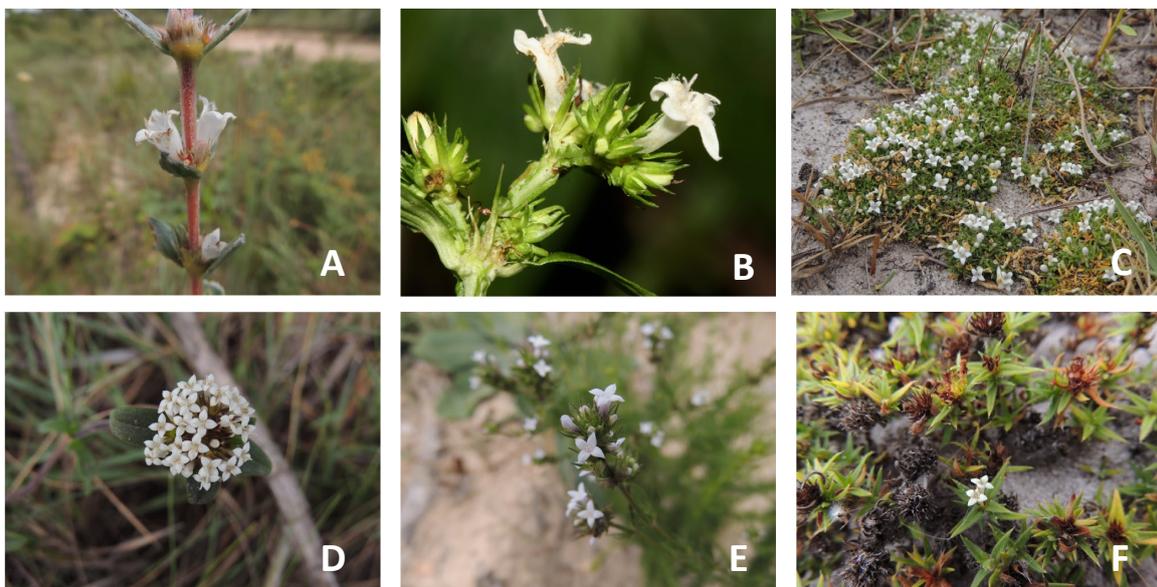


Figura 3: Representantes herbáceos da Tribo Spermacoceae. A – *Diodella*, B – *Galianthe*, C- *Staelia*, D – *Mitracarpus*, E – *Pyllocarpus*, F-*Mitracarpus*. Fotos: João AM Carmo.

O clado Spermacoce (Spermacoceae s.s.) na América é representando por cerca de 23 gêneros, cujas relações ainda são pouco definidas. Alguns desses gêneros estão sendo revisados, como *Diodella* e o complexo *Borreria-Spermacoce*, para os quais as evidências moleculares não têm suportado os limites quando baseados em caracteres morfológicos (Salas *et al.* 2011). Por outro lado, alguns gêneros têm tido suas circunscrições baseados em características morfológicas corroboradas por dados moleculares, como em *Crusea*, *Descantia*, *Ernodea*, *Emmeorhiza*, *Galianthe*, *Mitracarpus*, *Psyllocarpus*, *Richardia* e *Staelia* (Dessein 2003, Karehed *et al.* 2008 e Salas *et al.* 2015). Entretanto, as relações entre as espécies dentro de cada gênero ainda precisam ser melhor analisadas. A tribo ainda apresenta alguns gêneros monoespecíficos, como *Anthospermopsis*, *Carajasia*, *Diacrodon*, *Emmeorhiza*, *Hydrophylax*, *Nodocarpea*, *Micrasepalum*, *Schewndenera*, *Tortuella* e *Tobagoa* (Salas *et al.* 2015).

## 1.2 Estudos de números cromossômicos em Rubiaceae Juss.

A citogenética é uma área da ciência com uma abordagem ampla que estuda todos os aspectos ligados ao cromossomo, desde os estudos moleculares relacionados à sua herança, organização e expressão gênica até os estudos cariomorfológicos relativos à forma e tamanho cromossômico (Guerra 1988, Apples *et al.* 1998). Estudos de citogenética vegetal são de grande relevância quando utilizados para o entendimento do comportamento reprodutivo e da evolução de espécies de plantas nativas (Forni-Martins & Martins 2000, Forni-Martins & Calligaris 2002, Biondo *et al.* 2005, Forni-Martins *et al.* 2007a, b, Dhamer *et al.* 2011), bem como o de espécies de interesse econômico em estudos de melhoramento (Barros & Silva 2010, Almeida & Pedrosa-Harand 2011).

Um dos ramos da citogenética vegetal é a citotaxonomia, que compreende a análise de dados citogenéticos em relação à sistemática e taxonomia do grupo em estudo (Guerra 1988, Stace 1989, Bernardos *et al.* 2004, Moraes *et al.* 2007). O número cromossômico é um dos parâmetros citotaxonômicos mais utilizados na verificação da integridade de uma espécie ou da evolução de um grupo, além de ser de fácil obtenção e um método relativamente barato (Guerra, 1988). Diferenças no número cromossômico podem estar relacionadas à diversificação de espécies e grupos, assim, pode ser um caráter que auxiliar na delimitação de táxons, principalmente se acompanhado de variações morfológicas e ecológicas (Guerra 1988, Stace 1989).

Além do número cromossômico, outras características cariotípicas são estudadas na citotaxonomia como a morfologia cromossômica, que envolve o tamanho, posição do centrômero e a presença de constrições secundárias (Guerra 1988, Stace 1989). Em alguns casos, essas informações não são suficientes para que algumas relações cromossômicas e evolutivas sejam inferidas, sendo necessária a utilização de outras técnicas para a diferenciação longitudinal dos cromossomos, como bandamento cromossômico e hibridização de DNA *in situ*.

Análises cromossômicas em Rubiaceae não são muito frequentes, principalmente quando comparadas ao número de representantes compreendidos pela família. A maioria dos trabalhos envolve o gênero exótico *Coffea*, que possui grande valor comercial. Existem muitos trabalhos que apresentam a caracterização cariotípica de espécies e variedades de *Coffea*, por meio de cromossomos mitóticos (Krug 1934) e meióticos (Pinto-Maglio & Cruz 1988), utilizando coloração convencional, bandamentos tradicionais (Bandamento C, NOR e Orceína Acética) (Pierozzi *et al.* 1999) fluorocromos (Pinto-Maglio *et al.* 2000, Pinto-Maglio 2006), marcadores moleculares e FISH (Fluorescent *In Situ* Hibrydization) (Rania *et al.* 1998, Anthony *et al.* 2001) (Lombello & Pinto-Maglio, 2004, Yuyama *et al.* 2012, Lopes *et al.* 2013).

Um dos trabalhos de grande relevância para Rubiaceae, incluindo espécies nativas da Tribo Spermaceae foi realizado por Kiehn (1995). O pesquisador realizou uma análise cariológica, incluindo número básico, níveis de ploidia de tribos e subtribos de Rubiaceae, segundo classificação de Robbrecht (1988), porém não traçaram um panorama dos número cromossômicos para o

grupo. (Pierozzi & Jung Mendaçolli (1997) conseguiram distinguir espécies de *Genipa* pelo diferente número cromossômico.

Corrêa & Forni-Martins (2004) também realizaram uma caracterização cariotípica de espécies nativas de Rubiaceae, determinando o número cromossômico para quatorze espécies do Cerrado brasileiro, sendo quatro espécies do gênero *Alibertia*, duas de *Psychotria*, duas de *Borreria* e um representante de cada um dos demais gêneros *Amaioua*, *Genipa*, *Tocoyena*, *Coccocypselum*, *Coussarea*, *Palicourea* e *Richardia*, segundo a classificação de Robbrecht (1988).

Neste estudo a subfamília Rubioideae foi representada por três tribos, Psychotrieae, Spermaceae e Coussareeae, esta última incluindo a antiga tribo Coccocypseleae, ainda válida pela classificação da época. Psychotrieae foi representada por dois gêneros, *Palicourea* ( $n=11$ ) e *Psychotria* ( $2n=22$  e  $2n=32$ ). Em Spermaceae os gêneros *Borreria* e *Richardia* apresentaram  $2n=28$  e em Coussareeae, *Coccocypselum* apresentou  $2n=20$  e *Coussarea*  $n=11$ .

Em novo estudo para a família, Kiehn (2010) apresentou contagens cromossômicas para 91 espécies, representando 26 gêneros neotropicais, incluindo a tribo Spermaceae, como *Richardia*, *Manettia* e *Diodia*. Neste estudo, a primeira contagem para a tribo *Perameae* foi realizada, bem como para mais 11 gêneros e 71 espécies, de acordo com a classificação de Robbrecht e Manen (2006). Adicionalmente, Corrêa *et al.* (2010) apresentaram o número cromossômico de dez espécies de *Psychotria* com números cromossômicos variando de  $2n=22$ , 40 e 44 entre os táxons estudados.

## 1.3 Diversidade e estrutura genética

### 1.3.1 Local de estudo: Os campos rupestres

Abrangendo cerca de 90.000 a 100.000 espécies de plantas com sementes, os Neotrópicos possuem ca. de 37% das plantas do planeta, podendo representar mais do que toda a diversidade dos Paleotrópicos juntos (Ásia, África e Oceania (Antonelli & Sanmartín, 2011)). A topografia e os habitats observados na região neotropical nos mostram grande heterogeneidade fisiogeográfica, incluindo uma grande variedade de biomas tropicais, tais como: florestas ombrófilas, florestas sazonalmente secas, savanas, desertos e campos de altitude (Hughes *et al.*, 2013).

Vários fatores estão relacionados à diversificação das plantas nestes locais, como os bióticos que podem estar ligados a adaptações ao solo, capacidade de dispersão de sementes, dispersores, interações com polinizadores, herbivorismo, entre outros. Os mecanismos abióticos, como soerguimento de montanhas, mudanças hidrológicas, temperatura, clima e chuvas também são fatores influenciadores dessa diversificação (Antonelli & Sanmartín, 2011).

Basear-se em uma hipótese única e específica para esclarecer a diversidade encontrada nessa região, pode estar negligenciando diferenças críticas sobre como os eventos de diversificação ocorreram sob diferentes condições ambientais em estratos vegetacionais variados. Portanto, uma abordagem mais aprofundada deve levar em consideração as particularidades de cada bioma, para que possamos compreender melhor os padrões evolutivos de cada ambiente (Hughes *et al.*, 2013).

Os Campos rupestres são importantes centros de diversidade, especialmente quando relacionados a espécies arbustivas, como é o caso da tribo Spermaceae. Isto ocorre devido a sua fitogeografia que abrange campos rochosos e montanhosos, com vegetação transicional de cerrado. Também é um importante refúgio para espécies arbustivas nativas e endêmicas (Hughes *et al.*, 2013).

Tradicionalmente incluídos no cerrado *s. l.* por suas similaridades, os campos rupestres também se baseiam em regimes de fogo e vegetação aberta e se distribuem analogamente ao cerrado (Simon *et al.*, 2009, Antonelli & Sanmartín, 2011), tendo suas diferenças históricas e florísticas muitas vezes confundidas (Ribeiro *et al.*, 2014). As linhagens de Cerrado e Campos Rupestres parecem estar filogeneticamente relacionadas, embora não existam tantas evidências que comprovem o intercâmbio entre essas duas vegetações (Hughes *et al.*, 2013).

Silveira *et al.* (2015) definiram campo rupestre *s.l.* como uma formação de vegetação montana, geralmente ocorrendo a partir de 900 m, gramíneo-arbustiva, propensa a regimes de fogo, associada à afloramentos rochosos de quartzito, arenito ou canga e entremeados de campos arenosos, pedregosos ou alagados. Possuem fragmentos de vegetação transicional de cerrado, florestas de galeria e florestas montanas, encontrando-se em áreas de maior altitude da Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia.

Sugere-se que os campos rupestres tenham sido utilizados como refúgio para muitas espécies durante as oscilações climáticas no Pleistoceno. Possivelmente sucessivas expansões e contrações desse ecossistema tenham ocorrido, gerando a principal hipótese de origem da diversidade vegetal nesse

ecossistema (Alvez & Kolbek, 1994; Rapini *et al.*, 2008). Durante períodos interglaciais mais quentes e úmidos, os campos rupestres teriam se tornado fragmentados e isolados, favorecendo divergência entre populações vicariantes; por outro lado, em períodos glaciais mais frios e secos, as florestas teriam se retraído, ocasionando a expansão dos campos rupestres. Os limites de sua distribuição geográfica são estabelecidos principalmente por fatores relativos ao solo (Rapini *et al.*, 2008). Entretanto, filogenias datadas têm sugerido que os campos rupestres representam os chamados “museus” de linhagens antigas, o que está ligado ao seu contexto de estabilidade climática e diversificação de linhagens endêmicas (Silveira *et al.*, 2015).

Algumas hipóteses de diversificação têm sido propostas na literatura, para o bioma. Por exemplo, a diversificação de *Hoffmannseggella* (Orchidaceae) parece ter ocorrido devido à expansão dos campos rupestres em paralelo ao resfriamento global, após o ótimo climático do Mioceno (ca. 15 MA), onde eventos de especiação ocorreram por hibridação entre populações isoladas (Antonelli *et al.*, 2010). Já em *Minaria* (Apocynaceae), é sugerida a retração da distribuição do gênero, também durante o resfriamento global, e a diversificação seria resultado de seu isolamento geográfico, devido a diminuição dos campos rupestres (Ribeiro *et al.*, 2014).

### 1.3.2 Modelo de estudo: *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. (Spermacoaceae, Rubiaceae)

Formado geralmente por plantas herbáceas, com a presença de ráfides, estípulas fimbriadas, lóculos do ovário contendo apenas um óvulo e grãos de pólen pluriaperturados (Salas *et al.*, 2015), o clado Spermacoce, na tribo Spermacoceae, subfamília Rubioideae, é normalmente encontrado na região Neotropical. Algumas circunscrições genéricas baseadas em morfologia são refutadas por dados moleculares, como por exemplo o complexo *Spermacoce* L. e *Borreria* (Delprete & Jardim, 2012; Miguel & Cabral, 2013). Por outro lado, alguns gêneros são sustentados tanto morfologicamente quando molecularmente, embora seu uso em estudos filogenéticos seja limitado, como por exemplo os gêneros *Psyllocarpus* Mart. ex Zucc. e *Staelia* Cham. & Schldtl., entre outros.

*Psyllocarpus* é um gênero endêmico do Brasil (Figura 4), composto por duas seções: 1) *Psyllocarpus* seção Amazonica, com três espécies (*P. camponorum* (Krause) J.H.Kirkbr., *P. cruruensis* J.H.Kirkbr. e *P. psyllocarpoides* (Sucre) J.H.Kirkbr., que são endêmicas das campinas amazônicas, dos estados de Rondônia, Amazonas e Pará, geralmente reconhecidas pelas folhas planas, flores heterostílicas, grãos de pólen oblato-esferoidais, exina perfurada e finamente espinulosa e estigmas profundamente bilobados, e 2) *Psyllocarpus* seção *Psyllocarpus* que compreende cinco espécies endêmicas dos campos rupestres e cerrado, ocorrendo na região da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e Bahia (*P. asparagoides* Mart. ex Mart. & Zucc, *P. laricoides* Mart. ex Mart & Zucc. e *P. Schwackei* K.Schum.), e no sistema de chapadas do planalto central de Goiás e Distrito Federal (*P. goiasensis* J.H.Kirkbr e *P. phylocephalus*

K.Schum.). Caracterizada por folhas cilíndricas, flores homostílicas, grãos de pólen prolatoesferoidais, exina não perfurada e espinulosa ao longo de cada colpo e estigma curtamente bilobado a capitado. Algumas espécies não foram classificadas em nenhuma sessão por seus autores, sendo elas: (*P. intermedius* E.L.Cabral & Bacigalupo, e *P. densifolius* Zappi & Calió) encontradas na Chapada Diamantina, Bahia e Serra do Cipó em Minas Gerais (Zappi *et al.* 2014.

Por fim, Carmo e colaboradores (2018) descreveram mais duas espécies para o gênero, *P. bahiensis* Carmo, Sobrado & Salas e *P. scatignae* Carmo, Sobrado & Salas.



Figura 4: Representantes do gênero *Psyllocarpus*. A: *P. bahiensis*; B: *P. schawackei*; C: *P. laricoides*; D: *P. phyllocephalus*; E: *P. scatignae*; F: *P. asparagoides*. Fotos: João AM Carmo.

A dificuldade na identificação de indivíduos do gênero, especialmente quando ligados ao “Complexo *Psyllocarpus laricoides*”, que apresentam variações morfológicas, em suas ramificações, inflorescências, algumas características florais e até em suas sementes, como o já relatado por Carmo e seus colaboradores (2018), tem instigado estudos mais aprofundados, incluindo a revisão do gênero. Além do considerável nível de endemismo do gênero e sua distribuição restrita aos campos rupestres brasileiros, a espécie *Psyllocarpus laricoides* foi escolhida como modelo para o presente estudo.

### 1.3.3 Ferramenta de estudo: Marcador Molecular - Microssatélites

Os marcadores moleculares são definidos como um fragmento de DNA que revelam mutações / variações, que podem ser usados para detectar polimorfismo entre diferentes genótipos ou alelos de um gene para uma seqüência particular de DNA em uma população ou pool genético. Estes fragmentos estão associados a uma certa localização no genoma e pode ser detectada por meio de técnica molecular. De modo geral, o marcador molecular é uma pequena região da seqüência de DNA que apresenta polimorfismo (deleção, inserção e substituição de bases) entre diferentes indivíduos (Jiang, 2013).

A fim de se conhecer a diversidade genética, os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em muitas espécies de plantas. Os microssatélites são um dos marcadores mais utilizados nessas análises, bem como em estudos ecológicos e genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1996), para a detecção de polimorfismos entre seqüências de DNA (Buso *et al.*, 2003), além de ser empregados em populações naturais e cultivadas (Zucchi *et al.*, 2003).

Também conhecidos como *Simple Sequence Repeat* (SSR) (Kumar *et al.*, 2009), os marcadores microssatélites foram descritos como sendo seqüências curtas de DNA, que podem variar de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem (Litt e Luty *et al.*, 1989; Tautz, 1989; Weber *et al.*, 1989). Classificam-se pelo motivo repetido, sendo mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (Powell *et al.* 1996). Podem também ser descritos pelo tipo de seqüência repetitiva, como perfeitos, imperfeitos ou compostos (Weber, 1990). Os motivos que se repetem de forma contínua são chamados de microssatélites perfeitos, ou seja, sem a interrupção de outro motivo ou outra seqüência. Por sua vez, os microssatélites

compostos são aqueles que apresentam repetição de mais de um tipo de motivo. Os microssatélites imperfeitos são aqueles que apresentam outras sequências além das que se repetem em tandem.

Os microssatélites são amplamente distribuídos pelo genoma de grande parte dos eucariotos, em regiões codificadoras e não codificadoras (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Zane *et al.*, 2002). Esses locos possuem altas taxas de mutação quando comparados com o resto do genoma, ocorrendo provavelmente durante o processo de recombinação gênica, crossing-over desigual e o “deslizamento” da DNA polimerase durante a replicação do DNA (Oliveira *et al.* 2006). Estima-se que em média uma repetição com mais de 20 pares de bases ocorre a cada 33 Kb no genoma de plantas, e que as repetições mais frequentes são do tipo (AT) e (AG) (Powell *et al.*, 1996).

Os microssatélites apresentam conteúdo informativo, herança mendeliana, são codominantes, permitindo a discriminação entre homocigotos e heterocigotos, sendo amplamente utilizados em estudos genéticos. Uma das características mais importantes deste marcador é o alto poder discriminatório, constituindo o principal motivo de sua utilização em estudos de genética de populações (Oliveira *et al.* 2006). Além de possuírem um alto grau de polimorfismo e poderem ser analisados por reação da cadeia polimerase (PCR), o que dá mais praticidade ao estudo (Hoshino *et al.*, 2002), podem ser utilizados mesmo quando há pequenas quantidades de DNA (Buso *et al.*, 2003).

Os *primers* ou iniciadores são sequências de cerca de 16 a 25 nucleotídeos e se dão em pares com sequência complementar às regiões que flanqueiam os microssatélites e a detecção do polimorfismo se dá através do emprego dos mesmos em PCR. A grande aplicação desses marcadores em

estudos de espécies vegetais enfatiza as vantagens da utilização desse tipo de marcador em plantas. O acesso aos níveis de variabilidade genética no germoplasma e em populações naturais de uma espécie é muito importante, já que torna possível o acompanhamento da manutenção desta variabilidade durante a multiplicação dos acessos e estratégias de conservação (Pereira, 2009). A codominância e os altos níveis de polimorfismo os tornam também ideais para a análise de sistemas de cruzamento. A determinação do sistema de cruzamento permite o estabelecimento de estratégias para a melhor conservação de uma espécie (Hoshino *et al.*, 2002).

O isolamento de *locus* de microssatélites tem sido comumente realizado através de biblioteca genômicas enriquecidas, utilizando sondas contendo sequências repetitivas que se ligam por hibridização nas repetições de interesse de um determinado organismo (Rassmann *et al.* 1991). O método de biblioteca genômica enriquecida é o mais utilizado para isolamento de microssatélites em espécies vegetais (Zane *et al.* 2002). Não são encontradas bibliotecas de microssatélites em espécies do Clado Spermatoce, tornando nosso trabalho pioneiro para o grupo.

## 2. Objetivos Gerais

Considerando que: 1) dados sobre número cromossômico em Rubiaceae são dispersos entre os grupos e que isso tem dificultado a elaboração de inferências evolutivas para a família ou suas tribos; 2) há uma recorrente dificuldade na circunscrição de espécies da tribo Spermacoaceae, especialmente para o gênero *Psyllocarpus*, o que tem dificultado a identificação de novos táxons. 3) há um complexo de espécies de *Psyllocarpus*, restrito aos campos rupestres, e a presença de variações morfológicas entre as populações de *P. laricoides*, que constitui modelo adequado para estudo.

Desse modo, este estudo objetivou: a) investigar a evolução cariotípica à luz da sistemática da tribo Spermacoaceae, especialmente o clado Spermacoaceae (*sensu* Karehed *et al.* 2008), a fim de melhor compreender os processos envolvidos na sua diversificação e estabelecer um panorama mais claro sobre suas relações evolutivas e taxonômicas; b) avaliar a diversidade e estrutura genética entre as espécies e populações integrantes do “Complexo *P. laricoides*”.

### 2.1 Objetivos específicos

- Apresentar caracteres cromossômicos (número, cariótipo, bandamento) de espécies nativas da tribo Spermacoaceae neotropicais;
- Analisar o panorama dos dados citogenéticos em plataforma de dados para a tribo Spermacoaceae (número, frequência);
- Utilizar os dados cromossômicos obtidos no presente trabalho e os levantados na literatura para a reconstrução de caracteres ancestrais da tribo.
- Elaborar uma biblioteca de microssatélites (SSR) para o gênero *Psyllocarpus*.
- Verificar a diversidade genética entre as populações do complexo *P. laricoides*.

### 3. Referências

Almeida C, Pedrosa-Harand A. (2011). Contrasting rDNA evolution in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenet Genome Research*. 132: 212-217.

Alves R.J. V & Kolbek J. (1994). Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio*, 113, 125–139.

Anthony, F. Bertrand, B. Quiros, O, Lashermes, P., Berthaud, J, & Charrier, A. (2001). Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.

Antonelli A. & Sanmartín I. (2011). Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60, 403–414.

Antonelli A.E., Verola C.F., Parisod C.N., & Gustafsson a. L.S. 2(010). Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 100, 597–607.

APG – Angiosperm Phylogeny Group. (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531-553.

APG – Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnaean Society* 141: 399-436.

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

APG – Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.

Apples R, Morris R, Gill BS, May CE (1998). *Chromosome Biology*. Kluwer Academic Publishers, Boston. 401 pp.

Backlund, M.; Oxelman, B. & Bremer, B. (2000). Phylogenetic relationships within the Gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. *American Journal of Botany* 87: 1029-1043.

Barbosa, M. R.; Zappi, D.; Taylor, C.; Cabral, E.; Jardim, J. G.; Pereira, M. S.; Caliό, M. F.; Pessoa, M. C. R.; Salas, R.; Souza, E. B.; Di Maio, F. R.; Macias, L; Anunciaçāo, E. A. Da; Germano Filho, P. & Oliveira, J. A. (2013). Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000210>). Acesso em 14 Jan 2013.

Barret, S. C. H. (1992). Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: S.C.H. Barret (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. Berlin, 1-24.

Barrett, S.C.H. & Richards, J.H. (1990). Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of New York Botanical Garden* 55: 35-61.

Barros e Silva AE, Marques A, Santos KGB, Guerra M. (2010). The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Research*. 18: 503-514.

Bernardos S, Tyteca D, Amich F. (2004). Cytotaxonomic study of some taxa of the subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) from the Iberian Peninsula. *Israel Journal of Plant Science*. 52: 161-170.

Biondo E, Miotto STS, Schifino-Wittmann MT, Castro B. (2005). Cytogenetics and Cytotaxonomy of Brazilian Species of *Senna* Mill. (Cassieae - Caesalpinioideae - Leguminosae). *Caryologia* 58 (2): 152-163.

Bremekamp, C. E. B. (1966). Remarks on the position, the delimitation, and the subdivision of the Rubiaceae. *Acta Botanica Neerland* 15: 1-33. 35.

Bremer, B. & Eriksson, O. (1992). Evolution of fruit characters and dispersal modes in the tropical family Rubiaceae. *Biological Journal of the Linnean Society* 47: 79-95.

Bremer, B. & Eriksson, O. (2009). Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamily, and tribes. *International Journal of Plant Science* 170: 766-793.

Bremer, B. & Jansen, R.K. (1991). Comparative restriction site mapping of de chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within the Rubiaceae. *American Journal of Botany* 78: 198-213.

Bremer, B. (1996). Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. *Opera Botanica Belgica* 7: 33-50.

Bremer, B. (2009). A Review of Molecular Phylogenetic Studies of Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96(1): 4-26.

Bremer, B.; Andreasen, K. & Olsson, D. (1995). Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on *rbcl* sequence data. *Annals Missouri Botanical Garden* 82: 383-397.

Buso, G.S.C.; Clampi, A.Y.; Moretzsohn, M.C.; Souza, Z.P. (2003). Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites, Circular técnica 20, Embrapa Cenargen, Brasília DF, 11p.

Cabral E.L. & Bacigalupo N.M. (1997). Nuevas especies de la tribu Spermaceae (Rubiaceae) para la flora de Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 11, 45-54.

Coelho, C. P., & Barbosa, A. A. A. (2003). Biologia reprodutiva de *Palicourea macrobotrys* Ruiz & Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(3), 403-413.

Coelho, C. P., & Barbosa, A. A. A. (2004). Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta Botanica Brasilica*, 18(3), 481-489.

Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York. 1262p.

Dahmer N, Simon MF, Schifino-Wittmann MT, Hughes CE, Miotto STS, Giuliani JC (2011). Chromosome numbers in the genus *Mimosa* L.: cytotaxonomic and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*. 291: 211-220.

Davis, A. P.; Govaerts, R.; Bridson, D. M.; Ruhsam, M.; Moat, J.; Brummitt, N. A. (2009). A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96(1): 68-78. 38

Delprete P.G. & Jardim J.G. (2012). Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia*, 63, 101–128.

Delprete, P. G. (1999). *Rondeletieae* (Rubiaceae). Part I. *Flora Neotropica Monographs* 77: 1-226.

Delprete, P.G.; Jardim, J. G. (2012). Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia* 63(1): 101-128.

Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews – Genetics*, v. 5, p. 435-445.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p.

Flora do Brasil (2016. 2020) em construção. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em, 26/10/2018.

Forni-Martins ER, Calligaris KP, (2002). Chromosomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismataceae). *Aquatic Botanic* 74: 33-41.

Forni-Martins ER, Mansanares ME, Semir J., (2007b). Cytotaxonomy of *Lychnophoriopsis* Schultz-Bip. and *Paralychnophora* MacLeish species (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorianaes). *Botanic Journal of Linnean Society* 154: 109-114.

Forni-Martins ER, Martins FR., (2000). Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetic Molecular Biology* 23 (4): 947-955.

Forni-Martins ER, Oliveira VM, Semir J. (2007<sup>a</sup>). Cytotaxonomy of species of *Vernonia* (subsection Axilliflorae, section Lepidaploa, Vernonieae, Asteraceae). *Botanic Journal of Linnean Society* 154: 99-108.

Govaerts, R.; Andersson, L.; Robbrecht, E.; Bridson, D.; Davis, A.; Schanzer, I.; Sonke, B. (2006). World Checklist of Rubiaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.kew.org/wcsp/rubiaceae/>.

Guerra M. (1988). Introdução à citogenética Geral. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 142pp.

Hoshino, A. A.; Palmieri, D. A.; Bravo, J. P.; Pereira, T. E. B.; Lopes, C. R.; Gimenes, M. A. (2002). Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 29<sup>a</sup> ed., p. 146-150.

Hughes C.E., Pennington R.T., & Antonelli A. (2013). Neotropical Plant Evolution : Assembling the Big Picture. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 1–18.

Krug, C. A. (1934). Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. *Bol. Téc. do Instituto Agronômico de Campinas* 11 : 1-8.

Jiang, G. L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In *Plant breeding from laboratories to fields*. InTech.

Kumar, P.; Gupta, V.K.; Misra, A.K.; Modi, D.R.; Pandey, B.K. (2009). Molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2, 141–162.

Lombello, R. A., & Pinto-Maglio, C. A. (2004). Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* L. chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI II: *C. canephora* cv. Apoaã, *C. salvatrix* and *C. sessiliflora*. *Caryologia*, 57(2), 138-143.

Lopes, F. R., Jjingo, D., Da Silva, C. R., Andrade, A. C., Marraccini, P., Teixeira, J. B. & Wang, L. (2013). Transcriptional activity, chromosomal distribution and expression effects of transposable elements in *Coffea* genomes. *PLoS One*, 8(11), e78931.

Litt, M.; Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Amr J Hum Genet* 44: 397–401.

Mabberley, D.J. (2008). *Mabberley's plant book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. Cambridge University Press, Cambridge. 1019p.

Machado, O. A. (2007). Variações florais e heterostilia em *Palicourea rigida* (Rubiaceae) nos cerrados do Brasil central. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Miguel L.M. & Cabral E.L. (2013). *Borreria krapocarmeniana*, a New Cryptic Species Recovered Through Taxonomic Analyses of *Borreria scabiosoides* and *Borreria linoides* (Spermacoceae, Rubiaceae). *Systematic Botany*, 38, 769–781.

Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M. (2007). Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research* 15: 115-121.

Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 294-307.

Pierozzi, N. I., & Jung Mendacoli, S. L. (1997). Karyotype and C-band analysis in two species of *Genipa* L. (Rubiaceae, Gardenieae Tribe). *Cytologia*, 62(1), 81-90.

Pinto-Maglio, C. A. F. (2006). Cytogenetics of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 37-44.

Pinto-Maglio, C. A. F. & Cruz, N. D. da (1988). Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. *Complement Caryologia* 51: 19-35.

Pinto-Maglio, C. A. F., Cuiséllar, T. & Barbosa, R. L. (2000). Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. In I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Resumos expandidos. Poços de Caldas – MG 1: 444-446.

Powell, W., Macharay, G.C., Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, v.7, p.215-222.

Raina, S. N., Mukai, Y., & Yamamoto, M. (1998). *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 97(8), 1204-1209.

Rapini A., Ribeiro P.L., Lambert S., & Pirani J.R. (2008). A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4, 16–24.

Rassmann, K.; Schlötterer, C.; Tautz, D. (1991). Isolation of simple sequence *loci* for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12, 113-118.

Ribeiro P.L.P., Rapini A., Damascena L.S.L., & van den Berg C. (2014). Plant diversification in the Espinhaço Range: Insights from the biogeography of *Minaria* (Apocynaceae). *Taxon*, 63, 1253–1264.

Robbrecht, E. & Manen, J.F. (2006). The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. *Syst. Geogr. Pl.* 76: 85–146.

Robbrecht, E. (1988). Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica* 1: 1-127.

Salas R.M., Viana P.L., Cabral E.L., Dessein S., & Janssens S. (2015). *Carajasia* (Rubiaceae), a new and endangered genus from Carajás mountain range, Pará, Brazil. *Phytotaxa*, 206, 14–29.

Schumann, K. (1891). Rubiaceae. In: Engler, A. & Prantl, K. (eds.). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 4(4): 1-156.

Silveira F.A.O., Negreiros D., Barbosa N.P.U., Buisson E., Carmo F.F., Carstensen D.W., Conceição A.A., Cornelissen T.G., Echternacht L., Fernandes

G.W., Garcia Q.S., Guerra T.J., Jacobi C.M., Lemos-Filho J.P., Le Stradic S., Morellato L.P.C., Neves F.S., Oliveira R.S., Schaefer C.E., Viana P.L., & Lambers H. (2015). Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, 1–24.

Simon M.F., Grether R., de Queiroz L.P., Skema C., Pennington R.T., & Hughes C.E. (2009). Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 20359–64.

Souza, E. B. D., Costa, C. B., & Borba, E. L. (2007). Ocorrência de auto-incompatibilidade homomórfica em *Mitracarpus longicalyx* EB Souza & MF Sales (Rubiaceae-Spermacoaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 30 (2), 281-287.

Stace CA (1989) *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2 edition. Cambridge University Press, New York. 264pp.

Struwe, L.; Albert, V.A.; Bremer, B. “1994” (1995). Cladistics and family-level classification of the Gentianales. *Cladistics* 10: 175-206.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v.17, n.16, p.6463-6471.

Temnykh,S.; Declerck, 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*, vol. 11, no. 8, pp. 1441–1452.

Verdcourt, B. (1958). Remarks on the classification of the Rubiaceae. *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles* 28: 209-281.

Weber, J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, v.7, n.4, p.524-530.

Weber, J.L.; May, P.E. (1989). Abundance class os human DNA popymorphisms which can be typed using the popymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, v.44, n.3, p.388-396.

Yuyama, P. M., Pereira, L. F. P., dos Santos, T. B., Sera, T., Vilas-Boas, L. A., Lopes, F. R., ... & Vanzela, A. L. L. (2012). FISH using a gag-like fragment probe reveals a common Ty 3-gypsy-like retrotransposon in genome of Coffea species. *Genome*, 55(12), 825-833.

Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 1-16.

Zappi D.C., Calió M.F., & Pirani J.R. (2014). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Rubiaceae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 32, 71–140.

Zucchi, M.I.; Brondani, R.P.V.; Plnheiro, J.B.; Chaves, L.J.; Coelho, A.S.G.; Vencovsky, R. (2003). Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, n.4, p. 449-457.

JOÃO PAULO SARDIN NASÁRIO

**CAPÍTULO I**

**Panorama dos estudos citogenéticos  
na Tribo Spermaceae (Rubiaceae)**

CAMPINAS

2018

## Resumo

Análises cromossômicas em Rubiaceae não são muito frequentes, quando comparadas ao número de espécies compreendido pela família. A tribo Spermaceae (Sub. Rubioideae) apresenta poucos trabalhos que abordem aspectos relacionados a sua citogenética e evolução, bem como o Clado Spermaceae. Dessa maneira, objetivamos fazer o levantamento dos dados cromossômicos disponíveis na literatura para a Tribo Spermaceae (incluindo o clado Spermaceae), explanar o panorama destes dados dentro do grupo, além de ampliar o conhecimento cromossômico na tribo, observando tendências taxonômicas e evolutivas. Coletas de espécies da tribo foram realizadas na Serra do Espinhaço (MG e BA). Para as preparações citológicas, raízes foram obtidas a partir das sementes germinadas, pré-tratadas e fixadas em solução Farmer. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e em seguida foi realizada a técnica de bandamento CMA/DAPI. O levantamento de número cromossômico do clado Spermaceae foi realizado com consulta em obras de referência, artigos publicados e plataformas online. Cinco espécies do Clado Spermaceae (*Hexasepalum teres*, *Psyllocarpus asparagoides*, *P. laricoides*, *Staelia domingosii* e *S. hatschbachii*) apresentaram número cromossômico  $2n=28$  e *Remija ferruginea* (Spermaceae s.l) apresentou  $2n=22$ . Todas as espécies possuem o cariótipo composto por cromossomos metacêntricos e pequenos, variando de cerca de 1 a 3  $\mu\text{m}$ . O clado Spermaceae possui uma grande variabilidade no número cromossômico ( $2n=14, 28, 30, 42, 56, 64, 84$ ) e a maioria dos seus gêneros apresenta o possível número básico  $x=14$ . A Tribo Spermaceae possui 16,5% das espécies com dados cromossômicos, e para o Clado Spermaceae, apenas 9,3% das espécies possuem dados na literatura.

## 1. Introdução

Estudos citogenéticos são relevantes para o entendimento do comportamento reprodutivo, da taxonomia e da evolução de espécies de plantas tanto nativas (Forni-Martins & Martins 2000; Forni-Martins & Calligaris 2002; Biondo *et al.* 2005; Forni-Martins *et al.* 2007a, b; Dhamer *et al.* 2011), como o de espécies de interesse econômico (Barros & Silva 2010; Almeida & Pedrosa-Harand 2011). A citogenética estuda todos os aspectos ligados ao cromossomo, desde os estudos moleculares relacionados à sua herança, organização e expressão gênica até os estudos cariomorfológicos relativos ao número, forma e tamanho cromossômico (Guerra 1988; Apples *et al.* 1998).

A citotaxonomia, um dos ramos da citogenética, compreende a análise de dados citogenéticos em relação à sistemática do grupo em estudo (Guerra 1988; Stace 1989; Bernardos *et al.* 2004; Moraes *et al.* 2007).

O número cromossômico é o parâmetro cariotípico mais utilizado nos estudos citotaxonomias e evolutivos. A agilidade para a obtenção desses dados e o baixo custo associado, favorecem a ampla utilização deste parâmetro nos estudos de citotaxonomia (Guerra *et al.* 2008). Além disso, o número cromossômico é um estado de caráter que menos apresenta a influência de fatores ambientais ou fisiológicos, assim, fornece uma informação acurada sobre o genoma propriamente dito. Variações no número cromossômico é um dos fatores ligados a especiação por ser um mecanismo que estabelece barreiras reprodutivas (Riesenberg 1997).

As alterações cromossômicas numéricas originadas por variados eventos, são transmitidas para os descendentes quando ocorrem nas células reprodutivas. As principais alterações numéricas relacionadas a filogenia e a evolução cariotípica são a poliploidia e a disploidia.

A poliploidia corresponde a multiplicação total do número básico ( $x$ ) de cromossomos de uma espécie, originando indivíduos tetraploides ( $4x$ ), hexaploides ( $6x$ ), octaploides ( $8x$ ) e assim por diante. Acredita-se que a poliploidia é o principal mecanismo relacionado a diversificação das angiospermas (Soltis *et al.* 2009).

Por outro lado, a disploidia é o aumento ou diminuição do número cromossômico sem que haja mudanças quantitativas ou qualitativas no material

genético. Esse tipo de alteração origina-se geralmente por rearranjos estruturais, por eventos de fissão cromossômica ou fusão (Guerra 1989).

Existem ainda, outros tipos de alteração cromossômicas numéricas como a aneuploidia que é caracterizada pela perda ou ganho de cromossomos completos. Essa perda de material genético pode até ser letal (Guerra 1989, 2012; Guerra et al. 2008).

Além do número, o tamanho dos cromossomos, a posição do centrômero e a presença de constrições secundárias, são outros parâmetros cariotípicos que podem ser utilizados na citotaxonomia. Essas características podem fornecer informações importantes sobre a organização do genoma das espécies e alterações cromossômicas estruturais envolvidas na diversificação de espécies e grupos (Guerra 1988; Stace 1989).

Em alguns casos os dados de número e morfologia cromossômicos não são suficientes para a elucidação das relações taxonômicas e evolutivas de alguns clados. Geralmente isso ocorre quando as espécies em estudos possuem cariótipos com número e morfologia uniformes. Nesses casos, outras características cariotípicas podem ser exploradas com o uso de técnicas para a diferenciação longitudinal dos cromossomos.

O bandamento cromossômico fluorescente permite a visualização de regiões repetitivas do DNA, ricas em sequências AT e CG. Com o emprego da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), é possível localizar regiões específicas nos cromossomos com o uso de uma sonda, marcada por fluorocromos, que contém a sequência de interesse. (Guerra 2000; Roa & Guerra, 2012; Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2011).

Apesar de revelar padrões importantes, o uso de dados cromossômicos associados a estudos de sistemática vegetal abrange poucos grupos, diante da grande diversidade de espécies existentes. Em sua maioria, os estudos citogenéticos são habitualmente descritivos sem aprofundado apoio estatístico ou com lacunas de compreensão em seus mecanismos, sendo dessa forma difícil de determinar a história evolutiva do cariótipo, especialmente para eventos mais antigos (Guerra 2012; Acosta *et al.* 2016).

Análises cromossômicas em Rubiaceae não são frequentes, quando comparadas ao número de espécies agrupado na família. No Brasil, a maioria dos trabalhos envolve o gênero exótico *Coffea*, que possui grande valor

comercial (Corrêa *et al.* 2010). Os estudos em *Coffea* são variados, havendo trabalhos desde a caracterização cariotípica de suas espécies (Krug 1934, Pinto-Maglio & Cruz 1988), com o emprego de diversas técnicas, como a coloração convencional e bandamentos tradicionais (Orceína acética, Bandamento C e Bandas NOR) (Pierozzi *et al.* 1999; Pierozzi 2013) e com fluorocromos, como hibridização *in situ* (FISH) (Pinto-Maglio *et al.* 2000; Pinto-Maglio 2006) e marcadores moleculares (Anthony *et al.* 2001; Silva *et al.* 2011; Lepelley *et al.* 2012).

Em relação às espécies nativas, poucos trabalhos são encontrados para representantes de Rubioideae, Kiehn (1995) analisou o número básico, nível de ploidia e outros caracteres cariológicos de tribos e subtribos da família.

Pierozzi & Jung Mendaçolli (1997) distinguiram espécies de *Genipa* pela diferença no número cromossômico ( $2n=22$  em *G. americana* e  $2n=20$  em *G. infundibuliformis*). Corrêa & Forni-Martins (2004) realizaram a caracterização cariotípica clássica, determinando o número cromossômico e construindo os ideogramas, que são representações gráficas dos cromossomos, para quatorze espécies de Rubiaceae do Cerrado brasileiro: quatro do gênero *Alibertia*, duas de *Psychotria*, duas de *Borreria* (atuamente circunscritas dentro do gênero *Spermacoce*) e um representante dos demais gêneros, *Amaioua*, *Genipa*, *Tocoyena*, *Coccocypselum*, *Coussarea*, *Palicourea* e *Richardia*. Kiehn (2010) apresentou contagens cariotípicas para 91 espécies, representando 26 gêneros das Rubiaceae neotropicais, incluindo algumas contagens para a tribo Spermacoaceae, como *Richardia*, *Manettia* e *Diodia*, entre outras. Neste trabalho, foi realizada a primeira contagem para a tribo *Perameae*, bem como para 11 gêneros e 71 espécies da família, de acordo com a classificação de Robbrecht & Manen (2006). Corrêa *et al.* (2010) apresentaram o número cromossômico de dez espécies de *Psychotria*, com números cromossômicos variando de  $2n=22$ , 40 e 44 entre os táxons estudados. Em um estudo preliminar de Nasário *et al.* (2017), foram apresentados os números cromossômicos inéditos de quatro espécies da tribo Spermacoce, para os gêneros *Psyllocarpus*, *Staelia* e *Hexasepalum*.

Com relação à tribo Spermacoaceae, os trabalhos cromossômicos são ainda mais escassos, estando disponíveis, em sua maioria, contagens e níveis de ploidia (Kiehn 2010), porém nenhuma delas relacionadas à sistemática do

grupo. A fim de compreender o cenário cromossômico da tribo Spermaceae, buscamos primeiramente, levantar e agrupar os dados cromossômicos disponíveis na literatura para a tribo e enriquecer essa base de dados com novas informações citogenéticas, focadas na tribo Spermaceae. A partir disso, verificamos possíveis variações de número cromossômico na tribo e, por fim, oferecemos um panorama cromossômico atual para o grupo.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Análises cromossômicas**

#### **2.1.1 Coleta de material vegetal**

Para a realização do presente trabalho, sementes de 33 espécies, de gêneros da Tribo Spermaceae foram coletadas pelo doutorando e pesquisador João A.M. Carmo em diversos parques, como Serra do Tombador (GO), Serra do Cipó (MG), Parque Nacional das Sempre-Vivas (MG), Pico das Almas (MG), e nas cidades de Grão-Mogol (MG), Andaraí (BA) Mucugê (BA), Piatã (BA), Macaúbas (BA), Botumirim (MG), Cristália (MG), Itacambira (MG), Cristália (MG), Diamantina (MG), Felício dos Santos (MG), São Gabriel do Rio Preto (MG), Ouro Preto (MG), Santana do Riacho (MG), Santo Antonio do Itambé (MG) e Joaquim Felício (MG) e Catolés (BA).

As sementes recebidas foram colocadas para germinar em câmara de germinação (BOD) de acordo com condições já descritas para a família (28 graus constantes, Corrêa 2006). Ao menos um espécime de cada população foi incorporado ao Herbário UEC (Herbário da Universidade Estadual de Campinas) e a identificação das espécies foi feita por especialistas.

As sementes demoraram de 30 a 90 dias para germinar e diante da baixa taxa de germinação, foi aplicada solução de Giberelina 2% para acelerar o processo. Apenas seis espécies germinaram e foram utilizadas no estudo citogenético (Tabela 1). Um espécime de cada população foi incorporado ao Herbário UEC (Herbário da Universidade Estadual de Campinas).

Tabela 1: Lista de espécies da Tribo Spermacoce coletadas e estudadas com identificação, voucher e local de coleta. O gênero *Remija*\* foi utilizado como grupo externo à tribo.

<b>Espécie</b>	<b>Voucher</b>	<b>Localização</b>
<i>Hexasepalum teres</i> (Walter) Small	Carmo, J.A.M. 238	Joaquim Felício - MG
<i>Psyllocarpus asparagoides</i> Mart. ex Mart. & Zucc.	Carmo, J.A.M. 290	Diamantina - MG
<i>Psyllocarpus laricoides</i> Mart. ex Mart. & Zucc.	Carmo, J.A.M. 289	Diamantina - MG
<i>Remija ferruginea</i> * (A.St.-Hil.) DC.	Carmo, J.A.M. 320	Santana do Riacho - MG
<i>Staelia domingosii</i> R.M. Salas & E.L. Cabral	Carmo, J.A.M. 244	Andaraí - BA
<i>Staelia hatschbachii</i> J.H.Kirkbr.	Carmo, J.A.M. 424	Cristália - MG

### 2.1.2. Análises citogenéticas

Para as preparações citológicas, raízes foram obtidas a partir das sementes germinadas. As mesmas foram pré-tratadas em solução de 8-hidroxi-quiloneína (8-HQ a 0,002M), em temperatura de 4-10°C por 24 horas e, fixadas em solução Farmer (etanol absoluto :ácido acético glacial, 3:1; v:v) e estocadas em freezer. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento segundo Guerra e Souza (2002, com modificações). Inicialmente, as raízes foram lavadas em água destilada por três vezes, durante cinco minutos. Após a lavagem, foram mergulhadas em solução enzimática (2% celulase, 20% pectinase, 1% macerozima) e mantidas em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Posteriormente foram transferidas para água destilada por pelo menos uma hora. As pontas das raízes foram maceradas em uma lâmina, juntamente com uma gota de ácido acético 45% e cobertas com lamínula; foram congeladas em nitrogênio líquido (para aderência do material) e as lamínulas retiradas. As lâminas secas foram armazenadas e envelhecidas por no mínimo três dias para posteriores procedimentos. As melhores metáfases foram selecionadas em contraste de fase em microscópio BX51 (Olympus) para coloração com Giemsa ou aplicação das técnicas de bandamento com CMA/DAPI.

Para o bandamento CMA/DAPI os fluorocromos cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foram administrados sequencialmente em lâminas envelhecidas por pelo menos cinco dias, segundo (Schweizer 1976, com modificações). Para a coloração, uma gota de 15 µl de CMA<sub>3</sub> (0,5 mg/ml) foi aplicada sobre cada lâmina previamente preparada, e então coberta com uma lamínula. Depois de uma hora em câmara úmida escura, a lâmina foi lavada com

um jato de água destilada para remoção da lamínula e do excesso do fluorocromo. Posteriormente, cada lâmina recebeu uma gota de 15µl de DAPI (2 mg/ml) e foi mantida durante 30 minutos também em câmara úmida escura. A lâmina foi novamente lavada com um jato de água destilada e retirada a lamínula. Quando secas, as lâminas foram montadas em meio de montagem para CMA<sub>3</sub>/DAPI (glicerol: tampão McIlvaine 1:1) e armazenadas em câmara escura para a estabilização de fluorocromos por três dias.

### 2.1.3 Análise morfométrica do cariótipo

A morfometria dos cromossomos foi realizada com o software KaryoType® (2.0) em três células para cada táxon com padrão de condensação semelhantes. A medida absoluta do braço curto (S) e longo (L) e o tamanho absoluto de cada cromossomo foi obtido para cada metáfase. Foi calculada a posição do centrômero pelo índice  $r$  (relação entre braços) =  $L/S$  e classificado de acordo com Levan *et al.* (1964) em (*m*) metacêntrico (região mediana) ( $r = 1,0-1,69$ ), (*M*) metacêntrico (ponto mediano exato) ( $r = 1,0$ ), (*sm*) submetacêntrico ( $r = 1,70-2,99$ ), (*st*) subtlocêntrico ( $r = 3,0-6,99$ ) e (*t*) telocêntrico ( $r = 7,0 - \infty$ ). O comprimento total do lote haploide (CTLH) foi calculado através da soma do tamanho médio dos pares cromossômicos de cada espécie. Foram utilizados os índices  $A1 = 1 - [\sum bi/Bi]/n$  ( $bi$  = média do braço curto de cada par cromossômico,  $B$  = média do braço longo de cada par cromossômico,  $n$  = número de pares cromossômicos) e  $A2 = s/x$  (desvio padrão,  $x$  = média do comprimento do complemento cromossômico) (Zarco, 1986), para medir a simetria cariotípica. O índice  $A1$  mede a assimetria intracromossomal e o índice  $A2$  mede a assimetria intercromossomal. Os índices  $A1$  e  $A2$ , podem ter valores de 0 a 1, indicando, respectivamente, que quanto mais próximo de 0, maior a simetria cariotípica intra (diferenças em relação ao tamanho dos braços de cada par cromossômico) e intercromossomal (variação entre o tamanho dos pares cromossômicos), Também foi calculado o índice TF% (índice de simetria) (Huziwara, 1962) para confirmar a simetria total do complemento cromossômico, que é maior quanto mais próximo do valor 50%.

## 2.2 Banco de dados cromossômicos

A busca de dados citogenéticos disponíveis na literatura para a tribo foi realizada em obras de referência, em artigos publicados em periódicos científicos e plataformas de dados *on line*, como IPCN (Index to Plant Chromosome Numbers) e CCDB (Chromosome Counts Database). Sempre que possível, as publicações originais foram consultadas a fim de se obter maiores informações para a construção do banco de dados. O banco de dados foi construído a partir dos números cromossômicos obtidos para *Spermacoce sensu stricto* (clado *Spermacoce*) e *sensu lato*, organizados em uma planilha de Excel (MS Office). As correções nomenclaturais foram realizadas mediante consultas de check lists disponíveis *on line* (Tropicos e World Check List) e com trabalhos de sinonimização (The Plant List 2016).

### 2.2.1 Análise do banco de dados de número cromossômico

O banco de dados citogenéticos para o clado *Spermacoce* foi analisado sob os seguintes parâmetros: 1) Panorama atual de número de espécies de cada gênero e quantidade de números cromossômicos existentes para o mesmo; 2) Possíveis variações de número cromossômico dentro do gênero, incluindo maior e menor registro; 3) Frequência de registros cromossômicos.

## 3. Resultados

### 3.1. Análises cromossômicas

Cinco espécies (*H. teres*, *P. asparagoides*, *P. laricoides*, *S. domingosii* e *S. hatschbachii*). (Tabela 2, Figura 1). apresentaram número cromossômico  $2n=28$ , e *R. ferrugínea*, que compõe o grupo externo, apresentou  $2n=22$ . A espécie que apresentou o maior CTLH foi *H. teres*, com 21,78  $\mu\text{m}$  e variação de 2,77 a 1,77  $\mu\text{m}$ , do maior para o menor cromossomo. Os menores valores de CTLH foram encontrados em *R. ferrugínea* (grupo externo) com 11,83  $\mu\text{m}$  (3,03-1,63 $\mu\text{m}$ ), *P. asparagoides* com 12,5  $\mu\text{m}$  (2,55- 1,28  $\mu\text{m}$ ) e *P. laricoides* com 13,79  $\mu\text{m}$  (2,26-1,46  $\mu\text{m}$ ).

Todas as espécies analisadas possuem o cariótipo composto unicamente por cromossomos metacêntricos (Figura 1). Os valores de TF% encontrados para todos os táxons foram próximos de 50% e os índices de A1 e A2, apresentaram valores próximos de zero, evidenciando uma alta simetria

cariotípica para o grupo. As espécies apresentaram variação mínima em relação ao índice A1 (0.02 a 0.03) e pequena em A2, variando de 0,09 em *P. laricoides* a 0,27 em *Staelia domingosii*. (Tabela 2, C e E).

Já o comprimento total haploide da cromatina, apresentou uma variação de 11,03  $\mu\text{m}$  em *R. ferrugínea* a 21,78  $\mu\text{m}$  em *H. teres*. Um forte sinal CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> que corresponde à região organizadora do nucléolo (NOR) foi observado em todas as espécies estudadas. Em *H. teres*, foi observado um par de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup> na região terminal dos cromossomos e nas demais espécies foram encontradas bandas inconspícuas que não se sustentavam em repetição.

Tabela 2: Características cariotípicas de espécies do clado Spermacoe. 2n=Número diploide, x=nível de ploidia, TF% = índice de simetria. \* = Números cromossômicos apresentados preliminarmente por Nasário *et al.* (2017)

<b>Espécie</b>	<b>2n</b>	<b>Nível de Ploidia</b>	<b>Fórmula cariotípica</b>	<b>Varição do comprimento cromossômico (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Comprimento haploide CTHL (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>TF%</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>
<i>Hexasepalum teres</i>	28*	2x	2M+12m	2,77 - 1,17	21,78	49,4	0,03	0,24
<i>Psyllocarpus asparagoides</i>	28*	2x	1M+13m	2,55 - 1,28	12,5	49,4	0,02	0,18
<i>Psyllocarpus laricoides</i>	28*	2x	1M+13m	2,26 - 1,46	13,79	49,3	0,03	0,09
<i>Remija ferruginea</i>	22	2x	3M+8m	3,03-1,63	11,83	50,0	0,02	0,19
<i>Staelia domingosii</i>	28*	2x	6M+8m	2,96 - 1,21	20,43	49,4	0,02	0,27
<i>Staelia hatschbachii</i>	28	2x	3M+8m	2,45 - 1,05	15,43	49,4	0,02	0,19

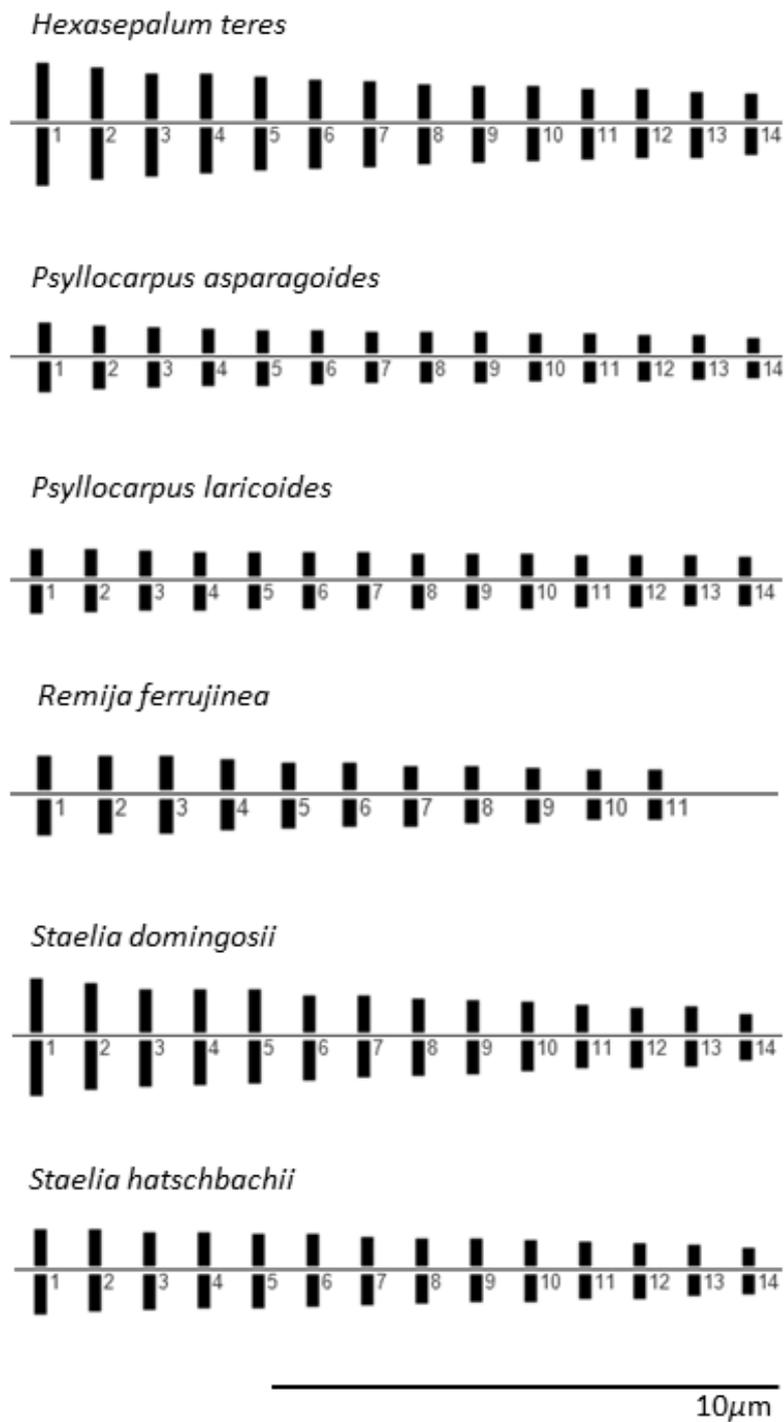


Figura 1: Idiograma das espécies da tribo Spermacoceae. Grupo externo: *Remija ferruginea*.

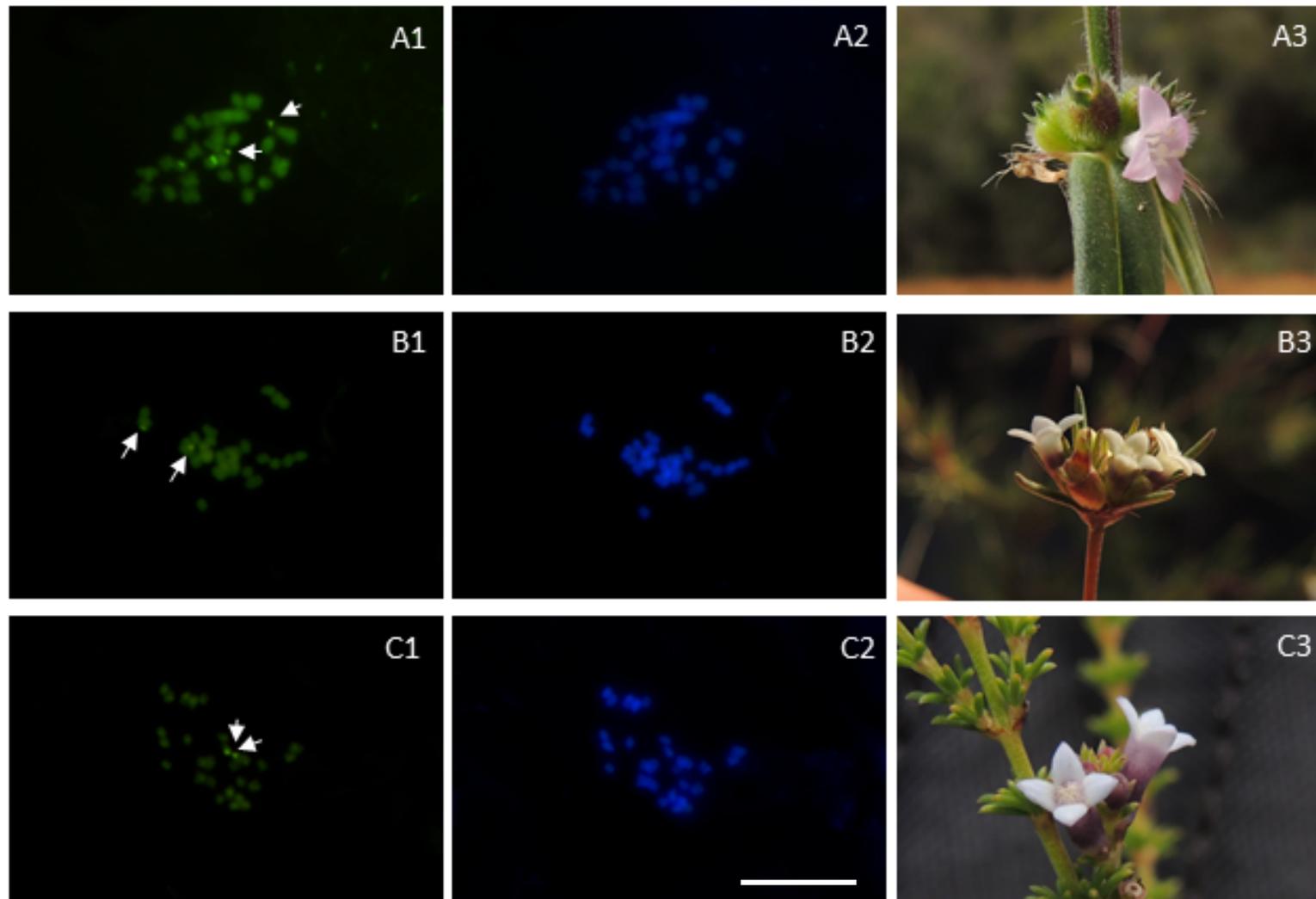


Figura 2: Cromossomos mitóticos, com bandamento CMA/DAPI (1 e 2, respectivamente) e flores (3) do Clado Spermaceae, Tribo Spermaceae, Rubiaceae.. A, *Hexasepalum teres* ( $2n=28$ ); B, *Psyllocarpus asparagoides* ( $2n=28$ ); C, *Psyllocarpus laricoides* ( $2n=28$ ); D, *Remija ferruginea* (grupo externo)( $2n=22$ ); E, *Staelia domingosii* ( $2n=28$ ), F, *Staelia hatschbachii* ( $2n=28$ ). — Barra = 10  $\mu\text{m}$ , Setas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (NOR).

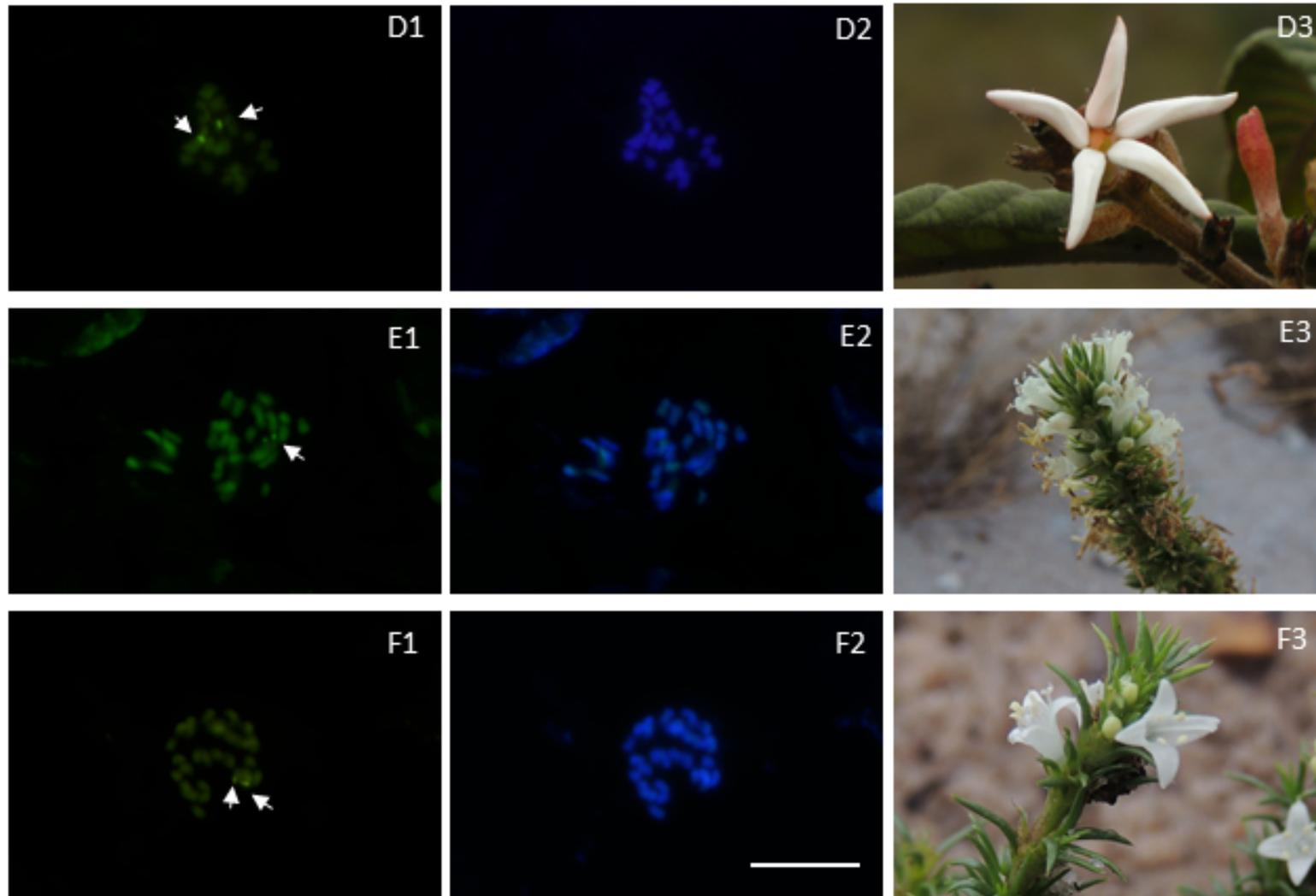


Figura 2: (Continuação) Cromossomos mitóticos, com bandamento CMA/DAPI (1 e 2, respectivamente) e flores (3) do Clado Spermaceae, Tribo Spermaceae, Rubiaceae.. A, *Hexasepalum teres* ( $2n=28$ ); B, *Psyllocarpus asparagoides* ( $2n=28$ ); C, *Psyllocarpus laricoides* ( $2n=28$ ); D, *Remija ferruginea* (grupo externo)( $2n=22$ ); E, *Staelia domingosii* ( $2n=28$ ), F, *Staelia hatschbachii* ( $2n=28$ ). — Barra = 10  $\mu$ m, Setas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (NOR).

### 3.2 Análise do banco de dados de números cromossômicos

Os estudos cromossômicos para a tribo Spermaceae ainda possuem muitas lacunas, poucos trabalhos foram encontrados para o grupo e muitos deles, sem uma descrição detalhada do cariótipo. Considerando os dados obtidos no presente estudo, 30 gêneros da tribo possuem algum trabalho citogenético e esse número corresponde a menos de 50% do total de gêneros reunidos em todo o grupo, em seu conceito amplo.

A amostragem para espécies também é escassa, apenas 205 espécies, possuem informações sobre número cromossômico, totalizando 16,5% dos representantes de Spermaceae (Anexo 1). Dos 23 gêneros agrupados no clado Spermeaceae (Spermaceae s.s.), 12 apresentam alguma contagem cromossômica, correspondendo a 56,5% dos gêneros do grupo. Em relação ao número total de espécies do clado, para apenas 48 de 516 espécies, são encontrados números cromossômicos, totalizando 9,3% (Tabela 3, anexo 2).

As informações de número cromossômico e o número de espécies de cada gênero, são apresentadas na Tabela 3. O gênero *Ernodea* é o mais amostrado cromossomicamente (44% de suas espécies) e *Staelia*, o gênero menos estudado, com 4,7% de espécies amostradas, com exceção dos gêneros monoespecíficos. Foi observada uma variação intragenérica no número cromossômico, com  $2n$  variando de 16 a 84 (Tabela 3).

A frequência dos registros quanto ao número somático ( $2n$ ) também foi calculada, sendo  $2n=18$ , 28 e 36 as contagens mais comuns para a tribo (Figura 3). Também foram analisadas as frequências dos números cromossômicos na tribo (com exceção do clado Spermaceae) e no clado Spermaceae. Para a tribo os números mais frequentes foram  $2n=18$  e 36 e para o Clado Spermaceae  $2n=28$  e 56 (Figura 4).

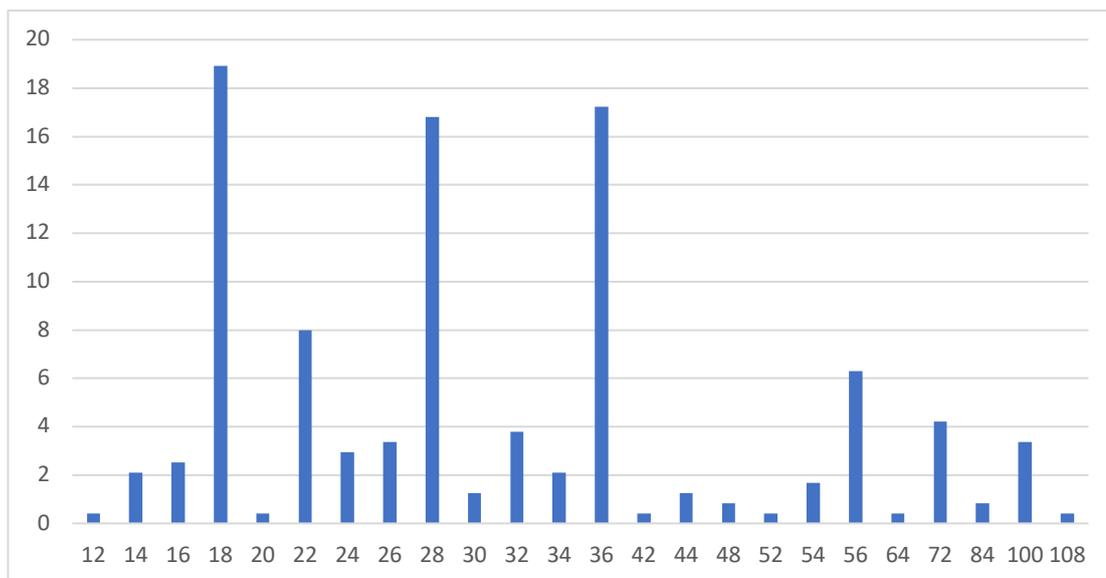


Figura 3: Frequência de registros de números cromossômicos ( $2n$ ) na tribo Spermacoceae s.l.. Vertical: Frequência (%), Horizontal ( $2n$ ).

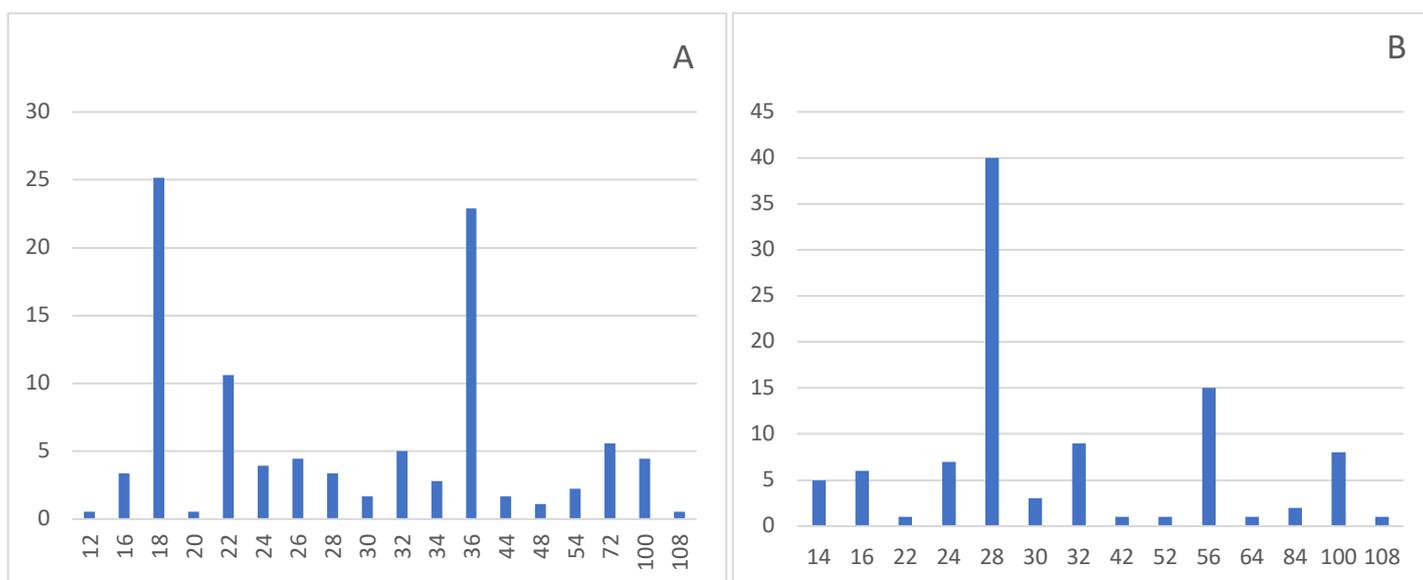


Figura 4: A – Frequência de números cromossômicos ( $2n$ ) na tribo Spermacoceae s. l., com exceção do clado Spermacoce. B – Frequência de números cromossômicos ( $2n$ ) no clado Spermacoce. Vertical: Frequência (%), Horizontal ( $2n$ ).

Tabela 3: Gêneros de Spermacoce s.s. (Rubiaceae) ou Clado Spermacoce reconhecidos por Sallas *et al.* (2015) onde se encontram dados cromossômicos.

\* = Contagem única, # = Número constante.

<b>Gênero</b>	<b>Nº de spp do gênero</b>	<b>Nº de spp com contagem</b>	<b>% de spp. Estudadas</b>	<b>Menor 2n</b>	<b>Maior 2n</b>
<i>Crusea</i>	14	5	35,7	14	56
<i>Diodia</i>	30	1	3,3	28*	-
<i>Emmeorhiza</i>	1	1	100	28*	-
<i>Ernodea</i>	9	4	44,4	14#	-
<i>Galianthe</i>	45	3	6,6	16	30
<i>Hexasepalum</i>	12	3	25	28	56
<i>Hydrophylax</i>	1	1	100	56*	-
<i>Mitracarpus</i>	49	3	6,1	16	84
<i>Psyllocarpus</i>	9	2	22,22	28#	-
<i>Richardia</i>	16	5	31,2	28	84
<i>Spermacoce</i>	288	20	6,9	28	84

## 4. Discussão

### 4.1 Análises cromossômicas

A germinação das sementes de representantes da família Rubiaceae é baixa como já relatado por Correa et al. (2010), em especial as sementes de espécies da tribo Spermaceae, o que foi constatado também nesse trabalho. Mesmo sob condições ideais de germinação, como proposto por Correa et al., 2010 (28 graus constantes sob luz direta) segundo dados da literatura, alguns táxons levaram um bom tempo para que houvesse a emissão das radículas e outros ainda não houve germinação.

Considerando o relato preliminar de Nasário et al. (2017) e os dados aqui obtidos, as contagens cromossômicas são inéditas para a maioria das espécies analisadas, com exceção de *H.teres* ( $2n=28$ , Jinno 1956b, Lewis 1962c). Da mesma forma, os dados são inéditos também para os gêneros *Psyllocarpus*, *Staelia* e *Remija* (Figura 1, Tabela 2), com todas as espécies apresentando  $2n=28$ , exceto *R. ferruginea* com  $2n=22$  (grupo externo).

O número cromossômico  $2n=28$ , nas espécies do clado Spermaceae, é o mais frequente no grupo (Figura 4B, Anexo2). Esse número já foi relatado para outras espécies (Tabela 3, Anexo 2), como em *Spermaceae laevis* (Lam.) Griseb., *S. ocymoides* (Burm. F.) DC. (Lewis 1962c), *S. remota* Ruiz & Pav., *S. confusa* Rendle (Kienh 2010) *S. verticillata* (L.) G. May. (Miège 1962), *Crusea parviflora* Hooker & Arnott (Anderson 1972), *D. virginiana* L., *Hexasepalum. teres* Walt. (Lewis 1962c), *Richardia brasiliensis* Gomes (Lewis 1962c, 1966), entre outras.

Apesar da grande frequência de  $2n=28$ , outros números cromossômicos foram encontrados no clado Spermaceae como  $2n=24$  em *S. laevis* Lam. (Lewis W. H. 1962c) até  $2n=84$  em *S. neoterminalis* Govaerts (Lewis 1962c). Outros números cromossômicos presentes no grupo são,  $2n=28$  em *S. verticillata* L. (Miège 1962),  $2n=32$  em *S. pusilla* Wall (Shivakumar e Chennaveeraiah 1993),  $2n=42$  em *S. dibrachiata* Oliv. (Lewis 1966a),  $2n=52$  em *S. ocymoides* Burm F. (Kienh 2010),  $2n=56$  em *S. hispida* L. (Koshoo 1941b) e  $2n=64$  em *S. articularis* L. (Lewis 1966a). Para outros gêneros da tribo, o número cromossômico é constante como em *Ernodea*, em que todos os representantes estudados até o momento possuem  $2n=14$ .

*Hexasepalum teres* apresentou  $2n=28$ , corroborando os resultados anteriormente descritos por Jinno (1956b) e Lewis (1962c). Este gênero foi recentemente circunscrito por Kirkbride & Delprete (2015), incluindo espécies anteriormente descritas no gênero *Diodella*.

O número  $2n=28$ , também encontrado em *Hexasepalum serrulata* e  $2n=56$  encontrado em *H. apicullata*, parecem corroborar o número básico  $x=14$  descrito para a tribo.

O número básico de cromossomos  $x=14$  já foi descrito para o clado Spermacoce (Kiehn 2010). Muitas informações da literatura corroboram essa informação. O número cromossômico  $2n=28$  é o mais frequente para o clado, sendo encontrado em aproximadamente 35% de seus representantes. Outros números múltiplos de  $2n=28$  estão presentes em algumas espécies do grupo como  $2n=56$  em *Richardia scabra* (Kiehn 2010) e  $2n=84$  em *Spermacoce neoterminalis* (Lewis W. H. 1962c), sugerindo eventos de poliploidização.

Por outro lado, em *Ernodea* há contagem de  $2n=14$  (Kiehn 1996), que sugere a possibilidade de  $x=7$  ser o número cromossômico básico para o grupo. Nesse caso, também pode ter ocorrido um possível evento de reversão do número cromossômico.

*Psyllocarpus* é um gênero pouco estudado, principalmente do ponto de vista cromossômico. Ele é raramente incluso em filogenias do grupo e trata-se de um gênero endêmico do Brasil, com distribuição restrita à Serra do Espinhaço, onde recentemente novas espécies foram descritas por Carmo *et al.* (2018). *Psyllocarpus asparagoides* e *P. laricoides* apresentaram  $2n=28$ , que parece ser comum principalmente para o clado Spermacoce e corrobora assim, o número básico descrito anteriormente para a tribo ( $x=14$ ). Da mesma forma, o gênero *Staelia* é pouco estudado e as contagens de *S. domingosii* e *S. hatschbachii* ( $2n=28$ ) suportam o número mais comum do grupo e o número básico da tribo.

Por fim, o número cromossômico de *Remija ferruginea* ( $2n=22$ ), com contagem inédita para o gênero e grupo externo desse estudo, parece ser mais comum para a família, do que no clado Spermacoce (Anexo 2), aparecendo apenas em algumas espécies da tribo Spermacoceae, nos gêneros *Manettia*, *Hedyotis* e *Oldenlandia*. O número básico  $x=11$ , também já foi citado como possível número básico da tribo e de alguns gêneros por Kiehn (2010), já que também é considerado como número básico da família Rubiaceae (Darlington & While, 1955).

O clado Spermacoce parece ser estável quanto à morfologia de seus cromossomos e simetria cariotípica. Apresenta todos os cromossomos das 6 espécies em estudo metacêntricos, o que também é observado em outras tribos da subfamília, como em Coussareae, Hedyotideae e Psychotrieae (Correa *et al.* 2004). Mesmo para outras subfamílias, como em Ixorideae, no gênero *Coffea*, espécies *C. canephora* e *C. dewevrei*, ( $2n=22$ ), o cariótipo é parcialmente simétrico, apresenta a maioria dos seus cromossomos submetacêntricos e alguns metacêntricos (Pierozzi *et al.*, 1999).

Um dos parâmetros utilizados para inferir o grau de simetria cariotípica das espécies neste trabalho, (TF%), representa a média da posição centromérica de todos os cromossomos de uma mesma espécie (Huziwara, 1956). Nas espécies aqui estudadas o TF% variou de 49,3 a 50,0 (*P. laricoides* e *R. ferruginea* respectivamente), indicando alta simetria cariotípica. Esses valores não possuem grandes diferenças comparando-se aos valores encontrados na literatura para a subfamília Rubioideae, como o observado em *Paulicourea croceoides* (47,98) *Psychotria gracilenta* (50,00), *Spermacoce verticillata* (47,45) (Correa et al. 2010). Considerando-se outras subfamílias, como Ixorideae, há uma certa variação desse valor, como em *Tocyena formosa* (38,01), *Genipa americana* (38,60), *Amaioua intermedia* (45,05) ou até mesmo no gênero *Coffea*, como *C. canephora* (30,71). Ainda assim os valores de TF% indicam ideogramas simétricos para grande parte da família, padrão que se repetiu nas espécies analisadas neste trabalho (Correa, 2004).

Segundo Stebbins (1950), o conceito de simetria cariotípica, além da posição centromérica, também envolve a diferença no tamanho relativo dos cromossomos de cada ideograma. A variação gradual no tamanho dos cromossomos observada nas seis espécies analisadas, sem descontinuidade, reforça assim, o caráter simétrico dos cariótipos, assim como o observado por Correa (2004) em algumas espécies da subfamília Rubioideae.

Os valores de A1 e A2 aqui obtidos também reforçam a variação gradual intra e intercromossomal, onde os valores se aproximaram de 0, confirmando a simetria cariotípica das espécies.

Os dados com bandamento CMA/DAPI são inéditos para a subfamília Rubioideae. Todas as espécies apresentaram um par de bandas CMA+/DAPI- associados à região da NOR. A presença de heterocromatina rica em sequências GC, associadas à região da NOR, tem sido observada em vários grupos de plantas (Guerra, 2000). Em Rubiaceae este padrão também foi observado em *Coffea canephora*, *C. eugenoides* e *C. dewevrei* (Barbosa, 2001; Clarindo, 2003). Esse padrão é frequentemente encontrado em espécies de *Solanum*, *Capsicum* e *Lycium*, Solanaceae (Brasileiro-Vidal et al., 2009; Chiarini et al., 2014; Melo et al., 2011; Miguel et al., 2012; Moscone et al., 2007; Rego et al., 2009; Romero-da Cruz et al., 2015; Stiefkens & Bernadello et al., 2010).

## 4.2 Panorama dos estudos cromossômicos

Em sua maioria, os relatos cromossômicos para a tribo se limitam a apresentar o número somático ou meiótico de algumas espécies (Tabela 2, Anexo 2). A Subfamília Rubioideae também não apresenta muitas informações cromossômicas. Kiehn (2010) apresentou dados para cerca de 91 espécies em 26 gêneros, sendo inéditos para 71 desses táxons. Este trabalho reúne um grande número de informações sobre possíveis números básicos e níveis de ploidia para várias de suas tribos, incluindo Spermaceae, sugerindo  $x=11$  como possível número básico para a subfamília. Esse dado corrobora o que foi proposto para a família Rubiaceae ( $x=11$ ) por Darlington & While (1955).

A tribo Spermaceae compreende 61 gêneros, dos quais apenas 31 possuem alguma contagem cromossômica: *Agathisanthemum*, *Amphiasma*, *Arcytophyllum*, *Bouvardia*, *Conostomium*, *Dentella*, *Dibrachionostylus*, *Hedyotis*, *Hemidiodia*, *Houstonia*, *Kadua*, *Kohautia*, *Lelya*, *Manettia*, *Manostachya*, *Neanotis*, *Oldenlandia* e *Pentodon* estes pertencentes a tribo sensu lato, além de *Crusea*, *Diodella*, *Emmeorrhiza*, *Ernodea*, *Diodia*, *Galianthe*, *Hexasepalum*, *Hidrophylax*, *Mitracarpus*, *Psyllocarpus*, *Spermaceae*, *Remija* e *Richardia*, pertencentes à tribo sensu strictu ou clado Spermaceae. Considerando as 1235 espécies da tribo (Salas *et al.* 2015), apenas 205 têm registros cromossômicos, sendo os gêneros mais amostrados *Hedyotis* (54 spp), *Oldenlandia* (43 spp), *Spermaceae* (20 spp). Juntos eles compreendem 57% do total de informação disponível para o grupo. Os outros 28 gêneros em que existe alguma contagem estão representados nos 43% restantes dos dados.

Para a tribo Spermaceae, vários números cromossômicos foram relatados, sendo eles ( $2n$ ) 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 64, 72, 84, 100 e 108. A maior parte dos estudos não apresenta imagens, nem acrescentam informações adicionais ao conjunto cromossômico. Ao observar a frequência em que estes números aparecem na tribo, foi possível identificar que alguns números são mais comuns (Figura 3), como 18, 22, 28, 36, 56 e 72. Ainda sob este aspecto, as contagens mais frequentes podem ser divididas em dois grupos, o Grupo  $x=9$  (18, 36, 72 – Figura 4A) e Grupo  $x=7$  ou  $x=14$  (28 e 56 - Figura 4B) com exceção a  $2n=22$  que pertence, em sua maioria, ao gênero *Hedyotis*, um dos gêneros mais amostrados. Nesses dois grupos, os números são múltiplos a partir de 7 ou 9, dando origem a uma pequena série poliploide ( $2x$ ,  $4x$  e  $6x$ ), que também foi reportado por Kiehn (2010). Quando os grupos são observados em relação aos gêneros que os compõem, nota-se que o grupo ( $x=9$ ) pertence à tribo Spermaceae de modo geral, enquanto o grupo ( $x=7/14$ ) pertence ao clado Spermaceae.

Os gêneros pertencentes ao clado Spermacoce foram os primeiros a ser circunscritos na tribo Spermacoce e, segundo a filogenia proposta por Karehed (2008), formam um grupo monofilético. Ao observar os grupos cromossômicos nota-se que o clado Spermacoce pode ter evoluído de uma forma distinta do restante da tribo. O número  $2n=22$  ( $x=11$ ) também é reportado como possível número básico da tribo no trabalho de Kiehn (2010), aparecendo também em tribos próximas como em *Rubiae* e *Paulicoureeae*.

## 5. Considerações Finais

Este trabalho apresentou cinco novas contagens cromossômicas para o clado Spermacoce (*H. teres*, *P. asparagoides*, *P. laricoides*, *S. domingosii* e *S. hatschbachii*) com número cromossômico  $2n=28$ , e *R. ferruginea*, que compõe o grupo externo, com  $2n=22$ . Todas as espécies aqui estudadas apresentaram cariótipo simétrico, assim como o já relatado para outras espécies do grupo.

A variabilidade de números cromossômicos levantados para a grupo (12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 64, 72, 84, 100 e 108) foi alta. A Tribo Spermacoceae possui 16,5% das espécies com dados cromossômicos, e para o Clado Spermacoce, apenas 9,3% das espécies possuem dados na literatura, que demonstram a pequena quantidade de trabalhos realizados na tribo. Diante disso, sugere-se que mais trabalhos cariotípicos e citogenéticos sejam realizados no grupo, para que novas inferências sejam realizadas.

## 6. Referências bibliográficas

Acosta, M. C., Moscone, E. A., & Cocucci, A. A. (2016). Using chromosomal data in the phylogenetic and molecular dating framework: Karyotype evolution and diversification in *Nierembergia* (Solanaceae) influenced by historical changes in sea level. *Plant Biology*.

Almeida, C. & Pedrosa-Harand A. (2011). Contrasting rDNA evolution in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenet Genome Research* 132: 212-217.

Anderson, W. R. (1972). A Monograph of the genus *Crusea* (Rubiaceae). *Mem. New York Botanic Garden* 22 (4): 1-128.

Andersson, L. & Rova, J. H. E. (1999). The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 214, 161–186.

Anthony, F. Bertrand, B. Quiros, O, Lashermes, P., Berthaud, J, & Charrier, A. (2001). Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.

Backlund, M. Oxelman, B. & Bremer, B. (2000). Phylogenetic relationships within the Gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. *American Journal of Botany* 87: 1029-1043.

Barbosa, M. R. Zappi, D. Taylor, C. Cabral, E. Jardim, J. G. Pereira, M. S. Caliό, M. F. Pessoa, M. C. R. Salas, R. Souza, E. B. Di Maio, F. R. Macias, L. Anunciaçāo, E. A. Da Germano Filho, P. & Oliveira, J. A. (2013). Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000210>). Acesso em 14 Jan 2013.

Barbosa, R. L., Pierozzi, N. I., Lombello, R. A., Silvarolla, M. B., & Pinto-Maglio, C. A. (2001). Caracterização citomolecular de três espécies de *Coffea* L: *C. eugenioides*, *C. canephora* e *C. dewevrei*.

Barret, S.C.H. (1992). Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: S.C.H. Barret (ed.). Evolution and function of heterostyly. Spring-Verlag. Berlin, 1-24.

Barrett, S.C.H. & Richards, J.H. (1990). Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of New York Botanical Garden* 55: 35-61.

Barros e Silva, A.E. Marques, A. Santos, K.G.B. & Guerra M. (2010). The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Research*. 18: 503-514.

Bernardos, S.; Tyteca, D. & Amich, F. (2004). Cytotaxonomic study of some taxa of the subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) from the Iberian Peninsula. *Israel Journal of Plant Science* 52: 161-170.

Biondo, E. Miotto, S.T.S. Schifino-Wittmann, M.T. & Castro, B. (2005). Cytogenetics and Cytotaxonomy of Brazilian Species of *Senna* Mill. (Cassieae - Caesalpinioideae - Leguminosae). *Caryologia* 58 (2): 152-163.

Bremekamp, C. E. B. (1966). Remarks on the position, the delimitation, and the subdivision of the Rubiaceae. *Acta Bot. Neerl.* 15: 1-33. 35

Bremer, B. & Eriksson, O. (1992). Evolution of fruit characters and dispersal modes in the tropical family Rubiaceae. *Biol. J. Lin. Soc.* 47: 79-95.

Bremer, B. & Eriksson, O. (2009). Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamily, and tribes. *Int. J. Plant Sci.* 170: 766-793.

Bremer, B. (1996). Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. *Opera Botanica Belgica* 7: 33-50.

Bremer, B. (2009). A Review of Molecular Phylogenetic Studies of Rubiaceae. Ann. Missouri Bot. Gar. 96(1): 4-26.

Bremer, B. Andreasen, K. & Olsson, D. (1995). Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. Annals Missouri Botanical Garden 82: 383-397.

Cabral, E. L. (1991). Rehabilitación del género *Galianthe* (Rubiaceae). Rehabilitation of the genus *Galianthe* (Rubiaceae.) Bol. Soc. Argent. Bot, 27(3-4), 235-249.

Clarindo, W. R., Carvalho, C. R. D., & Fontes, M. A. (2003). Bandeamento NOR e coloração com laranja de acridina em cromossomos metafásicos obtidos de agregados celulares de *Coffea canephora*.

Corrêa AM. (2004). Estudos cromossômicos em espécies de Rubiaceae (A. L. de Jussieu) de cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

Corrêa AM. (2007). Citotaxonomia de representantes da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) nos cerrados do estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

Corrêa, A. M., & Forni-Martins, E. R. (2004). Chromosomal studies of species of Rubiaceae (AL de Jussieu) from the Brazilian cerrado. Caryologia, 57(3), 250-258.

Dahmer, N. Simon, M.F. Schifino-Wittmann, M.T. Hughes, C.E. Miotto, S.T.S. & Giuliani, J.C. (2011). Chromosome numbers in the genus *Mimosa* L.: cytotaxonomic and evolutionary implications. Plant Syst Evol 291: 211-220.

Darlington, C. D., & Wylie, A. P. (1956). Chromosome atlas of flowering plants. Chromosome atlas of flowering plants.

Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., Ruhsam, M., Moat, J. & Brummitt, N. A. (2009). A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96(1): 68-78. 38.

Delprete, P. G. (1999). *Rondeletieae (Rubiaceae). Part I. Flora Neotropica Monographs* 77: 1-226.

Delprete, P.G. & Jardim, J. G. (2012). Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia* 63(1): 101-128.

Dessein, S. (2003). Systematic studies in the Spermaceae (Rubiaceae).

Dobigny, G., Ducroz, J. F., & Robinson, T. J. (2004). Cytogenetics and cladistics. *Systematic Biology*, 53(3), 470-484.

Forni-Martins, E.R. & Calligaris, K.P. (2002). Chromosomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismataceae). *Aquatic Bot* 74: 33-41.

Forni-Martins, E.R. & Martins, F.R. (2000). Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genet Mol Biol* 23 (4): 947-955.

Forni-Martins, E.R.; Mansanares, M.E. & Semir, J. (2007b). Cytotaxonomy of *Lychnophoriopsis* Schultz-Bip. and *Paralychnophora* MacLeish species (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae). *Bot J Linn Soc* 154: 109-114.

Groeninckx, I., Dessein, S., Ochoterena, H., Persson, C., Motley, T. J., Kårehed, J., ... & Smets, E. (2009). Phylogeny of the Herbaceous Tribe Spermaceae (Rubiaceae) Based on Plastid DNA Data 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 109-132

Govaerts, R. Andersson, L. Robbrecht, E. Bridson, D. Davis, A. Schanzer, I. & Sonke, B. (2006). World Checklist of Rubiaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.kew.org/wcsp/rubiaceae/>.

Guerra, M. (2012). Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3), 703-710.

Guerra, M. (1988). *Introdução à Citogenética Geral*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 142pp.

Guerra, M., & Souza, M. D. (2002). *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto: FUNPEC, 201.

Guerra M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120: 339–350.

Guerra, M (2012). Cytotaxonomy: The end of childhood.

Heslop-Harrison JSP, Schwarzacher T. (2011). Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant J*; 66: 18-33.

Hooker, J.D. (1873). LXXXIV. Rubiaceae. In: G. Bentham & J. D. Hooker (eds.). *Genera Plantarum ad exemplaria imprimis in herbariis kewensibus servata definita*. Lovell Reeve & Co., London. 2: 7-151.

- Kårehed, J., Groeninckx, I., Dessein, S., Motley, T. J., & Bremer, B. (2008). The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3), 843-866.
- Kiehn, M. (1985). Karyosystematische Untersuchungen an Rubiaceae: Chromosomenzählungen aus Afrika, Madagaskar und Mauritius. *Pl. Syst. Evol.* 149: 89–118.
- Kiehn, M. (1996). Chromosomes of Rubiaceae occurring in Malesia, the Philippines, New Guinea, and the Pacific. *Opera Bot. Belg.* 7: 249–260.
- Kiehn, M. (2010). Chromosomes of Neotropical Rubiaceae. I: Rubioideae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 97: 91-105.
- Krug, C. A. (1934). Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. *Bol. Téc. do Instituto Agrônômico de Campinas* 11 : 1-8.
- Lepelley, M., Mahesh, V., McCarthy, J., Rigoreau, M., Crouzillat, D., Chabrillange, N., ... & Campa, C. (2012). Characterization, high-resolution mapping and differential expression of three homologous PAL genes in *Coffea canephora* Pierre (Rubiaceae). *Planta*, 236(1), 313-326.
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.
- Lewis, W. H. (1962c). Chromosome numbers in North American Rubiaceae. *Brittonia*, 14, 3: 285-290.
- Lewis, W. H. (1966). Chromosome numbers of *Oldenlandia corymbosa* (Rubiaceae) from Southeastern Asia. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 53, 2: 257-258.
- Mabberley, D.J. (2008). *Mabberley's plant book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. Cambridge University Press, Cambridge. 1019p.

Machado, O. A. (2007). Variações florais e heterostilia em *Palicourearigida* (Rubiaceae) nos cerrados do Brasil central. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Maddison WP & Maddison DR. (2015). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. Disponível em: < <http://mesquiteproject.org/> >

Miège J. (1962). Nombres chromosomiques de plantes d'Afrique Occidentale. *Rev. Cytol. et. Biol. Vég.* 15, 4: 373-384.

Moraes, A. P., Souza-Chies, T. T., Stiehl-Alves, E. M., Burchardt, P., Eggers, L., Siljak-Yakovlev, S., ... & Viccini, L. F. (2015). Evolutionary trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(1), 27-49.

Moraes, A.P.Souares Filho, W.S. Guerra, M. (2007).Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res* 15: 115-121

O'Brien S.J., Menotti-Raymond M., Murphy W.J., Nash W.G., Wienberg J., Stanyon R., Copeland N.G., Jenkins N.A., Womack J.E., Marshall Graves J.A. (1999) The promise of comparative genomics in mammals. *Science*, 286,458–481.

Peruzzi, L. (2013). "x" is not a bias, but a number with real biological significance. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(4), 1238-1241.

Pierozzi, N. I., & Jung Mendacolli, S. L. (1997). Karyotype and C-band analysis in two species of *Genipa* L. (Rubiaceae, Gardenieae Tribe). *Cytologia*, 62(1), 81-90.

Pierozzi, N. I., Pinto-Maglio, C. A., & Cruz, N. D. (1999). Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-band techniques. *Caryologia*, 52(1-2), 1-8.

Pierozzi, N. I. (2013). "Orcein, C-and NOR-banding on mitotic chromosomes of some wild diploid coffee species (*Coffea* L.)." *Caryologia* 66.1: 76-83.

- Pinto-Maglio, C. A. F. & Cruz, N. D. da. (1988). Pachytenechromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. Arabica* L. *Complement Caryologia* 51: 19-35.
- Pinto-Maglio, C. A. F. (2006). Cytogenetics of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(1): 37-44.
- Pinto-Maglio, C. A. F., Cuiséllar, T. & Barbosa, R. L. (2000). Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. In I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Resumos expandidos. Poços de Caldas – MG 1: 444-446.
- Pinto, R. B., de Freitas Mansano, V., Torke, B. M., & Forni-Martins, E. R. (2015). Evidence for a conserved karyotype in *Swartzia* (Fabaceae, Papilionoideae): Implications for the taxonomy and evolutionary diversification of a species-rich neotropical tree genus. *Brittonia*, 1-9.
- Pires, J. C., & Hertweck, K. L. (2008). A Renaissance of Cytogenetics: Studies in Polyploidy and Chromosomal Evolution 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95(2), 275-281.
- Roa F. & Guerra M. (2012). Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*; 12: 225.
- Robbrecht, E. & Manen, J.F. (2006). The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcl*, *rps16*, *trnL*-*trnF* and *atpB-rbcl* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. *Syst. Geogr. Pl.* 76: 85–146.
- Robbrecht, E. (1988). Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Bélgica* 1: 1-127.

Salas, R. M., Viana, P. L., Cabral, E. L., Dessen, S., & Janssens, S. (2015). *Carajasia* (Rubiaceae), a new and endangered genus from Carajás mountain range, Pará, Brazil. *Phytotaxa*, 206(1), 14-29.

Salas, R.M., Soto, J.D. & Cabral, E.L. (2011) Dos nuevas especies de *Borreria*, un nuevo registro de *Declieuxia* y observaciones taxonómicas en Rubiaceae de Bolivia. *Brittonia* 63 (2): 286–294.

Schubert, I., & Lysak, M. A. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27(6), 207-216.

Shivakumar, P. M. & M. S. Chennaveeraiah. (1983). In: IOPB chromosome number reports LXXVIII. *Taxon* 32: 140. / Selvaraj, R. 1987. Karyomorphological

Silva, C. R., Lopes, F. R., Carareto, C., Vanzela, A. L., Domingues, D. S., & Pereira, L. F. (2011). Distribuição de elementos transponíveis em cromossomos de *Coffea arabica*.

Stace, C.A. (1989). *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2 edition. Cambridge University Press, New York. 264pp

Stebbins, G. L. (1966). Chromosomal variation and evolution. *Science*, 152(3728), 1463-1469.

Struwe, L. Albert, V.A. & Bremer, B. "1994" (1995). Cladistics and family-level classification of the Gentianales. *Cladistics* 10: 175-206.

Terrell, E. E., W. H. Lewis, H. Robinson, H. & J. W. Nowicke. (1986). Phylogenetic implications of diverse seed types, chromosome numbers, and pollen morphology in *Houstonia* (Rubiaceae). *Amer. J. Bot.* 73(1): 103–115.

Verdcourt, B. (1958). Remarks on the classification of the Rubiaceae. *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles* 28: 209-281.

JOÃO PAULO SARDIN NASÁRIO

## **CAPÍTULO II**

Tendências na evolução do número cromossômico na  
Tribo Spermaceae *sensu stricto* (Rubiaceae)

CAMPINAS

2018

## Resumo

O “renascimento da citogenética” tem acontecido com o desenvolvimento de novos métodos que permitem a associação de análises filogenéticas e citogenéticas, juntamente com o avanço da biologia molecular, a citometria de fluxo e a bioinformática. Este estudo objetivou investigar a evolução cariotípica à luz da sistemática da tribo Spermaceae s.s *sensu* Karehed *et al.* (2008) e sob nova proposta filogenética, a fim de melhor compreender os processos envolvidos na sua diversificação. A partir do número diploide foi determinado o número básico e o nível de ploidia para cada linhagem do clado, e plotados como dados categóricos, utilizando o programa Mesquite, sob máxima parcimônia e probabilidade, aplicando a análise de reconstrução caráter ancestral. Para as análises filogenéticas foram utilizados três marcadores plastidiais (*rps16*, *atpB-rbcL* e *trnL-trnF*) e dois marcadores nucleares (*ETS* e *ITS*). As sequências foram obtidas através do GenBank (NCBI) e em seguida, alinhadas e analisadas sob Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. O número básico ancestral mais parcimonioso sugerido para a tribo é de  $x=14$ , sendo constatados alguns eventos de poliploidia. A evolução cromossômica para o clado Spermaceae foi majoritariamente  $x=14$ . A evolução do número cromossômico do clado parece não divergir em relação a filogenia proposta no trabalho e a encontrada na literatura.

## 1- introdução

A subfamília Rubioideae (Rubiaceae) é representada em sua maioria por espécies herbáceas, e suas relações sistemáticas parecem não estar bem definidas, apresentando lacunas que impossibilitam o estabelecimento de características consistentes para as suas tribos, gêneros e espécies (Robbrecht & Manen 2006; Groeninckx et al. 2009).

Nos últimos 20 anos, três diferentes conceitos foram propostos para a tribo Spermacoce (Subfamília Rubioideae) e vem sendo consideravelmente modificada (Salas et al. 2015). As três definições são as seguintes: 1) Baseado em caracteres morfológicos Robbrecht (1988), propôs a definição clássica que inclui aproximadamente 20 gêneros (Terrell & Wunderlin 2002), que ainda é aceita por alguns autores, 2) Baseado em estudos moleculares, Bremer (1996) propôs o conceito mais amplo de Spermacoceae, e incluiu as tribos Knoxieae, Triainolepideae, Hedyotideae e Manettieae em sua circunscrição e 3) A definição de Anderson & Rova (1999) que reconheceram Knoxieae como uma tribo separada de Spermacoceae, redefinindo a proposta de Bremer (1996), que atualmente é a mais aceita pelos autores e muitas vezes é citada como Spermacoceae *sensu lato* (s.l.) (Dessein 2003; Robbrecht & Manen 2006; Groeninckx et al. 2009). A proposta de Bremer (1996) modificada por Anderson e Rova (1999) (Spermacoceae s.l.) é adotada no presente trabalho.

A tribo Spermacoceae s.l. totaliza 61 gêneros, contendo aproximadamente 1235 espécies, de acordo com a atualização de gêneros dos últimos trabalhos (Robbrecht & Manen 2006, Groeninckx et al. 2009 e Salas et al. 2015). Embora não existam sinapomorfias morfológicas que suportem a tribo, novos gêneros vêm sendo inseridos na tribo, baseados em combinações de dados morfológicos e evidências moleculares (Groeninckx et al. 2009 e Salas et al. 2015).

Spermacoceae *sensu stricto* (s.s.), reconhecido como clado Spermacoce em estudos filogenéticos, é tradicionalmente delimitado por vários autores (Hooker 1873; Bremekamp 1952, 1966; Verdcourt 1958; Robbrecht 1988, 1993), caracterizando-se pela presença de ráfides, estípulas fimbriadas, ovários biloculares com uma semente por lóculo, sementes com uma ranhura adaxial aparente e ocorrência frequente de grãos de pólen pluriaperturados (Groeninckx et al. 2009), sendo, geralmente, plantas herbáceas e formam um grupo monofilético (Salas et al. 2015). O clado Spermacoce (Spermacoceae s.s.) na América é representado por cerca de 23 gêneros, cujas relações ainda são pouco definidas. Alguns desses gêneros estão sendo revisados, como *Diodella* e o complexo *Borreria-Spermacoce*, para os quais evidências moleculares têm questionado seus limites quando

apenas baseados em caracteres morfológicos (Salas *et al.* 2011). Por outro lado, alguns gêneros têm apresentado maior consistência em suas posições, baseado em características morfológicas e apoiadas por dados moleculares, como em *Crusea*, *Descantia*, *Ernodea*, *Emmeorhiza*, *Galianthe*, *Hexasepalum*, *Mitracarpus*, *Psyllocarpus*, *Richardia* e *Staelia*, porém são necessários estudos mais detalhados (Dessein 2003, Karehed *et al.* 2008 e Salas *et al.* 2015). Dentro de cada gênero, as relações interespecíficas precisam ser analisadas com mais cuidado. Alguns gêneros monoespecíficos, como *Anthospermopsis*, *Carajasia*, *Diacrodon*, *Emmeorhiza*, *Hydrophylax*, *Nodocarpea*, *Micrasepalum*, *Schewndenera*, *Tortuella* e *Tobagoa* (Salas *et al.* 2015) também compõem a tribo.

O uso de dados cromossômicos associados a estudos de sistemática vegetal é essencial para o entendimento da evolução cromossômica e diversificação das espécies (Moraes *et al.* 2015). Segundo Acosta *et al.* (2016), as informações cromossômicas podem ser poderosas ferramentas para a inferência de relações filogenéticas, uma vez que são elementos hereditários e carregam informações de todo o genoma nuclear. Ainda que existam alguns trabalhos contendo dados citogenéticos de espécies nativas no clado Spermacece, não há uma investigação comparada e filogenética entre eles, principalmente em nível de tribo, estando disponíveis em sua maioria contagens cromossômicas e algumas características cariotípicas, porém nenhuma delas relacionadas à filogenia do grupo. Kiehn (1995) realizou uma análise cariológica incluindo número básico, níveis de ploidia entre outros caracteres de tribos e subtribos de Rubiaceae. Segundo Robbrecht (1988), algumas contagens mostraram-se incertas, não sendo suficientes para determinar o número básico da maioria dos táxons em estudo.

Os cromossomos evoluem através de rearranjos primários e secundários e também por alterações em seus níveis de ploidia, que podem ser subsequentes à hibridização interespecífica ou erros mitóticos ou meióticos. Ao observar a evolução dos cromossomos, por meio de diferentes abordagens experimentais, novos pontos de vista podem ser observados, como por exemplo, a reinterpretação do próprio número básico de cromossomos entre outros arranjos cromossômicos. (Schubert, 2007).

Os frequentes rearranjos cromossômicos ao longo do tempo, dificultam o entendimento do número e ordem dos eventos que aconteceram em uma linhagem (Schubert & Lysak 2011). Portanto, o uso de dados cromossômicos combinados com inferências evolutivas, inseridos em um contexto filogenético, deve ser encorajado (Guerra 2012). Segundo Pires & Hertweck 2008, o “renascimento da citogenética” tem acontecido com o desenvolvimento de novos métodos que permitem a associação de análises

filogenéticas e citogenéticas, juntamente com o avanço da biologia molecular, a citometria de fluxo, a bioinformática e a filogenia (Acosta *et al.* 2016).

Os dados sobre número cromossômico em Spermacoceae são raros e, além disso, encontram-se dispersos na literatura. Isso tem dificultado a elaboração de inferências evolutivas para a tribo Spermacoceae. Sendo assim, este estudo objetivou investigar a evolução cariotípica à luz da sistemática do clado Spermacoce (sensu Karehed *et al.* 2008) comparada a uma nova proposta filogenética, a fim de melhor compreender os processos envolvidos na sua diversificação e estabelecer um panorama mais claro sobre suas relações evolutivas e taxonômicas.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Evolução cromossômica baseada na hipótese filogenética *sensu* Karehed *et al.* 2008

Utilizando o banco de dados citogenéticos (Capítulo 1), foi feita a reconstrução de caráter ancestral para cada táxon dentro do Clado Spermacoce, com base na hipótese filogenética de Karehed *et al.* (2008). Foram utilizados o número diploide ( $2n$ ), o nível de ploidia e o número básico ( $x$ ) como dados categóricos na reconstrução filogenética.

De acordo com Guerra (2000), o número básico ( $x$ ) é o número que explica o mais parcimoniosamente possível a variabilidade cromossômica de um grupo e que demonstra um claro relacionamento com os números básicos de grupos próximos relacionados. De modo geral, o número básico ( $x$ ) é o número cromossômico base de uma linhagem. Dessa forma, levantamos os dados cromossômicos para as espécies (em plataformas *on line* e obras de referências, Cap. 1) com dados disponíveis em cada gênero e postulamos um possível número básico para cada gênero, que foi aplicado para as suas respectivas espécies (Stebbins 1966; Guerra 2008; Peruzzi 2013; Moraes *et al.* 2015).

Contagens cromossômicas para os grupos externos *Oldenlandia*, *Bouvardia*, *Arcytophyllum* e *Manettia*, que são gêneros pertencentes a *Spermacoceae s.l.*, também foram levantados para a reconstrução de caráter ancestral e foram utilizados como grupo-irmão do Clado Spermacoce. Para o gênero *Nesohedyotis* que também aparece como gênero externo, não foram encontrados dados cromossômicos. Foi utilizado o programa Mesquite v.3.04 (Maddison & Maddison 2015) sob máxima parcimônia (MP), aplicando a análise de reconstrução caráter ancestral.

Tabela 1: Matriz de dados cromossômicos utilizada para a reconstrução de caráter ancestral do clado Spermacoce baseado na hipótese filogenética *sensu* Karehed *et al.* 2008. 2n = número diploide, x = número básico postulado. \* = grupo externo.

	2n	x	Ploidia
<i>Manettia luteo-rubra</i> *	22	9,11	2x
<i>Manettia lygistium</i> *	-	9,11	-
<i>Manettia alba</i> *	-	9,11	-
<i>Arcytophyllum serpyllaceum</i> *	-	18	-
<i>Bouvardia sp.</i> *	-	18	-
<i>Bouvardia ternifolia</i> *	36	18	2x
<i>Bouvardia glaberrima</i> *	-	18	-
<i>Nesohedyotis arborea</i>	-	-	-
<i>Oldenlandia tenuis</i> *	-	9	-
<i>Oldenlandia salzmanii</i> *	-	9	-
<i>Galianthe sp.</i>	-	8,11	-
<i>Galianthe eupatorioides</i>	-	8,11	-
<i>Galianthe brasiliensis</i>	30	8,11	2x
<i>Diodia spicata</i>	-	14	-
<i>Emmeorhiza umbellata</i>	28	14	2x
<i>Crusea megalocarpa</i>	28	14	2x
<i>Crusea calocephala</i>	56	14	8x
<i>Spermacoce flageliformis</i>	-	14	-
<i>Spermacoce prostrata</i>	-	14	-
<i>Spermacoce erosa</i>	-	14	-
<i>Richardia stellaris</i>	-	14	-
<i>Richardia brasiliensis</i>	28	14	2x
<i>Richardia scabra</i>	56	14	4x
<i>Spermacoce confusa</i>	28	14	2x
<i>Spermacoce verticilata cult</i>	28	14	2x
<i>Spermacoce verticilata Mad</i>	28	14	2x
<i>Spermacoce capitada</i>	-	14	-
<i>Spermacoce remota</i>	28	14	2x
<i>Spermacoce ocymifolia French</i>	-	14	-
<i>Spermacoce ocymifolia Ecu</i>	-	14	-
<i>Mitracarpus microsperma</i>	-	14	-
<i>Mitracarpus frigidus</i>	-	14	-
<i>Psylocarpus laricoides</i>	28	14	2x
<i>Diodela teres</i>	28	14	2x
<i>Ernodea litorallis</i>	0	7	2x
<i>Spermacoce ruelliae</i>	56	14	4x
<i>Spermace hispida</i>	56	14	4x

<i>Spermacoce filituba</i>	-	14	-
<i>Spermacoce filifolia</i>	-	14	-
<i>Hydrophylax maritima</i>	56	28	2x
<i>Diodia sarmentosa</i>	-	14	-
<i>Diodia aulacosperma</i>	-	14	-

## 2.2. Evolução cromossômica proposta a partir de nova filogenia

### 2.2.1 Banco de dados moleculares

Para as análises filogenéticas, o maior número de representantes com dados moleculares do clado Spermacoce e táxons adjacentes pertencentes aos grupos externos escolhidos, foram incluídos em nossa amostragem. Foram incluídas 53 espécies da Tribo Spermacoceae *sensu stricto* e como grupo externo utilizamos 2 espécies de *Bouvardia*. Foram utilizados três marcadores plastidiais (*rps16*, *atpB-rbcL* e *trnL-trnF*) e dois marcadores nucleares (*ETS* e *ITS*), as sequências foram obtidas através do GenBank® (NCBI). Encontram-se disponíveis na Tabela 2 as informações sobre as espécies amostradas e voucher do GenBank. As sequências referentes aos cinco marcadores foram concatenadas em uma matriz de dados em formato FASTA e alinhadas utilizando o programa MAFFT v.7 disponível em: (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) em seguida foram ajustadas manualmente com a ajuda do programa Mesquite® v.3.0 (Maddison & Maddison, 2014).

Tabela 2: Espécies da tribo Spermacoceae s.s. amostradas e vouchers do Genbank. \* = grupo externo.

	ETS	ITS	rps16	atpB-rbcL	trnL-trnF
<b><i>Bouvardia glaberrima</i> *</b>	AM932922	AM939432	-	EU542925	EU543084
<b><i>Bouvardia ternifolia</i> *</b>	KF737029	-	AF002758	-	-
<b><i>Crusea calocephala</i></b>	-	AM939438	-	EU542930	EU543088
<b><i>Crusea megalocarpa</i></b>	AM932929	AM939439	EU543025	EU542931	EU543089
<b><i>Diodella teres</i></b>	AM932933	AM939443	-	-	-
<b><i>Diodia aulacosperma</i></b>	M932934	AM939444	-	EU542934	EU543092
<b><i>Diodia sarmentosa</i></b>	-	KF737005	AF002762	-	-

<i>Diodia spicata</i>	AM933008	AM939535	EU543027	EU542935	EU543093
<i>Diodia virginiana</i>	-	KF737008	AY764288	-	-
<i>Emmeorrhiza umbellata</i>	AM932935	AM939445	AY764289	EU542936	EU543094
<i>Ernodea littoralis</i>	AM932936	AM939446	AF002763	AJ234025	EU543095
<i>Galianthe brasiliensis</i>	AM932937	AM939447	AY764290	EU542938	EU543096
<i>Galianthe eupatorioides</i>	AM932938	AM939448	U543028	EU542939	EU543097
<i>Galianthe peruviana</i>	KF737056	KF737014	-	-	-
<i>Hydrophylax maritima</i>	-	-	AM117316	EU567457	-
<i>Mitracarpus albomarginatus</i>	KM215316	KM215354	-	-	-
<i>Mitracarpus aristatus</i>	KM215327	KM215363	-	-	-
<i>Mitracarpus baturitensis</i>	KM215303	KM215378	KM215458	-	-
<i>Mitracarpus capitatus</i>	KM215328	KM215366	KM215470	-	-
<i>Mitracarpus eichleri</i>	KM215312	KM215376	KM215482	-	-
<i>Mitracarpus eitenii</i>	KM215322	KM215360	-	-	-
<i>Mitracarpus federalensis</i>	KM215318	KM215357	KM215466	-	-
<i>Mitracarpus frigidus</i>	KM215319	AM939488	KM215468	EU542974	EU543128
<i>Mitracarpus glabrescens</i>	KM215330	KM215367	KM215471	-	-
<i>Mitracarpus hirtus</i>	KM215339	KM215374	KM215480	-	-
<i>Mitracarpus lhotzkyanus</i>	KM215315	KM215353	KM215464	-	-
<i>Mitracarpus megapotamicus</i>	KM215325	KM215361	KM215465	-	-
<i>Mitracarpus microspermus</i>	KM215313	KM215351	KM215462	EU542975	-
<i>Mitracarpus portoricensis</i>	KM215320	KM215359	-	-	-
<i>Mitracarpus recurvatus</i>	KM215317	KM215356	KM215467	-	-

<b><i>Mitracarpus schinianus</i></b>	KM215326	KM215355	KM215469	-	-
<b><i>Mitracarpus steyermarkii</i></b>	KM215311	KM215349	KM215479	-	-
<b><i>Psyllocarpus asparagoides</i></b>	KM215337	KM215372	AF003611	-	-
<b><i>Psyllocarpus laricoides</i></b>	AM933005	AM939531	-	-	-
<b><i>Richardia brasiliensis</i></b>	KM215334	KM215369	KM215474	-	-
<b><i>Richardia grandiflora</i></b>	KM215335	KM215370	KM215475	-	-
<b><i>Richardia humistrata</i></b>	KF737067	KF737028	-	-	-
<b><i>Richardia scabra</i></b>	AM933006	AM939532	AF003614	EU543005	EU543156
<b><i>Spermacoce alata</i></b>	KF737035	MF063719	-	-	-
<b><i>Spermacoce breviflora</i></b>	KF737062	KF737019	-	-	-
<b><i>Spermacoce capitata</i></b>	MF166811	MF166822	EU543069	EU543007	EU543158
<b><i>Spermacoce confusa</i></b>	KF737063	KF737020	AF003619	-	-
<b><i>Spermacoce erosa</i></b>	AM933009	AM939537	EU543070	EU543008	EU543159
<b><i>Spermacoce filifolia</i></b>	-	-	KT252879	KT252889	KT252882
<b><i>Spermacoce filituba</i></b>	AM933011	AM939539	EU543071	EU543009	EU543160
<b><i>Spermacoce glabra</i></b>	KF737064	KF737022	-	-	-
<b><i>Spermacoce hispida</i></b>	AM933017	AM939540	EU543073	EU543011	EU543162
<b><i>Spermacoce marginata</i></b>	-	-	KT25288	KT252890	KT252883
<b><i>Spermacoce ocymifolia</i></b>	KM215323	AM939463	-	EU542952	EU543108
<b><i>Spermacoce princeae</i></b>	HM042507	HM042452	HM042566	-	HM042585
<b><i>Spermacoce prostata</i></b>	AM933012	AM939541	-	EU543012	EU543163
<b><i>Spermacoce remota</i></b>	AM933013	AM939542	-	EU543013	EU543164
<b><i>Spermacoce ruelliae</i></b>	AM933014	AM939543	EU543074	EU543014	EU543165
<b><i>Spermacoce tenuior</i></b>	KF737065	KF737023	-	-	-

<b><i>Spermacoce verticilata</i></b>	MF166811	-	-	-	-
<b><i>Staelia aurea</i></b>	KM215338	KM215373	KM215478	-	-
<b><i>Staelia galioides</i></b>	KM215340	KM215375	KM215481	-	-

### 2.2.2. Análise de parcimônia (MP)

A análise de máxima parcimônia foi feita usando o PAUP v.4.0b (Swofford, 2000). Foi realizada uma busca heurística para as árvores mais parcimoniosas (MPT) incluindo uma rodada inicial de buscas de árvores com 1000 repetições usando ordem aleatória de entrada de táxons (RASR-random addition sequence replicates) e o algoritmo TBR (Tree Bisection Reconnection; branch-swapping; MultiTress), sendo salvas no máximo 100 árvores em cada replicação. Uma segunda rodada de buscas heurísticas foi realizada usando as árvores mais curtas que estavam salvas e aplicando novamente o algoritmo TBR. A análise de bootstrap (BS) consistiu de 1000 réplicas, usando o procedimento de re-amostragem de bootstrap (Felsenstein, 1985).

### 2.2.3. Inferência Bayesina (BI)

O melhor modelo evolutivo de substituição nucleotídica para cada marcador foi escolhido usando o Bayesia Information Criterion (BIC) no programa jModelTest v.2 (Posada 2008). Para a análise bayesiana foi utilizado o programa MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). As análises consistiram de duas corridas paralelas com quatro cadeias MCMC (Markov Chain Monte Carlo, Yang e Rannala, 1997) executadas por 20.000.000 de gerações e amostradas a cada 2.000 gerações; como ponto de corte excluíram-se os primeiros 25% das amostras (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). Uma árvore de consenso de maioria com as probabilidades posteriores (PP), foi calculada para os nós, salva e editada com o programa FigTree.

### 2.2.4 Evolução cromossômica proposta a partir de nova filogenia

Tendo em vista os mesmos critérios empregados para a reconstrução de caráter ancestral sensu Karehed *et al.* 2008, utilizamos o banco de dados citogenéticos para o levantamento de dados categóricos, sendo eles, o número diploide ( $2n$ ) e o número básico ( $x$ ). A reconstrução filogenética foi feita utilizando o programa Mesquite v.3.04 (Maddison & Maddison 2015) sob máxima parcimônia (MP), aplicando a análise de reconstrução caráter ancestral.

Tabela 3: Matriz de dados cromossômicos utilizada para a reconstrução de caráter ancestral do clado Spermacoce baseado na árvore filogenética proposta pelo presente trabalho.  $2n$  = número diploide,  $x$  = número básico. \* = grupo externo.

	2n	x
<i>Bouvardia glaberrima</i> *	36	9
<i>Bouvardia ternifolia</i> *	36	9
<i>Crusea calocephala</i>	56	14
<i>Crusea megalocarpa</i>	28	14
<i>Hexasepalum teres</i>	28	14
<i>Diodia aulacosperma</i>	28	14
<i>Diodia sarmentosa</i>	-	14
<i>Diodia spicata</i>	28	14
<i>Diodia virginiana</i>	28	14
<i>Emmeorhiza umbellata</i>	28	14
<i>Ernodea litoralis</i>	14	7
<i>Galianthe brasiliensis</i>	30	15
<i>Galianthe eupatorioides</i>	22	11
<i>Galianthe peruviana</i>	16	8
<i>Hydrophylax maritima</i>	56	14
<i>Mitracarpus albomarginatus</i>	-	14
<i>Mitracarpus hirtus</i>	28	14
<i>Mitracarpus lhotzkyan</i>	-	14
<i>Mitracarpus longicalyx</i>	-	14
<i>Mitracarpus megapotamicus</i>	-	14
<i>Mitracarpus microspermus</i>	-	14
<i>Mitracarpus portoricensis</i>	-	14
<i>Mitracarpus recurvatus</i>	-	14
<i>Mitracarpus schinianus</i>	-	14
<i>Mitracarpus steyennarkii</i>	-	14

<i>Psyllocarpus asparagoides</i>	28	14
<i>Psyllocarpus laricoides</i>	28	14
<i>Richardia brasiliensis</i>	28	14
<i>Richardia grandiflora</i>	-	14
<i>Richardia humistrata</i>	28	14
<i>Richardia scabra</i>	56	14
<i>Spermacoce alata</i>	28	14
<i>Spermacoce breviflora</i>	-	14
<i>Spermacoce capitata</i>	-	14
<i>Spermacoce confusa</i>	28	14
<i>Spermacoce erosa</i>	-	14
<i>Spermacoce filifolia</i>	-	14
<i>Spermacoce filituba</i>	-	14
<i>Spermacoce flageliformis</i>	-	14
<i>Spermacoce glabra</i>	28	14
<i>Spermacoce hispida</i>	-	14
<i>Spermacoce marginata</i>	-	14
<i>Spermacoce ocymifolia</i>	-	14
<i>Spermacoce princeae</i>	-	14
<i>Spermacoce prostrata</i>	-	14
<i>Spermacoce remota</i>	-	14
<i>Spermacoce ruelliae</i>	-	14
<i>Spermacoce tenuior</i>	-	14
<i>Spermacoce verticilata</i>	28	14
<i>Staelia aurea</i>	-	14
<i>Staelia galioides</i>	-	14

### 3. Resultados

#### 3.1 Evolução cromossômica baseada na hipótese filogenética *sensu* Karehed *et. al* 2008

Entre as espécies presentes na árvore filogenética de Karehed *et al.* (2008) (42 táxons), há contagem cromossômica para apenas 17 (40%), variando de  $2n=14$  a  $2n=56$  e com nível de ploidia de  $2x$  a  $8x$  (Fig.1) O número básico reconstruído mais parcimonioso para a tribo foi  $x=14$  (Fig.2).

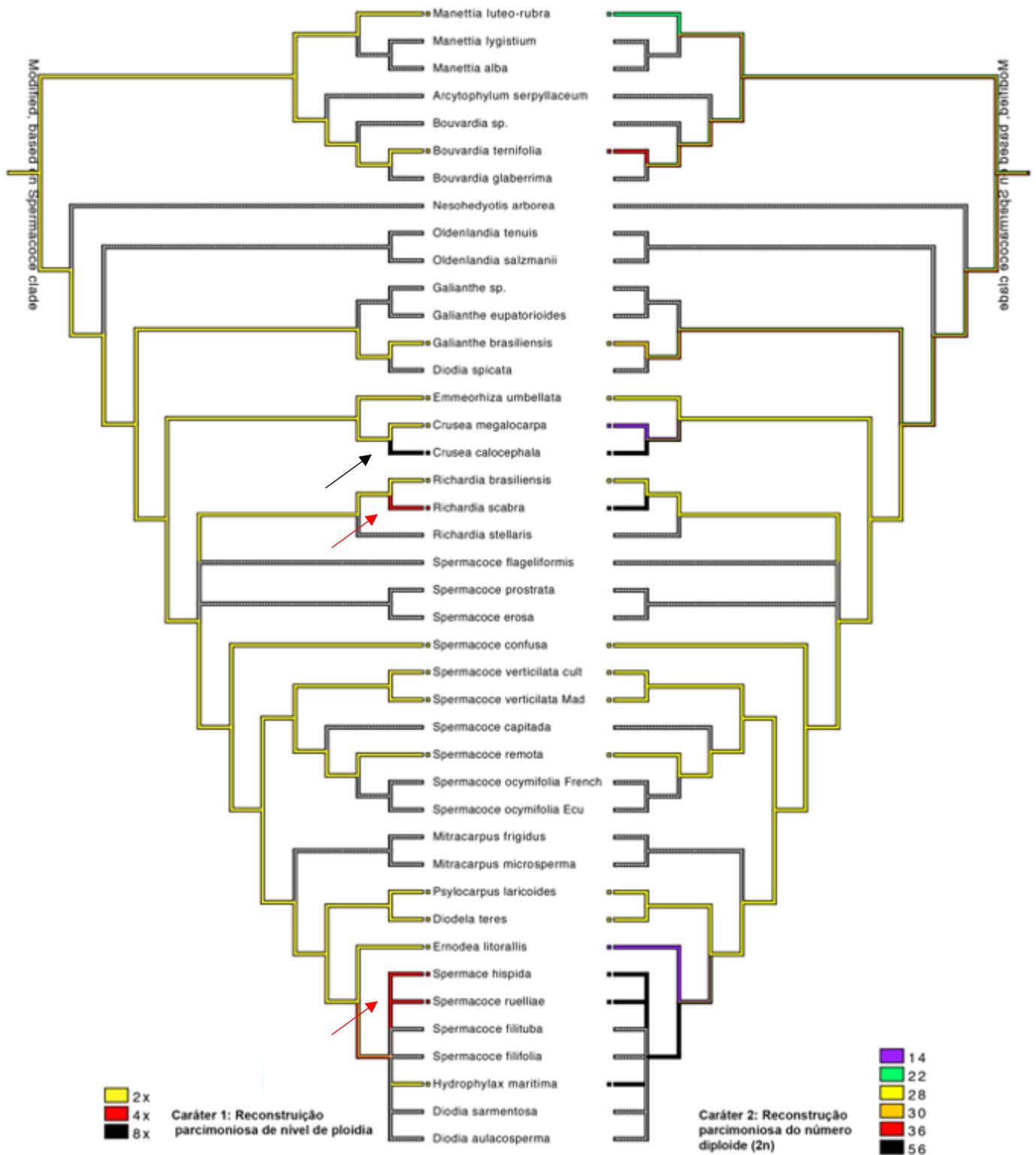


Figura 1: Evolução do número cromossômico diploide ( $2n$ ) e o nível de ploidia ( $x$ ) do clado Spermaceae (Rubiaceae) *sensu* Karehed *et al.* (2008). Os gêneros *Oldenlandia*, *Bouvardia*, *Arcytophyllum* e *Manettia* foram utilizados como grupo externo. Setas: eventos de poliploidia.

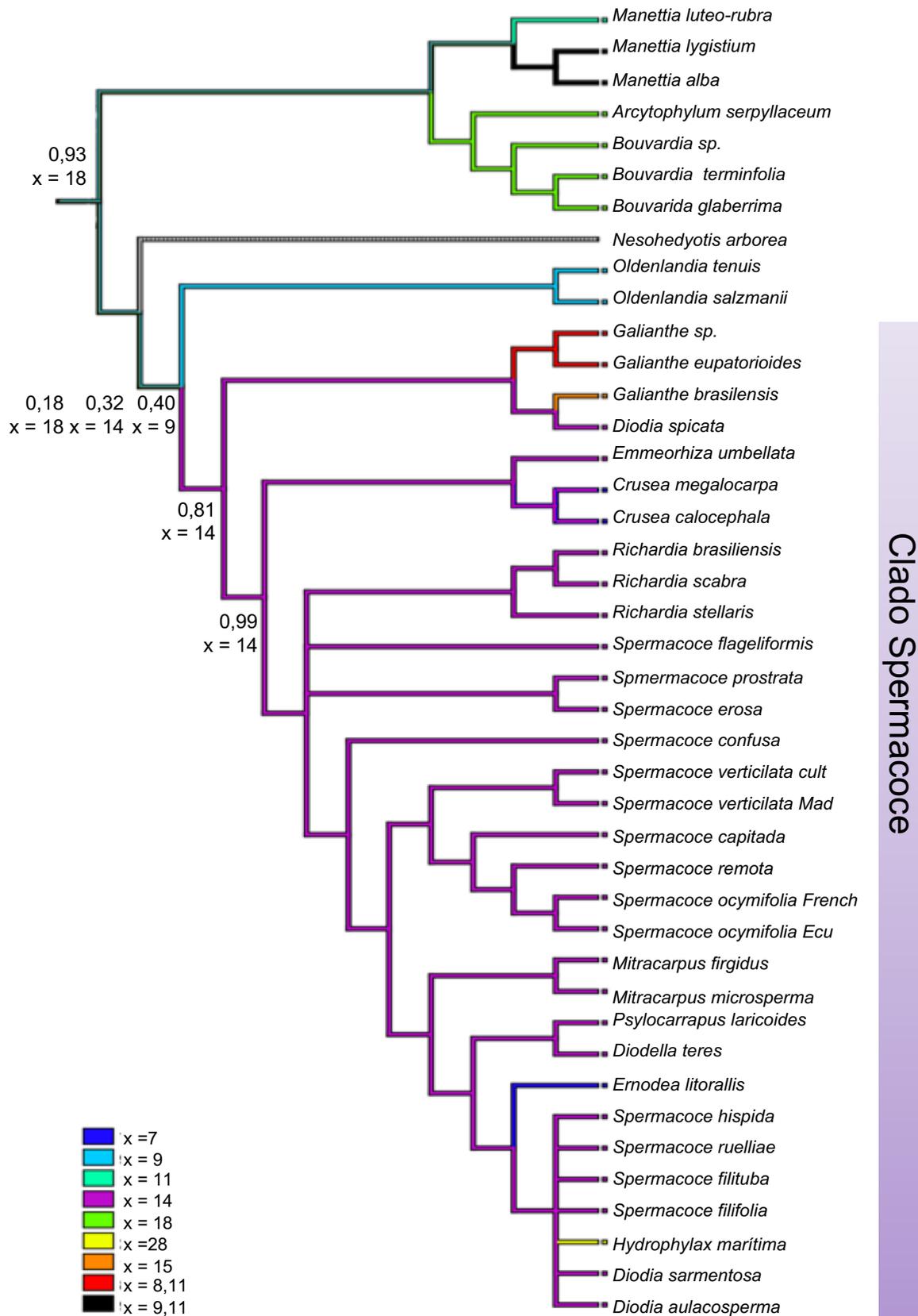


Figura 2: Evolução do número básico do clado Spermacoce (Rubiaceae) *sensu* Karehed *et al.* (2008), com probabilidades. Os gêneros *Oldenlandia*, *Bouvardia*, *Arcytophyllum* e *Manettia* foram utilizados como grupo externo. Número básico mais parcimonioso x = 14.

### 3.2 Sistemática filogenética

A matriz combinada com os cinco marcadores (ITS, ETS, rps16, atpB-rbcL e trnL-trnF) consistiu em 59 terminais e 3665 caracteres alinhados, sendo 431 caracteres informativos para a análise de parcimônia. A árvore mais parcimoniosa (consenso), com o comprimento total de 1856 mudanças, resultou em um índice de consistência 0,385 e de retenção 0,540. Alguns táxons tiveram dados faltantes, sendo 6/57 para o espaçador ETS, 5/57 para ITS e 19/57 para rps16, 34/57 para atpB-rbcL e por fim 35/57 para trnL-trnF. O modelo de substituição nucleotídica selecionado pelo Critério de Informação Bayesiano (BIC) para cada marcador foi: ETS (TPM3uf+G), ITS (SYM+I+G), atpB-rbcL (TPM1uf), rps16 (TPM1uf+G) e trnL-trnF (HKY).

As árvores de Máxima Parcimônia (MP) e Bayesiana (BI) para cada marcador variaram um pouco em sua topologia e tiveram nós com suportes muito baixos. Em relação às matrizes combinadas, não houve absoluta congruência entre as duas hipóteses (Fig.3 e 4). Para a discussão deste capítulo decidimos usar a árvore de consenso de maioria da inferência Bayesiana, onde os valores de bootstrap foram plotados nos ramos correspondentes aos obtidos na árvore de máxima parcimônia. (fig.4).

Alguns táxons que ainda não haviam sido utilizados em outros trabalhos filogenéticos foram incluídos em nossa amostragem. O grupo formado pelo gênero *Crusea* (A), parece estar bem sustentado assim como o grupo formado pelo gênero *Mitracarpus* (B), este gênero ainda não apareceu em outras filogenias e está bem sustentado. O grupo formado por *Psyllocarpus* e *Staelia* (C) e o grupo *Richardia* (D), todos eles apresentam boa sustentação em ambas as análises e aparecem em destaque.

O grupo formado pelo gênero *Spermacoce* difere bastante nas análises, em MP eles aparecem formando um grupo, mesmo que algumas espécies estejam indefinidas na árvore, já na hipótese BI o grupo está ainda mais disperso em com muitas incongruências.

### 3.3 Evolução cromossômica proposta a partir de nova filogenia

A reconstrução de estado ancestral para a árvore gerada é apresentada na figura 5. Quando comparadas, as reconstruções de número básico, para a proposta de Karehed (2008) e a proposta do presente trabalho não apresentam

incongruências em sua hipótese de evolução cromossômica, mesmo que alguns ramos se alterem ou mudem de posição e mesmo ainda que sua classificação sistemática não esteja bem definida, a história cromossômica parece permanecer a mesma, com o número básico mais parcimonioso para o clado  $x=14$ .

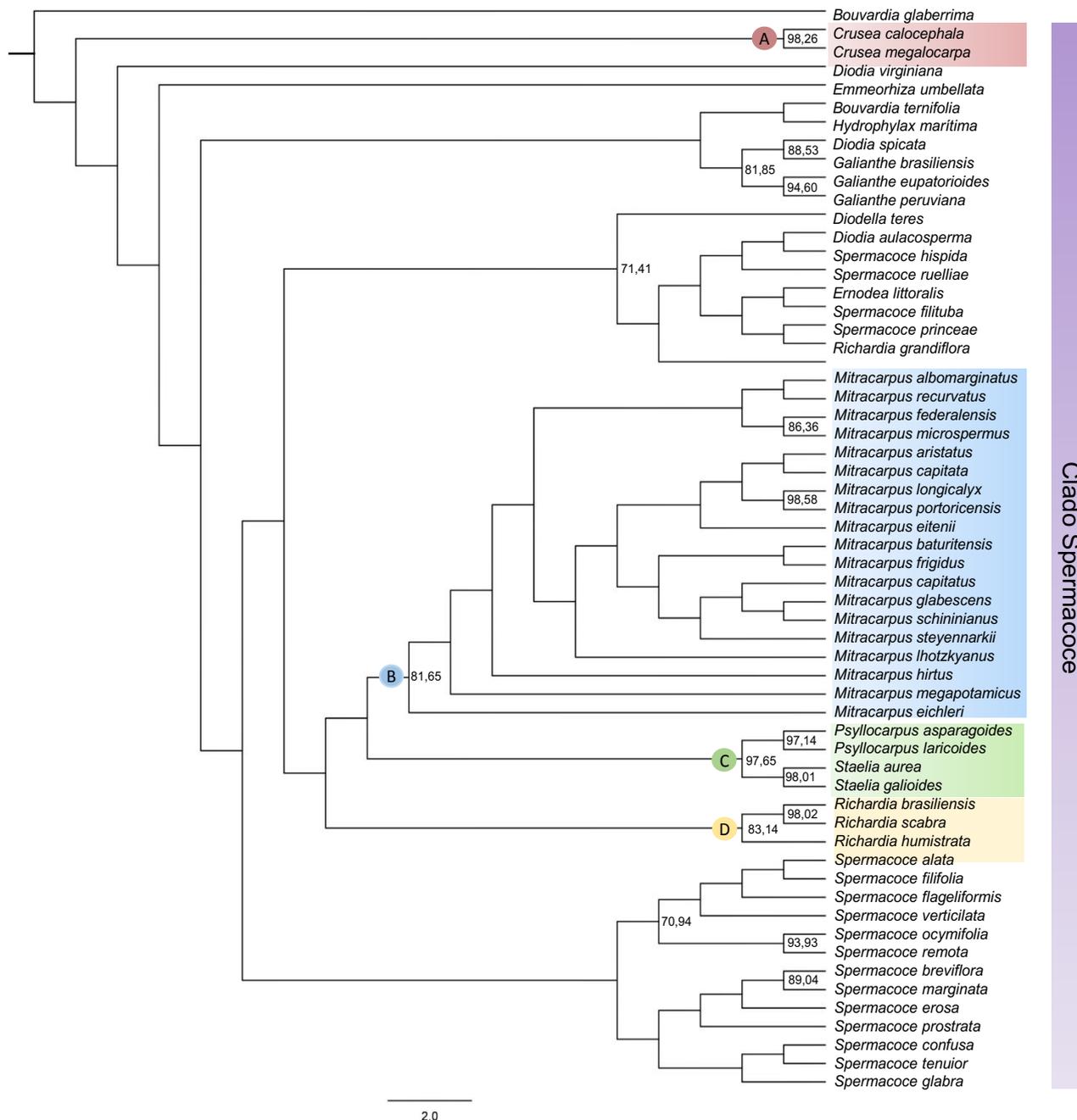


Figura 3: Árvore de estrito consenso do clado Spermacoce gerada pela análise de Máxima Parcimônia (MP) com os valores de bootstrap plotados nos nós (valores >70,0). Os grupos marcados apresentaram boa sustentação na análise. A: Grupo *Crusea*; B: Grupo *Mitracarpus*; C: Grupo *Psyllocarpus-Staelia*; Grupo D: *Richardia*.

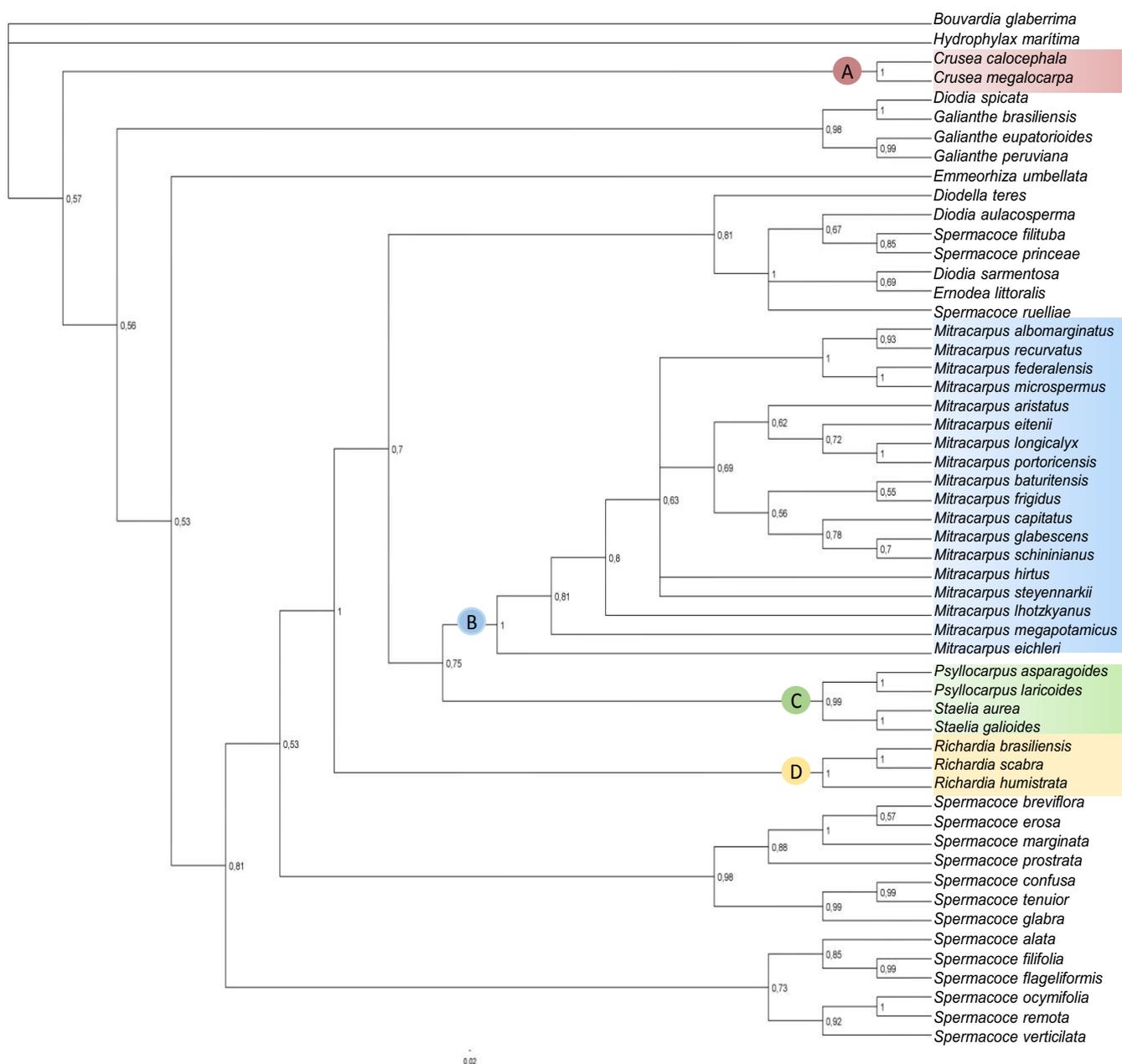


Figura 4: Árvore de consenso do clado Spermacoce de maioria gerada por Inferência Bayesiana (BI) com os valores de nós de probabilidade posterior (PP). Os grupos marcados apresentaram boa sustentação na análise. A: Grupo *Crusea*; B: Grupo *Mitracarpus*; C: Grupo *Psyllocarpus-Staelia*; Grupo D: *Richardia*.



Figura 4b: Árvore de consenso do clado Spermaceae de maioria gerada por Inferência Bayesiana (BI) com os valores de nós de probabilidade posterior (PP) e tamanho de braços. Os grupos marcados apresentaram boa sustentação na análise. A: Grupo *Crusea*; B: Grupo *Mitracarpus*; C: Grupo *Psyllocarpus-Staelia*; Grupo D: *Richardia*.

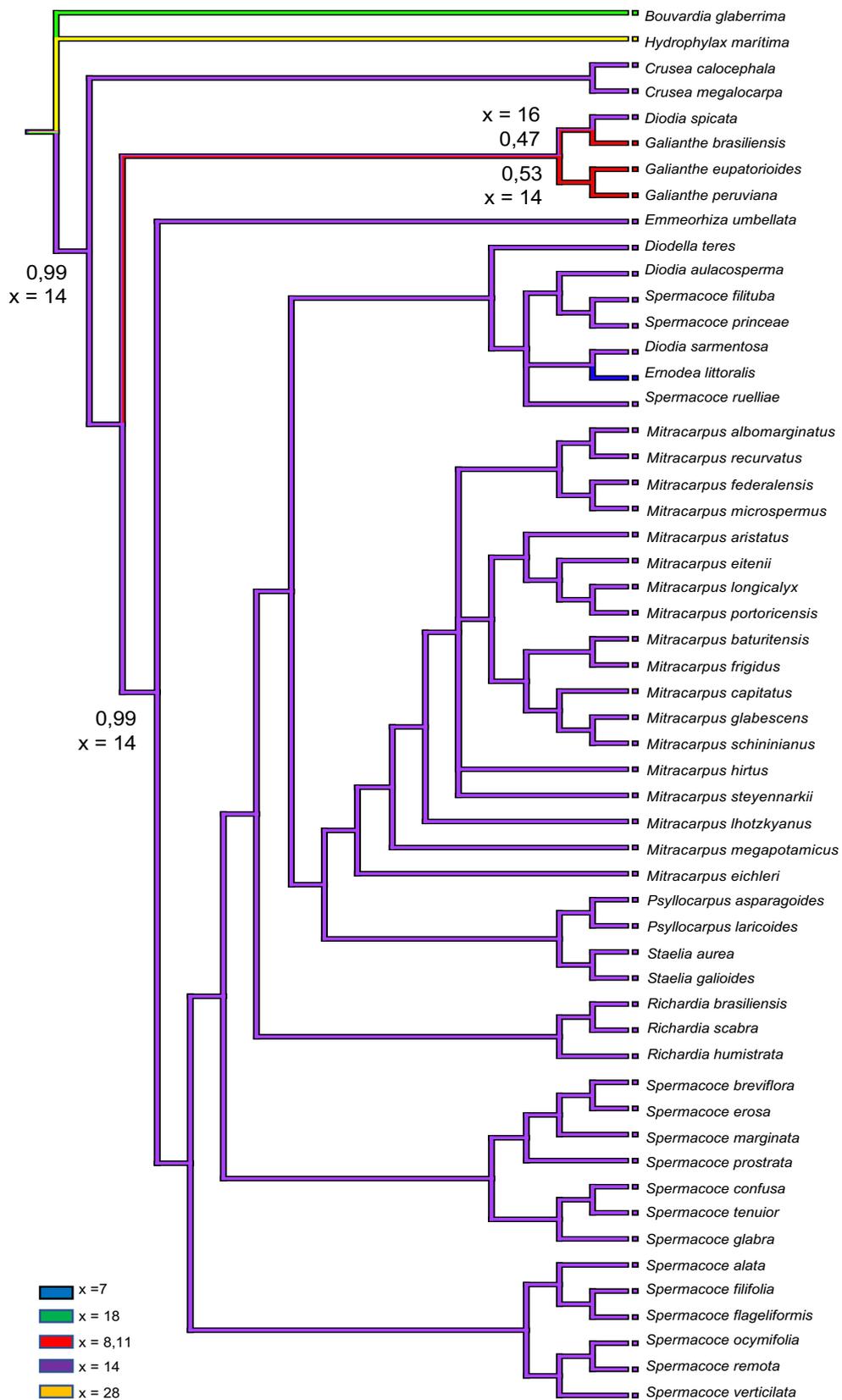


Figura 5: Evolução do número básico mais parcimonioso para o clado Spermacoce, de acordo com o proposto no presente trabalho pela análise de Inferência Bayesiana, com probabilidades. *Bouvardia glaberrima*: grupo externo. Número básico (x) mais parcimonioso: x = 14.

## 4. Discussão

### 4.1 Evolução cromossômica do clado Spermacoce

Os dados obtidos pelo levantamento de números cromossômicos (ver Nasário, cap. 1) demonstram que o clado Spermacoce possui uma grande variabilidade nas contagens cromossômicas ( $2n= 14, 28, 56$ ), além de outras eventos e contagens. A análise de reconstrução de dados cromossômicos ancestrais indicou que o número básico ancestral mais parcimonioso sugerido para o clado é de  $x=14$ , tanto seguindo a filogenia proposta por Karehed *et al.* (2008) quanto as aqui elaboradas, por análise de Máxima Parcimônia e Bayesiana. O mesmo número básico já havia sido proposto para o clado por outros autores, como Correa (2008) e Kiehn (2010). O número difere do número básico proposto para a família Rubiaceae, que é de  $x=11$  (Darlington & While, 1955), embora diversos outros números básicos tenham sido propostos para outros grupos dentro da família, como  $x=2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 20$  e  $22$  (Robrecht *et al.* 1996) e até mesmo para a subfamília Rubioideae ( $x=9$ ) (Kiehn, 2010).

A comparação feita no presente trabalho entre a reconstrução de caráter ancestral cromossômico a partir de três árvores filogenéticas (a de Karehed *et al.* 2008 e as duas aqui produzidas) analisou as possíveis variações da história cromossômica do clado Spermacoce. Com o acréscimo de novos táxons e novas análises, as posições dos grupos dentro do clado podem sofrer alterações, mudando o rumo da evolução cromossômica. Dessa forma, o presente trabalho priorizou a discussão do aspecto evolutivo e cromossômico do grupo e não as suas relações filogenéticas específicas.

O grupo formado por representantes do gênero *Galianthe*, incluindo *Diodia spicata* Mart. & Zucc, é a primeira ramificação no clado Spermacoce *sensu* Karehed *et al.* (2008) (Fig. 2) aparecendo também na reconstrução proposta neste trabalho (Fig 5). O gênero *Galianthe* inclui cerca de 45 espécies distribuídas do México até a América do Sul, caracterizado pela presença de inflorescências terminais, flores heterostílicas e estigmas com dois lobos distintos (Cabral 1991; Karehed *et al.* 2008). Este parece ser o clado mais incerto do ponto de vista citogenético, devido a contagens divergentes e números cromossômicos distintos. Dentre as três espécies de *Galianthe* apresentadas nas árvores filogenéticas, há contagem cromossômica apenas para *G.*

*brasiliensis* E.L.Cabral & Bacigalupo ( $2n=30$ ). As outras duas contagens cromossômicas disponíveis para *Galianthe* evidenciam diversificação, para *G. krausei* ( $2n=16$ ) e *G. bogotensis* (Willd.) E.L.Cabral ( $2n=22$ ). Dessa forma, a grande variação do número somático dos representantes ( $2n= 16, 22$  e  $30$ ) impossibilita a inferência de padrões citogenéticos para o gênero. Não há contagem para *Diodia spicata*, espécie que aparece juntamente com as do gênero *Galianthe* na árvore filogenética (Karehed *et al.* 2008) e no presente trabalho. Entretanto, outra espécie do gênero, *D. virginiana* (L.) apresenta o número cromossômico  $2n=28$ , que parece ser mais comum dentro do clado Spermaceae. Morfologicamente *D. spicata* apresenta inflorescências terminais espiciformes, com flores homostílicas e frutos separando-se em dois mericarpos afastados da base (Karehed *et al.* 2008). Em sua filogenia, Karehed *et al.* (2008) defendem a inclusão de *D. spicata* em *Galianthe*, porém, os dados cromossômicos desse clado não fornecem muitas informações que apoiem ou não a inclusão, não sendo possível sequer a definição do número básico dos gêneros, especialmente *Galianthe*. Um número maior de estudos citogenéticos e filogenéticos devem ser elaborados nestes gêneros, a fim de que se compreenda com mais precisão as relações evolutivas entre eles.

O agrupamento constituído por *Crusea* juntamente com o gênero monotípico *Emmeorhiza* (Karehed *et al.* 2008) (Fig. 2) difere do proposto por este trabalho, onde *Crusea* forma um grupo separado e *Emmeorhiza* aparece isolado em outro ramo. O gênero *Crusea* possui aproximadamente 14 espécies, representadas na filogenia por *C. megalocarpa* (A.Gray) S.Watson ( $2n=28$ ) e *C. calocephala* DC. Greenm. ( $2n=56$ ). Há contagens disponíveis na literatura para mais três espécies (Tabela 3), *C. longiflora* (Roem. & Schult.) W.R.Anderson ( $2n=56$ ), *C. calcicola* Greenman ( $2n=56$ ) e *C. parviflora* Hooker & Arnott ( $2n=28$ ). Podemos sugerir em primeiro lugar,  $x=14$  como número básico para o gênero, com eventos de poliploidia formando uma série poliploide, com  $2n=2x=28$  em *C. parviflora* e  $2n=4x=56$  em *C. calocephala*, *C. calcicola* e *C. Longiflora*. Para *Emmeorhiza umbellata* (Spreng.) K.Schum., a contagem de  $2n=28$  sugere também o número básico  $x=14$  para o gênero, corroborando com o número mais parcimonioso para o clado Spermaceae.

O gênero *Richardia*, representado na filogenia de Karehed *et al.* (2008) por *R. brasiliensis* Gomes ( $2n=28/84$ ), *R. scabra* L. ( $2n=28/56$ ) e *R. stellaris*

(Cham. & Schltl.) Steud., que não possui contagem cromossômica, apresenta ao todo 16 espécies distribuídas na América tropical e subtropical (Karehed *et al.* 2008). Outra espécie pertencente ao gênero possui contagem disponível na literatura, *R. humistrata* (Cham. & Schltl.) Steud, com  $2n=28$  cromossomos. O grupo parece estar bem suportado na filogenia e sugerimos como número básico  $x=14$ . Nesse gênero, os eventos de poliplodia parecem ocorrer não só entre as espécies, mas também dentro de uma mesma espécie, com ocorrência de citótipos em *R. brasiliensis* ( $2x/6x$ ) e *R. scabra* ( $2x/4x$ ).

*Spermacoce* (incluindo *Borreria*) é o maior gênero no clado *Spermacoce*, com aproximadamente 288 espécies. As 15 espécies do gênero, utilizadas na filogenia de Karehed *et al.* (2008) estão distribuídas em diversos grupos, incluindo uma politomia. Dentre essas 15 espécies estão disponíveis dados cromossômicos apenas para cinco: *S. confusa* Rendle ( $2n=28$ ), *S. verticillata* L. ( $2n=28$ ), *S. remota* Lam. ( $2n=28$ ), *S. hispida* L. ( $2n=28/56$ ) e *S. ruelliae* DC. ( $2n=56$ ). Na literatura ainda estão disponíveis contagens para mais 13 espécies: *S. glabra* Michx. ( $2n=28$ ), *S. ocymoides* Burm.F. ( $2n=28/40/56$ ), *S. brachystema* R.Br. ex Benth. ( $2n=56$ ), *S. tenuir* L. ( $2n=28$ ), *S. alata* Aubl. ( $2n=28$ ), *S. articularis* L.f. ( $2n=56/64$ ), *S. dibrachiata* Oliv. ( $2n=28/42$ ), *S. laevis* Lam. ( $2n=28$ ), *S. neohispida* Govaerts ( $2n=56$ ), *S. neoterminalis* Govaerts ( $2n=84$ ), *S. pusilla* Wall. ( $2n=32/56$ ), *S. erecta* ( $2n=28$ ) e *S. natalensis* Hochst. ( $2n=28$ ). Na árvore proposta neste trabalho, foram utilizadas 18 espécies do gênero e elas também apareceram em posições diferentes na filogenia. O gênero é o que apresenta maior variação de níveis de ploidia dentro da tribo, e faz parte do complexo *Spermacoce-Borreria*, onde suas relações taxonômicas não são bem definidas e ainda geram discussões entre os especialistas do complexo. A maioria das espécies apresentam números cromossômicos múltiplos de  $x=14$ , passando por  $2x$ ,  $3x$ ,  $4x$ ,  $6x$ . Sugere-se até então  $x=14$  como número básico do gênero. Apesar de números cromossômicos múltiplos de 8 já terem sido citados em algumas contagens, como em *S. pusilla* ( $2n=32$ ) e *S. articularis* ( $2n=54$ ), porém, nessas mesmas espécies também foram mencionadas outras contagens, como  $2n=64$ , que corroboram o número básico mais comum de  $x=14$ .

Na árvore filogenética proposta por Karehed *et al.* (2008), foram amostradas apenas duas espécies do gênero *Mitracarpus* formando um grupo (Figura 2). O gênero, apresenta cerca de 49 espécies, porém há contagem

cromossômica para apenas uma espécie, *Mitracarpus hirtus* (L.) DC. ( $2n=28$ ) (Tabela 3). Apesar desta espécie não ter sido utilizada na filogenia, aparentemente o grupo parece estar bem sustentado, o que é corroborado em nossa hipótese, onde todas as espécies aparecem formando um clado. Também se sugere, até o momento, o número básico  $x=14$ .

O grupo seguinte da filogenia de Karehed *et al.* (2008), formado por *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc e *Diodella teres* (Figuras 2 e 5), possui poucos dados cromossômicos disponíveis. O gênero *Psyllocarpus*, apresenta cerca de 12 espécies, e não possuía dados citogenéticos até o presente trabalho. Foi constatado  $2n=28$  para *P. laricoides* e  $2n=28$  também para *P. asparagoides*. Mart. & Zucc. (ver Nasario, cap.1), podendo ser sugerido para o gênero o número básico  $x=14$ . *Diodella*, atualmente circunscrito como gênero *Hexasepalum*, apresenta em sua totalidade cerca de 16 espécies, sendo encontradas contagens disponíveis para *H. teres* (Walter) Small. ( $2n=28$ ), esta utilizada na filogenia, *H. serrulata* (P.Beauv.) Borhidi ( $2n=28$ ) e *H. apicullata* (Willd.) Delprete ( $2n=56$ ). Em nosso trabalho, *Hexasepalum* apareceu em um grupo diferente de *Psyllocarpus*. Por outro lado, *Psyllocarpus* constituiu um clado bem sustentado com *Staelia*, gênero que até então não havia aparecido nas filogenias da tribo e ambos apresentam  $x=14$  como sugestão de número básico.

O último grupo, formado por *Ernodea*, que aparece na filogenia de Karehed *et al.* (2008) como grupo irmão de algumas espécies de *Spermacoce*, *Hydrophylax* e *Diodia* em uma politomia, parece estar pouco resolvido. O gênero *Ernodea* apresenta cerca de nove espécies, das quais quatro apresentam contagens cromossômicas, *E. litoralis* Sw. ( $2n=14$ ), utilizada na filogenia, *E. cokeri* Britton ex Coker in G.B.Shattuck ( $2n=14$ ), *E. millspaughii* Britton ( $2n=14$ ) e *E. taylori* Britton ( $2n=14$ ). Este gênero parece apresentar número cromossômico constante e, contrastando com a maioria dos demais gêneros do clado *Spermacoce*, sugere-se  $x=7$ . *Hydrophylax* é mais um gênero monotípico da tribo, representado por *H. maritima* L.f. ( $2n=56$ ), que ocorre à beira-mar da Índia, Sri Lanka e Tailândia. *Hydrophylax* encontra-se em agrupamento distinto quando se comparam as filogenias de Karehed *et al.* (2008) e a apresentada no presente estudo. Neste trabalho, a espécie também se agrupa com indivíduos do gênero *Spermacoce*, porém espécies diferentes das citadas na filogenia de Karehed *et al.* (2008), e não aparece relacionada o gênero *Ernodea*. O número

básico de *Hydrophylax* parece ser  $x=28$ , sugerindo um possível evento de poliploidização, porém, deve-se levar em consideração que o gênero possui apenas este representante.

Os grupos externos formados pelos gêneros *Oldenlandia*, *Neshohedyotis*, *Bouvardia*, *Arcytophyllum* e *Manettia* (tribo Spermacoaceae), também foram analisados e estão na base do clado Spermacoace (Karehed *et al.* 2008) (Tabela 4). O agrupamento formado por *Oldenlandia* aparece na filogenia como grupo irmão de todo o clado Spermacoace e, segundo Karehed *et al.* (2008), o gênero é claramente polifilético. As duas espécies apresentadas são *Oldenlandia tenuis* e *O. salzmanii* (Figura 2) e não há contagens cromossômicas para nenhuma delas. Ainda assim, o gênero possui 43 contagens cromossômicas (Tabela 4) apresentando, aparentemente, como número básico  $x=9$ . Para o gênero *Neshohedyotis*, não existem dados de número cromossômico na literatura e é o único gênero do clado que não é de distribuição neotropical (Karehed *et al.* 2008).

*Manettia* e *Bouvardia* aparecem como gêneros irmãos. *Manettia* apresenta cerca de 124 espécies e já foi reconhecida em uma tribo separada, Manettieae (Bremekamp 1934). O gênero não apresenta muitas contagens cromossômicas, sendo elas,  $2n=22$  em *M. luteo-rubra* (utilizada na filogenia),  $2n=22$  em *M. barbata* Oerst.,  $2n=22$  em *M. bicolor* Paxt.,  $2n\sim 36$  em *M. coccinea* Gribest. e  $2n\sim 36$  em *M. inflata* Sprague. Podem ser apresentados como números básicos do gênero  $x=11$  ou  $x=18$ . *Bouvardia* compreende cerca de 41 espécies distribuídas no sul dos Estados Unidos e América Central. Apresenta contagens cromossômicas para dez espécies (Tabela 4), com números cromossômicos que variam de  $2n=36$ , 72 e 108, assim sugere-se o número básico de  $x=18$  para o gênero. Os dois gêneros parecem ser similares em algumas características morfológicas, segundo Bremer (1996), e apresentam também números básicos semelhantes, o que pode sustentar a irmandade dos gêneros. *Arcytophyllum serpyllaceum*, que aparece como irmão de *Bouvardia*, não apresenta contagem cromossômica, mas outra espécie do gênero, *A. lavarum* J. D. Smith, apresenta  $2n=36$ , podendo ser sugerido  $x=18$  também para o gênero.

## 5. Considerações Finais

A evolução cromossômica da tribo Spermaceae s. l. parece seguir a ordem de  $x=9$ , derivando de  $x=18$  e  $x=11$  (Kiehn, 2010), enquanto para clado Spermaceae foi majoritariamente  $x=14$ , com possíveis eventos de poliploidização. O grupo externo formado por *Manettia*, *Arcytophyllum*, *Bouvardia* e *Oldenlandia*, (Karehed et al. 2008), parece seguir o número básico 9 ( $x=9$ ), apresentando duplicação desse número no clado formado por *Arcytophyllum* e *Bouvardia* ( $x=18$ ). Os grupos que seguem na filogenia, pertencentes ao clado Spermaceae, parecem apresentar  $x=14$  em sua maioria, podendo apresentar variações poliploides, com exceção de *Ernodea* ( $x=7$ ), sugerindo uma reversão de caráter ancestral.

Alguns eventos de poliploidia foram constatados na evolução cromossômica do clado Spermaceae, em nível específico e infraespecífico, como no gênero *Spermaceae*, passando por níveis de ploidia  $2x$ ,  $3x$ ,  $4x$ ,  $6x$  (*S. verticillata* ( $2n=28$ ), *S. pusilla* ( $2n=32$ ), *S. brachystema* ( $2n=56$ ) e *S. neoterminalis* ( $2n=84$ )) e ainda em *Richardia* (*R. brasiliensis* ( $2n=28/84$ ) e *R. scabra* ( $2n=28/56$ )).

Estes eventos são importantes ao longo da evolução cromossômica de inúmeros grupos de plantas (Moraes et al. 2014). Eventos de poliploidia já foram relatados para a tribo Spermaceae, como em linhagens de *Houstonia* (Church et al. 2005) e para outros gêneros da família, como em *Galium* (Ehrendorfer et al. 1996) e *Damnacanthus* (Naiki & Nagamasu, 2004). Por outro lado, a disploidia está pouco representada na derivação dos gêneros do clado, em sua maioria com  $2n=28$ . Diferenciações são encontradas nos gêneros *Ernodea* ( $2n=14$ ), *Hydrophylax* ( $2n=56$ ) e *Galianthe* que apresentam números variados. Infelizmente há muito pouco conhecimento sobre o detalhamento cariotípico de representantes do clado Spermaceae, de forma a inviabilizar a análise de possíveis alterações estruturais, como inversões e translocações, que poderiam ter ocorrido durante a evolução.

## 6. Referências bibliográficas

Acosta, M. C., Moscone, E. A., & Cocucci, A. A. (2016). Using chromosomal data in the phylogenetic and molecular dating framework: Karyotype evolution and diversification in *Nierembergia* (Solanaceae) influenced by historical changes in sea level. *Plant Biology*.

Almeida, C. & Pedrosa-Harand A. (2011). Contrasting rDNA evolution in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenet Genome Res* 132: 212-217.

Anderson, W. R. (1972). A Monograph of the genus *Crusea* (Rubiaceae). *Mem. New York Bot. Gard.* 22 (4): 1-128.

Andersson, L. & Rova, J. H. E. (1999). The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 214, 161–186.

Anthony, F. Bertrand, B. Quiros, O, Lashermes, P., Berthaud, J, & Charrier, A. (2001). Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.

Backlund, M. Oxelman, B. & Bremer, B. (2000). Phylogenetic relationships within the Gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. *Am. J. Bot.* 87: 1029-1043.

Barbosa, M. R. Zappi, D. Taylor, C. Cabral, E. Jardim, J. G. Pereira, M. S. Caliό, M. F. Pessoa, M. C. R. Salas, R. Souza, E. B. Di Maio, F. R. Macias, L. Anunciaçō, E. A. Da Germano Filho, P. & Oliveira, J. A. (2013). Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000210>). Acesso em 14 Jan 2013.

Barret, S.C.H. (1992). Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: S.C.H. Barret (ed.). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag, Berlin, 1-24.

Barrett, S.C.H. & Richards, J.H. (1990). Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of New York Botanical Garden* 55: 35-61.

Barros e Silva, A.E. Marques, A. Santos, K.G.B. & Guerra M. (2010). The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Res* 18: 503-514.

Bernardos, S.; Tyteca, D. & Amich, F. (2004). Cytotaxonomic study of some taxa of the subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) from the Iberian Peninsula. *Israel J of Plant Sci* 52: 161-170.

Biondo, E. Miotto, S.T.S. Schifino-Wittmann, M.T. & Castro, B. (2005). Cytogenetics and Cytotaxonomy of Brazilian Species of *Senna* Mill. (Cassieae - Caesalpinioideae - Leguminosae). *Caryologia* 58 (2): 152-163.

Bremekamp, C. E. B. (1966). Remarks on the position, the delimitation, and the subdivision of the Rubiaceae. *Acta Bot. Neerl.* 15: 1-33. 35

Bremer, B. & Eriksson, O. (1992). Evolution of fruit characters and dispersal modes in the tropical family Rubiaceae. *Biol. J. Lin. Soc.* 47: 79-95.

Bremer, B. & Eriksson, O. (2009). Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamily, and tribes. *Int. J. Plant Sci.* 170: 766-793.

Bremer, B. (1996). Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. *Opera Botanica Belgica* 7: 33-50.

Bremer, B. (2009). A Review of Molecular Phylogenetic Studies of Rubiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gar.* 96(1): 4-26.

Bremer, B. Andreasen, K. & Olsson, D. (1995). Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Annals Missouri Botanical Garden* 82: 383-397.

Cabral, E. L. (1991). Rehabilitación del género *Galianthe* (Rubiaceae). Rehabilitation of the genus *Galianthe* (Rubiaceae.) *Bol. Soc. Argent. Bot.* 27(3-4), 235-249.

Church, S. A., & Taylor, D. R. (2005). Speciation and hybridization among *Houstonia* (Rubiaceae) species: the influence of polyploidy on reticulate evolution. *American journal of botany*, 92(8), 1372-1380.

Corrêa AM. (2003). Estudos cromossômicos em espécies de Rubiaceae (A. L. de Jussieu) de cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

Corrêa AM. (2007). Citotaxonomia de representantes da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) nos cerrados do estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

Corrêa, A. M., & Forni-Martins, E. R. (2004). Chromosomal studies of species of Rubiaceae (AL de Jussieu) from the Brazilian cerrado. *Caryologia*, 57(3), 250-258.

Dahmer, N. Simon, M.F. Schifino-Wittmann, M.T. Hughes, C.E. Miotto, S.T.S. & Giuliani, J.C. (2011). Chromosome numbers in the genus *Mimosa* L.: cytotoxic and evolutionary implications. *Plant Syst Evol* 291: 211-220.

Davis, A. P. Govaerts, R. Bridson, D. M. Ruhsam, M. Moat, J. & Brummitt, N. A. (2009). A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96(1): 68-78. 38.

Delprete, P. G. (1999). Rondeletieae (Rubiaceae). Part I. *Flora Neotropica Monographs* 77: 1-226.

Delprete, P.G. & Jardim, J. G. (2012). Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia* 63(1): 101-128.

Dessein, S. (2003). Systematic studies in the Spermacoceae (Rubiaceae).

Dobigny, G., Ducroz, J. F., & Robinson, T. J. (2004). Cytogenetics and cladistics. *Systematic Biology*, 53(3), 470-484.

Ehrendorfer, F., Samuel, R., & Pinsker, W. (1996). Enzyme analysis of genetic variation and relationships in diploid and polyploid taxa of *Galium* (Rubiaceae). *Plant systematics and evolution*, 202(1-2), 121-135.

Forni-Martins, E.R. & Calligaris, K.P. (2002). Chromosomal studies on Neotropical *Limnocharitaceae* (Alismataceae). *Aquatic Bot* 74: 33-41.

Forni-Martins, E.R. Martins, F.R. (2000). Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genet MolBiol* 23 (4): 947-955.

Forni-Martins, E.R.; Mansanares, M.E. & Semir, J. (2007b). Cytotaxonomy of *Lychnophoriopsis* Schultz-Bip. and *Paralychnophora* MacLeish species (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophoriana). *Bot J Linn Soc* 154: 109-114.

Govaerts, R. Andersson, L. Robbrecht, E. Bridson, D. Davis, A. Schanzer, I. & Sonke, B. (2006). World Checklist of Rubiaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.kew.org/wcsp/rubiaceae/>.

Groeninckx, I., Dessein, S., Ochoterena, H., Persson, C., Motley, T. J., Kårehed, J., ... & Smets, E. (2009). Phylogeny of the Herbaceous Tribe Spermacoceae (Rubiaceae) Based on Plastid DNA Data 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 109-132.

Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and genome research*, 120(3-4), 339-350.

Guerra, M. (2012). Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3), 703-710.

Guerra, M. (1988). *Introdução à Citogenética Geral*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 142pp.

Guerra, M., & Souza, M. D. (2002). *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto: FUNPEC, 201.

Hooker, J.D. (1873). LXXXIV. Rubiaceae. In: G. Bentham & J. D. Hooker (eds.). *Genera Plantarum ad exemplaria imprimis in herbariis kewensibus servata definita*. Lovell Reeve & Co., London. 2: 7-151.

Kårehed, J., Groeninckx, I., Dessein, S., Motley, T. J., & Bremer, B. (2008). The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3), 843-866.

Kiehn, M. (1985). *Karyosystematische Untersuchungen an Rubiaceae: Chromosomenzählungen aus Afrika, Madagaskar und Mauritius*. *Pl. Syst. Evol.* 149: 89–118.

Kiehn, M. (1996). Chromosomes of Rubiaceae occurring in Malesia, the Philippines, New Guinea, and the Pacific. *Opera Bot. Belg.* 7: 249–260.

Kiehn, M. (2010). Chromosomes of Neotropical Rubiaceae. I: Rubioideae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 97: 91-105.

Krug, C. A. (1934). Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. *Bol. Téc. do Instituto Agrônômico de Campinas* 11 : 1-8.

Lepelley, M., Mahesh, V., McCarthy, J., Rigoreau, M., Crouzillat, D., Chabrillange, N., ... & Campa, C. (2012). Characterization, high-resolution mapping and differential expression of three homologous PAL genes in *Coffea canephora* Pierre (Rubiaceae). *Planta*, 236(1), 313-326.

Lewis, W. H. (1962c). Chromosome numbers in North American Rubiaceae. *Brittonia*, 14, 3: 285-290.

Lewis, W. H. (1966). Chromosome numbers of *Oldenlandia corymbosa* (Rubiaceae) from Southeastern Asia. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 53, 2: 257-258.

Mabberley, D.J. (2008). *Mabberley's plant book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*. Cambridge University Press, Cambridge. 1019p.

Machado, O. A. (2007). *Variações florais e heterostilia em Palicourea rigida* (Rubiaceae) nos cerrados do Brasil central. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Maddison WP & Maddison DR. (2015). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 3.04. Disponível em: < <http://mesquiteproject.org/>>

Miège J. (1962). Nombres chromosomiques de plantes d'Afrique Occidentale. *Rev. Cytol. et. Biol. Vég.* 15, 4: 373-384.

Moraes, A. P., Souza-Chies, T. T., Stiehl-Alves, E. M., Burchardt, P., Eggers, L., Siljak-Yakovlev, S., ... & Viccini, L. F. (2015). Evolutionary trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(1), 27-49.

Moraes, A.P. Soares Filho, W.S. Guerra, M. (2007). Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res* 15: 115-121

- Naiki, A., & Nagamasu, H. (2004). Correlation between distyly and ploidy level in *Damnacanthus* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 91(5), 664-671.
- O'Brien S.J., Menotti-Raymond M., Murphy W.J., Nash W.G., Wienberg J., Stanyon R., Copeland N.G., Jenkins N.A., Womack J.E., Marshall Graves J.A. (1999) The promise of comparative genomics in mammals. *Science*, 286,458–481.
- Peruzzi, L. (2013). “x” is not a bias, but a number with real biological significance. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(4), 1238-1241.
- Pierozzi, N. I., & Jung Mendacolli, S. L. (1997). Karyotype and C-band analysis in two species of *Genipa* L.(Rubiaceae, Gardenieae Tribe). *Cytologia*,62(1), 81-90.
- Pierozzi, N. I., Pinto-Maglio, C. A., & Cruz, N. D. (1999). Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-band techniques. *Caryologia*, 52(1-2), 1-8.
- Pierozzi, N. I. (2013). "Orcein, C-and NOR-banding on mitotic chromosomes of some wild diploid coffee species (*Coffea* L.)." *Caryologia* 66.1: 76-83.
- Pinto-Maglio, C. A. F. & Cruz, N. D. da. (1988). Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II.*C. arabica* L. *Complement Caryologia* 51: 19-35.
- Pinto-Maglio, C. A. F. (2006). Cytogenetics of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*18(1): 37-44.
- Pinto-Maglio, C. A. F. Cuiséllar, T. & Barbosa, R. L. (2000). Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L. In I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Resumos expandidos. Poços de Caldas – MG 1: 444-446.

Pinto, R. B., de Freitas Mansano, V., Torke, B. M., & Forni-Martins, E. R. (2015). Evidence for a conserved karyotype in *Swartzia* (Fabaceae, Papilionoideae): Implications for the taxonomy and evolutionary diversification of a species-rich neotropical tree genus. *Brittonia*, 1-9.

Pires, J. C., & Hertweck, K. L. (2008). A Renaissance of Cytogenetics: Studies in Polyploidy and Chromosomal Evolution 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95(2), 275-281.

Robbrecht, E. & Manen, J.F. (2006). The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on rbcL, rps16, trnL- trnF and atpB-rbcL data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. *Syst. Geogr. Pl.* 76: 85–146.

Robbrecht, E. (1988). Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Bélgica* 1: 1-127.

Salas, R. M., Viana, P. L., Cabral, E. L., Dessein, S., & Janssens, S. (2015). *Carajasia* (Rubiaceae), a new and endangered genus from Carajás mountain range, Pará, Brazil. *Phytotaxa*, 206(1), 14-29.

Salas, R.M., Soto, J.D. & Cabral, E.L. (2011) Dos nuevas especies de *Borreria*, un nuevo registro de *Declieuxia* y observaciones taxonómicas en Rubiaceae de Bolivia. *Brittonia* 63 (2): 286–294.

Schubert, I., & Lysak, M. A. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27(6), 207-216.

Shivakumar, P. M. & M. S. Chennaveeraiah. (1983). In: IOPB chromosome number reports LXXVIII. *Taxon* 32: 140. / Selvaraj, R. 1987. Karyomorphological

Silva, C. R., Lopes, F. R., Carareto, C., Vanzela, A. L., Domingues, D. S., & Pereira, L. F. (2011). Distribuição de elementos transponíveis em cromossomos de *Coffea arabica*.

Stace, C.A. (1989). Plant Taxonomy and Biosystematics. 2 edition. Cambridge University Press, New York. 264pp

Stebbins, G. L. (1966). Chromosomal variation and evolution. *Science*, 152(3728), 1463-1469.

Struwe, L. Albert, V.A. & Bremer, B. "1994" (1995). Cladistics and family-level classification of the Gentianales. *Cladistics* 10: 175-206.

Terrell, E. E., W. H. Lewis, H. Robinson, H. & J. W. Nowicke. (1986). Phylogenetic implications of diverse seed types, chromosome numbers, and pollen morphology in *Houstonia* (Rubiaceae). *Amer. J. Bot.* 73(1): 103–115.

Verdcourt, B. (1958). Remarks on the classification of the Rubiaceae. *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles* 28: 209-281.

JOÃO PAULO SARDIN NASÁRIO

### **CAPÍTULO III**

**Diversidade genética e estrutura populacional  
do Complexo *Psyllocarpus laricoides*  
(Clado Spermacoce, Rubiaceae) na Serra do  
Espinhaço**

CAMPINAS

2018

## Resumo

As relações taxonômicas no “Complexo *Psyllocarpus laricoides*” são confusas, onde algumas populações, separadas entre vales pela região montanhosa, têm apresentado diferenças morfológicas entre si, o que leva à hipótese de isolamento reprodutivo e especiação nestas populações. Nesse contexto, objetivou-se o estudo da diversidade e estrutura genética das populações integrantes do complexo *P. laricoides*, utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSR). Estes marcadores são muito empregados como ferramentas moleculares em estudos evolutivos para conhecimento da variabilidade genética entre populações. Para o complexo *P. laricoides* foi desenvolvida uma biblioteca enriquecida de microsatélites e obtidos 14 marcadores polimórficos. As populações de *P. laricoides* são pequenas, as 96 amostras foram coletadas por toda a Serra do Espinhaço. As análises de estrutura ( $F_{ST}$ , Structure, PCoA e DAPC) e de variação genética (AMOVA, distâncias de Nei) sugeriram a formação de dois grupos genéticos. O primeiro grupo G1, geneticamente distinto do G2, correspondendo as regiões oeste e leste respectivamente. A alta heterozigosidade encontrada em G2 sugere que esses indivíduos estão compartilhando alelos. Dessa forma, estes resultados podem servir para enfatizar a capacidade de adaptação dessas plantas ao longo da evolução perante as divergências de fatores abióticos encontrados na cadeia da Serra do Espinhaço, e podem corroborar com novas descrições taxonômicas de espécies para o gênero. Além disso, os resultados podem ser úteis para subsidiar estratégias de conservação destas populações.

## 1. Introdução

A diversificação de plantas na região Neotropical está relacionada a vários mecanismos bióticos tais como adaptações ao solo, capacidade de dispersão de sementes, dispersores, interações com polinizadores e herbivoria. Também devem ser considerados os fatores abióticos, como soerguimento de montanhas, mudanças hidrológicas, temperatura, clima e chuvas (Antonelli & Sanmartín, 2011). Para que possamos compreender melhor o padrão evolutivo de cada linhagem biológica é necessária uma abordagem específica, levando em consideração as particularidades de cada bioma, observando como os eventos de diversificação ocorreram sob diferentes condições ambientais em extratos vegetacionais variados (Hughes *et al.*, 2013).

Os campos rupestres caracterizam-se como uma formação de vegetação montana, geralmente ocorrendo a partir de 900 m, gramíneo-arbustiva, associada a afloramentos rochosos de quartzito, arenito ou canga, entremeados de campos arenosos, pedregosos ou alagados (Silveira *et al.*, 2015). Possuem vegetação aberta, apresentando regimes de fogo, assim como o cerrado, e ocupam basicamente as mesmas regiões (Simon *et al.*, 2009, Antonelli & Sanmartín, 2011). Embora não existam muitas evidências do compartilhamento entre as duas vegetações, as linhagens parecem estar filogeneticamente intercaladas (Hughes *et al.*, 2013).

Sugere-se que os campos rupestres tenham sido utilizados como refúgio para muitas espécies durante as oscilações climáticas no Pleistoceno, com indícios de que sucessivas expansões e contrações desse ecossistema tenham ocorrido, sendo esta a principal hipótese de origem da diversidade vegetal nesse estrato vegetal (Alvez & Kolbek, 1994; Rapini *et al.*, 2008).

*Psyilocarpus* Mart. & Zucc., do clado Spermacoce (Rubiaceae), um gênero de distribuição neotropical do clado Spermacoce e endêmico do Brasil, ocorre em campos rupestres, cerrados, campinaranas e savanas amazônicas (Zappi *et al.* 2014). É um grupo monofilético bem sustentado em análises moleculares e morfológicas, embora baseado em filogenias de apenas duas das doze espécies apresentadas para o grupo. (Karehed *et al.* 2008, Groeninkcx *et al.* 2009, Salas *et al.* 2015 e Carmo *et al.* 2018).

Algumas espécies foram recentemente descritas neste gênero (*P. scatignae* e *P. bahiensis*) por Carmo *et al.* (2018), e isso tem gerado alguns questionamentos acerca de sua integridade, pois anteriormente estas espécies que apresentam algumas divergências morfológicas ente populações, eram identificadas como *P. laricoides*, formando o “Complexo *Psyllocarpus laricoides*”. O complexo *P. laricoides* é endêmico e ocorre, geralmente, na região da Serra do Espinhaço compreendida entre os estados de Minas Gerais e Bahia, onde algumas de suas populações, muitas vezes separadas entre vales, têm apresentado diferenças morfológicas entre si, levantando a hipótese de isolamento reprodutivo e especiação destas populações. Nesses casos, o uso de marcadores moleculares tem facilitado o estudo populacional.

Marcadores microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) são muito empregados como ferramentas moleculares em estudos evolutivos para conhecimento da variabilidade genética entre populações (Siqueira 2014). Isso se deve por serem amplamente distribuídos no genoma, ao elevado polimorfismo, a herança codominante e a neutralidade evolutiva, além do fácil desenvolvimento desses marcadores e baixo custo (Alves 2014, Chen 2017, Lee 2017, Tuler *et al.* 2015). Os estudos de avaliação da diversidade genética de populações de espécies nativas e endêmicas podem contribuir para a conservação dessas espécies, como em *Rauvolfia weddeliana* Mull. Arg. (Apocynaceae) (Vidal Jr. *et al.* 2018). E também promover a preservação dos estratos vegetacionais em que estão inseridas (Conner & Hartl, 2004), como apresentado por Alves e colaboradores (2014), no Chaco brasileiro, utilizando *Prosopis rubriflora* e *P. ruscifolia* (Leguminosae-Mimosideae).

Dessa forma, mediante o uso de marcadores microssatélites desenvolvidos por meio de bibliotecas genômicas enriquecidas, objetivou-se o estudo da diversidade e estrutura genética de populações de espécies integrantes do complexo *P. laricoides* presentes em regiões de campos rupestres da Serra do Espinhaço.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Coleta do material vegetal e extração de DNA

As populações naturais de *P. laricoides*, encontram-se distribuídas em toda a Serra do Espinhaço, compreendida entre os estados de Minas Gerais e Bahia. Foram encontradas apenas populações que incluíam entre 4 a 17 indivíduos, nas seguintes localidades: Itacambira-MG (N=6), Botumirim-MG (N=15), Cristália-MG (N=14), Diamantina-MG (N=17), Felício dos Santos-MG (N=6), Joaquim Felício-MG (N=9), Santo Antonio do Itambé-MG (N=10), São Gonçalo (N=7).

Foram coletadas ao todo, folhas de 93 indivíduos (N=93) e armazenadas em sílica gel. O material testemunho está depositado no Herbário (UEC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A extração de DNA genômico foi realizada conforme descrito por Doyle e Doyle (1987), que utiliza o reagente brometo de cetil-trimetil-amônio (CTAB).

### 2.2 Desenvolvimento de marcadores microssatélites

A construção da biblioteca genômica enriquecida em regiões com microssatélites seguiu o protocolo de Billotte *et al.* (1999) com modificações. Resumidamente, o DNA genômico foi digerido com a enzima *Afa* I (10 U/ $\mu$ l) e, em seguida, os fragmentos foram ligados a adaptadores de sequências conhecidas. Foi realizada a amplificação destes por meio de PCR, usando como *primers* sequências complementares aos adaptadores. Posteriormente, o enriquecimento para regiões com microssatélites foi feito por meio de hibridização com os oligonucleotídeos (CT)<sub>8</sub> e (GT)<sub>8</sub> ligados a *beads* magnéticas. Os fragmentos selecionados foram amplificados por meio de PCR.

Para a clonagem dos fragmentos, foi utilizado o vetor pGEM-T. Células XL1-Blue competentes foram transformadas com os vetores por meio de eletroporação e crescidas em meio de cultura seletivo pelo método branco-azul. Os clones positivos foram individualizados e estocados em placas de ELISA. Após extração plasmidial, cada clone foi duplamente sequenciado

pelo método de Sanger (Sequenciador ABI 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster California, USA) com os *primers* T7 e SP6 (BigDye Terminator version 3.1).

### 2.3 Análise das sequências

O programa Chromas v.2.6.5 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) foi utilizado para a remoção dos adaptadores. Para a manipulação das sequências foi utilizado o programa Chromatogram Explorer (<http://www.dnabaser.com/download/chromatogram-explorer/index.html>).

Foram geradas sequências consenso para cada clone com programa CAP3 (Huang, X & Madan, 1999) e realizada a busca para eliminar os possíveis fragmentos de vetor no programa VecScreen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreem/about/>). Em seguida, utilizamos o programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para detectar possível contaminação do material. As sequências contendo SSRs foram identificadas pela ferramenta SSRIT (Temnykh *et al.* 2001). Os *primers* foram desenhados utilizando o Primer3 Plus (Untergasser, 2012).

### 2.4 Validação e caracterização dos marcadores microssatélites

As reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas com 20 ng de DNA genômico, tampão de reação 1X, 2,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mg/mL de BSA, 0,2 μM de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase. O volume final de cada reação foi de 12 μL. As condições de amplificação seguiram o sistema *touchdown* (Don *et al.*, 1991): *premelting* de 5 minutos à 95 °C, seguido de 10 ciclos de denaturação de 30 segundos à 95 °C, anelamento de 45 segundos à 65°C (temperatura decrescente de 1 °C por ciclo) e 40 segundos à 72 °C, em seguida, 30 ciclos de 45 segundos à 55 °C, com extensão final de 5 minutos à 72 °C. A amplificação foi verificada através de eletroforeses horizontais em gel de agarose 2% (p/v) corado com brometo de etídio. Foi realizada a genotipagem dos indivíduos em eletroforese vertical, usando o gel de poliacrilamida 6% (p/v) e a coloração das bandas foi feita com nitrato de prata de acordo com Creste *et al.* (2001). Foi utilizado o *ladder* 10pb (Invitrogen, Carlsbad, CA)

para estimar o tamanho dos fragmentos. A otimização dos marcadores foi realizada com 12 indivíduos de localidades diferentes.

A caracterização genética dos locos polimórficos foi realizada com as estimativas da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) com o programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi estimado, assim como o índice de fixação ( $F_{is}$ ) e o desequilíbrio de ligação (LD) com o programa Gene Pop 4.2 (Rousset, 2008). A frequência de Alelos Nulos (AL) foi estimada com o programa FreeNA (Chapuis, 2007). Para todos os  $P$ -valores aplicamos a correção de Bonferroni (Rice, 1989), considerando  $\alpha = 0,05$ .

## 2.5 Análises de estrutura populacional

A estrutura populacional foi avaliada com o programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Foram realizadas 500000 iterações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) após 200000 iterações de *burnin*. Para cada valor  $K$  do número de agrupamentos (com  $K$  variando de 1 a 10) foram realizadas 10 simulações independentes, considerando os modelos de ancestralidade com mistura e de frequências alélicas correlacionadas. A estimativa do número  $K$  de agrupamentos com maior probabilidade foi realizada com a ferramenta StructureHarvester (Earl & vonHoldt, 2012) utilizando o critério  $\Delta K$  (Evanno *et al.* 2005). A estrutura genética também foi avaliada por meio das estatísticas- $F$  estimadas com o pacote diveRsity (Keenan *et al.*, 2013).

Para a representação geográfica dos grupos identificados pelo programa Structure, uma interpolação espacial das probabilidades de ancestralidade ( $q$ ) foi realizada pelo método Kriging, para cada um dos grupos identificados pela análise Bayesiana de estruturação genética. Foi utilizada uma função disponibilizada por Oliver François (Université Joseph Fourier, Institut National Polytechnique de Grenoble) na plataforma R (R Core Team, 2015).

A distribuição hierárquica da variação genética entre as populações foi avaliada com a análise de variância molecular (AMOVA, Michalakis & Excoffer, 1996), realizada com o pacote poppr (Kamvar *et al.*, 2015). A divergência entre populações foi também caracterizada por meio da construção de um

dendrograma *neighbor-joining* baseado em distâncias genéticas de Nei (Nei, 1978) com o pacote *poppr* (Kamvar et al., 2015), todos utilizados no programa R (R Core Team, 2018).

As análises de diversidade populacional foram conduzidas com 14 marcadores microssatélites desenvolvidos para *P. laricoides* neste trabalho. Realizamos a caracterização da diversidade genética das populações com as estatísticas descritivas: heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), Número Médio de Alelos (NA), número de alelos privados (AP) e índice de fixação (Fis) no programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). O equilíbrio de Hardy-Wendberg (EHW) foi testado no pacote *diveRcity* (Keenan *et al.*, 2013) no programa R (R CoreTeam, 2018) e o PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) foi calculado no pacote *PopGenkit*, também no programa R.

### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterização genética dos locos SSR e amplificação heteróloga

Foram sequenciados 96 clones e desenhados e sintetizados 50 pares de *primers*, dos quais 15 pares amplificaram, resultando em 14 marcadores polimórficos e 1 marcador monomórfico para *P. laricoides* (Tabela 1).

O número total de alelos encontrados para os marcadores microssatélites foi de 64 e variou entre 2 (PLa22 e PLa36) e 12 alelos (PLa10 e PLa21), o que pode evidenciar um alto grau de polimorfismo dos locos. O valor do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,16 a 0,792 (Tabela 2). A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) média para todos os locos foi de 0,49, variando de 0,11 a 0,99 e a média das heterozigosidades esperadas ( $H_e$ ) foi de 0,54, variando de 0,17 a 0,81. As frequências alélicas variaram entre os locos e as populações (Tabela 2).

O desequilíbrio de ligação (LD) foi significativo apenas entre os locos PLa08 e PLa28 ( $p$ -valor = 0,0005 – Correção de Bonferroni). O teste de transferabilidade resultou em três marcadores (PLa17, PLa21, PLa28) que amplificaram em todas as espécies testadas (Tabela 3). Entretanto, o número de

marcadores transferidos para cada espécie variou de sete (*P. bahiensis*) a 11 (*P. ericoides* e *P. goiasensis*).

Tabela 1: Identificação e características dos pares de *primers* microsatélites desenvolvidos para *Psyllocarpus laricoides*. %GC = porcentagem de GC.

Marcador	Sequência	%GC	Motivo	Tamanho esperado
PLa02	F: TGTTGAACCCATGCCCAAGA	45.0	(GT) <sub>15</sub>	108
	R: ATTCACCCATGCTCACCCC	50.0		
PLa05	F: GACACAGGTGACCCTATGAG	55.0	(TG) <sub>7</sub>	181
	R: TGCACATGACTGCATTTTCT	40.0		
PLa08	F: ATTAAGCACGGCAGTAGTGT	45.0	(TG) <sub>8</sub>	126
	R: ACTCGCAAAGGAGAAGTGAA	45.0		
PLa10	F: TGATCCTTAGACCATCTCACT	42.9	(AT) <sub>5</sub> (TG) <sub>10</sub> (GT) <sub>5</sub>	171
	R: TCTAGCGTTGTTTAACCCCC	50.0		
PLa15	F: GTTAATTATTCACCTTTCCCACT	32.0	(TG) <sub>14</sub>	313
	R: TCAATATCCAGCATTTTACTTACT	32.0		
PLa17	F: GCTTTCTCTGCTGCTCTCTA	50.0	(CA) <sub>17</sub>	261
	R: ATGTTCTGAGTGCTTGGAGT	45.0		
PLa18	F: ACCCACGTCTACATTATGAAGT	40.9	(GT) <sub>8</sub>	149
	R: CTGGACTGCGAACATGTTAC	50.0		
PLa20	F: CTACCTTTTCACTGCAGCAC	50.0	(AC) <sub>18</sub>	229
	R: CTGTGCCTGGCTTATTTAC	50.0		
PLa21	F: AGTTGGAAATGTAGCCAATGG	42.9	(AC) <sub>7</sub>	151
	R: CTGAGTTCCAAAGGTGCATG	50.0		
PLa22	F: TACAAATCTGTGCGTGGGTA	45.0	(GT) <sub>8</sub>	147
	R: GGATTCTCTCCAAGGGCTAT	50.0		
PLa28	F: GGACTAACCTGTACTTGCA	50.0	(AT) <sub>5</sub> (CA) <sub>15</sub>	272
	R: TACGACTCACTATAGGGCGA	50.0		
PLa30	F: TCACTTTTCACTCACTTCATCT	34.8	(AC) <sub>6</sub>	302
	R: CGATTCCTGGAGCAGTAAGT	50.0		

PLa36	F: GCAACTCACTTCACAGCAAT	45.0	(AC) <sub>17</sub>	138
	R: GGAGAGAGACTGCCAACTTT	50.0		
PLa42	F: AGTGTGGTGCTATTTCTCGA	40.9	(AC) <sub>16</sub>	168
	R: TGGAAGGATGCATGGATGAA	45.0		
PLa46	F: ATTTGAGGCAGGCAGAAAAC	45.0	(TG) <sub>22</sub>	219
	R: CTGCGTGATCTCATTTGGTC	50.0		

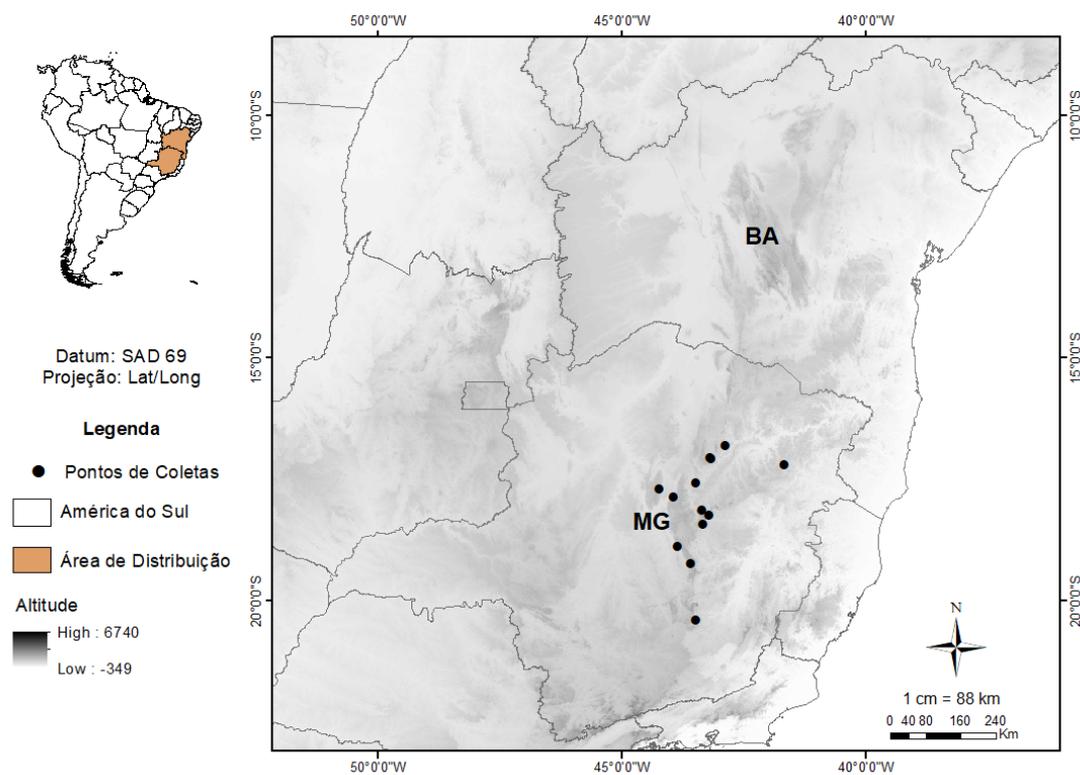


Figura 1. Distribuição do complexo *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. na Serra do Espinhaço (MG e BA) e localidades das populações coletadas.

Tabela 2: Estimativas de diversidade genética e coeficiente de endogamia com base em 14 locos microssatélites avaliados em *Psyllocarpus laricoides* da região da Serra do Espinhaço, considerando cada loco, os grupos de indivíduos definidos pelo programa Structure e para o conjunto total dos 93 indivíduos avaliados. N – número de indivíduos genotipados; A – número de alelos; Ar – riqueza alélica;  $H_O$  – heterozigosidade observada;  $H_E$  – heterozigosidade esperada;  $Fis$  – coeficiente de endogamia de Weir & Cockerham (1984); PIC – conteúdo de informação de polimorfismo. \* desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ); \*\* significativamente diferente de zero de acordo com 1000 réplicas de bootstrap

		PL02	PL05	PL08	PL10	PL15	PL17	PL18	PL20	PL21	PL22	PL28	PL30	PL36	PL46
<b>Grupo 1</b> (N = 32)	N	27	29	30	28	23	32	31	27	30	29	30	27	30	32
	A	4	3	4	5	4	3	3	4	9	2	5	2	2	4
	Ar	3,7	2,6	4	4,7	3,8	2,6	2,6	2,9	7,6	2	4,8	1,9	1,8	3,9
	$H_O$	1	0,621	0,9	0,393	0,348	0,281	0,613	0,111	0,467	0,103	0,467	0,148	0,067	0,188
	$H_E$	0,569 *	0,483	0,693 *	0,596 *	0,479	0,451 *	0,434 *	0,107	0,719 *	0,262 *	0,649 *	0,137	0,064	0,327 *
	$Fis$	-0,759 **	-0,284	-0,299 **	0,341	0,274	0,376 **	-0,411 **	-0,038	0,351 **	0,605	0,281 **	-0,08 **	-0,034 **	0,426 **
<b>Grupo 2</b> (N = 61)	N	58	56	58	46	51	61	60	58	48	43	60	60	61	49
	A	4	7	5	12	5	2	6	4	7	2	5	3	2	4
	Ar	4	4,9	4,9	9,3	4,3	2	4,6	3,8	6,1	1,9	4,5	2,9	2	3,4
	$H_O$	0,983	0,625	0,914	0,348	0,431	0,836	0,333	0,397	0,458	0,116	0,5	0,233	0,393	0,816
	$H_E$	0,683 *	0,581 *	0,742 *	0,829 *	0,659 *	0,487 *	0,309 *	0,405	0,53	0,11	0,627	0,213	0,316	0,636 *
	$Fis$	-0,439 **	-0,076	-0,231 **	0,58 **	0,346 **	-0,718 **	-0,077	0,02	0,135	-0,062 **	0,202 **	-0,097 **	-0,245 **	-0,283 **
<b>Todos os indivíduos</b> (N = 93)	N	85	85	88	74	74	93	91	85	78	72	90	87	91	81
	A	4	7	5	12	5	3	6	4	12	2	7	3	2	5
	Ar	2,8	2,1	2,7	1,9	1,9	2,2	1,8	1,5	2,1	1,1	2,3	1,3	1,4	2,1
	$H_O$	0,988	0,624	0,909	0,365	0,405	0,645	0,429	0,306	0,462	0,111	0,489	0,207	0,286	0,568
	$H_E$	0,748 *	0,55 *	0,729 *	0,818 *	0,724 *	0,629 *	0,372 *	0,324	0,697	0,176 *	0,717 *	0,19	0,245	0,583 *
	$Fis$	-0,321 **	-0,134	-0,248 **	0,554 **	0,44 **	-0,026	-0,151 **	0,055	0,338 **	0,367	0,318 **	-0,088 **	-0,167 **	0,025
	PIC	0,70	0,47	0,68	0,79	0,67	0,55	0,35	0,30	0,66	0,16	0,67	0,18	0,21	0,52

Tabela 3: Transferabilidade de microssatélites desenvolvidos para *Psyllocarpus laricoides* para outras espécies do gênero *Psyllocarpus*. (+) – amplificação positiva, (-) não houve amplificação.

	PLa 02	PLa 05	PLa 08	PLa 10	PLa 15	PLa 17	PLa 18	PLa 20	PLa 21	PLa 22	PLa 28	PLa 30	PLa 36	PLa 42	PLa 46
<i>Psyllocarpus bahiensis</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>P. densifolius</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. ericoides</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. goiasensis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>P. phylocephalus</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>P. scatignae</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>P. scwackei</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>P. asparagoides</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

### 3.2 Diversidade e estruturação genética

Para definir os indivíduos com evidência de mistura entre grupos, foi usado um limite arbitrário de 80% do coeficiente de ancestralidade de cada indivíduo. Foram encontrados dois *pool* gênicos (Figura 2): o Grupo 1 (G1) com 32 indivíduos dos quais 03 apresentaram mistura com os indivíduos do Grupo 2 (G2). Dos 61 indivíduos do G2, 04 apresentaram mistura com os indivíduos do G1.

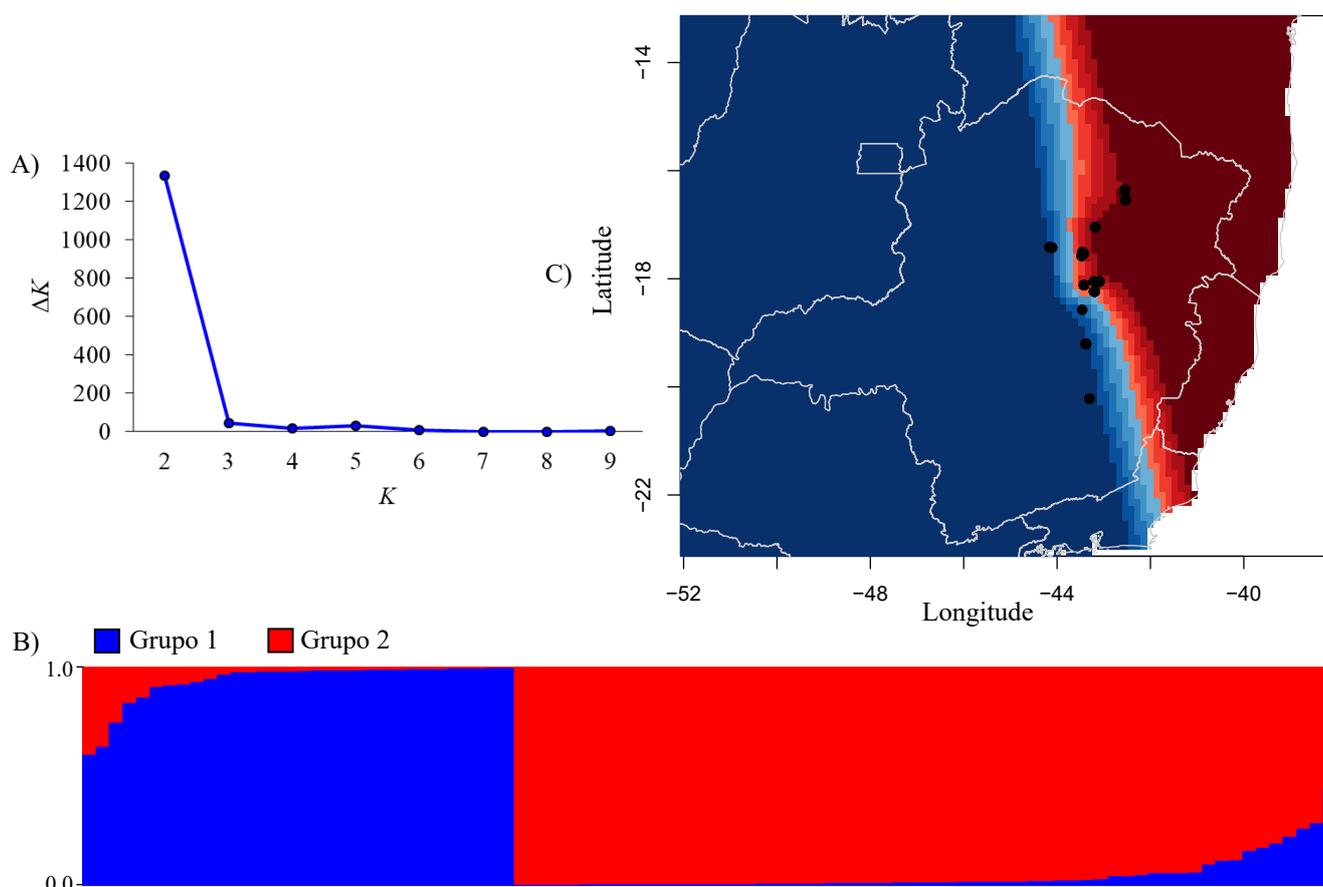


Figura 2: Análise do programa Structure realizada para o complexo *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. da Serra do Espinhaço, Brasil. A- Valores de K mais provável para agrupamento genético. B- Gráfico construído considerando K=2. C- Gráfico de interpolação espacial das probabilidades de ancestralidade.

A caracterização da diversidade genética das populações por meio das estatísticas descritivas mostrou que o número médio de alelos (NA) variou, e o número de alelos privados (AP) variou de nove em G1 a 23 em G2. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) foi maior do que a esperada ( $H_e$ ) em G2 (Tabela 4). O coeficiente de endogamia ( $Fis$ ) foi significativo em G1 (0,044) sugerindo a presença de indivíduos aparentados nesta população e não foi significativo para as demais populações, refletindo um excesso de indivíduos heterozigotos. Todas as populações apresentaram desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P$ -valor  $< 0,05$ ).

Tabela 4. Estimativas de diversidade genética e coeficiente de endogamia para grupos de indivíduos *Psyllocarpus laricoides* da região da Serra do Espinhaço definidos pelo programa Structure, com base em 14 locos microssatélites. N – número de indivíduos; A – número total de alelos; Ar – riqueza alélica; AP – número de alelos privados;  $H_o$  – heterozigosidade observada;  $H_e$  – heterozigosidade esperada;  $Fis$  – coeficiente de endogamia de Weir & Cockerham (1984);  $Fis$  IC95% – intervalos de confiança (95%) para  $Fis$  com base em 1000 réplicas de bootstrap. \* desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ).

	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>Ar</b>	<b>AP</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b><math>Fis</math></b>	<b><math>Fis</math> IC95%</b>
Grupo 1	32	54	3,5	9	0,408	0,427 *	0.044	-0.012; 0.092
Grupo 2	61	68	4,2	23	0,527	0,509 *	-0.036	-0.083; 0.012

O índice de fixação entre as populações foi significativo ( $F_{ST} = 0,188$ ), considerando um intervalo de confiança de 95%. Embora a maior parte da variação genética tenha sido observada dentro dos grupos (86%), a divergência entre grupos não pode ser desprezada (Tabela 5).

A análise de DAPC agrupou os indivíduos em seis prováveis grupos (Figura 3). Nota-se um agrupamento formado pelos grupos 1 e 2, correspondente ao *pool gênico* G1 e outro agrupamento formado pelos grupos 3, 4 e 5 correspondendo ao *pool gênico* G2 (Figura 3-C). Outro grupo (grupo 6) corresponde a indivíduos mistos (Figura 3-B).

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de grupos de *Psyllocarpus lariocides* Mart. & Zucc. definidos pela análise no programa Structure. GL = graus de liberdade, SQ = soma de quadrados, MQ = média de quadrados, Var. Est. = variância estimada.

	GL	SQ	MQ	Var. Est.	%
<b>Entre grupos</b>	1	61,826	61,826	0,690	15%
<b>Dentro de grupos</b>	184	720,841	3,918	3,918	85%
<b>Total</b>	185	782,667		4,607	100%

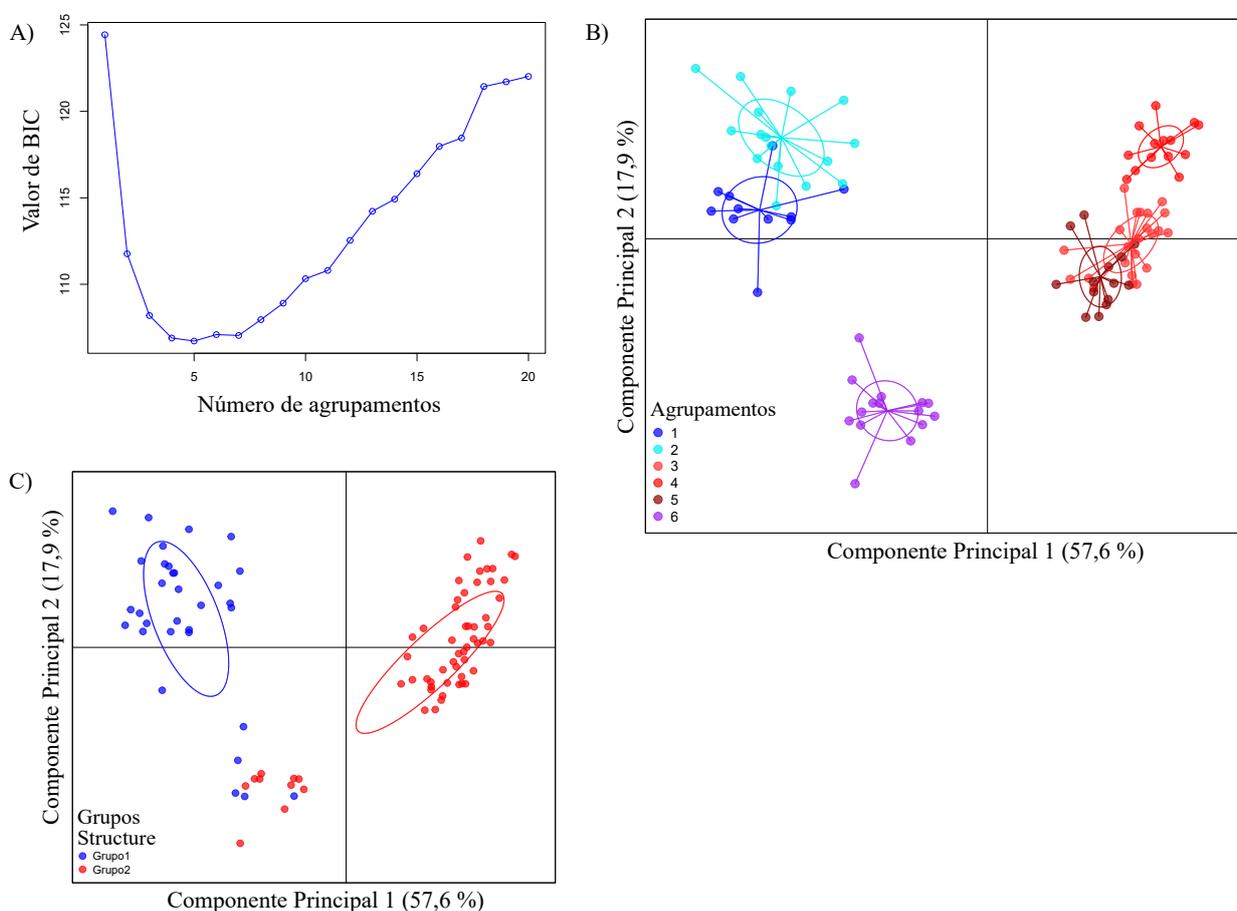


Figura 3: Análise discriminante de componentes principais para populações do complexo *Psyllocarpus lariocides* Mart. & Zucc. Com base em 14 marcadores microsatélites. A – Número de mais provável de agrupamentos definido pelo menor valor do critério de informação Bayesiana (BIC). B – Organização dos grupos de acordo com os eixos 1 e 2. C- Agrupamento de acordo com o programa Structure.

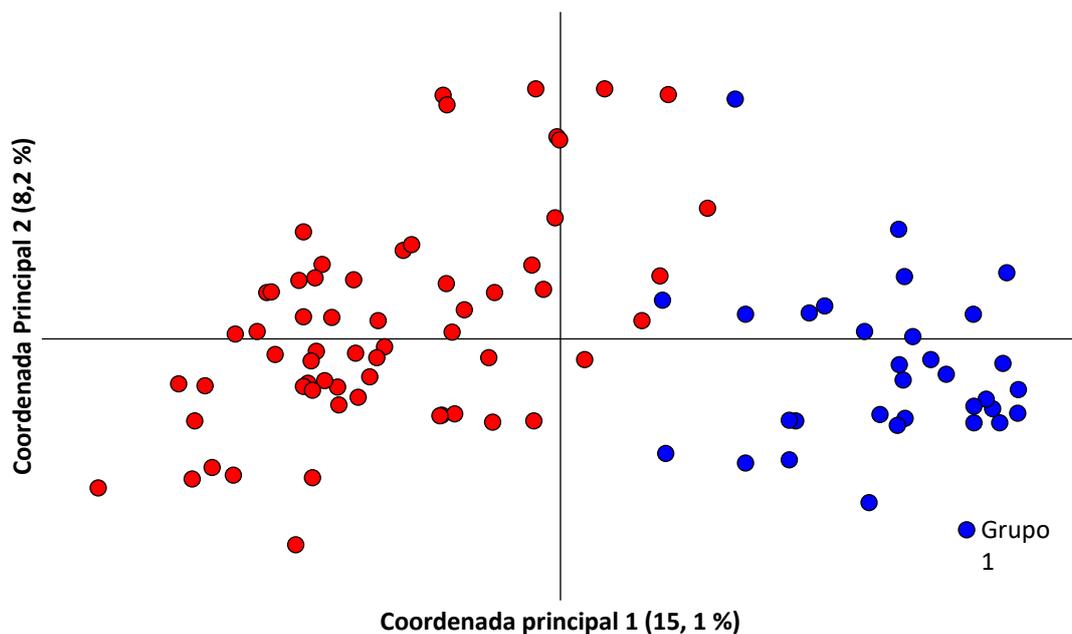


Figura 4. Análise de coordenadas principais (PcoA) entre as populações do complexo *P. laricoides* Mart. & Zucc. Com base em 14 marcadores microssatélites.

A análise de coordenadas principais (PCoA) também mostrou dois grupos correspondentes aos dois pool gênicos apresentados anteriormente (Figura 4). A maioria dos agrupamentos sugeridos pelo dendrograma *neighbor-joining* baseado em distâncias genéticas de Nei (1978) entre indivíduos apresentou baixos valores de suporte (Figura 5). Entretanto, uma vez mais os indivíduos se dividiram em dois *pool gênicos* evidenciando a formação do G1 e G2, alguns indivíduos mistos.

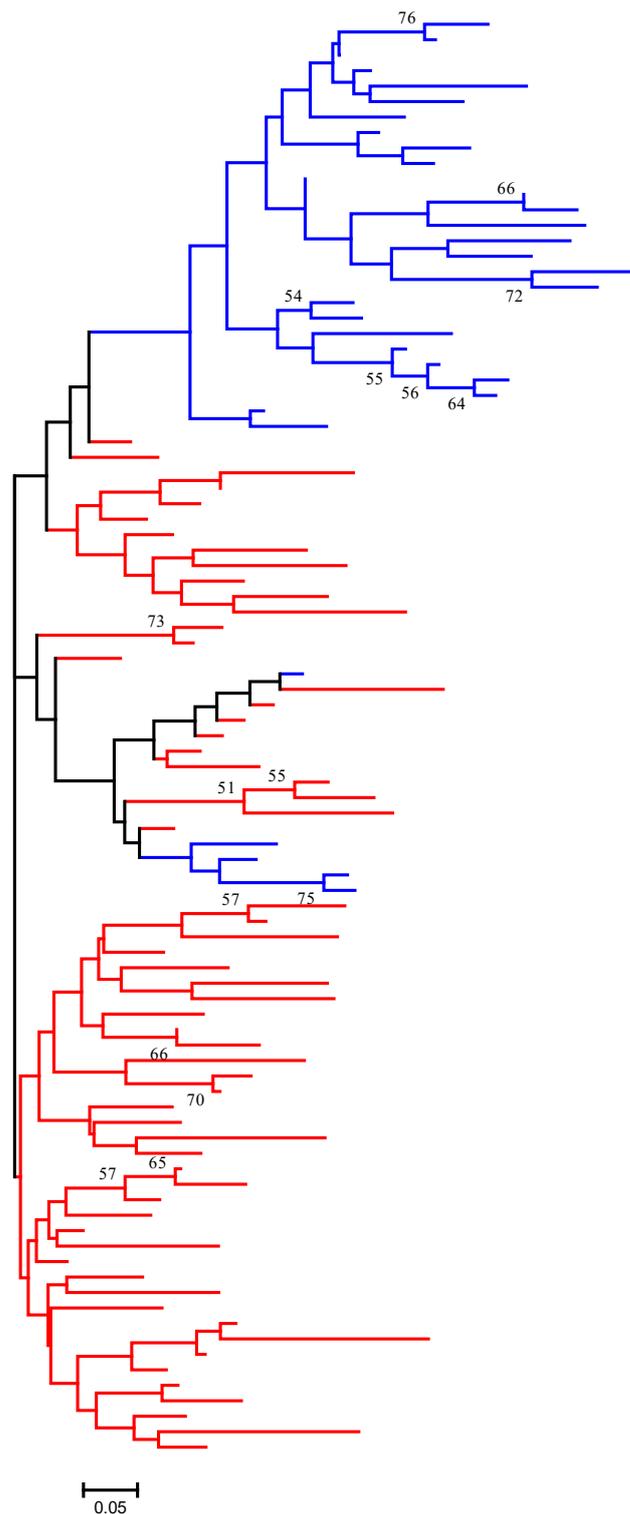


Figura 5: Dendrograma *neighbor-joining* construído com base em distâncias genéticas de Nei (1978) entre indivíduos das populações *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. Azul: Grupo 1. Vermelho: Grupo 2.

## 4. Discussão

### 4.1 Caracterização dos locos e transferibilidade

Considerando as estimativas de diversidade genética, os grupos do complexo *Psyllocarpus laricoides* apresentam altos níveis de polimorfismo. Os marcadores são os primeiros desenvolvidos para *P. laricoides* e para o gênero e foram poderosos em detectar a diversidade genética das populações em estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos na família como, por exemplo, em *Genipa americana* (Ruzza *et al.* 2018) e *Coffea canephora* (Ogutu *et al.*, 2016).

Com base nas frequências alélicas dos 14 locos microssatélites, foram estimados os índices de diversidade e estrutura genética para os grupos de *P. laricoides* amostradas. A heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) foi maior que a esperada ( $H_e$ ) para o G2, o que indica uma maior ocorrência de heterozigotos do que a esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por outro lado, em G1 a heterozigosidade observada foi menor do que a esperada, indicando possível endogamia na população. Em espécies da mesma família, como *Genipa americana* L., a heterozigosidade observada também foi menor do que a esperada nas populações avaliadas por Ruzza *et al.* (2018). Resultados semelhantes também foram observados em outros trabalhos com espécies tropicais, como em *Spondias mombin* L. (Cajazeira) (Silva *et al.*, 2017) e *Theobroma speciosum* Willd ex Spreng. (Cacauí) (Dardengo *et al.*, 2016). Similarmente, populações de *Coffea canephora* P. Efforts apresentaram  $H_o$  médio menor do que  $H_e$ , porém as diferentes populações avaliadas apresentaram níveis variáveis de déficit ou excesso de heterozigotos (Ogutu *et al.*, 2016).

Quanto maior o número de alelos nas populações, maior o número de heterozigotos esperado entre os indivíduos (Griffiths *et al.*, 2013; Ruzza *et al.* 2018). A partir da elevada heterozigosidade presente nos grupos pode ocorrer um grande número de combinações genotípicas, relevantes para a conservação da espécie e a manutenção do seu potencial evolutivo frente às mudanças ambientais e a colonização de novos territórios (Sebenn *et al.*, 1998a).

Foram transferidos com sucesso, para todas as espécies três marcadores (Tabela 3), que corroboram com os resultados de outros trabalhos de espécies da mesma família. Lima *et. al* 2009, verificaram a transferibilidade de marcadores anteriormente desenvolvidos para *Coffea* em *Psychotria tenuinervis* Muell. Arg., porém apenas dois se mostraram polimórficos, o que enfatiza a necessidade do desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para cada espécie. Entretanto, o número de locos transferidos considerando cada espécie (entre sete e 11) pode ser suficiente para uma caracterização inicial da diversidade genética nas diferentes espécies de *Psyllocarpus*. Desta forma, os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho podem consistir numa importante ferramenta para análise genética de espécies aparentadas a *Psyllocarpus laricoides*.

#### 4.2 Diversidade e estruturação genética

O índice de fixação médio no Grupo 1 foi de 0,044, o que pode refletir um pequeno grau de parentesco entre os indivíduos desta população, enquanto para o Grupo 2 este valor foi negativo. Em *Genipa americana*, o índice de fixação médio foi positivo, constatando-se também a presença de indivíduos aparentados dentro das populações (Lima *et al.* 2009). Porém, isso não parece ser comum para *G. americana*: outros autores descreveram índices negativos para diferentes populações da mesma espécie (Sebben *et al.* 1998 e Manoel *et al.* 2014). Segundo Kageyama *et al.* (2003), o índice de fixação ( $f$ ) é um dos mais importantes parâmetros genéticos da população, sendo usado para estimar o equilíbrio entre homozigotos e heterozigotos. Da mesma forma, a AMOVA (tabela 6) demonstrou que a maior parte da diversidade genética está dentro das populações de *P. laricoides*.

A diferenciação genética verificada pela PCoA (Figura 2), sugere a existência de dois grupos geneticamente distintos, corroborando com os resultados ( $k$ ) gerados pelo programa Structure. Em ambos os casos, parece haver uma correspondência moderada com a distribuição geográfica dos indivíduos. Dessa forma, pode ser inferido que G1 pode ser geneticamente distinta de G2.

As estimativas de  $F_{ST}$  entre os dois grupos também corroboram esse cenário, ao revelar maior diferenciação genética entre G1 e G2. Portanto, a organização da diversidade genética avaliada neste estudo indica uma estrutura moderada entre os grupos, perante a sua distribuição geográfica. Em *Genipa americana*, a diversidade genética não está geograficamente estruturada em seus indivíduos (Lima *et. al.* 2009).

O conhecimento da estrutura genética da população é essencial para os conservacionistas, a fim de que eles possam fazer mudanças na magnitude e na direção desejada (Siqueira *et al.* 2013). Neste contexto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que as populações do “complexo *P. laricooides*” que ocorrem no leste da Cadeia do Espinhaço apresentam uma redução de diversidade genética em comparação às populações que ocorrem no oeste, possivelmente devido à endogamia.

## **5. Considerações finais**

Em nosso trabalho foram encontrados dois “*pool gênicos*” apresentando estruturação genética diferentes, correspondendo as regiões leste e oeste da Serra do Espinhaço. Dessa forma, estes resultados podem servir para enfatizar a capacidade de adaptação dessas plantas ao longo da evolução perante as divergências de fatores abióticos encontrados na cadeia da Serra do Espinhaço, e podem corroborar com novas descrições taxonômicas de espécies para o gênero. Além disso, os resultados podem ser úteis para subsidiar estratégias de conservação destas populações.

## 6. Conclusões Gerais

De acordo com o proposto para o presente trabalho e com os resultados apresentados, podemos considerar que:

- Novas contagens cromossômicas para o clado Spermaceae foram apresentadas (*Hexasepalum teres*, *Psyllocarpus asparagoides*, *P. laricoides*, *Staelia domingosii* e *S. hatschbachii*) com número cromossômico  $2n=28$ , e *R. ferrugínea*, que compõe o grupo externo, com  $2n=22$ .
- As espécies aqui estudadas apresentaram cariótipo simétrico, assim como o já relatado para outras espécies do grupo.
- Há uma grande variabilidade de números cromossômicos disponíveis na literatura para a tribo ( $2n=12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 64, 72, 84, 100$  e  $108$ ).
- A Tribo Spermaceae possui 16,5% das espécies com dados cromossômicos, e para o Clado Spermaceae, apenas 9,3% das espécies possuem dados na literatura.
- A evolução cromossômica da tribo Spermaceae s. l. parece seguir a ordem de  $x=9$ , derivando de  $x=18$  e  $x=11$ .
- A evolução cromossômica do clado Spermaceae, baseia-se majoritariamente em  $x=14$ , com eventos de poliploidização.
- Uma biblioteca de marcadores microssatélites foi elaborada para *Psyllocarpus laricoides*,
- Dois “pool gênicos” apresentando estruturação genética diferentes foram encontrados para o Complexo *Psyllocarpus laricoides*, correspondendo as regiões leste e oeste da Serra do Espinhaço.
- Os resultados podem servir para enfatizar a capacidade de adaptação dessas plantas ao longo da evolução perante as possíveis divergências encontrados na cadeia da Serra do Espinhaço, e podem corroborar com novas descrições taxonômicas de espécies para o gênero.

## 6. Referências

Alves R.J. V & Kolbek J. (1994) Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio*, 113, 125–139.

Alves, F. M., Zucchi, M. I., Azevedo-Tozzi, A. M., Sartori, Â. L., & Souza, A. P. (2014). Characterization of microsatellite markers developed from *Prosopis rubriflora* and *Prosopis ruscifolia* (Leguminosae-Mimosoideae), legume species that are used as models for genetic diversity studies in Chaquenan areas under anthropization in South America. *BMC research notes*, 7(1), 375.

Antonelli A. & Sanmartín I. (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60, 403–414.

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(4), 277-288.

Carmo, J. A., Sobrado, S. V., Salas, R. M., & Simões, A. O. (2018). Two New Threatened Species of *Psyllocarpus* (Rubiaceae; Spermacoceae) from Eastern Brazil. *Systematic Botany*, 43(2), 579-590.

Creste, S., Tulmann Neto, A. & Figueira, A. (2001). Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology* -306.

Dardengo JFE, Rossi AAB, Silva BM, Silva IV, et al. (2016). Diversity and spatial genetic structure of a natural population of *Theobroma speciosum* (Malvaceae) in the Brazilian Amazon. *Rev Biol Trop*. 64: 1091-99.

Deus Vidal Jr, J., Cortez, M. B., Alves, F. M., Koehler, S., de Souza, A. P., & Koch, I. (2018). Development and cross-validation of microsatellite markers for *Rauvolfia weddeliana* Müll. Arg.(Apocynaceae) species complex. *Brazilian Journal of Botany*, 41(3), 681-686.

Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., & Mattick, J. S. (1991). 'Touchdown'PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research*, 19(14), 4008.

Doyle, J.J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.

Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.

Griffiths AJF, Lewontin RC, Carroll SB, Wessler SR (2013). *Introdução à Genética*. 10th edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Groeninckx, I., Dessein, S., Ochoterena, H., Persson, C., Motley, T. J., Kårehed, J., ... & Smets, E. (2009). Phylogeny of the Herbaceous Tribe Spermaceae (Rubiaceae) Based on Plastid DNA Data 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 109-132.

Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, 9(9), 868-877.

Hughes C.E., Pennington R.T., & Antonelli A. (2013). Neotropical Plant Evolution : Assembling the Big Picture. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 1–18.

Jombart T, Ahmed I (2011) *adegenet 1.3-1*: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27: 3070-3071, 2011.

Kageyama PY, Sebben AM, Ribas LA, Gandara FB (2003). Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sussecionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis*. 64: 93-107.

Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281.

Kårehed, J., Groeninckx, I., Dessein, S., Motley, T. J., & Bremer, B. (2008). The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3), 843-866.

Keenan K, McGinnity P, Cross TF, Crozier WW, Prodöhl PA (2013) *diveRsity*: an R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol Evol* 4(8): 782-788.

Lima, P. F., Ramos, F. N., Zucchi, M. I., Möller, M., Priolli, R. H. G., Colombo, C. A., & Solferini, V. N. (2009). Development and characterization of microsatellite markers for *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae), a shrub species from the Atlantic forest, and primers transferability from *Coffea*. *Conservation genetics*, 10(6), 1883.

Manoel RO, Freitas MLM, Barreto MA, Moraes MLT (2014). Development and characterization of 32 microsatellite loci in *Genipa americana* (Rubiaceae). APPS. 2: 1-3.

Michalakis, Y., & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142(3), 1061-1064.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.

Ogutu, C., Fang, T., Yan, L., Wang, L., Huang, L., Wang, X., ... & Han, Y. (2016). Characterization and utilization of microsatellites in the *Coffea canephora* genome to assess genetic association between wild species in Kenya and cultivated coffee. *Tree genetics & genomes*, 12(3), 54.

Paquette SR (2012) PopGenKit: Useful Functions for (batch) file conversion and data resampling in microsatellite datasets. R package version 1.0. Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=PopGenKit>.

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28:2537-2539.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. Available from: <http://www.R-project.org/>.

Rapini A., Ribeiro P.L., Lambert S., & Pirani J.R. (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4, 16–24.

Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223-225.

Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.

Ruzza, D. A. C., Rossi, A. A. B., Bispo, R. B., Tiago, A. V., Cochev, J. S., & Fern, J. M. (2018). The genetic diversity and population structure of *Genipa americana* L. in Northern Mato Grosso, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 17(1).

Salas, R. M., Viana, P. L., Cabral, E. L., Dessen, S., & Janssens, S. (2015). *Carajasia* (Rubiaceae), a new and endangered genus from Carajás mountain range, Pará, Brazil. *Phytotaxa*, 206(1), 14-29.

Sebbenn, A. M., Kageyama, P. Y., & Vencovsky, R. (1998). Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. *Scientia forestalis*, 53, 15-30.

Silva BM, Rossi AAB, Tiago AV, Schmitt KFM, et al. (2017). Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. *Genet Mol Res*. 16: 1-11.

Silveira F.A.O., Negreiros D., Barbosa N.P.U., Buisson E., Carmo F.F., Carstensen D.W., Conceição A.A., Cornelissen T.G., Echternacht L., Fernandes G.W., Garcia Q.S., Guerra T.J., Jacobi C.M., Lemos-Filho J.P., Le Stradic S., Morellato L.P.C., Neves F.S., Oliveira R.S., Schaefer C.E., Viana P.L., & Lambers H. (2015) Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, 1–24.

Simon M.F., Grether R., de Queiroz L.P., Skema C., Pennington R.T., & Hughes C.E. (2009) Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 20359–64.

Siqueira, M. B. M., Sujii, P. S., Bajay, M., Grandó, C., Schwarcz, K., Macrin, C., & Zucchi, M. I. (2013). How can molecular ecology contribute to forest restoration? *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4(4).

Siqueira, M. V., Bonatelli, M. L., Günther, T., Gawenda, I., Schmid, K. J., Pavinato, V. A., & Veasey, E. A. (2014). Water yam (*Dioscorea alata* L.) diversity pattern in Brazil: an analysis with SSR and morphological markers. *Genetic resources and crop evolution*, 61(3), 611-624.

Team, R. C. (2015). R: A language and environment for statistical computing.

Tuler, A. C., Carrijo, T. T., Nória, L. R., Ferreira, A., Peixoto, A. L., & da Silva Ferreira, M. F. (2015). SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). *Molecular biology reports*, 42(11), 1501-1513.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.

Zappi, D. C., Calió, M. F., & Pirani, J. R. (2014). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Rubiaceae. *Boletim de Botânica*, 32(1), 71-140.

## Anexos

Anexo 1: Números cromossômicos da tribo Spermaceae s.l. ,Rubiaceae.

<b>Espécie</b>	<b>2n</b>	<b>n</b>	<b>Autoria</b>
<i>Agathisanthemum bojeri</i> Hiern	36, 18		Kiehn, M. (1985) / Lewis W. H. (1965)
<i>Agathisanthemum globosum</i> (Host. et Rich.)	36		Lewis W. H. (1965)
<i>Amphiasma merenskyanum</i> Bremek.	18		Lewis W. H. (1965)
<i>Amphiasma</i> sp.	~36		Lewis W. H. (1965)
<i>Arcytophyllum lavarum</i> J. D. Smith	36		Kienh, M (2010)
<i>Bouvardia alexanderae</i> Carter	26		Lewis W. H. (1962c)
<i>Bouvardia chrysantha</i> Mart.	~72		Lewis W. H. (1962c)
<i>Bouvardia coccinea</i> A. Rich.	~72		Fagerlind (1937)
<i>Bouvardia corymbosa</i>	36		Fagerlind (1934, 1937)
<i>Bouvardia hybrida</i>	36		Fagerlind (1934, 1937)
<i>Bouvardia laevis</i> M. Martens & Galeotti	34-36		Kienh, M (2010)
<i>Bouvardia leiantha</i> Benth.	~72		Fagerlind (1937)
<i>Bouvardia scabrida</i> Mart. et Gal.	36, 72, 108		Lewis W. H. (1962c)
<i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) Schlecht.	36, 72		Lewis W. H. (1962c)

<i>Bouvardia versicolor</i> Ker. Gawl.	72		Lewis W. H. (1962c)
<i>Conostomium quadrangulare</i> (Rendle)		9	Kiehn, M. (1985)
<b>Cufod.</b>			
<i>Conostomium kenyense</i> Bremek.	~36		Lewis W. H. (1965)
<i>Conostomium natalense</i> (Hochst.) Bremek.	18		Lewis W. H. (1965)
<i>Dentella repens</i> (L.) J.R. Forst.	18	36	Philip, K. O. & P. M. Mathew (1988) / Selvaraj, R. (1987) / Raghavan T. S. & Rangaswamy (1941)
<i>Dibrachionostylus kaessneri</i> (S. Moore) Bremek.	18		Lewis, W. H. (1965)
<i>Hedyotis acerosa</i> A. Gray	22		Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis alata</i> Koenig in Wight & Arnott		13	Sinha, A. R. P. & K. Kumar. (1993)
<i>Hedyotis alexanderae</i> (A.M. Carter) W.H. Lewis	26		Terrell, E. E. (1986)
<i>Hedyotis arenaria</i> (Rose) Lewis	26		Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis articularis</i> R. Br.		11	Bir, S. S. & G. S. Chatha. (1987)
<i>Hedyotis asperuloides</i> Benth.	26		Lewis, W. H. (1926a)
<i>Hedyotis australis</i> Lewis et Moore	32		Lewis W. H. (1958c, 1962a)
<i>Hedyotis boseii</i> DC.	36		Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis brevipes</i> (Rose) Lewis	26		Lewis W. H. (1962a)

<i>Hedyotis caerulea</i> (L.) Hook.	16, 18, 32, 48	Lewis W. H. (1962a) / Lewis & Terrell (1962)
<i>Hedyotis canadensis</i> (Willd.) Fosb.	24                      12	Lewis & Terrell (1962) / Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis centranthoides</i> (Hook. & Arn.) Steud.	~100	Kiehn, M. (1996, 2005)
<i>Hedyotis coreana</i> H. Lév.	34	Terrell, E. E. <i>et al.</i> (1986)
<i>Hedyotis corymbosa</i> (L.) Lam.	18	Lewis W. H. (1958c)
<i>Hedyotis crassifolia</i> Rafin.	16	Lewis W. H. (1958c, 1962a)
<i>Hedyotis croftiae</i> (Britt. et Rusby) Shinnery	22	Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	32	Lewis W. H. (1967)
<i>Hedyotis elatior</i> (Mann) Fosberg	~100	Kiehn, M. (1996)
<i>Hedyotis galioides</i> F. Muell.	36	Lewis W. H. (C. n. p. I. 1966)
<i>Hedyotis grayi</i> Hook. f.	34	Ono, M. & Y. Masuda (1981)
<i>Hedyotis greenmanii</i> Fosb.	22	Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis halei</i> Torr. et A. Gray	18	Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis hispida</i> Retz.	32	Khoshoo & Bhatia (1963a)
<i>Hedyotis humifusa</i> A. Gray	22	Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis lancifolia</i> K. Schum.	36	Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis longifolia</i> (Gaertn.) Hook.	24                      12	Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis littoralis</i> (Hillebr.) Fosberg	96-100	Kiehn, M. (1996)
<i>Hedyotis longipes</i> (Wats.) Lewis	22	Lewis, W. H. (1962a)

<i>Hedyotis mexicana</i> Standl.	34		Ono, M. & Y. Masuda (1981)
<i>Hedyotis michauxii</i> Fosb.	32, 48		Lewis W. H. (C. n. p. l. 1966)
<i>Hedyotis mucronata</i> Benth.	26		Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis nantoensis</i> Hayata	32		Kiehn, M. (1996)
<i>Hedyotis nigricans</i> (Lam.) Fosb.	18, 20		Lewis, W. H. (1958c) / Lewis W. H. (1962a)
<i>Hedyotis nigricans</i> var. <i>rigidiuscula</i> (A. Gray)		11	Ward, D. E. (1984)
<b>Shinners</b>			
<i>Hedyotis nuttalliana</i> Fosb.		12	Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis obscura</i> Thw.	40-44		Kiehn, M. (1996)
<i>Hedyotis paradoxa</i> Kurz		15	Sinha, A. R. P. & K. Kumar. (1993)
<i>Hedyotis polypremoides</i> (A. Gray) Shinners	44	22	Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis pygmaea</i> Roem. & Schult.		11	Ward, D. E. (1983)
<i>Hedyotis procumbens</i> (Gmel.) Fosb.	28		Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis purpurea</i> (L.) Torr. et A. Gray	24	12	Lewis, W. H. (1962a) / Lewis & Terrell (1962) / Lewis W. H. (C. n. p. l. 1966)
<i>Hedyotis rosea</i> Rafin..		14	Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis rubra</i> (Cav.) A. Gray	22	11	Parfitt, B. D. <i>et al.</i> (1985) / Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis scandens</i> Roxb.		29	Sarkar, A. K. <i>et al.</i> (1982)

<i>Hedyotis salzmannii</i> (DC.) Steud.	30		Lewis W. H. (C. n. p. l. 1966)
<i>Hedyotis saxatilis</i> Lewis	26		Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis schlechtendahlia</i> subsp. <i>remyi</i> (Hillebr.) Fosberg	94-100		Kiehn (2005)
<i>Hedyotis subviscosa</i> (Wright) Shinnars	22		Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis terminalis</i> (Hook. & Arn.) W.L. Wagner & Herbst	90-100 / 96 - 100		Kiehn, M. (1996) / Kiehn (2005)
<i>Hedyotis trimenii</i> D. B. Debb & R. Dutta	c.90, 140-160	70-82, 56-72	Kiehn, M. (1986)
<i>Hedyotis uncinella</i> Hook. & Arn.		18	Hsu, C. C. (1968)
<i>Hedyotis uniflora</i> (L.) Lam.	72	36	Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis watsonii</i> Lewis		12	Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hedyotis wrightii</i> (A. Gray) Fosb.	22		Lewis, W. H. (1962a)
<i>Hemidiodia ocymifolia</i> (Wild. Ex. Roem. & Schult.)	28		Kiehn, M (2010)
<i>Houstonia caerulea</i> L.	32	16	Kapoor, B. M. & C. Gerrais (1982) / Kovanda, M. (1978) / Stevens (1912)
<i>Houstonia canadensis</i> Willd.	18		Terrell (1959)
<i>Houstonia gracilis</i> Brandegees		17	Terrell, E. E. <i>et al.</i> (1986)

<i>Houstonia longifolia</i> Gaertn.	12		Love, A. & D. Love. (1982) / Packer, J. G. & R. Witkus. (1982)
<i>Houstonia nigricans</i> var. <i>floridana</i> (Standl.) Terrell	18	9	Terrell, E. E. et al. (1986)
<i>Houstonia nigricans</i> var. <i>pulvinata</i> (Small) Terrell	20	10	Terrell, E. E. et al. (1986)
<i>Houstonia pusilla</i> Schoepf	16	8	Terrell, E. E. et al. (1986)
<i>Houstonia purpurea</i> L.	18		Terrell (1959)
<i>Houstonia serpyllifolia</i> Michaux	16		Ornduff (D. n. 1965)
<i>Kadua centranthoides</i> Hook. et Arn.	~100		Skottsberg (1955)
<i>Kohautia amatymbica</i> Eckl. & Zeyh.	54		Kiehn, M. (1985)
<i>Kohautia aspera</i> (Heyne ex Roth) Bremek.	36	18	Lewis, W. H. (1965) / Kiehn, M. (1985)
<i>Kohautia caespitosa</i> var. <i>amaniensis</i> (K. Krause) Bremek.	18, 36	9	Lewis, W. H. (1965) / Kiehn, M. (1985)
<i>Kohautia coccinea</i> Royle	18	9	Lewis, W. H. (1965) / Kiehn, M. (1985)
<i>Kohautia cynanchica</i> DC.	18		Lewis, W. H. (1965)
<i>Kohautia gracilis</i> (Wall.) DC.	36		Malla, S. B. et al. (1984)
<i>Kohautia grandiflora</i> DC.	18		Lewis, W. H. (1965)
<i>Kohautia longifolia</i> Klotzsch	36		Lewis, W. H. (1965)
<i>Kohautia platyphylla</i> (Schumann) Bremek.	18	9	Kiehn, M. (1985)

<i>Kohautia virgata</i> (Willd.) Bremek	54		Lewis, W. H. (1965)
<i>Lelya prostrata</i> (R. Good) W. H. Lewis	36		Lewis, W. H. (1965)
<i>Manettia barbata</i> Oerst.	22		Kienh, M (2010)
<i>Manettia bicolor</i> Paxt.	22		Poucques (1949a)
<i>Manettia coccinea</i> Griseb.	~36		Fagerlind (1937)
<i>Manettia inflata</i> Sprague	~36		Fagerlind (1937)
<i>Manettia luteo-rubra</i> (Vell.) Benth. Var. <i>paraguariensis</i> (Chodat) I. C. Chung	22	Kienh, M (2010)	
<i>Manostachya ternifolia</i> S. Martins	20-22		Kiehn, M. (1985)
<i>Neanotis hirsuta</i> var. <i>glabricalycina</i> (Honda) W. H. Lewis	36		Lewis W. H. (1967)
<i>Oldenlandia affinis</i> (Roem. & Schult.) DC.	18	9	Lewis W. H. (1985) / Rao, P. N. & L. B. Mwasumbi. (1981a)
<i>Oldenlandia alata</i> Koch	36		Raghavan T. S., Rangaswamy (1941)
<i>Oldenlandia angolensis</i> K. Schum.		18	Lewis W. H. (1985)
<i>Oldenlandia aspera</i> (Heyne ex Roth) DC.	18	11	Baquar <i>et al.</i> (1965) / Sanjappa, M. (1979a)
<i>Oldenlandia auricularia</i> (L.) F. Muell.	36 II		Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988)
<i>Oldenlandia biflora</i> L.	54, 72	18 II	Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988) / Selvaraj, R. (1987)
<i>Oldenlandia callitrichoides</i> Griseb.	22		Terrell, E. E. et al. (1986)

<i>Oldenlandia capensis</i> L. f.	18		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia cephalotes</i> (Hochst.) Kunze	36		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia coccineo</i> Royle	18		Khoshoo & Bhatia (1963a)
<i>Oldenlandia corymbosa</i> var. <i>corymbosa</i>	18		Kiehn, M. (1996)
<i>Oldenlandia corymbosa</i> var. <i>linearis</i> (DC.) Verdc.		9	Kiehn, M. (1985)
<i>Oldenlandia corymbosa</i> L.	36, 18	9 II	Selvaraj, R. (1987) / Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988) / Kienh, M (2010)
<i>Oldenlandia crassifolia</i> DC.	34		Lewis & Oliver (1970)
<i>Oldenlandia crystalliana</i> Roxb.	18	9 II	Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988) / Raghavan T. S., Rangaswamy (1941)
<i>Oldenlandia diffusa</i> (Willd.) Roxb.		27 II	Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988)
<i>Oldenlandia duemmeri</i> S. Moore	18		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia echinulosa</i> K. Schum.	18		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia fastigiata</i> Bremek.	18		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia flosculosa</i> Hiern	36		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia goreensis</i> (DC.) Summerhayes	36		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia herbacea</i> (L.) Roxb.	18, 36	9 II	Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988) / Selvaraj, R. (1987) /

		Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia herbacea</i> var. <i>herbacea</i>	9	Kiehn, M. (1985)
<i>Oldenlandia herbacea</i> var. <i>holstii</i> (K. Schum.) Bremek.	36	Kiehn, M. (1985)
<i>Oldenlandia jonhstonis</i> (Oliv.) K. Schum	18	Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia lancifolia</i> (Schumach.) DC.	36	Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia marginata</i> Bremek.	36	Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia microtheca</i> (Schltdl. & Cham.) DC.	11	Terrell, E. E. et al. (1986)
<i>Oldenlandia monanthos</i> (Hochst. ex A. Rich.) Hiern	18, 54, 72	Kiehn, M. (1985) / Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia nitida</i> Gamble	36 II	Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988)
<i>Oldenlandia paniculata</i> L.	18, 72	Sarkar, A. K. et al. (1980a) / Raghavan T. S., Rangaswamy (1941)
<i>Oldenlandia pellucida</i> Hiern	18	Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia praetermissa</i> Bremek.	36	Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia pruinosa</i> Kuntze	36	Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988)
<i>Oldenlandia pumila</i> (L. f.) DC.	18	Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia rupicola</i> (Sand.) Kuntze	18	Lewis W. H. (1965)
<i>Oldenlandia saxifragoides</i> Chiov.	18	Lewis W. H. (1965)

<b><i>Oldenlandia scopulorum</i> Bullock</b>	18		Lewis W. H. (1965)
<b><i>Oldenlandia senegalensis</i> Hiern</b>	18		Hagerup (1932)
<b><i>Oldenlandia somala</i> Chiov. et. Bremek</b>	36		Lewis W. H. (1965)
<b><i>Oldenlandia tenelliflora</i> (Blume) Kuntze</b>		28II	Philip, K. O. & P. M. Mathew. 1988
<b><i>Oldenlandia umbellata</i> L.</b>	36	9 II	Raghavan T. S., Rangaswamy (1941) / Selvaraj, R. (1987) / Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988)
<b><i>Oldenlandia wightii</i> Hook. f.</b>	36	36 II	Selvaraj, R. (1987) / Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988)
<b><i>Pentodon pentandrus</i> (Schum. Et Thon.)</b>	18		Lewis W. H. (1965)
<b>Vatke</b>			

Anexo 2: Números cromossômicos do clado Spermacoce (Spermacoaceae *sensu strictu*), Rubiaceae.

<b>Espécies</b>	<b>2n</b>	<b>n</b>	<b>Autoria</b>
<i>Crusea calcicola</i> Greenman		27-28	Anderson, W. R. (1972)
<i>Crusea calocephala</i> DC.	54 - 56		Anderson, W. R. (1972)
<i>Crusea longiflora</i> (Willd. ex R. S. S.) W. R. Anderson		27-28	Anderson, W. R. (1972)
<i>Crusea megalocarpa</i> (A. Gray) S. Wats.	14+1		Anderson, W. R. (1972)
<i>Crusea parviflora</i> Hooker & Arnott	28		Anderson, W. R. (1972)
<i>Diodia virginiana</i> L.	28	14	Lewis, W. H. (1962c) / Hsieh, C. F. & S. m. Chaw. (1987)
<i>Emmeorrhiza umbellata</i> (Spreng.) K. Schum.	28		Kienh, M (2010)
<i>Ernodea cokeri</i> Britton ex Coker	14		Kiehn, M. (1996)
<i>Ernodea littoralis</i> Sw.	14		Kiehn, M. (1996)
<i>Ernodea millspaughii</i> Britton	14		Kiehn, M. (1996)
<i>Ernodea taylori</i> Britton	14		Kiehn, M. (1996)
<i>Hexasepalum apicullata</i> Willd. J.H. Kirkbr. & Delprete	56		Kienh, M (2010)
<i>Hexasepalum serrulata</i> (P. Beauv.) J.H. Kirkbr. & Delprete	28		Mangenot S. & Mangenot G. (1962), Miège (1962)
<i>Hexasepalum teres</i> (Walt.) Small. J.H. Kirkbr. & Delprete	28		Jinno (1956b), Lewis, W. H. (1962c)

<b><i>Hydrophylax maritima</i> L.</b>	56		Shivakumar, P. M. & M. S. Chennaveeraiah (1983)
<b><i>Mitracarpus breviflorus</i> A Gray</b>		42	Lewis 1962d
<b><i>Mitracarpus hirtus</i> (L.) DC.</b>		28	Kiehn 1996
<b><i>Mitracarpus linearis</i> Benth.</b>		40	Lewis 1962d
<b><i>Psyllocarpus asparagoides</i> Mart. ex Mart. &amp; Zucc</b>		28	Nasario <i>et al.</i> 2017
<b><i>Psyllocarpus laricoides</i> Mart. ex Mart. &amp; Zucc</b>		28	Nasario <i>et al.</i> 2017
<b><i>Richardia brasiliensis</i> Gomes</b>	28, 84, 28		Correa, M.N. (2004) / Lewis, W. H. (C. n. p. 1966), (1962c) / Kienh, M (2010)
<b><i>Richardia humistrata</i> (C. et S.) Steud</b>	28		Lewis, W. H. (1962c)
<b><i>Richardia scabra</i> L.</b>	56	14	Philip, K. O. & P. M. Mathew. (1988) / Kienh, M (2010)
<b><i>Spermacoce alata</i> Aubl.</b>	28	14	Correa, M.N. 2004
<b><i>Spermacoce articularis</i> L.</b>	56,64	28	Selvaraj, R. 1987
<b><i>Spermacoce brachystema</i> R. Br. ex Benth.</b>	56		Raghasavan T. S., Srinivassan A. R. (1941)
<b><i>Spermacoce confusa</i> Rendle</b>	28		Kienh, M (2010)
<b><i>Spermacoce dibrachiata</i> Oliv.</b>	28,42		Lewis 1966a
<b><i>Spermacoce erecta</i> Larrañaga</b>	28		Philip, O. & Mathew, P.M. 1975b

<b><i>Spermacoce glabra</i> Michaux</b>	28		Lewis, W. H. (1962c)
<b><i>Spermacoce hispida</i> L.</b>	28, 56		Raghavan T. S. & Rangaswamy (1941), Koshoo. Bathia (1963a) / Raghasavan T. S., Srinivassan A. R. (1941b)
<b><i>Spermacoce laevis</i> Lam.</b>	24,28		Lewis W. H. 1962c
<b><i>Spermacoce natalensis</i> Hochst.</b>		14	Lewis 1966a
<b><i>Spermacoce neohispida</i> Govaerts</b>	56	28	Sanjappa, M. 1979a
<b><i>Spermacoce neoterminalis</i> Govaerts</b>	84		Lewis W. H. 1962c
<b><i>Spermacoce ocymoides</i> Burm. F.</b>	28, 52-56, 40		Kienh, M (2010), Lewis, W. H. (1962c, 1966), Philip, K. O. & P. M. Mathew (1988)
<b><i>Spermacoce pusilla</i> Wall</b>	32, 56	14	Shivakumar, P. M. & M. S. Chennaveeraiah. (1993) / Selvaraj, R. (1987) / Khaton, S. & S. I. Ali (1993)
<b><i>Spermacoce ruelliae</i> DC.</b>	56		Shivakumar, P. M. & M. S. Chennaveeraiah. (1993)
<b><i>Spermacoce tenuir</i> Gaertn.</b>	28		Fagerlind (1934, 1937)
<b><i>Spermacoce verticillata</i> L.</b>	28, 28, 28, 28		Miège (1962) / Shivakumar, P. M. & M. S. Chennaveeraiah (1983) / Borgen, L. (1980) / Correa, M.N. (2004)
<b><i>Staelia domingosii</i> R.M. Salas &amp; E.L. Cabral</b>		28	Nasario <i>et al.</i> 2017

**Anexo 3: Declaração de Bioética**

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

**DECLARAÇÃO**

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "***Cariótipos e evolução cariotípica do clado Spermacoce e Diversidade genética de Psyllocarpus laricoides Mart. & Zucc. (Rubiaceae)***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) aluno(a): João Paulo Sardin Nasario

Assinatura: \_\_\_\_\_

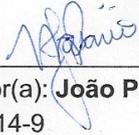
Nome do(a) orientador(a): Eliana Regina Forni-Martins


Data: 16 de janeiro de 2019

**Anexo 4: Declaração de direitos autorais****Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Cariótipos e evolução cariotípica do clado Spermacoce e Diversidade genética de *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. (Rubiaceae)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16 de janeiro de 2019.

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **João Paulo Sardin Nasario**  
RG n.º 46.799.214-9

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Eliana Regina Forni-Martins**  
RG n.º 8580582-8