UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MAYARA KRASINSKI CADDAH

Estudos taxonômicos no complexo

Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. (Clusiaceae)

Es	te exe	mpla	r corre	spond	e à red	ação f	inal
da	tese	defe	ndida Kras	pelo(a) cano	didato	(a)
-##	MD	ie d	. ce	11	An	r	
e	aprova	ada p	ela Co	missã	o Julga	dora.	

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C114e	Caddah, Mayara Krasinski Estudos taxonômicos no complexo <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. (Clusiaceae) / Mayara Krasinski Caddah. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.
	Orientadora: Maria do Carmo Estanislau do Amaral. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Botânica - Classificação. Cerrados. Clusiaceae. Microssatélites (Genética). Amaral, Maria do Carmo Estanislau do. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Taxonomic studies in the Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. complex (Clusiaceae).

Palavras-chave em inglês: Botany – Classification; Savanna; Clusiaceae; Microsatellites (Genetics).

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Maria do Carmo Estanislau do Amaral, Maria Imaculada Zucchi, Samantha Koehler.

Data da defesa: 20/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 20 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Carmo Estaislau do Amaral (Orientadora)

Mai a a E. Ame Assinatura

Mogucchi Assinatura

for the Assinatura

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi

Profa. Dra. Samantha Koehler

Prof. Dr. George John Shepherd

Prof. Dr. Volker Bittrich

Assinatura

Assinatura

"I went to the woods because I wished to live deliberately, to front only the essential facts of life, and see if I could not learn what it had to teach, and not, when I came to die, discover that I had not lived. I did not wish to live what was not life, living is so dear; nor did I wish to practice resignation, unless it was quite necessary. I wanted to live deep and suck out all the marrow of life, to live so sturdily and Spartanlike as to put to rout all that was not life, to cut a broad swath and shave close, to drive life into a corner. and reduce it to its lowest terms. and, if it proved to be mean, why then to get the whole and genuine meanness of it, and publish its meanness to the world; or if it were sublime, to know it by experience, and be able to give a true account of it in my next excursion."

> Walden or Life in the Woods, H. D. Thoreau (1817-1862)

Agradecimentos

Durante o mestrado, conheci muitos laboratórios e diversas técnicas em biologia vegetal. Conheci pessoas famosas no cenário da biologia nacional e aparelhos fantásticos e inconcebíveis. Convivi com colegas de pós com currículo de professor e projetos milionários. Trabalhei com ferramentas que sequer imaginava a existência, e aprendi muito sobre plantas e evolução, meu principal objetivo ao entrar no mestrado. Mas não foram as máquinas, nem os currículos, nem a biblioteca que mais me impressionaram. Foram as pessoas. Muitas lições de botânica e genética eu certamente vou esquecer (qual é mesmo o nome daquela planta....mmmmffffffff.....Gustaaaavooo....). Mas as lições de fraternidade, solidariedade, companheirismo, gentileza, humildade e por aí vai, eu tenho certeza que não serão esquecidas, por que essas não se guardam na mente, mas no coração. Por todas essas lições, as de amizade e as de biologia, serei eternamente grata, a muitas pessoas. A começar pelos meus queridos orientadores, Maria do Carmo do Amaral e Volker Bittrich, que possibilitaram e viabilizaram todo meu aprendizado. Já aproveito e registro meu débito com a Lea Maria do Amaral, auxiliar de pesquisa, motorista, preparadora de lanchinho, carregadora de podão e de escada, consultora de saúde e, principalmente, amiga. Entre tantas pessoas importantes para mim nesse trabalho, duas foram especialmente distintas. Boa parte dessa dissertação eu devo a Juliana Mayer, que indescritivelmente me dedicou seu tempo (e o tempo da Isa também) e paciência. A ela devo, além das lições de anatomia e histologia, lições de ética, profissionalismo e humanidade, além da amizade. Aproveito e agradeço ao Laboratório de Anatomia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica por possibilitarem o trabalho. Além da Ju, fui agraciada também com a ajuda da Tatiana Campos. A Taty literalmente me adotou, num momento em que eu me encontrava num lugar macabro, com pessoas assustadoras, fazendo coisas que eu nem sabia o que significava, precisando desesperadamente de "25 µl de DNA a 250 ng/µl". Foi quando aprendi que nem protocolos nem receitas de bolo são tão simples quanto parecem; que almoçar todo dia é bobagem; que ir pra casa antes das oito é vadiagem. E assim, a Taty transformou o lugar macabro em lar, as pessoas assustadoras em amigos e as coisas misteriosas em coisas um pouco menos misteriosas. À professora Anete de Souza agradeço pela colaboração, sem a qual esse trabalho não teria sido possível, mas principalmente agradeço pela chance de poder realizá-lo e também à professora Maria Zucchi, pelas lições, colaboração, e orientações. Agradeço também a todos os colegas do CBMEG, técnicos e alunos, por toda a ajuda, orientação e compreensão, principalmente à Adna Sousa, à Bianca Vigna, ao Danilo Sforça, à Fernanda Cidade, ao Gustavo Mori e à Prianda Laborda, que compartilharam aflições, brometo e clorofórmio, madrugadas e finais de semana, expectativas, muitas frustrações e, claro, importantes realizações, e tudo o mais que um típico laboratório de biologia molecular tem a oferecer aos seres errantes que ousam entrar em seus domínios. Agradeço também aos meus amigos do laboratório de Taxonomia por toda a convivência, sugestões, discussões, apoio e amizade, principalmente à Ana Paula Fortuna, ao Gustavo Shimizu, ao João Aranha, à Marcela Firens, ao Marcelo Monge, ao Marcos da Silva, à Rosemeri Morokawa, Silvana Penachione e ao Tiago Mouzinho. Também estarei para sempre em débito com a minha família campineira, da "Casa das Sete Mulheres", agradeço por toda a amizade à Andressa Pinheiro, à Flávia Melo, à Marcela Firens, à Rose Mary Louzada e à Rosemeri Morokawa. E, finalmente, mas não menos importante, nada eu teria feito sem o amor, a compreensão e o incentivo dos meus pais, Tania e Eduardo Caddah, e do meu namorado, Dejair Piekarski.

À Capes e à Faepex eu agradeço pelo financiamento de parte da pesquisa, e ao Cnpq pela minha bolsa durante todo o mestrado. Aproveito e agradeço aos herbários do Instituto Botânico, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, da Universidade de Copenhague e do Jardim Botânico de Nova Iorque pelo empréstimo dos materiais, e também ao Professor Manuel Gavilanes pela ajuda no herbário da Universidade Federal de Lavras.

Índice

Resumo/Abstract1
Introdução geral4
Capítulo 1 - Estudos morfo-anatômicos no complexo Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc.
(Clusiaceae)
Capítulo 2 - Microsatellite markers isolated from polyploid Kielmeyera coriacea Mart. &
Zucc. (Clusiaceae) from an enriched genomic library51
Capítulo 3 - Species Boundaries Inferred from Microsatellite Markers in the Kielmeyera
<i>coriacea</i> complex (Clusiaceae)
Considerações finais77
Anexos

Índice de figuras

Introdução geral

Figura 1 - Exem	plo de loco	microssatélite	dinucleotídeo	hipotético	(motivo	de repetição =
CA) e quatro alel	.OS					14

Capítulo 1

Figura 1 - Folhas e flores de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. e <i>K. grandiflora</i> (Wawra)
Saddi40
Figura 2 - Superfície foliar de Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. e K. grandiflora
(Wawra) Saddi em Microscopia Eletrônica de Varredura41
Figura 3 - Pecíolo e superfície foliar de Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. e K.
grandiflora (Wawra) Saddi
Figura 4 - Limbo de folhas de Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. e K. grandiflora
(Wawra) Saddi43
Figura 5 - Nervura central de folhas de Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. e K.
grandiflora (Wawra) Saddi
Figura 6 - Nervura central e limbo de folhas de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. e <i>K</i> .
grandiflora (Wawra) Saddi45

Capítulo 3

Figura 1 - PCO analysis of 120 individuals of <i>Kielmeyera coriacea</i> complex based in eight	ıt
microsatellite loci and Jaccard's similarity	5
Figura 2 - STRUCTURE clusters of 106 individuals of <i>Kielmeyera coriacea</i> complex6	8

Índice de tabelas

Capítulo 1
Tabela 1. - Material testemunho dos estudos micromorfológicos e anatômicos27
Tabela 2 - Caracteres morfológicos mais consistentes para a distinção das espécies do
complexo <i>Kielmeyera coriacea</i> e seus respectivos estados28
Capítulo 2
Tabela 1 - Characterization of 11 microsatellites in <i>Kielmeyera coriacea</i>
Capítulo 3
Tabela 1 - Vouchers of each studied population61
Tabela 2 - Comparative characterization of eight microsatellite loci in Kielmeyera coriacea
complex
Tabela 3 - Distribution of alleles of seven locus in populations of Kielmeyera coriacea
complex64
Tabela 4 - Dissimilarities (ϕ_{ST} -value) scored in different comparisons among populations
of <i>Kielmeyera coriacea</i> complex66
Tabela 5 - Gene diversity of Shannon's information index (I) of populations and
populations groups of <i>Kielmeyera coriacea</i> complex

Índice de anexos

Anexo II - Coeficientes de ancestralidade parciais de 106 indivíduos do complexo *Kielmeyera coriacea* obtidos para quatro grupos (K=4) pelo software STRUCTURE........86

RESUMO ABSTRACT

Resumo

Kielmeyera Mart. & Zucc. (Clusiaceae) inclui 47 espécies e sua revisão mais recente foi baseada em caracteres morfológicos. A série Coriaceae (Wawra) Saddi distingue-se das demais principalmente pelas folhas coriáceas e pelo hábito arbóreo/arbustivo. Em sua nova circunscrição, a série apresenta apenas duas espécies, K. coriacea, com duas subespécies e sete variedades, e K. grandiflora, que antes estava incluída na primeira espécie como variedade. Apesar da recente revisão, a circunscrição taxonômica das espécies ainda é muito problemática. Kielmeyera coriacea é amplamente conhecida como um dos principais componentes do Cerrado, enquanto K. grandiflora é pouquíssimo conhecida. Dessa forma, os dois táxons específicos envolvidos na série Coriaceae (Wawra) Saddi foram investigados para esclarecer o relacionamento dentro do grupo e para propor, se fosse o caso, uma classificação mais clara. Para tanto foram procedidos estudos morfológicos, anatômicos, fenológicos e moleculares. A morfologia e a anatomia foliar não foram satisfatoriamente informativas, e apenas revelaram caracteres sem consistência taxonômica. Apenas o padrão de nervação secundária, a tonalidade das folhas e a quantidade e distribuição dos compostos fenólicos se mostraram disgnósticos para as duas espécies. Adicionalmente, análises da superfície foliar em Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram um padrão de estruturas epicuticulares distinto nas duas espécies. Para o estudo da biologia molecular das espécies, foram utilizados marcadores microssatélites, capazes de detectar polimorfismo ao nível específico. Foram desenvolvidos 22 pares de *primers* a partir de uma biblioteca enriquecida para K. coriacea. Onze pares de primers amplificaram locos polimórficos e com bom padrão de amplificação para leitura. Nesta espécie, o padrão de bandas apresentou de 12 a 32 bandas por loco, e de duas a oito bandas por indivíduo. Kielmeyera grandiflora apresentou padrão de bandas semelhante. Foram amostradas duas populações de cada espécie (uma alopátrica e uma simpátrica, todas do estado de São Paulo). Trinta plantas de cada população foram genotipadas com oito pares de primers e 213 alelos foram encontrados ao total, quase metade deles sendo compartilhado pelas duas espécies. Diversas abordagens utilizando softwares de genética de populações indicaram dois grupos distintos dentro das populações amostradas, suportando a manutenção das duas espécies propostas por Saddi. A presença de vários alelos específicos de K. grandiflora em plantas de K. coriacea na área onde as espécies são simpátricas sugerem a ocorrência de hibridação introgressiva. Com os resultados obtidos neste trabalho, a proposta de Saddi de separação de K. grandiflora de K. coriacea foi corroborada, e o esclarecimento das relações entre os táxons infraespecíficos de K. coriacea tornou-se iminente à luz das novas ferramentas desenvolvidas.

Abstract

Kielmeyera Mart. & Zucc. (Clusiaceae) has 47 species and its more recent revision was based on morphological characters. The Coriaceae (Wawra) Saddi series is distinguished from the other series mainly by its coriaceous leaves and shrub/tree habit. In its latest circumscription, the series has two species, K. coriacea, with two subspecies and seven varieties, and K. grandiflora, which in the past was considered a variety of the later. However, the circumscription of the two species is problematic and they form the "K. coriacea complex". Kielmeyera coriacea is considered one of the main components of the Cerrado, while K. grandiflora is poorly known. Therefore, both specific taxa of the Coriaceae were investigated to clarify their relationship and to set out a more accurate classification, if necessary. Thus, we carried out morphological, anatomical, phenological, and molecular studies with the two species of the complex. Morphological and leaf anatomy studies were not satisfactory informative and revealed inconsistent differences between the species. Only the secondary veins pattern, the leaf shade and quantity and distribution of phenolic compounds in leaves tissues could be considered diagnostic characters. In addition, the analysis of the leaf surface in Scanning Electron Microscope showed a distinct pattern of epicuticular structure in both species. Microsatellite markers were used in the molecular studies, due to their capacity to detect polymorphism at specific level. Twenty-two primers pairs were developed from an enriched library of K. coriacea and eleven of them amplified polymorphic and readable loci. In this species, the band pattern presented 12 to 32 bands per locus and two to eight bands per individual. Kielmeyera grandiflora showed a similar band pattern. For each species we sampled two populations (one allopatric and one sympatric, all from São Paulo state). Thirty plants of each population were genotyped with eight microsatellites and 213 alleles were found; almost half of that were shared by the two species. Different approaches using population genetics softwares indicated two distinct groups inside the four populations, supporting the maintenance of the two species proposed by Saddi. The presence of many alleles specific to K. grandiflora in K. coriacea plants of the sympatric area suggests an introgressive hybridization. Our results corroborated Saddis's proposal of recognize both K. grandiflora and K. coriacea, and the clarification of the infraspecific taxa of K. coriacea becomes imminent in the light of these new developed tools.

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução Geral

Tradicionalmente conhecida por Guttiferae Jussieu, a família Clusiaceae Lindley é composta por plantas lenhosas, perenifólias e laticíferas, distribuídas amplamente nas regiões tropicais úmidas e de baixas altitudes (Stevens 2007). Apresenta 27 gêneros e aproximadamente 1090 espécies (Bittrich 2003; Judd et al. 1999; Stevens 2007). Dentro de Malpighiales, a família está intimamente relacionada a Bonnetiaceae, Hypericaceae e Podostemaceae, no entanto, as relações dentro desse grande grupo não estão completamente elucidadas (APG 2003; Gustaffson et al 2002; Stevens 2007). Duas subfamílias monofiléticas reconhecidas em Clusiaceae (Stevens 2007): são Kielmeyeroideae, abrigando as tribos Calophylleae e Endodesmieae, com um total de 14 gêneros; e Clusioideae, contendo as tribos Clusieae, Garcinieae e Symphonieae, totalizando 13 gêneros. Clusioideae é composta por plantas normalmente dióicas, com canais secretores, folhas glabras com nervação não transcurrente e filetes espessos, enquanto que em Kielmeyeroideae as plantas geralmente apresentam folhas com cavidades secretoras e nervuras transcurrentes, flores hermafroditas e com filetes delgados (Stevens 2007). As relações entre essas duas subfamílias ainda não estão completamente esclarecidas, e evidências sugerem que Kielmeyeroideae é mais relacionada a Hypericaceae e Podostemaceae do que a Clusioideae, enquanto que esta subfamília parece ter maior afinidade com Bonnetiaceae do que com Kielmeyeroideae, o que tornaria a família Clusiaceae polifilética (Davis et al. 2007).

Histórico taxonômico

Kielmeyera Mart. & Zucc. pertence à tribo Calophylleae-Kielmeyeroideae e compreende 47 espécies distribuídas principalmente no Brasil, em regiões de baixa altitude (Stevens 2007). O gênero distingue-se dentro da família principalmente pelas folhas alternas e pelos frutos capsulares lenhosos, 3-valvares, com numerosas sementes aladas (Bittrich 2003; Stevens 2007), e está intimamente relacionado a *Caraipa* e *Haploclathra* (Notis 2004), gêneros amazônicos e das Guianas. *Kielmeyera* foi descrito por Martius & Zuccarini (1825), que propuseram sua inserção na família "Bonnetiae". Nesta obra, foram brevemente descritas cinco espécies, entre elas *K. coriacea*. No ano seguinte à publicação do gênero, Martius (1826) publica a descrição detalhada dessas plantas e ilustrações coloridas. Pouco depois, mais sete espécies foram descritas (Cambessèdes 1828), entre elas *K. tomentosa*, *K. humifusa* e *K. falcata*. Na seqüência, Pohl (1830) descreveu outras quatro espécies, entre elas *K. oblonga* e *K. microphylla*.

Na primeira revisão do gênero, preparada para a *Flora brasiliensis* (Wawra 1886), *Kielmeyera* foi incluído em Ternstroemiaceae, mas logo em seguida Engler (1888), no tratamento das Guttiferae, já sugere a inserção do gênero nesta família. Wawra divide o gênero em quatro seções, com *Coriaceae* incluindo *K. falcata* Cambess., *K. humifusa* Cambess., *K. coriacea* Mart. & Zucc., *K. microphylla* Pohl e *K. tomentosa* Cambess. Dentro de *K. coriacea*, foram reconhecidas três variedades: var. *typica* (= var. *coriacea*), var. α . *oblonga*, baseada em *K. oblonga* Pohl, uma espécie com flores róseas; e var. β . *grandiflora*, proposta sobre o nome *K. grandiflora*, supostamente sugerido por Saint-Hilaire a uma coleta de Pohl (Pohl 110, *in schaed:* W); assim, esses antigos nomes específicos foram reduzidos à categoria de variedade. No entanto, os nomes das variedades nunca foram amplamente utilizados.

A revisão mais recente do gênero foi realizada por Saddi (1982), baseada principalmente em caracteres morfológicos. A partir de seus estudos, Saddi descreve diversas novas espécies e propõe novas classificações infraespecíficas (1984a; 1984b; 1984c; 1984d; 1984e; 1984f; 1986; 1987a; 1987b). Fundamentado no trabalho de Wawra (1886), Saddi (1982) divide a seção Coriaceae em três séries, das quais a série Coriaceae distingue-se das demais pelas folhas coriáceas com a base da nervura central expandida, pelo hábito arbóreo/arbustivo, caule suberoso e sem xilopódio e pelas anteras delicadas. Apenas duas espécies compõem esta série: K. coriacea Mart. & Zucc., que inclui K. microphylla, K. tomentosa, K. falcata e K. oblonga como sinônimos; e K. grandiflora (Wawra) Saddi, novo status para K. coriacea var. grandiflora Wawra. Kielmeyera tomentosa e K. microphylla também recebem status novos, como subespécie e variedade de K. coriacea, respectivamente, pois Saddi (1982) considera suas características insuficientes para serem reconhecidas como espécies distintas. Por outro lado, K. oblonga e K. falcata foram apenas sinonimizadas sob a variedade típica, pois o autor considerou os caracteres supostamente distintivos para as espécies como simples variações fenotípicas. Saddi inclui ainda em K. coriacea o sinônimo Martinieria arborea de Vellozo (sua data efetiva de publicação é 1829), cujo tipo é representado apenas por uma ilustração da Florae fluminensis (Vellozo 1825). No entanto, nem a prancha nem a breve descrição da espécie deixam claro se a planta se trataria de K. coriacea ou K. grandiflora. Portanto, esse nome precisa ser epitipificado, e nesta ocasião, caso a espécie ilustrada por Vellozo venha a ser considerada a mesma de K. grandiflora, o nome desta espécie tornar-se K. arborea, já que o epíteto "grandiflora" surgiu apenas em 1886, na ocasião da publicação da variedade na *Flora brasiliensis* (Wawra 1886). Por sua vez, *Kielmeyera humifusa*, que também compunha a seção *Coriaceae* de Wawra, é incluída na série *Corymbosae* (Wawra) Saddi, inserida também na seção *Coriaceae*, de acordo com Saddi.

Kielmeyera coriacea e K. grandiflora ocorrem simpatricamente e apresentam a distribuição geográfica e os padrões ecológicos mais amplos dentro do gênero, além de estarem entre as espécies mais notáveis e os constituintes mais importantes da flora lenhosa da vegetação de Cerrado s.s. do Brasil Central (Saddi 1984a), sendo também muito comuns em cerrados alterados pelo homem. Segundo o autor, as flores das duas espécies são quase indistinguíveis e os táxons só podem ser distintos pela venação das folhas: reticulada, com as nervuras secundárias distantes entre si e não formando arcos conspícuos em *K. coriacea*, e uniformemente paralelas, com as nervuras secundárias compactas e formando arcos distintos em *K. grandiflora* (Saddi 1982; 1984a, mas ver Bittrich 2003). Para Durigan *et al.* (2004), no estado de São Paulo as duas espécies podem, ainda, ser separadas pelo tamanho e tonalidade das folhas (maiores e glaucas em *K. grandiflora*), pela coloração das flores (róseas em *K. grandiflora* e brancas em *K. coriacea*) e pelo tamanho dos frutos (maiores em *K. grandiflora*).

Saddi (1982) também reconhece táxons infraespecíficos para *K. coriacea*: duas subespécies e sete variedades. Assim como quaisquer outros níveis hierárquicos, não existem conceitos formais e absolutos relacionados às categorias infraespecíficas. Ao contrário do conceito de espécie, amplamente discutido no meio científico, pouca discussão existe sobre essas categorias inferiores (Hamilton & Reichard 1992). Normalmente no meio científico, as categorias de subespécie e variedade são reconhecidas como grupos naturais,

enquanto a categoria de forma representa um grupo de indivíduos não relacionados que compartilham uma característica peculiar, formando um grupo artificial (Hamilton 1995). O reconhecimento de duas categorias infraespecíficas dentro de uma única espécie é um fenômeno raro em taxonomia, e para a maioria dos taxonomistas, subespécies e variedades têm idêntica correspondência na prática (Raven 1974), e formas são irrelevantes do ponto de vista taxonômico (Hamilton 1995). No entanto, Saddi (1986) justifica que, em seu tratamento taxonômico, subespécies são distintas entre si por um considerável conjunto de caracteres morfológicos e pela distribuição geográfica em áreas distintas ou apenas parcialmente sobrepostas, enquanto variedades apresentam pequenas divergências morfológicas, mas constantes e facilmente perceptíveis, com as respectivas populações sendo geralmente simpátricas. Kielmeyera coriacea subsp. coriacea é caracterizada pelas folhas glabras e pelas nervuras secundárias sutis, e é constituída por quatro variedades, distintas entre si pelo tamanho e forma das folhas e das inflorescências, e pela presença ou ausência de indumento no pedicelo das flores. São elas: K. coriacea var. coriacea; K. coriacea var. microphylla (Pohl) Saddi; K. coriacea var. guiaensis Saddi; e K. coriacea var. glabripes Saddi. Kielmeyera coriacea subsp. tomentosa (Cambess.) Saddi é caracterizada pelas folhas com indumento e com nervuras secundárias proeminentes. Esta subespécie inclui três variedades: K. coriacea var. tomentosa (Cambess.) Saddi; K. coriacea var. intermedia Saddi; e K. coriacea var. pseudotomentosa Saddi, distintas pelo tamanho do pecíolo, pelo grau de proeminência das nervuras e pela densidade de tricomas nas folhas. Saddi (1986) admite, no entanto, que algumas de suas variedades poderiam vir a assumir o status de espécie por meio de estudos mais aprofundados.

Apesar da ampla distribuição de *K. grandiflora*, esse nome é pouquíssimo utilizado em comparação ao nome *K. coriacea*. Mesmo em sua revisão, Saddi (1982) lista muito mais material examinado de *K. coriacea* do que de *K. grandiflora*. Numerosos são os exemplos de flórulas que citam apenas o nome *K. coriacea*, quando na realidade a área estudada possui representantes das duas espécies (e.g. Mantovani & Martins 1993), ou mesmo possui apenas *K. grandiflora* (Santin 1999), ou ainda de trabalhos que aparentemente não utilizam a proposta de Saddi (Libano *et al.* 2006; Reis *et al.* 2007a; 2007b; Rocha *et al.* 2006; Sujii *et al.* 2006; 2007a; 2007b). Por serem plantas muito comuns nos cerrados, *K. coriacea* é ainda alvo dos mais variados estudos, como de floração (e.g. Oliveira & Sazima 1990), ecofisiologia (e.g. Arasaki 1993; Nardoto *et al.* 1998) morfologia (Dionelo-Basta & Basta 1984), estudos de propriedades medicinais e de interesse farmacológico (Lopes *et al.* 1977; Obici *et al.* 2008; Zagoto *et al.* 2006), incluindo a patente de extratos da planta (Cortez & Audi 2002). Dessa forma, uma reavaliação taxonômica do complexo *K. coriacea* é imprescindível para esclarecer mais apropriadamente a identidade dos organismos envolvidos.

Coleções de herbário vistas por Saddi e observações de especialistas (Bittrich 2003; Oliveira & Sazima 1990) têm indicado problemas na classificação proposta para o complexo *K. coriacea*, incluindo identificações duvidosas do próprio Saddi, além de observações de plantas na natureza sugerirem a possibilidade de hibridação entre as duas espécies propostas (*obs. pess.*), o que levaria, segundo Rieseberg (1997), ao aumento de diversidade genética intraespecífica, que poderia ser a causa, ao menos em parte, da multiplicidade de fenótipos encontrada em *K. coriacea* e dos problemas encontrados na atual classificação. Dessa forma, uma reavaliação taxonômica do complexo *K. coriacea*

10

Ferramentas

Essencialmente, taxonomia é uma ciência que utiliza os resultados de investigações de diversas áreas das ciências naturais para arquitetar os seus próprios, sendo imprescindível a utilização das mais diversas evidências possíveis para isso (Judd *et al.* 1999). No entanto, normalmente os dados disponíveis para a construção de informações taxonômicas são escassos e, quando existem, são insuficientes ou inutilizáveis. Dessa maneira, grande parte do trabalho em taxonomia é direcionada a atividades de coleta de dados e, portanto, os caracteres escolhidos para estudo devem ser cuidadosamente selecionados, levando-se em consideração a facilidade de obtenção e a informatividade (Stace 1989).

Morfologia

Os dados mais utilizados em taxonomia vegetal, tanto historicamente quanto modernamente, são os provindos da morfologia, já que são os mais facilmente observáveis e comparáveis, e são os que fornecem a estrutura e a fundamentação da maior parte das atuais classificações (Stuessy 1990). Pensando a taxonomia de maneira menos individualista e lembrando que ela própria é uma ferramenta para todas as ciências da vida, deve-se ter em mente que os trabalhos de taxonomia, na medida do possível, devem resultar em entidades claramente reconhecíveis pela morfologia, proporcionando uma ferramenta efetiva aos diversos ramos da biologia. Considerando que a morfologia do grupo estudado já foi amplamente detalhada por Saddi (1982; 1988; 1989; 1990), o presente trabalho objetiva apenas rever alguns aspectos morfológicos sob um olhar mais focado nos limites entre as espécies estudadas.

Anatomia

O estudo da anatomia dos órgãos e tecidos vegetais é também uma das ferramentas mais tradicionalmente utilizadas para o levantamento de caracteres passíveis de utilização sistemática. Algumas obras clássicas, como as publicadas por Solereder (1908), Metcalfe (1960) e Metcalfe & Chalk (1950; 1957; 1979) tratam a anatomia dos grupos vegetais com o objetivo especifico de auxiliar na identificação das plantas e de fornecer subsídios ao entendimento das relações de parentesco entre elas. Assim, a taxonomia de muitos grupos botânicos tem sido elucidada a partir de estudos de anatomia foliar, como em Celastraceae (Gomes *et al.* 2005), Cyperaceae (Alves *et al.* 2002), Erythroxylaceae (Bieras & Sajo 2004) e Poaceae (Ma *et al.* 2005).

Marcadores moleculares microssatélites

Como a biologia de maneira geral, a taxonomia vegetal vem passando por momentos fascinantes de "renascimento", reflexo da introdução das novas técnicas moleculares (Matioli 2001; Soltis & Soltis 2000). Utilizando-se de marcadores genéticos moleculares, a Sistemática Molecular gera um enorme banco de dados, passíveis de comparação entre organismos, permitindo-a fazer inferências de processos populacionais até filogenias (Hillis *et al.* 1996). Entre algumas das vantagens dos dados moleculares perante os tradicionalmente utilizados estão a quantidade muito maior de dados disponíveis para comparação e a facilidade de interpretação evolutiva dos caracteres examinados (Judd *et al.* 1999). No entanto, Crawford (1990) alerta que este tipo de dado deve ser, na medida do possível, comparado e contrastado com outras evidências, como dados morfológicos, cariológicos e ecológicos. Não existem dados moleculares publicados para o gênero *Kielmeyera*. Há, entretanto, evidências que sugerem que *K. coriacea* seja poliplóide (com 116 a 153 cromossomos), no entanto, não há comprovações da correta contagem dos cromossomos nem da correta identificação da planta, já que não há material testemunho dessas contagens.

Marcadores microssatélites (ou SSR - simple sequence repeats, Tautz 1989; Weber & May, 1989) são pequenas seqüências de DNA compostas por repetições em tandem de unidades formadas por um até seis nucleotídeos, encontradas em virtualmente todos os organismos, principalmente no DNA não-codificante. Ao contrário do seqüenciamento de regiões específicas do DNA, o polimorfismo de microssatélites deriva principalmente da variação no número de cópias das unidades repetitivas, ou seja, no tamanho das seqüências (Ellegren 2004). A maioria das mutações pode ser explicada por um de dois mecanismos principais. As mutações podem ser originadas durante a replicação do DNA, devido a uma pequena dissociação das fitas seguida de uma re-associação errônea (replication slippage, Schlotterer & Tautz 1992). Assim, ao longo das gerações, as mutações acrescentam ou diminuem unidades da repetição, de maneira que alelos de diferentes tamanhos são formados em uma população, conforme o modelo tradicionalmente mais aceito (modelo stepwise, Ohta & Kimura 1973; Slatkin 1987; Valdes et al. 1993). Alternativamente, as mutações em locos microssatélites podem também estar relacionadas a processos de recombinação desigual entre as fitas de DNA durante a mitose (Li et al. 2002). A estabilidade dos microssatélites pode ainda ser afetada por uma interação intrincada dos dois modelos, constituindo os modelos mistos de mutação (Li et al. 2002). Os diferentes alelos então criados são controlados pelos mecanismos evolutivos de mutação, seleção, deriva e migração (Chambers & MacAvoy 2000). A porção de DNA ao redor do

13

microssatélite é chamada "região flanqueadora", uma região mais conservada que a região repetitiva (Selkoe & Toonen 2006). A partir do seqüenciamento dessa região flanqueadora podem ser criados oligonucleotídios (*primers*) espécie-específicos, capazes de anelar-se ao DNA genômico e desencadear, assim, a amplificação da região que contém o DNA repetitivo (Figura 1).



Figura 1. Exemplo de microssatélite dinucleotídeo hipotético (motivo de repetição = CA) e quatro alelos. A, T, C e G = bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina e Guanina, respectivamente); r = número de repetições; pb = pares de base.

Dentre as vantagens dos microssatélites para estudos biológicos podem-se citar sua natureza multi-alélica e co-dominante, fácil amplificação por PCR e detecção, abundância e ampla ocorrência no genoma, além de requerer pouca quantidade de DNA (Powell *et al.* 1996). São considerados a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis atualmente (Ferreira & Grattapaglia 1996) e possuem grande abrangência de aplicação, sendo utilizados, por exemplo, em estudos de melhoramento genético, mapeamento genético, avaliação de germoplasma/estoque, estudos populacionais e de conservação de espécies (e.g. Clark *et al.* 2008; Liu *et al.* 2007; Kawamoto *et al* 2007; Oyant *et al.* 2008;

Neeraja *et al.* 2007; Romo *et al.* 2006; Sarno *et al.* 2004). Devido à alta taxa de mutação, microssatélites normalmente não são informativos para construções de filogenias. No entanto, pelo mesmo motivo têm o potencial de esclarecer relacionamentos intraespecíficos e entre espécies próximas, sendo utilizados em estudos de complexos de espécies, padrões filogeográficos, detectando processos como hibridação e até mesmo complementando filogenias (e.g. Craft *et al.* 2002; Jorgensen *et al.* 2008; Marthinsen *et al.* 2007; Yao *et al.* 2008).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo investigar os táxons específicos da série *Coriacea* proposta por Saddi (1982), estudando o relacionamento entre as entidades que a compõem e, assim, esclarecendo as questões relativas a nível hierárquico e possíveis subordinações, para propor, se fosse o caso, uma classificação mais natural para o grupo. Para tanto, foram realizados estudos de morfologia, anatomia, biologia reprodutiva e molecular de populações alopátricas (isoladas, consideradas populações "puras") e populações simpátricas (misturadas espacialmente) de *Kielmeyera coriacea* var. *coriacea* (*sensu* Saddi 1982) e *K. grandiflora*.

Referências

APG (2003) An update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot J Lin Soc 141:399-436

Alves MV, Estelita MEM, Wanderley MGL *et al.* (2002). Aplicações taxonômicas da anatomia foliar das espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae). Rev Bras Bot 25:1-9

Arasaki FR (1993) Crescimento foliar em árvores e crescimento inicial em plântulas de *Kielmeyera coriacea*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas

Bieras A, Sajo MG (2004) Anatomia foliar de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do cerrado do estado de São Paulo, Brasil. Acta Bot Bras 18:601-612

Bittrich V (2003) Clusiaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giulietti AM *et al.* Flora fanerogâmica do estado de São Paulo, v. 3, FAPESP: RiMa, São Paulo, pp 4562

Cambessèdes J (1828) Ternstroemiaceae. In: Saint-Hillaire A. Flora brasiliae meridionalis, v. I, p. VIII. A. Belin, Paris, pp 296-310

Chamber GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 126:455-476

Clark RW, Brown WS, Stechert R *et al.* (2008) Integrating individual behavior and landscape genetics: the population structure of timber rattlesnake hibernacula. Mol Ecol 17:719-730

Cortez DAG, Audi EA (2002) Uso do extrato da planta *Kielmeyera coriacea* e de seus princípios ativos para o tratamento dos sintomas da depressão, associados ou não com distúrbios da ansiedade. PI 0204026-3.

Craft KJ, Ashley MV, Koenig WD (2002) Limited hybridization between *Quercus lobata* and *Quercus douglassi* (Fagaceae) in a mixed stand in central coastal California. Am J Bot 89:1792-1798

Crawford DJ (1990) Plant molecular systematics: macromolecular approaches. Wiley Interscience, New York

Davis CC, Latvis M, Nickrent DL *et al.* (2007) Floral gigantism in Rafflesiaceae. Science Support material online available at <www.sciencemag.org/cgi/content/full/1135260/DC1>

Dionelo-Basta SB, Basta F (1984) Estudos morfológicos das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Kielmeyera coriacea* Mart. Brasil Florestal 58:25-30

Durigan G, Baitello JB, Franco GADC *et al.*(2004). Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. Páginas & Letras Editora e Gráfica, São Paulo

Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature 5:435-445

Engler A (1888) Guttiferae et Quiinaceae. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I. Flora brasiliensis, v. XII, p. I. Frid. Fleischer, Leipzig, pp 381-486

Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) Introdução ao uso dos marcadores genéticos em análise genética. Embrapa Cenargen, Brasília

Gomes SMA, Silva EAM, Lombardi JA *et al.* (2005) A anatomia foliar como subsídio à taxonomia de Hippocrateoideae (Celastraceae) no sudeste do Brasil. Acta Bot Bras 19:945-961

Gustafsson MHG, Bittrich V, Stevens PF (2002) Phylogeny of clusiaceae based on *rbcL* sequences. International J Plant Sciences 163:1045-1054

Hamilton CW (1995) Implications of the equivalence of subspecies and variety, and of the irrelevance of forma. Acta Hortic 413:57-63

Hamilton CW, Reichard SH (1992) Current practice in the use of subspecies, variety, and forma in the classification of wild plants. Taxon 41:485-498

Hillis DM, Moritz C, Mable BK. (1996) Molecular systematics. Sinauer Associates, Sunderland

Jorgensen MH; Carlsen T; Skrede I *et al.* (2008) Microsatellites resolve the taxonomy of the polyploid *Cardamine digitata* aggregate (Brassicaceae). Taxon 57:882-892

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA *et al.* (1999) Plant systematics: a phylogenetical approach. Sinauer Associates, Sunderland

Kawamoto Y, Tomari KI, Kawai S *et al.* (2008) Genetics of the Shimokita macaque population suggest an ancient bottleneck. Primates 49:32-40

Li YC, Korol AB, Fahima T *et al.* (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol Ecol 11:2453-2465

Libano AM, Rocha DMS. (2006) Fenologia da floração de uma população de *Kielmeyera coriacea*. In: Sociedade Botânica do Brasil. Resumos do 57º Congresso Nacional de Botânica. Material em CD-ROM, Gramado

Liu J, Liu L, Hou N *et al.* (2007) Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. Euphytica 155:249-258

Lopes JLC, Lopes JNC, Gilbert B *et al.* (1977) Osajaxantrhone from *Kielmeyera coriacea*. Phytochem 16:1101-1110

Ma HY, Peng H,; Li DZ (2005) Taxonomic significance of leaf anatomy of *Aniselytron* (Poaceae) as an evidence to support its generic validity against *Calamagrostis* s. l. J Plant Research 118:401-414

Mantovani W, Martins FR (1993) Florística do cerrado na reserva biológica de Mogi Guaçu, SP. Acta Bot Bras 7:33-60

Marthinsen G, Wennerberg L, Lifjeld JT (2007) Phylogeography and subspecies taxonomy of dunlins (*Calidris alpina*) in weastern Paleartic analysed by DNA microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers. Biol J Lin Soc 92:713-726

Martius, CFP (1826) Nova genera et species plantarum, v.I, p.IV. Typis Lindaueri, München

Martius CFP, Zuccarini JG (1825) Anzeigen. Flora 8:27-32

Matioli SR (2001) Prefácio. In: Matioli SR. Biologia molecular e evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto

Mayr E (1963) Animal species and evolution. The Belknap Press, Cambridge

Metcalfe CR (1960) Anatomy of the monocotyledons. Clarendon Press, Oxford

Metcalfe CR, Chalk L (1950) Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy. Clarendon, Oxford

Metcalfe C, Chalk L (1957) Anatomy of the dicotyledons. Claredon Press, Oxford

Metcalfe CR, Chalk L (1979) Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. 2.ed. Clarendon Press, Oxford

Nardoto GB, Souza MP, Franco AC (1998) Estabelecimento e padrões sazonais e produtividade de *Kielmeyera coriacea* (Spr) Mart. nos cerrados do Planalto Central: efeitos do estresse hídrico e sombreamento. Rev Bras Bot 21:313-319

Neeraja CN, Maghirang-Rodriguez R, Pamplona A *et al.* (2007) A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. Theor Appl Genet 115:767-776

Notis C (2004) Phylogeny and character evolution of Kielmeyeroideae (Clusiaceae) based on molecular and Morphological Data. MSc thesis, University of Florida

Obici S, Otobone FJ, Sela VRS *et al.* (2008) Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. J Ethnopharmacol 115:131-139

Ohta T, Kimura M (1973) The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. Genet Res 22:201-204

Oliveira PEAM, Sazima M (1990) Pollination biology of two species of *Kielmeyera* (Guttiferae) from brazilian cerrado vegetation. Plant Syst Evol 172:35-49

Oyant LHS, Crespel L, Rajapakse S *et al.* (2008) Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. Tree Genetics and Genomes 4:11-23

Pohl JBE (1830) Plantarum brasiliae icones et descriptiones hactenus ineditae, v. II, p. 2. Antonii Strauss, Wien

Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Science 1:215-222

Raven PH (1974) Proposals for the simplification if infraspecific terminology. Taxon 23: 828-831

Reis BF, Libano AM, Rocha DMS. (2007a) Comparação da relação entre estrutura vegetativa e produção de flores em uma população de *Kielmeyera coriacea* var. *coriacea* (Clusiaceae) em duas florações consecutivas. In: Sociedade Botânica do Brasil. Resumos do 58° Congresso Nacional de Botânica. Material em CD-ROM, São Paulo

Reis BF, Libano AM, Rocha DMS (2007b) Fenologia da floração em dois períodos consecutivos em uma população de *Kielmeyera coriacea* var. *coriacea* (Clusiaceae). In: Sociedade Botânica do Brasil. Resumos do 58° Congresso Nacional de Botânica. Material em CD-ROM, São Paulo

Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. Annual Review Ecol Syst 28:359-389

Rocha DMS, Sujii PS, Reis BF *et al.* (2006) Fenologia floral de *Kielmeyera coriacea var. coriacea* e *K. coriacea* var. *glabripes.* Variedades ou duas espécies distintas? In: Sociedade Botânica do Brasil. Resumos do 57° Congresso Nacional de Botânica. Material em CD-ROM, Gramado

Romo MMOV, Suzuki S, Nakajima M *et al.* (2006) Genetic evaluation of interindividual relatedness for broodstock management of the rare species barfin flounder *Verasper moseri* using microsatellite DNA markers. Fish Sci 72:33-39

Saddi N (1982) A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis, University of Reading.

Saddi N (1984a) A new combination in Kielmeyera (Guttiferae) Kew Bul 39:140

Saddi N (1984b) A new species of Kielmeyera (Guttiferae) from Peru. Kew Bul 39:741

Saddi N (1984c) Duas novas espécies do gênero Kielmeyera Martius (Guttiferae). Bradea 4:27-30

Saddi N (1984d) Novas espécies de *Kielmeyera* Martius (Guttiferae) do sudeste brasileiro. Rodriguésia 36:59-64

Saddi N (1984e) Some new taxa in Kielmeyera (Guttiferae). Kew Bul 39:729-740

Saddi N (1984f) Uma nova espécie de *Kielmeyera* Martius endêmica do Paraná. Rodriguésia 36:43-44

Saddi N (1986) Novos táxons intraespecíficos no gênero *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Bradea 4281-286

Saddi N (1987a) New species of Kielmeyera (Guttiferae) from Brazil. Kew Bul 42:221-230

Saddi N (1987b) Novitates Kielmeyerae brasilienses. Bradea 4:337-344

Saddi N (1988) Micromorphological evidence in the genus *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Rev Bras Biol 48:697-720

Saddi N (1989) Comparative external morphology study in the genus *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Publ Avulsas Herb Cent, 2:1139

Saddi N (1990) Leaf Venation patterns of species of *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Publ Avulsas Herb Cent, 3:1-47

Santin DA (1999) A vegetação remanescente do município de Campinas (SP): mapeamento, caracterização fisionômica e florística, visando a conservação. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas

Sarno RJ, Villalba L, Bonacic C *et al.* (2004) Phylogeography and subspecies assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellite markers: implications for vicuña conservation and management. Conservation Genetics 5:89-102

Schlotterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res 20:211-215

Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecol Letters 9:615-629

Slatkin M (1987) Heritable variation and heterozygosity under a balance between mutations and stabilizing selection. Genet Res 50:53-62

Solereder H (1908) Systematic anatomy of dicotyledons. Clarendon, Oxford

Soltis ED, Soltis PS (2000) Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. Plant Mol Biol:45-75

Stace CA (1989) Plant taxonomy and biosystematics. The University Press, Cambridge

Stevens PF (2007) Clusiaceae. In: Kubitzki (ed.). The families and genera of vascular plants, v 9. Springer, Verlag

Stuessy TF (1990) Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data. Columbia University Press, New York Sujii, PS, Libano AM, Rocha DMS (2006) Variação de tipos florais em uma população de *Kielmeyera coriacea*. In: Sociedade Botânica do Brasil. Resumos do 57° Congresso Nacional de Botânica. Material em CD-ROM, Gramado

Sujii PS, Libano AM, Rocha DMS (2007a) Comparação entre duas florações consecutivas em uma população de *Kielmeyera coriacea* var. *glabripes* Clusiaceae em Brasília, DF. In: Sociedade Botânica do Brasil. Resumos do 58° Congresso Nacional de Botânica. Material em CD-ROM, São Paulo

Sujii PS, Libano AM, Rocha DMS (2007b) Relação entre produção floral e características vegetativas em uma população de *Kielmeyera coriacea* var. *glabripes* (Clusiaceae) em Brasília, DF. In: Sociedade Botânica do Brasil. Resumos do 58° Congresso Nacional de Botânica. Material em CD-ROM, São Paulo

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 17:6463-6471

Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1993) Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. Genetics 133:737-749

Vellozo JMC (1825) Florae Fluminensis. Typographia nationali, Rio de Janeiro

Wawra H (1886) Ternstroemiaceae. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I. Flora brasiliensis, v12. Frid. Fleischer, Lipsiae

Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 44:388-396

Yao X, Ye Q, Fritsch PW *et al.* (2008) Phylogeny of *Sinojackia* (Styracaceae) based on DNA sequence and microsatellite data: implications for taxonomy and conservation. Ann Bot 101:651-659

Zagoto JN, Bracht A, Pagadigorria CL *et al.* (2006) Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat liver. J Ethnopharmacol 105:47-54

CAPÍTULO 1 ESTUDOS MORFO-ANATÔMICOS NO COMPLEXO *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (CLUSIACEAE)

Estudos morfo-anatômicos no complexo

Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. (Clusiaceae)

Mayara K. Caddah; Juliana L. S. Mayer; Maria do Carmo E. do Amaral; Volker Bittrich

Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. é um dos principais componentes do Cerrado. No entanto, a circunscrição taxonômica da espécie é problemática. A última revisão do gênero desmembrou a espécie em duas, *K. coriacea* e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi, mas a proposta é pouco adotada no meio científico. Neste estudo, procurou-se investigar as duas espécies dos pontos de vista morfológico e anatômico, com os objetivos de contribuir ao entendimento das relações entre as duas entidades e de detectar possíveis caracteres diagnósticos para a taxonomia do grupo.

Introdução

Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. é um dos principais componentes da flora lenhosa do Cerrado (Ratter *et al.* 2003) e, dessa forma, é objeto de estudo das mais variadas investigações biológicas. Na revisão taxonômica do gênero, Saddi (1982) desmembra a espécie em duas, elevando uma antiga variedade à categoria de espécie, *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. A principal diferença entre as duas espécies é o padrão de organização das nervuras secundárias. Todo o polimorfismo restante apresentado por *K. coriacea* é apresentado na forma de duas subespécies e sete variedades (Saddi 1982). No entanto, a circunscrição taxonômica da espécie e dos táxons relacionados é confusa e pouco adotada,
e a identificação dos espécimes é problemática, gerando suspeitas envolvendo muitas publicações científicas que utilizam o nome *K. coriacea*. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar morfológico e anatomicamente plantas pertencentes às duas espécies propostas por Saddi (1982), a fim de delinear mais claramente a classificação dentro complexo, contribuir à compreensão da história do grupo e fornecer caracteres úteis para a sua taxonomia.

Material e métodos

O estudo da morfologia das espécies foi baseado em observações de campo e na análise de exsicatas (herbários C, SP, UEC e NY). Apenas os aspectos relevantes para a diferenciação das espécies foram reavaliados (para descrições morfológicas mais completas, ver Saddi 1982). Material testemunho dos estudos micromorfológicos e anatômicos foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC), de acordo com a Tabela 1. Todos os indivíduos de *K. coriacea* estudados foram classificados como *K. coriacea* var. *coriacea* segundo a classificação proposta por Saddi (1982).

Observações de estruturas epicuticulares foram efetuadas sob Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram estudadas ambas as faces de duas amostras herborizadas e uma fresca (seca em sílica gel) de cada espécie (incluindo espécimes supostamente híbridos) e também do material tipo de *K. coriacea* (depositado no herbário de Munique). Porções da lâmina foliar de cada amostra foram recortadas e coladas em *stubbs*, cobertas com ouro (Balzers SCD 050) por 180 segundos e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 5800LV (15-20kV), no Instituto de Biologia/Unicamp. As descrições anatômicas foram baseadas em dois indivíduos de cada espécie, um proveniente de população isolada (sem a presença da outra espécie, populações consideradas "puras"; ambas localizadas no município de Campinas/SP) e outro proveniente de suposta zona híbrida (Alumínio/SP). Amostras da região mediana do limbo e do pecíolo de folhas maduras foram fixadas em FNT (formalina neutra tamponada; Lillie 1948 *in* Clark 1973) e FAA (formalina, ácido acético e álcoo etílico; Johansen 1940) para estudo estrutural e em SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) para evidenciação de compostos fenólicos, estocadas em etanol 70%, desidratadas em série butílica, incluídas em parafina e seccionadas em séries transversais e longitudinais com 10-12 µm de espessura em micrótomo de rotação Microm HM340E rotativo. Os cortes provenientes do material fixado em FAA e FNT foram corados com safranina e azul de astra. Os materiais foram montados em resina sintética e observados em microscópio óptico Olympus BX51.

Espécie	Estudo	Voucher (UEC)			
	Anatomia	124.190			
V agrigand	Anatonna	148.202			
к. сописеи	MIEX /	148.202			
	IVIE V	147.862			
	Anotomio	148.198			
V angu diflang	Anatonna	148.203			
к. granaifiora	MIEXZ	148.203			
	IVIE V	25.883			

 Tabela 1. Material testemunho dos estudos micromorfológicos e anatômicos, classificados conforme a proposta de Saddi (1982).

Resultados

Morfologia

Essencialmente, o que foi observado nas espécies estudadas é um acentuado polimorfismo morfológico. Algumas características apresentaram-se mais constantes e, dessa forma, mais consistentes para uma delimitação taxonômica. A Tabela 2 apresenta os caracteres morfológicos mais apropriados para a diferenciação das duas espécies e seus estados de caráter típicos são ilustrados na Figura 1.

Tabela 2. Caracteres	morfológicos	mais	consistentes	para	a distinção	das	espécies	do	complexo	Kielmeyera
coriacea e seus respec	tivos estados.									

Caracteres morfológicos	K. coriacea	K. grandiflora			
Espessura dos ramos largura do ápice (mm)	delgados 2,6 – 4,9 (21,2)	espessos (4,0) 6,2 – 30,8 (34,50)			
Pecíolo e nervura central	arredondados	achatados			
Tonalidade das folhas	verde-escuras	glaucas			
Nervuras intersecundárias	sutis	proeminentes			
Tamanho das flores comprimento das pétalas (mm)	menores (13,4) 14,8 - 19,6 (26,3)	maiores 18,9 – 25,4 (34,3)			
Cor das pétalas	brancas	róseas			

Comumente, *K. grandiflora* apresenta os ramos, dos quais partem as folhas, mais espessos que os ramos de *K. coriacea* (ver Tabela 2), característica responsável pelo único nome popular encontrado por Saddi (1982) para aquela espécie: "gordinha" (Figura 1 A-B). Apesar de ser típico para a espécie, no entanto, os ramos espessados não foram detectados em todas as plantas, assim como já foi observado em *K. coriacea*. O pecíolo das folhas e,

da mesma forma, a nervura central das folhas, apresentou-se tipicamente arredondado na face abaxial em *K. coriacea* e achatado em *K. grandiflora* (ver Figura 3 A-B e 5 A-B), assim como as folhas são geralmente obovadas nesta espécie e elípticas naquela (Figura 1 C-E). No entanto, devido ao grande polimorfismo apresentado pelas folhas em relação às formas, este caráter não pode ser utilizado com segurança para a delimitação das espécies.

A tonalidade das folhas (ver discussão abaixo sobre micromorfologia) e o padrão das nervuras secundárias mostraram ser os caracteres mais consistentes para a distinção das espécies. *Kielmeyera grandiflora* apresenta uma camada mais espessa de cutícula (ver discussão sobre micromorfologia), evidenciada pela tonalidade glaucescente das folhas, distintas das folhas verde-escuras de *K. coriacea* (Figura 1 C-G). Cambessèdes (1828), Martius (1826) e Pohl (1830), no entanto, descrevem *K. coriacea* como também possuindo folhas glaucescentes.

Em relação às nervuras secundárias, *K. grandiflora* apresenta um padrão de nervação mais compacto, com as nervuras intersecundárias bem evidentes (quase indistinguíveis das secundárias a olho nu), quando comparadas às de *K. coriacea* (Figura 1 E-I). Este caráter já foi observado por Saddi (1990) em um estudo sobre os padrões de nervação em *Kielmeyera*. Neste trabalho, menciona essa diferença como de valor taxonômico para a distinção de *K. coriacea* de *K. grandiflora*, embora na revisão do gênero (Saddi 1982) ter identificado a distância entre as nervuras secundárias principais como o caráter diagnóstico para essas espécies, estabelecendo o padrão de *K. grandiflora* como nervuras secundárias subjacentes com menos de três mm de distância entre si, enquanto *K. coriacea* apresentaria distâncias maiores. No entanto, a distância de três mm entre as nervuras secundárias (principais) em *K. grandiflora* não condiz com o observado neste

estudo (1,7 - 4,6 mm) e apenas poderia ser aceita se considerada a distância entre quaisquer nervuras secundárias (distância entre uma nervura secundária principal e uma nervura intersecundária). Ainda assim, este caráter não é constante, ocorrendo sobreposição dos valores de distância entre nervuras secundárias nas duas espécies [*K. coriacea:* (2,2) 3,0 – 6,5 (9,4)]. O padrão de nervação secundária mostrou-se diagnóstico no complexo estudado apenas no que diz respeito à similaridade ou não das nervuras secundárias principais das intersecundárias (nervuras secundárias principais tão evidentes quanto as intersecundárias em *K. grandiflora*). No entanto, em plantas herborizadas a detecção desta característica não é satisfatoriamente clara.

O nome "grandiflora" (flores grandes, em latim) foi adotado por Wawra (1886), na revisão do gênero para a *Flora brasiliensis*, onde aponta que a variedade assim nominada possui pétalas maiores que a variedade típica. Observamos que *K. grandiflora* usualmente apresenta pétalas e sépalas maiores que *K. coriacea* (ver Tabela 2). No entanto, também este caráter apresenta exceções e constante sobreposição dos limites dos estados apresentados pelas duas espécies e, portanto, deve ser utilizado com cautela. Ao contrário do tamanho das flores (um caráter quantitativo e, portanto, mais passível de sobreposição), a cor das flores (um caráter qualitativo) apresenta maior consistência para a diferenciação das espécies. Ambas as espécies possuem corola alva, no entanto, *K. grandiflora* possui pétalas rosadas (ao menos nas populações observadas) (Figura 1 J-K), evidentes no botão floral, enquanto que *K. coriacea* apresenta flores totalmente brancas. No entanto, este caráter apresenta força apenas quando observado *in vivo*, já que informações de coloração são apenas guardadas na forma de transcrições em etiquetas de exsicatas que, na quase

totalidade dos casos, fazem referência apenas à coloração branca das pétalas (cor predominante nas duas espécies).

Micromorfologia

Observações em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostraram distintos padrões de estruturas epicuticulares entre as espécies (Figura 2 A-H). Em ambas as faces, as folhas de K. coriacea apresentam um padrão essencialmente bidimensional, na forma de placas horizontais, irregulares, de margem indefinida que podem se sobrepor, formando finas camadas sobre a epiderme (Figura 2 A,C,E), caracterizando o modelo de "camadas fissuradas" de deposição de cera de Barthlott et al. (1998). O padrão das estruturas epicuticulares em K. grandiflora também se mostrou constante nas duas faces das folhas. No entanto, nesta espécie o padrão apresentou-se em complexos arranjos tridimensionais, na forma de densos aglomerados rosetados (Figura 2 D), compostos de placas irregulares, sem margem definida, em orientações diversas (Figura 2 F), semelhante ao modelo de "plaquetas irregulares" de Barthlott et al. (1998), de "colunas poligonais" (Barthlott et al. 1998) (Figura 2 G) ou na forma de filamentos moniliformes (Figura 2 H), estas duas últimas podendo ocorrer lado-a-lado, na mesma folha. Em ambas as espécies, essas estruturas epicuticulares estendem-se sobre as células-guarda dos estômatos, que estão localizados em pequenas depressões da superfície foliar (Figura 2 C-D). Os espécimes supostamente provenientes da zona híbrida apresentaram o mesmo padrão das respectivas populações puras. O material tipo de K. coriacea apresentou elevada contaminação por hifas fúngicas e, mesmo em porções onde se podia observar a superfície da folha, não foi encontrado qualquer tipo de estrutura epicuticular, talvez devido a algum processo de fixação do material botânico para herborização.

Anatomia

O pecíolo das plantas de ambas as espécies apresenta, em secção transversal, formato arredondado com duas projeções de pequeno porte na face adaxial, sendo o pecíolo de K. grandiflora mais achatado e o de K. coriacea mais arredondado ventralmente (Figura 3 A-B). A epiderme é uniestratificada e glabra. Subjacente à epiderme, ocorrem de três a muitas camadas de colênquima em toda a extensão do pecíolo, inclusive nas projeções. A região mais interna do córtex do pecíolo é formada por parênquima fundamental, composto por células com parede delgada, espaços intercelulares, canais secretores e idioblastos com drusas dispersos (Figura 3 C-D). O feixe vascular é único e colateral, com formato de arco tênue aberto. Em K. coriacea, o arco apresenta-se com as extremidades planas, enquanto em K. grandiflora o arco apresenta as extremidades curvas (Figura 3 A-D). No floema ocorrem células com conteúdo denso entre os elementos de transporte e células companheiras. O xilema é constituído por elementos de protoxilema e metaxilema dispostos em séries radiais separadas por células parenquimáticas. Em algumas amostras, as extremidades do arco formado pelo feixe formam uma dobra sobre si mesmas. Na região central, a medula apresenta, além de células parenquimáticas, canais secretores (de um a três) e drusas (Figura 3 C-D).

Nas duas espécies, os estômatos podem ser encontrados tanto na face abaxial quanto na adaxial das folhas (Figuras 3 E-F e 6 C-D). De maneira geral, podem ser classificados como paracíticos, como já destacado por Paula (1974), apesar de, eventualmente, algumas células subsidiárias poderem estar divididas no sentido transversal. Em vista paradérmica, pode-se observar que os feixes vasculares apresentam-se envolvidos por uma bainha de células parenquimáticas com conteúdo denso (Figura 4 A-B), inclusive na região da nervura central (Figura 4 C). Idioblastos com drusas estão presentes nas células parenquimáticas próximas aos canais e aos feixes vasculares (Figura 4 D). Canais secretores estão amplamente distribuídos pela lâmina foliar das duas espécies, correndo paralelamente aos feixes vasculares (Figura 4 D-F).

Da mesma forma que o pecíolo, a nervura central apresenta-se mais arredondada na face abaxial em K. coriacea e mais achatada em K. grandiflora, e a epiderme é uniestratificada e glabra em ambas as faces (Figura 5 A-B). Na região cortical próxima ao feixe vascular ocorrem células de parênquima fundamental com canais secretores dispersos (Figura 5 A-B). Sob luz polarizada, ficam evidentes as paredes espessadas das células do colênquima (na região cortical) e do feixe vascular (nas células que envolvem o feixe e nos elementos de vaso), além das drusas nos idioblastos (Figura 5 C-D). Em vista transversal, é possível observar que o sistema vascular apresenta um feixe vascular central de maior calibre com formato de anel, além de dois feixes menores localizados lateralmente, próximos à face adaxial, todos envoltos por células parenquimáticas de parede espessa. (Figura 5 A-F e 6 A-B). Diferentemente, Schofield (1968) encontrou o feixe central da nervura central formando um arco aberto (como no pecíolo) em espécimes de K. coriacea, e aponta também a absoluta ausência de idioblastos nas folhas desta espécie e de outras do gênero. No interior do feixe central ocorre uma medula composta por células parenquimáticas, um canal secretor central (podendo estar ausente em K. coriacea) e drusas dispersas (Figura 5 E-F).

Em vista transversal, o limbo das duas espécies compartilha muitos aspectos com outras espécies características de cerrado (Morretes & Ferri 1959). Pode-se verificar que o limbo possui epiderme uniestratificada e mesofilo dorsiventral, composto por duas ou três camadas de parênquima paliçádico clorofilado, eventualmente com algumas células dividindo-se e dispondo-se em número diverso de camadas, e por parênquima lacunoso, também clorofilado, mas com menor freqüência de cloroplastos (Figura 6 C-D). Em ambas as espécies, tanto o parênquima paliçádico como o lacunoso é composto por células alongadas, mas este apresenta organização mais compacta em *K. coriacea*. Os feixes vasculares menores estão distribuídos ao longo do limbo, envolvidos por células com conteúdo denso e por uma bainha com expansões de células parenquimáticas aclorofiladas tanto em direção à epiderme adaxial quanto à abaxial (Figura 6 E-F), como observado também por Morretes & Ferri (1959) em outras plantas de cerrado. As células da bainha do feixe podem ou não apresentar paredes espessadas.

Os materiais fixados em SFF revelaram a presença de compostos fenólicos no pecíolo e no limbo das duas espécies (Figura 7 A-F e 8 A-F). Em *K. coriacea* foram observados compostos fenólicos nas células epiteliais dos canais e nas células corticais, ausentes em *K. grandiflora* (Figura 7 A-B e 8 C-D). Em secção paradérmica e transversal do limbo, podem-se observar idioblastos com compostos fenólicos próximos aos feixes vasculares de maior e menor calibre nas duas espécies e também no mesofilo de *K. coriacea* (Figura 7 C-F e 8 A-F). A secreção (látex) presente nos canais não reage com SFF (Figura 8 B). Nas duas espécies foram encontrados idioblastos contendo compostos fenólicos, no entanto, com maior freqüência e intensidade em *K. coriacea*.

34

Discussão

As duas espécies propostas por Saddi (1982) compartilham a maior parte dos caracteres morfológicos, apresentando uma variação gradual entre os extremos típicos. Os caracteres usuais em taxonomia, aqueles presentes nos órgãos reprodutivos, apresentaram limitada utilidade no complexo K. coriacea. Na revisão do gênero, Saddi (1982) aponta que as flores das duas espécies são extremamente parecidas. Como ressaltado neste estudo, devido à sobreposição (não infreqüente) do tamanho da corola e do cálice, as flores são, na prática, indistinguíveis na ausência da informação de coloração da corola. No entanto, apesar da boa consistência deste caráter para a delimitação das espécies nas populações estudadas, a coloração branca das pétalas de K. coriacea (como observado neste trabalho) vai de encontro com a informação transcrita e ilustrada em Nova genera et species plantarum (Martius 1826) para a espécie, "petala (...) rosea", e também com as descrições de Cambessèdes (1828) e do próprio Saddi (1982) que descreve flores brancas para K. grandiflora e pétalas brancas ou rosas em K. coriacea. Kielmeyera coriacea var. oblonga (Pohl) Wawra, considerada por Saddi um sinônimo de K. coriacea var. coriacea (a variedade estudada neste trabalho), apresenta pétalas róseas (Pohl 1830). Tais discrepâncias entre as observações de campo procedidas neste estudo e as descrições morfológicas da literatura podem ser decorrentes de uma variação não detectada neste trabalho, identificações incorretas de Saddi ou ainda de processos de hibridação. Importante lembrar ainda que neste trabalho apenas a variedade típica de K. coriacea (a única presente no estado de São Paulo) foi o foco de estudo metódico, e a possibilidade de ocorrência de flores róseas em outras variedades não é descartável. Dessa forma, são os caracteres vegetativos, então, que permitiriam uma mais segura distinção entre as espécies. A

espessura dos ramos e a forma do pecíolo e da nervura central, na realidade, representam apenas uma tendência, e devem ser usados apenas a título de confirmação. A tonalidade das folhas e as características da sua nervação secundária são os caracteres morfológicos com maior poder taxonômico no caso do complexo *K. coriacea*. Infelizmente, estes caracteres nem sempre são preservados satisfatoriamente no material herborizado.

A presença de uma camada mais espessa de estruturas epicuticulares nas folhas de K. grandiflora, como sugerido pelas observações macroscópicas, foi confirmada pelas observações sob MEV. Estudos mais acurados precisam ser procedidos para confirmação da natureza desta camada epicuticular. Redução da perda de água por transpiração e de nutrientes por lixiviação e proteção contra patógenos são propriedades normalmente atribuídas às camadas de cera ocorrentes sobre as folhas (Baker 1982) e que podemos entender como possíveis fatores que poderiam atuar como pressões de seleção no ambiente do cerrado. Ainda, folhas glaucescentes devido à presença maciça de cera epicuticular apresentam significativa vantagem em ambientes com alta incidência de radiação solar (Cameron 1970), como é o caso no Cerrado s.s. A morfologia da camada de cera tem sido utilizada com sucesso como caráter taxonômico (e.g. Heinrichs et al. 2000; Tomaszewski 2004; Wissemann 2000). No caso do complexo K. coriacea, foi verificado certo grau de polimorfismo morfológico na camada epicuticular em K. grandiflora, mas que difere consistentemente do padrão de K. coriacea. Estudando o padrão de deposição de cera das espécies de Kielmeyera, Saddi (1988) aponta uma crosta amorfa de cera cobrindo a superfície abaxial das folhas de K. coriacea var. coriacea. Segundo a descrição e as fotos apresentadas pelo autor, este padrão não apresenta qualquer ornamentação, nem mesmo as finas camadas observadas no presente trabalho. Em K. grandiflora, Saddi (1988) indica a ocorrência de deposição do tipo verrucada ou pruinoso-escamada. O padrão descrito e ilustrado como verrucado não corresponde ao observado neste estudo, no entanto, a ilustração para o padrão "pruinoso-escamado" lembra o padrão rosetado observado em menores aumentos nas amostras de *K. grandiflora*. A tonalidade das folhas observadas neste estudo, assim como a coloração das flores, mostrou-se também contraditória com as informações da literatura do grupo (Cambessèdes 1828; Pohl 1830; Martius 1826) o que deixa dúvidas acerca da congruência dos trabalhos de Saddi com os trabalhos anteriores.

Assim como os caracteres morfológicos, o estudo da anatomia do complexo *K. coriacea* também revelou poucas informações úteis para delimitação taxonômica, mas neste caso devido a uma grande similaridade estrutural entre as espécies. No presente estudo, a única diferença estrutural observada nas duas espécies é a forma do feixe central na altura do pecíolo. D'Arcy & Keating (1979), revisando *Calophyllum* (Clusiaceae) para o Panamá e, da mesma maneira, encontrando dificuldade na identificação de espécimes herborizados, estudam a anatomia do gênero em uma tentativa de elucidação dos problemas. Detectam também a forma do feixe vascular central em vista transversal no limbo foliar como um caráter de utilidade taxonômica para o grupo estudado. Também Gomes *et al.* (2005) diagnosticaram o formato do feixe vascular do pecíolo como o melhor atributo para a distinção de duas espécies de Hippocrateoideae-Celastraceae investigadas, apontando ainda que este caráter pode ser visualizado mesmo macroscopicamente, em campo. No entanto, esse caráter pode ainda se mostrar de difícil utilização devido a sutileza da diferença entre as formas dos feixes, principalmente considerando que poucos indivíduos foram amostrados em relação ao polimorfismo apresentado pelas espécies. Os feixes vasculares

dos indivíduos provenientes da zona híbrida mostraram-se compatíveis aos encontrados nas respectivas populações puras.

As reações ao sulfato ferroso presente no fixador SFF apresentaram padrão específico, indicando maior quantidade e distribuição de compostos fenólicos em K. coriacea em comparação à K. grandiflora. Compostos fenólicos compõem um grupo heterogêneo de substâncias químicas, compreendendo os metabólitos secundários mais importantes do ponto de vista taxonômico, tanto em níveis hierárquicos superiores como em infragenéricos e infraespecíficos (Stace 1989). Diversos experimentos atestam a propriedade de resistência à radiação ultravioleta, danosa às estruturas biológicas, atribuída às folhas pela produção de compostos fenólicos nas células (Arezki et al. 2001, Bachereau et al. 1998, Boeger & Poulson 2006, Day et al. 1992). A maior ocorrência dessa classe de metabólitos secundários em K. coriacea pode representar a contra-partida da espécie à cera epicuticular de K. grandiflora no que diz respeito à "resposta fisiológica" à acentuada intensidade luminosa do ambiente. No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho não permitem adicional conjectura, e estudos com focos mais específicos no tema deveriam ser procedidos para elucidar a questão. No que concerne ao foco deste estudo, podemos apenas supor que a quimiotaxonomia possa representar uma ferramenta mais informativa na taxonomia do grupo.

Conclusões

O compartilhamento do polimorfismo morfológico, caracterizado por um gradualismo de estados de caráter, pelas duas espécies e a constância anatômica podem

justificar a manutenção de apenas um táxon específico. As características com potencial diagnóstico para o complexo representam muito mais extremos de um contínuo do que características discretas, à exceção da micromorfologia da camada epicuticular das folhas. A sobreposição constante dos limites dos estados de caráter morfológicos entre os dois táxons propostos por Saddi (1982), da mesma forma que a uniformidade dos caracteres anatômicos, poderia ainda ser entendida como o compartilhamento de características do ancestral comum entre as espécies, que teriam especiado recentemente ou, ainda, estariam apenas num estágio final de especiação (Wu 2001). A re-avaliação da morfologia do grupo pôde ainda detectar uma certa incongruência entre os trabalhos clássicos e os trabalhos recentes de revisão de Saddi, questão que apenas poderá ser sanada com estudos minuciosos dos tipos nomenclaturais. Investigações utilizando ferramentas mais minuciosas, como marcadores moleculares adequados, podem esclarecer o relacionamento interno do complexo *Kielmeyera coriacea* e fornecer uma melhor resolução da sua taxonomia do que as ferramentas tradicionais utilizadas neste estudo.



FIGURA 1. Folhas e flores de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. A-B: Ramos jovens. C-D: Folhas e flores. E-G: Folhas frescas, evidenciando tonalidade das superfícies foliares. H-I: Folhas estocadas em álcool 70% sobre fonte de luz, evidenciando organização das nervuras secundárias. J-K: Flores. A,C,H,J: *Kielmeyera coriacea;* B,D,I,K: *K. grandiflora.* E-G: folhas à esquerda: *K. coriacea;* folhas à direita: *K. grandiflora.* E-F: face adaxial. G: face abaxial. Barra = 5 cm (E).



FIGURA 2. Superfície foliar de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. em Microscopia Eletrônica de Varredura. A,C,E: *K. coriacea*; B,D,F-H: *K. grandiflora*. A,B,C,D,F,H: face abaxial; E,G: face adaxial. Barra = $10 \mu m$ (C-H); Barra = $100 \mu m$ (A-B).



FIGURA 3. Pecíolo e superfície foliar de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. A-B: Secção transversal do pecíolo. C-D: Secção transversal do pecíolo, evidenciando feixe vascular central. E-F: Secção paradérmica do limbo, evidenciando estômatos. A,C,E: *Kielmeyera coriacea*; B,D,F: *K. grandiflora*. Fv = Feixe vascular central; * = célula subsidiária dividida no sentido transversal. Barra = 50 µm (E-F); Barra = 500 µm (C-D); Barra = 2000 µm (A-B).



FIGURA 4. Limbo de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. A-B: Secção paradérmica da folha. C: Secção paradérmica da folha na região da nervura central. D-F: Secção paradérmica da folha, evidenciando canais secretores. A,E: *Kielmeyera coriacea;* B-D,F: *K. grandiflora.* Bd = Célula da bainha do feixe; Ca = Canal secretor; Dr = Drusa. Barra = 50 μm (A-C); Barra = 200 μm (D-F).



FIGURA 5. Nervura central de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. A-B: Secção transversal da nervura central. C-D: Secção transversal da nervura central sob luz polarizada, evidenciando células de parede espessada e idioblastos. E-F: Secção transversal da nervura central, evidenciando medula e feixes vasculares. A,C,E: *Kielmeyera coriacea*; B,D,F: *K. grandiflora*. Fv = Feixes vasculares; Ca = Canal secretor; F = Floema; X = Xilema. Barra = 200 μ m (E-F); Barra = 500 μ m (A-D).



FIGURA 6. Nervura central e limbo de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi. A: Secção transversal da nervura central, evidenciando feixe vascular central. B: Secção transversal da nervura central, evidenciando feixe vascular central, sob luz polarizada. C-F: Secção transversal do limbo. A-C,E-F: *Kielmeyera coriacea;* D: *K. grandiflora*. Cp = Célula de parede espessada; Dr = Drusa; Eb = Extensão de bainha; Et – Estômato; F = Floema; Fv = Feixe vascular; Pl = Parênquima lacunoso; PP = Parênquima paliçádico; X = Xilema. Barra = 20 µm (E-F); Barra = 50 µm (A-B); Barra = 200 µm (C-D).



FIGURA 7. Pecíolo e limbo de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi fixados em SFF (Sulfato Ferroso em Formalina - evidenciação de compostos fenólicos). A-B: Secção transversal do pecíolo, evidenciando parte do feixe vascular central. C-F: Secção paradérmica do limbo foliar. A,C,E: *Kielmeyera coriacea;* B,D,F: *K. grandiflora.* Ca = Canal secretor; F = Floema; Fv = Feixe vascular; X = Xilema. Barra = 25 μ m (E-F); Barra = 200 μ m (A-B); Barra = 250 μ m (C-D).



FIGURA 8. Pecíolo e limbo de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi fixados em SFF (Sulfato Ferroso em Formalina - evidenciação de compostos fenólicos). A: Secção paradérmica da nervura central, evidenciando células contendo compostos fenólicos. B Secção paradérmica do limbo, evidenciando canal secretor com conteúdo. C-D: Secção transversal do pecíolo, evidenciando canais secretores. E-F: Secção transversal do limbo. A,B,C,E: *Kielmeyera coriacea;* D,F: *K. grandiflora.* Ca = Canal secretor; Et = Estômato; Fv = Feixe vascular; PL = Parênquima lacunoso; PP= Parênquima paliçádico. Barra = 50 μ m (A,C-D); Barra = 100 μ m (C); Barra = 200 μ m (E-F).

Referências

Arezki O, Boxus O, Kevers C *et al.* (2001) Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. Plant Growth Regul 33:215-219

Bachereau F, Marigo G, Asta J (1998) Effect of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in Sedum album. Physiol Plant 104:203-210

Baker EA (1982) Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: Cutler DF, Alvin, KL, Price CE. The Plant Cuticle. Academic Press, New York, pp 139-165

Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D *et al.* (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Bot J Linn Soc 126:237-260

Boeger MRT, Poulson ME (2006) Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). Acta Bot Bras 20:329-338

Cambessèdes J (1828) Ternstroemiaceae. In: Saint-Hillaire A. Flora brasiliae meridionalis, v. I, p. VIII. A. Belin, Paris, pp 296-310

Cameron R (1970) Light intensity and the growth of *Eucalyptus* seedlings. Aust J Bot 18: 275-284

Clark G (1973) Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore

D'Arcy WG, Keating RC (1979) Anatomical support for the taxonomy of *Calophyllum* L. (Clusiaceae) in Panama. Ann Mo Bot Gard 66:557-571

Day TA, Vogelmann TC, Lucia EH (1992) Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? Oecologia 92:513-519

Gomes SMA, Silva EAM, Lombardi JA *et al.* (2005) Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de Hippocrateoideae (Celastraceae) no Sudeste do Brasil. Acta Bot Bras 19:945-961

Heinrichs J, Anton H, Gradstein SR *et al.* (2000) Surface wax, a new taxonomic feature in Plagiochilaceae. Plant Syst Evol 225:225-233

Johansen DA (1940) Plant Microtechnique. MacMillan & Co., London

Martius CFP (1826) Nova genera et species plantarum, v.I, p. IV. Typis Lindaueri, München

Morretes BL, Ferri MG (1959) Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado. Bol Fac Filos Cienc Let Univ São Paulo 243:7-70

Paula JE (1974) Estômatos de Guttiferae: estudo morfológico, dimensional e quantitativo. Acta Amaz 4:23-39

Pohl JBE (1830) Plantarum brasiliae icones et descriptiones hactenus ineditae, v. II, p. 2. Antomii Strauss, Wien

Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF (2003) Analysis of the floristic composition of the brazilian cerrado vegetation III: comparation of the woody vegetation of 376 areas. Edinb J Bot 60:57-109

Saddi N (1982) A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis. University of Reading.

Saddi N (1988) Micromorphological evidence in the genus *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Rev Bras Biol 48:697-720

Saddi N (1990) Leaf Venation patterns of species of *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Publ Avulsas Herb Cent, 3:1-47

Schofield EK (1968) Petiole anatomy of the Guttiferae and related families. Mem New York Bot Gard 18:1-55

Stace CA (1989) Plant taxonomy and biosystematics. Edward Arnold, London.

Tomaszewski D (2004) The wax layer and its morphological variability in four European *Salix* species. Flora 199:320-326

Wawra H (1886) Ternstroemiaceae. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I. (eds) Flora brasiliensis, v. XII p. I. Frid. Fleischer, Leipzig

Wissemann V (2000) Epicuticular wax morphology and the taxonomy of Rosa (section Caninae, subsection Rubiginosae). Plant Syst Evol 221:107-112

Wu CI (2001) The genic view of the process of speciation. J Evol Biol 14:851-865

CAPÍTULO 2 MICROSATELLITE MARKERS ISOLATED FROM POLYPLOID *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (CLUSIACEAE) FROM AN ENRICHED GENOMIC LIBRARY

Microsatellite markers isolated from polyploid *Kielmeyera coriacea* Mart.

& Zucc. (Clusiaceae) from an enriched genomic library

Mayara K. Caddah; Tatiana Campos; Danilo A. Sforça; Adna C. B. de Sousa; Maria do Carmo E. do Amaral; Volker Bittrich; Anete P. de Souza

> available at Conserv Genet http://www.springerlink.com/content/105709/ DOI 10.1007/s10592-008-9786-8

Kielmeyera coriacea is a morphologically highly variable polyploid species, characteristic of the Cerrado, the savanna-like vegetation of the Central-Brazil. It was subject of various biological studies and, like others cerrado plants, this species suffers strong anthropogenic pressure. To access the genetic diversity of populations of this species, its taxonomic circumscriptions and to study supposed hybridization events, we have developed 11 polymorphic microsatellite loci from a CT/GT-enriched genomic library. The band pattern showed 12–32 bands per locus, and 2–8 bands per locus per individual. All microsatellites successfully amplified PCR products in *K. grandiflora*, the putative sister species, and all revealed similar multibanded pattern.

The Cerrado, a savanna-like vegetation typical of Central-Brazil, is one of the most species rich/threatened biomes of the world and, therefore was classified as a Biodiversity Hotspot (Myers et al. 2000). It is suffering strong anthropogenic pressures of different sources, and quite a number of species is seriously threatened. *Kielmeyera coriacea* is one of the main components of the woody flora of the Cerrado. It shows the widest ecological

amplitude within the genus (47 spp.) and its geographical distribution largely coincides with the biome itself. The species was subject of many biological studies under different aspects, including chemical, pharmaceutical and ecological investigations. The bark is used as a source of cork, the leaves as a source of a dye and in folk medicine bark and leaves are used for the preparation of an analgesic. However, the taxonomic circumscription and correct identification of the species is problematic. Together with related taxa it is sometimes treated just as the "*K. coriacea* complex". This casts doubt on several scientific publications using the name *K. coriacea*. Furthermore, the morphological and phenological patterns shown by the plants suggest interesting evolution processes, like hybridization. Here, we report the development of 11 microsatellite loci in *K. coriacea*, which can be used for population and taxonomic studies of the complex and represent the first report on rapid molecular markers in the genus.

The genomic DNA was extracted from lyophilized leaf tissue using a CTAB method, based on Doyle and Doyle (1987), and then digested with RsaI restriction enzyme. Microsatellite DNA loci were isolated of one individual (UEC 124.190) as described in Billote et al. (1999). The library was enriched for dinucleotide sequences using (CT)₈ and (GT)₈ biotinylated microsatellite probes. The selected fragments were amplified by PCR using primer sequences complementary to the adapters and then cloned into the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were introduced into XL-1 blue cells and transformed cells were cultivated on agar plates containing 100 lg/ml of X-galactosidase. Forty-eight clones contained inserts (white colonies) were sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and automated ABI 377 sequencer (Applied

Biosystems). About 33 sequenced clones presented microsatellite motifs, from which 22 primer pairs were designed, using PrimerSelect (DNASTAR).

The polymorphism was tested with total DNA of 60 individuals from 2 populations. The microsatellite fragments were amplified by PCR containing: 20 ng of template DNA, 0,8 μ M of forward and reverse primer, 150 μ M of each dNTP, 1,5 mM MgCl2, 20 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, and 0.5 U Taq DNA Polymerase. Reactions were performed using the following conditions: 1 min at 94°C, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, specific annealing temperature for 1 min and 72°C for 1 min, finishing by 72°C for 5 min. PCR products were separated by electrophoresis in denaturing acrylamide gels and silver stained (Creste et al. 2001). Molecular size of the fragments was estimated using a 10-bp ladder (Invitrogen).

From the 22 primers pairs developed, 6 did not successfully amplify in PCR, 4 did not show clear bands and 1 resulted in monomorphic PCR products. Eleven primers pairs amplified readable and polymorphic PCR products. The characteristics of the primers pairs and the optimal annealing temperature are given in Table 1. These revealed a multibanded pattern which is typical of polyploidy organisms. This result is in accordance with preliminary cytogenetic studies reporting a number of around 120 chromosomes (Silva and Davide 1996). The total number of bands per locus ranged from 12 to 32 and the number of bands per locus per individual ranged from 2 to 8. The number of allelic copies per individual cannot be accessed because of the unknown allele dosage of partial heterozygotes. The ploidy level cannot be confirmed, which must be investigated by others methods, such as flow cytometry. Therefore, traditional measures of genetic variability could not be determined. However, these highly polymorphic markers may be used like dominant markers to testing ecological and evolutionary hypotheses (Byrne et al. 2008).

Leave	Primer	Repeat	Size	Та			GenBank
Locus	sequences (5-3)	motif	(bp)	(°C)	N_b	N_i	accession n.
KC 01	F: TTAGCTCAAAGAAGAAGGATG	(TC) ₂₇	144-268	49,6	32	2-7	FJ360885
	R: TGAAAAACAAAGCCACAGA						
KC 02	F: AATCTAGAGCTTATTACTTTG	(AG) ₂₅	234-272	48,1	17	4-8	FJ360886
	R: TGTTCCTCATTTTATCTGT						
KC 03	F: CACTTTGGCTGCTAACCTC	(TC) ₁₀	128-149	51,6	15	3-7	FJ360887
	R: TTCCAAACAACTGCGAGAG						
KC 04	F: AAGGCAGCGAGCGACAAAAGA	(TC) ₁₆	156-192	55,5	16	4-8	FJ360888
	R: TGAGAGCAAAGGAGGAGGAGATGA						
KC 05	F: GTGGCTGGTGGAAGGTC	(GA) ₉	186-226	53,3	29	4-8	FJ360889
	R: CCAAAAAGTCTAGGACAAAGTT						
KC 06	F: GAAGACCCTAGGAGTGAAG	(GA) ₁₈	195-237	48,1	32	3-8	FJ360890
	R: AAACAGGGTTTATTTGATTA						
KC 07	F: ATTTCCAGTTGCCTTCCT	(GT) ₈	283-305	50,7	12	5-7	FJ360891
	R: GTGTATCAACAAACAGTAATCCT						
KC 08	F: AGTGAGAGCGGTGAGGTTG	(GT) ₇	197-213	53,1	12	3-7	FJ360892
	R: TCCAGGGTAAGAGATTGTTTTG						
KC 09	F: ACACTAACTTATTCATCTCTAT	$(AG)_6(TG)_7$	157-184	45,7	14	2-6	FJ360893
	R: AATCCCCTTTCTTCTAC						
KC 10	F: CAGAGGGACGATGACAAC	$(CT)_{11}(CA)_8$	182-230	50,8	23	4-7	FJ360894
	R: ATCCACTAATTCCACTTTCTACT						
KC 11	F: CTTCCCTCGTACTCTTCC	(ATCTA) ₆	194-218	49,9	12	2-7	FJ360895
	R: TCTCTGTTTCTTTCTGTATCAA						

Table 1 Characterization of 11 microsatellites in Kielmeyera coriacea.

Ta is specific annealing temperature; N_b is total number of alleles; N_i , is number of alleles per individual.

In addition, the eleven microsatellites were tested in individuals from two populations of *K. grandiflora* (Wawra) Saddi, the putative sister species of *K. coriacea* (sometimes treated as a subspecies of *K. coriacea*). All microsatellites successfully amplified PCR products, and all revealed a similar multibanded pattern.

These microsatellites will be an important tool to study conservation genetics, the genetic structure, gene flow and the taxonomic status of divergent populations of the *K*. *coriacea* complex.

References

Billote N, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits 54:277–288

Byrne M, Hankinson M, Sampson JF, Stankowski S (2008) Microsatellite markers isolated from a polyploid saltbush, *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). Mol Ecol Resour 6:1426–1428

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturating polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol Biol Rep 19:299–306

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11–15

Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403:853–858

Silva R, Davide LC (1996) Avaliação citogenética de *Kielmeyera coriacea*. In: Pereira RC, Nasser LCB (eds) Proceedings of the 1st international symposium on tropical savannas. EMBRAPACEPAC, Brasília, pp 268–270

CAPÍTULO 3 SPECIES BOUNDARIES INFERRED FROM MICROSATELLITE MARKERS IN THE *Kielmeyera coriacea* COMPLEX (CLUSIACEAE)

Species boundaries inferred from microsatellite markers in the

Kielmeyera coriacea complex (Clusiaceae)

Mayara K. Caddah; Tatiana Campos; Maria do Carmo E. do Amaral; Volker Bittrich; Maria I. Zucchi; Anete P. de Souza

Kielmeyera coriacea is one of the most important components of the Cerrado, a savannalike vegetation of Central-Brazil. In its current circumscription, the complex is formed by two species, *K. coriacea* (with two subspecies and seven varieties) and *K. grandiflora*. The species are morphologically and anatomically similar, and their delimitation is very problematic. Microsatellite markers were used in attempt to understand the relationships within the complex and to investigate the consistency of the present circumscription of these taxa. Sixty plants of each species were genotyped with eigth microsatellites, and 213 alleles were found. Different approaches of analyses clearly showed the distinction of the two species, and indicate introgressive hybridization. *Kielmeyera coriacea* in a hybrid zone of a Cerrado vegetation strong altered by human impact is represented by a wholly hybrid population. The taxonomically difficulties within the *K. coriacea* complex may be due to a shading of the boundaries due recent speciation and/or introgression.

Introduction

Biosystematics is a branch of taxonomy which studies the diversity of life at the population level. It is often concerned with genetical, cytological and/or ecological studies to understand the evolutionary history of species and infraspecific groups (Stace 1989). In

this context, many studies have been carried out with the intention of delimiting species boundaries in morphologically similar populations (e.g. Chiari *et al.* 2006; Craft *et al.* 2002; Jorgensen *et al.* 2008; Martínez-Ortega *et al.* 2004; Minder *et al.* 2007; Minder & Widmer 2008; Passalacqua *et al.* 2008; Sarno *et al.* 2004). The phenomenon of taxonomically difficult groups (or species complex) may be originated from recent speciation events in which consistent morphological traits or other diagnosable features have not yet evolved or fixed (Bickford 2006; Stebbins 1950), or even by a shading of the boundaries due natural introgression (Briggs & Walters 1997; Rieseberg & Wendel 1993). Frequently, studies of natural hybridization overlap with debates concerning the nature of species, covering both semantic and philosophical questions (Arnold 1997). If in the past, taxonomists had no access to clearing evidences of these blurrings, now we are provided with a large number of neutral and independent molecular markers helping to understand the microevolutionary processes and to choose the best infraspecific classification.

Microsatellites (SSRs - simple sequence repeats) are sequences repeated *in tandem* present in virtually all organisms (Li *et al.* 2002). Since their mutational rates are considered very high in comparisons with other molecular markers, they comprise a powerful tool to studies at population levels and, therefore, biosystematic studies (Jarne & Lagoda 1996). The polymorphisms of microsatellites derive mainly from variability in length rather than in the primary sequence of a fragment (Ellegren 2004).

The Cerrado, a savanna-like vegetation typical of Central-Brazil, is one of the most species rich/threatened biomes of the world and, therefore, is classified as a Biodiversity Hotspot (Myers *et al.* 2000). *Kielmeyera coriacea* is one of the main components of the woody flora of the Cerrado (Ratter *et al.* 2003). The species has been the subject of many

biological studies under different aspects, including chemical, pharmaceutical and ecological investigations. However, the taxonomic circumscription and correct identification of the species is still problematic. Together with related taxa it is sometimes treated just as the "K. coriacea complex". In his taxonomic revision of the genus, Saddi (1982) recognized two species, Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc. (with two subspecies and seven varieties) and K. grandiflora (Wawra) Saddi, a variety elevated to species level, but poorly known. According to Saddi (1982), both species differ basically only in the arrangements of the secondary veins, and field and laboratorial observations revealed a very similar group, with morphological and anatomical species boundaries widely overlapping, becoming these traditional tools unable to the secure delimitation of these species (Caddah et al. 2009a), casting doubts on several scientific publications using the name K. coriacea. Therefore, the goal of our study is to investigate species delimitation proposed by Saddi (1982) and look for possible explanations for the morphological complexities previously seen in K. coriacea complex. For this aim, we evaluated an alternative approach for the question, using microsatellites markers and phenological observations.

Materials and methods

The two species studied (*sensu* Saddi 1982) are widely sympatric. We studied one isolated population of each species, called here *allopatric populations*, both situated in Campinas, São Paulo state. Additionally, we studied two populations, one of each species, which occur mixed in the same area in Alumínio, São Paulo state (ca. 63 miles of

Campinas), called here *sympatric populations*, which represent the most common distributional pattern. All areas are composed of strongly degenerated Cerrado vegetation due human impact. Phenological observations throughout 20 months were carried out in the studied populations.

Vouchers are deposited in the herbarium of University of Campinas (UEC), and their data are in Table 1.

Table 1. Vouchers of each studied population. CA and GA are sympatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora* respectively, both situated in Alumínio/SP; CD and GV are allopatric populations of *K. coriacea* situated at Dom Pedro road (km 145) and of *K. grandiflora* situated near Viracopos airport, respectively, both in Campinas/SP.

Species	Population	Coordinates	Vouchers
K. coriacea	CA	23°29'05.6" S 47°17'09.9" W	UEC 148.202
	CD	22°51'05.8" S 47°08'14.8" W	UEC 124.190
K. grandiflora	GA	23°29'06.4" S 47°17'12.4" W	UEC 148.203
	GV	23°01'00.3" S 47°08'52.3" W	UEC 148.198

Leaves of 30 individual of each population were collected, lyophilized and stored at -20°C. DNA extractions were performed following Doyle & Doyle (1987) with slightly modifications. Eight primers pairs developed from *K. coriacea* were used and the PCR reactions were performed following Caddah *et al.* (2009b). The PCR products were denatured for 5 min at 95 °C, separated by electrophoresis in denaturing acrylamide gels and silver stained (Creste *et al.* 2001). Molecular size of the fragments was estimated using a 10-bp ladder (Invitrogen).
Since the species are polyploid the genotyping was based on the presence/absence of bands and each allele was considered a locus in the analyses, like a dominant marker.

The variation in the dataset was visualized using Principal Coordinate Analyses (PCO) in NTSYSpc 2.1 (Rohlf 2000), based on the similarity measure of Jaccard. A Bayesian approach using STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000) calculate a logarithmic probability for the genotyped dataset be assigned to a given number of clusters. Five replicates of each value of clusters (1-10) were run with a burn-in period of 200,000 and 500,000 iterations. Analysis of Molecular Variance (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992; Excoffier *et al.* 2005) supply a measure of dissimilarities, a variation inter-population (ϕ_{ST} , analogous to genetic distances, F_{ST} -Weir & Cockerham 1984). Shannon's index of gene diversity was calculated using POPGENE 1.31 (Yeh & Boyle 1997).

Results

The phenological observations of the populations showed a similar time period of flowering of about three months. However, they showed a desynchronized flowering period, *K. grandiflora* flowering early, with flowers opening in September, and *K. coriacea* delayed, starting flowering in November. In addition, exclusively staminate flowers were noticed only in *K. coriacea* and hermaphrodite flowers with collapsed carpels in *K. grandiflora*.

All loci showed high polymorphism in both species. The eight microsatellite loci provided a matrix of 213 scored variable alleles. The total number of bands per locus

ranged from 12 to 32 in *K. coriacea* and from 11 to 42 in *K. grandiflora* and the number of bands per locus per individual ranged from two to eight in the former and one to eight in the last named species (Table 2).

	К. со	riacea		K. grandiflora				
Locus	Size (bp)	N_b	N_i	Size (bp)	N_b	N_i		
KC 01	144-268	32	2-7	142-268	42	1-5		
KC 02	234-272	17	4-8	234-270	18	4-8		
KC 03	128-149	15	3-7	127-157	18	3-7		
KC 04	156-192	16	4-8	156-192	19	4-8		
KC 05	186-226	29	4-8	192-218	17	2-7		
KC 09	157-184	14	2-6	157-187	21	2-6		
KC 10	182-230	23	4-7	184-238	28	4-8		
KC 11	194-218	12	2-7	194-221	11	1-7		

Table 2. Comparative characterization of eight microsatellite loci in *Kielmeyera coriacea* complex. N_b is total number of alleles per locus and N_i , is number of alleles per individual in each locus.

KC 01 (58 alleles) presents a particular band pattern and, therefore, will be treated here specially. In this locus, *K. grandiflora* showed similar band patterns in both populations, a bimodal distribution. Alleles varied from 142 to 176 base pairs and from 194 to 268 base pairs. In contrast, *K. coriacea* showed a different band pattern in the two populations: in the allopatric one, alleles ranged from 156 to 184 base pairs, while the sympatric population was the responsible for the wide (and similar to *K. grandiflora*, see Table 2) band pattern of this locus for this species. Ruling out the KC 01 locus and the rare alleles (that were present in only one or two individuals of the whole dataset), we calculate that 49.3% of the alleles are shared by all populations and a mean of 10.0% are specific to of each species (Table 3). Three alleles (2.2%) present in both *K. coriacea* populations are present in plants of the sympatric *K. grandiflora* population as well (but are absent in allopatric *K. grandiflora* population), while 16 alleles (11.8%) present in both *K. grandiflora* populations are also present in plants of the sympatric *K. coriacea* population (but not in the allopatric *K. coriacea* population).

Table 3. Distribution of alleles of seven locus in populations of *Kielmeyera coriacea* complex. *N* is total number of exclusive alleles per cluster of populations, ^{*} is percentage of each N in the total number of alleles without the rare alleles (155-19), ^{**} is the percentage of rare alleles in the total number of alleles. CD and GV are allopatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively; CA and GA are sympatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively.

population	Ν	$\%^*$
CA+CD+GA+GV	67	49.3%
CA+CD+GV	6	4.4%
CD+GV	3	2.2%
CD+GA+GV	2	1.5%
CA+CD+GA	3	2.2%
CA+GA+GV	16	11.8%
CA+GA	3	2.2%
CD+GA	1	0.7%
CA ou CD ou GA ou GV	8	5.9%
(CA+CD) ou (GA+GV)	27	19.9%
rare alleles	19	$12.3\%^{**}$
total alleles	155	

Principal coordinate analysis allows the separation of the two species (Figure 1). The dendrogram also separated the two species, but with bootstrap support only in internal nodes (data not shown), like the results in the analysis of *Cardamine digitata* aggregate (Jorgensen *et al.* 2008).



Figure 1. PCO analysis of 120 individuals of *Kielmeyera coriacea* complex based in eight microsatellite loci and Jaccard's similarity. • is individuals of *K. coriacea* Mart. & Zucc. and \Box is individuals of *K. grandiflora* (Wawra) Saddi.

AMOVA analyses gives the dissimilarity (analogous to genetic distances in codominant markers) between populations (Table 4). The dissimilarity index in the comparison of the two "pure" populations (CD/GV) scored the greatest value, while the comparison among the two sympatric populations (CA/GA) scored an intermediate value between that distance and the distances among the comparisons of conspecific populations (CA/CD and GA/GV), that showed the lower values.

The genic variation measured by Shannon's information index revealed a greatest diversity in the sympatric *K. coriacea* population (CA, Table 5). In an interspecific pair comparison, the allopatric pair showed lower diversity than sympatric pair (CD+GV \leq CA+GA).

Table 4. Dissimilarities (ϕ_{ST} -value) scored in different comparisons among populations of *Kielmeyera coriacea* complex. CD and GV are allopatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively; CA and GA are sympatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively; p-value = 0.00000 for all ϕ_{ST} -values.

Comparisons	ø _{ST} -value
CD/GV	0.28871
CA/GA	0.20495
CA/CD	0.18212
GA/GV	0.10492
all populations	0.22102

Table 5. Gene diversity of Shannon's information index (I) of populations and populations pairs of *Kielmeyera coriacea* complex. CD and GV are allopatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively; CA and GA are sympatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively.

.

Population/Group	Ι			
СА	0.2460			
CD	0.2162			
GA	0.2348			
GV	0.2383			
CA+CD	0.2528			
GA+GV	0.2512			
CD+GV	0.2644			
CA+GA	0.2684			

The software STRUCTURE estimates a membership coefficient for each individual, and grouped the plants of similar coefficients in clusters. The analysis indicated that all plants can be organized in four principal clusters, one group composed of all *K. grandiflora* plants and three groups of *K. coriacea* plants: one formed just by plants of allopatric populations, a second just by sympatric plants and a third group of plants from the two populations. The cluster of allopatric *K. coriacea* plants is composed of several repeated genotypes (assumed to be clones), that biased the result. Therefore, a new analysis without all repeated genotypes of all the populations (a total of 14 plants) was run. In this new analysis, a number of four or two groups were indicated like the most probable organization (Figure 2). In the former organization, all *K. coriacea* plants were assembled in a single set, while *K. grandiflora* plants were separated in three more or less heterogeneous clusters. In the two clusters organization, all plants were separated exactly in species-specific groups. Besides the number of clusters in the dataset, STRUCTURE shows the background of each cluster in the composition of individual samples, a coefficient of ancestry. *Kielmeyera grandiflora* has two samples that had more than 0.05 of *K. coriacea* ancestry (both of allopatric *K. grandiflora* population, with 6,4% and 7.4% of *K. coriacea* ancestry), while *K. coriacea* has four plants (all of sympatric population) that possesses more than 0.05 of *K. grandiflora* membership coefficient (with 5.6-23.7% of *K. grandiflora* ancestry).

Discussion

Although the high similarity observed between the genotype patterns, the analyses performed in this study supports the assumption of two distinct entities in *Kielmeyera coriacea* complex, corresponding to the two species accepted by Saddi (1982).



Figure 2. STRUCTURE clusters of 106 individuals of *Kielmeyera coriacea* complex. The individuals are represented by columns and each colour represents one cluster. Different colours in a single column indicate the resemblance of the individual to each cluster. A and B are the clusters resulted by K=4 analyses, while C and D are the clusters resulted by K=2 analyses. Individuals in A and C are aligned according to their original population, while in B and D they are aligned according to their coefficient of ancestry. CD and GV are allopatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively; CA and GA are sympatric populations of *K. coriacea* and *K. grandiflora*, respectively.

The microsatellites developed from an enriched library of microsatellites for *K*. *coriacea* (Caddah *et al.* 2009b) works equally well in the second studied taxon, with high levels of shared alleles. In contrast to expectation (e.g. Smulders *et al.* 1997; Smulders *et al.* 2008), the transferability of microsatellites did not imply in a reduction of the polymorphism, suggering that these primers must be tested in others species of the genus.

The locus KC 01 was the most variable in relation to the ranged size and showed a peculiar performance in the taxa. A similar bimodal distribution of alleles was founded in the two populations of *K. grandiflora*, with longer and smaller alleles, while allopatric *K. coriacea* population showed intermediate alleles. The sympatric *K. coriacea* population, in contrast, possesses in addition to the alleles of the conspecific allopatric population, several alleles shared with the *K. grandiflora* populations. A succession of insertions through duplication of adjacent repeated regions may explain the independent appearance of longer alleles in the sympatric *K. coriacea* population. However, insertions are considered very rare in microsatellite mutational mechanisms (Zhu *et al.* 2000) and a most plausible explanation seems the transferability of longer alleles of sympatric *K. grandiflora*, by introgressive hybridization.

The remaining seven loci showed a high degree of shared alleles. A strategy to detect hybrids in sympatric populations was to look for "species-specific alleles" of one species in the other species in the hybrid zone (Cruzan & Arnold 1993; Minder *et al.* 2007). Therefore, we looked for alleles present in both populations of one species and also present in the sympatric population of the other species. Sixteen alleles found in *K grandiflora* populations are also found in sympatric *K. coriacea* plants and are absent in allopatric *K. coriacea* population. This is a significant value since the numbers of alleles shared by any

other three population combinations were from two to six, these numbers can be reasonable explained by independent appearance of simples mutations. Hence, as the KC 01 locus, the occurrence of some alleles suggests an introgressive process of *K. grandiflora* genome into the sympatric *K. coriacea* population. When plotting the putative introgressants alleles within the sympatric *K coriacea* individuals we encountered that 83,3% of sampled plants contain at least one of these alleles, and if considering also the putative KC 01 introgressive alleles, then, absolutely all sampled plants contain at least one foreign allele, revealing a hybrid population.

The PCO analyses essentially mixed the conspecific populations but separated the taxa through both axes. STRUCTURE analysis was influenced by the occurrence of several repeated genotypes (clones) in the allopatric *K. coriacea* population, but their presence did not interfered significantly in the results of the other analyses (data not shown). Analysis with removal of all the clones showed two possible organizations within the dataset: a division into two groups exactly coincident with the specific status of the plants, and a division into four groups, derived from splitting *K. grandiflora*. Analyses of molecular variance (AMOVA) showed scored values of ϕ_{ST} corroborating the introgressive hybridization hypothesis. The dissimilarity among the two species significantly decrease from allopatric (pure putative populations) to sympatric (putative hybrid zone) comparisons, suggesting a homogenizing of these populations. The earlier hybridizers already noted that populations under hybridization effects show an enrichment of variation (Anderson 1948), as Shannon's index of genic variation showed in the sympatric *K. coriacea* population. This improvement of the intraspecific diversity would be due to the addition of alien alleles (of *K. grandiflora*) in almost intact genome of the host (*K.*

coriacea), by hybridization followed by constant backcrosses to this parental species. STRUCTURE analysis suggests the occurrence of some hybrids of early generations in sympatric *K. coriacea* population, which may be the bridge from *K. grandiflora* genome to *K. coriacea* population (Craft *et al.* 2002). In the same way, this *K. coriacea* population may be, or may have been, a greater level bridge of *K. grandiflora* genome to *K. coriacea* species.

The phenological observations showed that the studied species possess a desynchronized flowering period, a mechanism that prevents gene flow and that is assumed to be a way to promote speciation. The flowering period constitutes one of the best non-molecular diagnostic characters to differentiate the studied species in the populations investigated. However, a small overlap flowering period remains like a weak point in this fragile reproductive isolation, allowing to the reestablishment of gene exchange (Avise 2004). In our study case, the whole (or almost whole) *K. coriacea* population sympatric with *K. grandiflora* was formed by hybrids of late generations, in accordance with Harrison (1993), that point out the common occurrence of stable plant populations of introgressants dominating disturbed habitats. However, we do not know how the populations from undisturbed areas are structured. Apparently, the phenomenon of introgression is blocked in preserved environments of natural reserves. This can not, however, minimize the concern about the future of these species, since disturbed areas are now the rule, not the exception, in the Brazilian Cerrado.

A critical event in the origin of species is reproductive isolation, preventing gene flow, therefore a recent speciation event rising an incipient pair of species not necessarily imply morphological divergence or even any diagnostic trait (Bickford 2006; Stebbins 1950), as pointed in morphological and anatomical studies of *K. coriacea* complex (Caddah *et al.* 2009a). This putative recent divergence, apart from introgressive hybridization, would contribute to make this a taxonomically difficult group.

Conclusion

Like morphological and anatomical observations in both allopatric and sympatric populations, molecular studies of high polymorphic markers show a great similarity between the two species. However, this tool, in contrast to the former ones, can effectively screen the boundaries of the species complex and, in addition, can detect microevolutionary processes. The two distinct species of Saddi's proposal (1982) are clearly recognized by microsatellites analyses and are detectable by careful phenological observation too. The low morphological and anatomical divergence previously seen probably may be due to recent speciation and introgressive hybridization. However, to understand the origin and history of these species it is necessary investigate what kinds of evolutionary processes can be particularly responsible for the origin of isolating mechanisms (Stebbins 1977).

References

Anderson E (1948) Hybridization of the habitat. Evolution 2:1-9

Arnold ML (1997) Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York

Avise JC (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer Associates, Sunderland

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi, NS *et al.* (2006) Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol Evol 22:148-155

Briggs D, Walters SM (1997) Plant variation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge

Caddah MK, Mayer JLS, Amaral MCE *et al.* (2009a) Estudos morfo-anatômicos no complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae). In: Caddah MK. Estudos taxonômicos no complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.

Caddah MK, Campos T, Sforça DA *et al.* (2009b) Microsatellite markers isolated from poliploid *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae) from an enriched genomic lybrary. In: Caddah MK. Estudos taxonômicos no complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.

Chiari Y, Wengel PO, Vences M *et al.* (2006) Genetic identification of unit for conservation in tomato frogs, genus *Dyscophus*. Conserv Genet 7:473-482

Craft KJ, Ashley MV, Koenig WD (2002) Limited hybridization between *Quercus lobata* and *Quercus douglasii* (Fagaceae) in a mixed stand in central coastal California. Am J Bot 89:1792-1798

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. Plant Mol Biol Report 19:299-306

Cruzan MB, Arnold ML (1993) Ecological and Genetic Associations in an *Iris* Hybrid Zone. Evol 47:1432-1445

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. Phytochem Bull Bot Soc Am 19:11-15

Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat Rev Genet 5:435-445

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinformatics Online 1:47-50

Harrison RG (1993) Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, New York

Jarne P, Lagoda PJL (1996) Microsatellites: from molecules to populations and back. Tree 11:424-429

Jorgensen MH, Carlsen T, Skrede I *et al.* (2008) Microsatelites resolve the taxonomy of the polyploid *Cardamine digitata* aggregate (Brassicaceae). Taxon 57:882-892

Li IC, Korol AB, Fahima T *et al.* (2002) Microsatellites: genomic distributions, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol Ecol 11:2453-2465

Martínez-Ortega MM, Delgado L, Albach DC *et al.* (2004) Species Boundaries and Phylogeographic Patterns in Cryptic Taxa Inferred from AFLP Markers: *Veronica* subgen. *Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the Western Mediterranean. Syst Bot 29:965-986

Minder AM, Widmer A (2008) A population genomic analysis of species boundaries: neutral processes, adaptative divergence and introgression between two hybridizing plant species. Mol Ecol 17:1552-1563

Minder AM, Rothenbuehler C, Widmer A (2007) Genetic structure of hybrid zones between *Silene latifolia* and *Silene dioica* (Caryophyllaceae): evidence for introgressive hybridization. Mol Ecol 16:2504-2516

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG *et al.* (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403:853-858

Passalacqua NG, Peruzzi L, Pellegrino G (2008) A biosystematic study of the *Jacobaea maritime* group (Asteraceae,Senecioneae) in the Central Mediterranean area. Taxon 57:893-906

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959

Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF (2003) Analysis of the floristic composition of the brazilian cerrado vegetation III: comparation of the woody vegetation of 376 areas. Edinb J Bot 60:57-109

Rieseberg LH, Wendel J (1993) Introgression and its consequences in plants. In: Harrison RG. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, New York

Rohlf JF (2000) NTSYSpc: numerical taxonomy system, ver. 2.1. Exeter Software, New York

Saddi N. (1982) A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis. Univerity of Reading.

Sarno RJ, Villalba L, Bonacic C *et al.* (2004) Phylogeography and subspecies assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellite markers: implications for vicuña conservation and management. Conserv Genet 5:89-102

Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekass W *et al.* (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. Theor Appl Genet 97:264-272

Smulders MJM, Beringen R, Volosyanchuk R *et al.* (2008) Natural hybridisation between Populus nigra L. and P. x canadensis Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine river in the Netherlands. Tree Genet Genomes 4:663-675

Stace CA (1989) Plant taxonomy and biosystematics. Edward Arnold, London.

Stebbins GL (1950) Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press, New York

Stebbins GL (1977) Processes of organic evolution. Prentice Hall, Englewoods Cliffs

Yeh FC, Boyle TJB (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belg J Bot 129: 157

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for thw analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370

Zhu Y, Strassmann JE, Queller DC (2000) Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. Genet Res 76:227-236

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações finais

A taxonomia vegetal, de maneira ampla, pode ser analisada sob duas diferentes visões, complementares: a taxonomia clássica e a biossistemática. Ambas investigam a variação ocorrente nas plantas, suas causas e conseqüências. No entanto, diferem em seus focos, a biossistemática estando interessada no estudo de populações e de processos microevolutivos, enquanto a taxonomia clássica estuda indivíduos representativos ao nível de espécie ou superior e grandes processos (Stace 1989). Neste contexto, pode-se perceber que algumas ferramentas são mais adequadas do que outras a uma ou outra vertente da taxonomia. Morfologia e anatomia são ciências clássicas dentro da biologia vegetal e são as ferramentas mais utilizadas em taxonomia clássica, enquanto que a biossistemática normalmente utiliza ferramentas alternativas, mais sutis, como a biologia molecular, citologia e ecologia para entender a história e os processos que estão ocorrendo em um grupo de indivíduos, freqüentemente envolvidos nos infames "complexos de espécies". Dessa forma, pode-se compreender a menor informatividade taxonômica provinda dos estudos anatômicos e morfológicos no complexo Kielmeyera coriacea. Nesta situação, a anatomia ainda perde relevância frente à morfologia, já que poucos indivíduos podem ser analisados por esforço de trabalho e, portanto, provê menos informação. Assim, podemos concluir que no complexo K. coriacea indivíduos (representantes) não devem ser utilizados como a unidade de estudo taxonômico, mas sim populações. Quando populações tornaramse o foco deste estudo, sob os auspícios da genética de populações, então uma resolução clara do complexo tornou-se evidente, pelo menos para as populações estudadas.

De certa forma, o presente estudo corrobora a proposta de Saddi (1982) no que diz respeito à subdivisão de K. coriacea em uma segunda espécie, K. grandiflora. No entanto, muitas perguntas ainda permeiam o complexo K. coriacea, como a classificação infraespecífica de K. coriacea, principalmente no que diz respeito ao rebaixamento de K. tomentosa Cambess. à categoria de subespécie e à proposta das novas variedades. Kielmeyera coriacea var. tomentosa já foi coletada em diversas áreas do Brasil Central e seus caracteres diagnósticos, apesar da natureza quantitativa, são consistentes, justificando a proposição de um táxon diferenciado para tais plantas. No entanto, segundo o próprio Saddi (1986), subespécies possuem uma certa separação espacial, e no caso de K. coriacea, as duas subespécies são completamente simpátricas, já que K. coriacea subsp. coriacea ocupa toda a área de distribuição da espécie. São necessários estudos biossistemáticos com enfoques nas subespécies, para esclarecer qual o melhor posicionamento para esses táxons, se a proposta de Saddi (1982) ou se a manutenção de um táxon específico, K. tomentosa, como proposto originalmente por Cambèssedes (1828). Ainda em relação a subespécie tomentosa, as variedades precisam ser postas em xeque. A variedade intermedia é descrita por Saddi com características intermediárias entre os representantes típicos das duas subespécies. Dessa forma, plantas aparentemente típicas da variedade coriacea, mas que possuíam algum tricoma, mesmo que poucos no ápice das folhas, foram incluídas nesta variedade intermedia por Saddi. Aparentemente, a presença de tricomas nas folhas não deve ser demasiadamente valorizada taxonomicamente no caso das espécies estudadas, haja visto que até mesmo representantes típicos de K. grandiflora podem apresentar tricomas folhas. A terceira variedade da subespécie tomentosa, Kielmeyera nas var. pseudotomentosa, é baseada em apenas duas exsicatas (da mesma localidade), de plantas essencialmente glabras que se diferenciam pela presença de um pecíolo conspícuo. É

necessário verificar se essas características são consistentes em uma ou mais populações para poder-se confirmar a coerência da proposta. O mesmo deve ser procedido para as variedades da subespécie K. coriacea subsp. coriacea, baseadas em caracteres quantitativos e na presença/ausência de tricomas. Kielmeyera var. mycrophylla é descrita por Saddi (1982) como uma figura degenerada da variedade típica, com uma estranha distribuição disjunta (Paraná e Goiás). Alguns exemplares de K. coriacea das populações estudadas (K. coriacea var. coriacea) apresentaram características de K. coriacea var. microphylla (folhas pequenas). Aparentemente, este táxon é um bom exemplo do que é chamado de "forma" pelos taxonomistas (Hamilton 1995). No entanto, estudos biossistemáticos, como o procedido neste estudo, podem ser aplicados neste táxon, assim como também em K. coriacea var. glabripes e K. coriacea var. guiaensis, pobremente sustentados. Os marcadores desenvolvidos neste trabalho poderão permitir elucidações dessas questões e outras. Além da revisão da classificação por meio de estudos fitogeográficos, uma revisão nomenclatural, com acesso aos tipos precisa ser procedida, momento no qual a taxonomia clássica será indispensável, como por exemplo: K. coriacea var. coriacea descrita na revisão de Saddi (1982) precisa ser confrontada com o tipo nomenclatural de Martius, (pois tanto a descrição e a ilustração [Martius & Zuccarini 1825; Martius 1826] quanto a foto do tipo deixam suspeitas sobre a identidade da variedade tipo assumida por Saddi); e os nomes sinonimizados por Saddi (1982) em K. coriacea precisam ser revistos, como Martinieria arborea Vell., que precisa ser epitipificada e então sinonimizada a uma das duas espécies do complexo, sendo que o nome de Vellozo possui prioridade sobre o de Wawra.

Em uma revisão sobre os mecanismos envolvidos nos processos de especiação, Wu (2001) aponta que não se pode utilizar o isolamento reprodutivo como um critério para especiação (Mayr 1963), já que tal fenômeno freqüentemente está associado às conseqüências do processo de especiação, não podendo, portanto, ser declarado sua causa. Dessa maneira, é completamente admissível certo grau de fluxo gênico entre espécies distintas (e.g. Arnold 1997; Briggs & Walters 1997; Stace 1989). Segundo o modelo de Wu (2001), *K. coriacea* e *K. grandiflora* poderiam estar em um estágio final de especiação ou esta pode ter ocorrido apenas recentemente, de maneira que podem ser caracterizadas como linhagens divergentes evidentes, mas que compartilham grande parte do genoma (e das características fenotípicas) devido à ancestralidade e/ou via fluxo gênico, já que os marcadores estudados indicam que não estão completamente isoladas reprodutivamente.

Extrapolando as evidências de especiação recente no complexo *K. coriacea* a um contexto histórico, podem-se fazer algumas conjecturas acerca da história da vegetação do Brasil Central. Considerando que as duas espécies ocorrem simpatricamente em regiões de cerrado *s.s.* ou cerrados bastante degradados, sendo raras em vegetações mais densas (como cerradão) e distribuem-se ao longo de toda a área do Cerrado (aproximadamente 2 milhões de km²; Oliveira & Marquis 2002), pode-se construir uma relação dialética: ou as espécies começaram o processo de especiação <u>antes</u> da expansão da vegetação e foram ocupando o hábitat à medida que este foi sendo construindo, mantendo o <u>mesmo</u> estágio de especiação ao longo de <u>toda a distribuição</u> e ao longo de <u>todo o tempo</u> decorrido; ou o ancestral comum já apresentava a ampla distribuição do complexo com a vegetação já estabelecida, e as espécies divergiram mais tarde, da <u>mesma maneira</u> ao longo de <u>toda a área</u>, formando espécies polifiléticas A primeira hipótese diz respeito a um processo de divergência não tão recente, anterior ao estabelecimento do cerrado, e que estaria estático desde então. A segunda hipótese assume que o processo de especiação seria realmente recente, mas

81

implica em um processo de divergência idêntico ao longo de toda a área. De qualquer modo, nenhuma das duas hipóteses parece biologicamente razoável. No entanto, confrontando estas hipóteses com as teorias sobre a origem do Cerrado s.s., pode-se encontrar uma explicação alternativa. Rizzini (1997) faz uma revisão das teorias já postuladas sobre a formação das savanas do Brasil. Muitos são os fatores que já foram apontados como responsáveis pela fisionomia da vegetação, como clima, solo e radiação solar. No entanto, tem sido cada vez mais sustentada a versão de uma origem, ao menos em grande parte, antropogênica, com forte influência do fogo sobre a vegetação (Ledru 2002; Rizzini 1997). A idéia de uma vegetação florestal (cerradão) ocupando originalmente a distribuição do cerrado s.l., sendo apenas recentemente substituída por uma fisionomia campestre/arbustiva devido ao intenso manejo do fogo pelo homem, provê uma alternativa para o entendimento da história do complexo K. coriacea: há pouco tempo, as duas espécies encontravam-se restritas a uma determinada área (onde a vegetação não desenvolvia a fisionomia florestal), mas já apresentavam sinais de um processo de divergência. Então, com a influência do fogo (intensificada pelo homem), a fisionomia savânica foi rapidamente expandindo sua distribuição e, junto com ela, suas espécies características, entre elas K. coriacea e K. grandiflora. Assim, os resultados encontrados para as espécies do complexo K. coriacea e a hipótese, atualmente amplamente aceita, da origem da fisionomia de cerrado s.s. por meio da ação do fogo, aparentemente, corroborarem-se mutuamente. No entanto, os objetivos deste trabalho e suas conclusões limitam-se à circunscrição taxonômica do complexo K. coriacea, e para ir-se além das conjecturas e suposições sobre a história evolutiva do grupo e das vegetações a ele relacionadas, muito ainda precisaria ser estudado, como padrões fitogeográficos dentro do grupo, aspectos que vão além do escopo deste trabalho.

Referências

Arnold ML (1997) Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York

Brigg D, Walters SM (1997) Plant variation and evolution. University Press, Cambridge

Hamilton CW (1995) Implications of the equivalence of subspecies and variety, and of the irrelevance of forma. Acta Hortic 413:57-63

Ledru MP (2002) Late quaternary history and evolution of the cerrados as revealed by palynological records. In: Oliveira PS, Marquis RJ. The Cerrados of Brazil. Columbia University Press, New York, pp 33-50

Martius CFP, Zuccarini JG (1825) Anzeigen. Flora 8:27-32

Martius CFP (1826) Nova genera et species plantarum, v.I, p. IV. Typis Lindaueri, München

Mayr E (1963) Animal species and evolution. The Belknap Press, Cambridge

Oliveira PS, Marquis RJ (2002) Preface. In: Oliveira PS, Marquis RJ. The Cerrados of Brazil. Columbia University Press, New York, pp vii-viii

Rizzini CT (1997) Tratado de fitogeografia do Brasil. Âmbito Cultural Edições Ltda., Rio de Janeiro

Saddi N (1982) A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis. University of Reading.

Stace CA (1989) Plant taxonomy and biosystematics. The University Press, Cambridge

Wu CI (2001) The genic view of the process of speciation. J Evol Biol 14:851-865

ANEXOS

Anexo I. Protocolo utilizado para extração de DNA genômico em *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi (baseado em Doyle & Doyle 1987).

Solução CTAB (10 ml):

H ₂ O Miliq	5,78 ml
Tris HCl (1M, pH 7,5)	1 ml
NaCl (5M)	2,7 ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	400 µ1
PVP 40	0,1 g
СТАВ	0,2 g
BME (14M)	20 µ1

obs. para facilitar a dissolução do CTAB e do PVP, aquecer previamente a solução a 65°C; acrescentar BME por último. É recomendável utilizar sempre solução recém preparada. Nunca estocar a solução se BME já tiver sido acrescentado.

Etapas para extração:

- 1. Colocar 100 mg de folha moída em eppendorf de 2 ml;
- 2. Adicionar 800 µl da solução CTAB;
- 3. Incubar à 65°C por 1 hora, agitando a cada 10 minutos;
- 4. Deixar à temperatura ambiente por 5 minutos;
- Adicionar 800 µl de SEVAG (24 Clorofórmio: 1 Álcool isoamílico), de preferência gelado;
- 6. Misturar delicadamente por inversão por 1 minuto;
- 7. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos;
- 8. Transferir fase aquosa para *eppendorf* limpo de 1,5 ml;
- 9. Adicionai mais 800 µl de SEVAG (24 Clorofórmio: 1 Álcool isoamílico);
- 10. Misturar delicadamente por inversão por 1 minuto;
- 11. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos;
- 12. Transferir fase aquosa para eppendorf limpo de 1,5 ml;
- 13. Adicionar 300 µl de Isopropanol;

- 14. Misturar delicadamente por inversão por 1 minuto;
- 15. Armazenar a -20°C por 1-24 horas;
- 16. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos;
- 17. Descartar delicadamente o sobrenadante;
- 18. Adicionar 1 ml de etanol 70% gelado;
- 19. Centrifugar a 10.000 por 10 minutos;
- 20. Descartar o sobrenadante;
- 21. Secar internamente o tudo (delicadamente com papel absorvente ou deixando descansar a temperatura ambiente ou em câmara de fluxo por algumas horas);
- 22. Adicionar 1 µl de RNAse (10 mg/ml);
- 23. Deixar o tubo a temperatura ambiente por 2-24 horas;
- 24. Estocar em *freezer* (se for estocar por muito tempo) ou geladeira (caso for usar nos próximos dias).

Anexo II. Coeficientes de ancestralidade parciais de 106 indivíduos do complexo *Kielmeyera coriacea* obtidos para quatro grupos (K=4) pelo software STRUCTURE. Indivíduos 1-29 são originados da população simpátrica de *K. coriacea*, 30-47 da população alopátrica de *K. coriacea*, 48-77 da população simpátrica de *K. grandiflora* e 78-106 da população alopátrica de *K. grandiflora*.

Ι	1	2	3	4	Ι	1	2	3	4	Ι	1	2	3	4
1	0.002	0.006	0.006	0.986	38	0.005	0.003	0.002	0.990	75	0.010	0.031	0.944	0.016
2	0.002	0.001	0.005	0.991	39	0.031	0.005	0.086	0.878	76	0.220	0.064	0.669	0.047
3	0.004	0.003	0.020	0.973	40	0.008	0.011	0.018	0.964	77	0.521	0.019	0.334	0.127
4	0.002	0.001	0.001	0.996	41	0.014	0.004	0.004	0.978	78	0.636	0.014	0.292	0.057
5	0.014	0.009	0.008	0.969	42	0.004	0.002	0.004	0.989	79	0.907	0.036	0.055	0.002
6	0.003	0.004	0.019	0.973	43	0.006	0.016	0.032	0.946	80	0.884	0.076	0.034	0.005
7	0.020	0.011	0.276	0.693	44	0.036	0.002	0.039	0.923	81	0.297	0.054	0.625	0.024
8	0.009	0.003	0.060	0.929	45	0.013	0.002	0.013	0.972	82	0.666	0.306	0.004	0.024
9	0.001	0.012	0.005	0.983	46	0.004	0.002	0.007	0.987	83	0.107	0.004	0.885	0.004
10	0.001	0.002	0.002	0.995	47	0.012	0.009	0.002	0.977	84	0.945	0.007	0.047	0.002
11	0.004	0.003	0.005	0.988	48	0.006	0.008	0.984	0.002	85	0.029	0.011	0.958	0.002
12	0.007	0.094	0.011	0.888	49	0.017	0.007	0.971	0.005	86	0.603	0.010	0.383	0.004
13	0.007	0.005	0.003	0.985	50	0.093	0.637	0.257	0.013	87	0.642	0.094	0.262	0.002
14	0.049	0.012	0.010	0.928	51	0.053	0.716	0.229	0.003	88	0.007	0.003	0.983	0.006
15	0.001	0.002	0.004	0.993	52	0.002	0.039	0.954	0.004	89	0.981	0.008	0.005	0.006
16	0.005	0.003	0.002	0.990	53	0.102	0.236	0.639	0.023	90	0.988	0.003	0.003	0.006
17	0.009	0.003	0.102	0.886	54	0.028	0.002	0.970	0.001	91	0.973	0.001	0.022	0.004
18	0.015	0.070	0.051	0.864	55	0.003	0.993	0.001	0.003	92	0.979	0.010	0.008	0.003
19	0.011	0.072	0.031	0.885	56	0.028	0.010	0.960	0.002	93	0.985	0.008	0.002	0.005
20	0.007	0.008	0.002	0.983	57	0.015	0.011	0.967	0.008	94	0.971	0.004	0.022	0.003
21	0.004	0.023	0.029	0.944	58	0.016	0.010	0.973	0.001	95	0.952	0.016	0.007	0.024
22	0.019	0.011	0.020	0.950	59	0.088	0.009	0.901	0.003	96	0.938	0.012	0.042	0.008
23	0.005	0.002	0.308	0.684	60	0.011	0.003	0.984	0.003	97	0.748	0.006	0.244	0.002
24	0.001	0.001	0.002	0.996	61	0.158	0.012	0.821	0.010	98	0.866	0.010	0.118	0.007
25	0.003	0.004	0.003	0.990	62	0.002	0.001	0.992	0.005	99	0.629	0.356	0.009	0.006
26	0.003	0.003	0.001	0.993	63	0.004	0.987	0.004	0.005	100	0.957	0.022	0.011	0.010
27	0.002	0.023	0.019	0.956	64	0.010	0.975	0.002	0.013	101	0.993	0.003	0.003	0.001
28	0.013	0.008	0.003	0.975	65	0.001	0.995	0.003	0.001	102	0.965	0.005	0.023	0.007
29	0.015	0.003	0.017	0.966	66	0.001	0.996	0.001	0.001	103	0.971	0.006	0.021	0.002
30	0.002	0.003	0.002	0.993	67	0.002	0.990	0.005	0.003	104	0.994	0.003	0.002	0.002
31	0.007	0.003	0.059	0.932	68	0.001	0.996	0.001	0.002	105	0.988	0.008	0.003	0.001
32	0.004	0.004	0.001	0.991	69	0.441	0.539	0.008	0.012	106	0.986	0.005	0.005	0.004
33	0.003	0.002	0.003	0.993	70	0.342	0.641	0.002	0.015					
34	0.034	0.008	0.188	0.769	71	0.013	0.826	0.155	0.007					
35	0.007	0.002	0.004	0.987	72	0.002	0.990	0.004	0.004					
36	0.007	0.007	0.005	0.981	73	0.044	0.609	0.339	0.008					
37	0.005	0.004	0.004	0.986	74	0.004	0.006	0.978	0.012					

Anexo III. Coeficientes de ancestralidade parciais de 106 indivíduos do complexo *Kielmeyera coriacea* obtidos para dois grupos (K=2) pelo software STRUCTURE. Indivíduos (I) 1-29 são originados da população simpátrica de *K. coriacea*, 30-47 da população alopátrica de *K. coriacea*, 48-77 da população simpátrica de *K. grandiflora* e 78-106 da população alopátrica de *K. grandiflora*.

Ι	1 2	Ι	1	2	Ι	1	2
1	0.002 0.998	38	0.001	0.999	75	0.974	0.026
2	0.001 0.999	39	0.038	0.962	76	0.993	0.007
3	0.006 0.994	40	0.010	0.990	77	0.987	0.013
4	0.001 0.999	41	0.002	0.998	78	0.936	0.064
5	0.004 0.996	42	0.001	0.999	79	0.997	0.003
6	0.007 0.993	43	0.021	0.979	80	0.999	0.001
7	0.237 0.763	44	0.022	0.978	81	0.993	0.007
8	0.008 0.992	45	0.005	0.995	82	0.986	0.014
9	0.002 0.998	46	0.006	0.994	83	0.926	0.074
10	0.001 0.999	47	0.009	0.991	84	0.999	0.001
11	0.001 0.999	48	0.998	0.002	85	0.989	0.011
12	0.056 0.944	49	0.997	0.003	86	0.997	0.003
13	0.007 0.993	50	0.997	0.003	87	0.999	0.001
14	0.060 0.940	51	0.981	0.019	88	0.966	0.034
15	0.008 0.992	52	0.997	0.003	89	0.999	0.001
16	0.013 0.987	53	0.993	0.007	90	0.999	0.001
17	0.008 0.992	54	0.999	0.001	91	0.990	0.010
18	0.039 0.961	55	0.996	0.004	92	0.998	0.002
19	0.022 0.978	56	0.999	0.001	93	0.994	0.006
20	0.002 0.998	57	0.958	0.042	94	1.000	0.000
21	0.001 0.999	58	0.997	0.003	95	0.993	0.007
22	0.015 0.985	59:	0.993	0.007	96	0.991	0.009
23	0.110 0.890	60:	0.998	0.002	97	0.999	0.001
24	0.004 0.996	61	0.994	0.006	98	0.996	0.004
25	0.001 0.999	62	0.993	0.007	99	0.994	0.006
26	0.002 0.998	63	0.996	0.004	100	0.996	0.004
27	0.014 0.986	64	0.967	0.033	101	0.998	0.002
28	0.003 0.997	65	0.999	0.001	102	0.979	0.021
29	0.009 0.991	66	0.998	0.002	103	0.997	0.003
30	0.003 0.997	67	0.997	0.003	104	0.999	0.001
31	0.011 0.989	68	0.997	0.003	105	0.999	0.001
32	0.005 0.995	69	0.992	0.008	106	0.999	0.001
33	0.004 0.996	70	0.997	0.003			
34	0.041 0.959	71	0.995	0.005			
35	0.001 0.999	72	0.997	0.003			
36	0.004 0.996	73	0.998	0.002			
37	0.005 0.995	74	0.994	0.006			

Anexo IV. Foto de parte de um gel de acrilamida de genotipagem (microssatélite KC 02) de indivíduos de *Kielmeyera coriacea* mostrando exemplo de indivíduo com oito bandas (seta vermelha), sugerindo que a espécie é, no mínimo, octaplóide.

