

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
TROPICAL E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM BOTÂNICA

SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DOS GÊNEROS NEOTROPICAIS
DA TRIBO **DORSTENIEAE** Dumort. *Brosimum* Sw, *Helianthostylis* Baillon
e *Trymatococcus* Poepp. & Endl. (**MORACEAE**)

WELMA SOUSA SILVA

Manaus – AM
Junho, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL
E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM BOTÂNICA

SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DOS GÊNEROS NEOTROPICAIS
DA TRIBO **DORSTENIEAE** Dumort. *Brosimum* Sw, *Helianthostylis* Baillon
e *Trymatococcus* Poepp. & Endl. (**MORACEAE**)

WELMA SOUSA SILVA

Orientadora: Dra Aparecida Donisete de Faria

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica.

Manaus – AM
Junho, 2007

Silva, Welma Sousa

Sistemática Filogenética dos gêneros neotropicais da Tribo Dorstenieae: *Brosimum* Sw, *Helianthostylis* Baillon e *Trymatococcus* Poepp. & Endl. (**MORACEAE**): / Welma Sousa S. Araújo –

Manaus: UFAM/INPA,

2007.

100 p. ilustr.

Dissertação de Mestrado - Área de concentração Botânica.

1. Sistemática 2. Filogenia 3. Moraceae

CDD 19º ed. 595.735

Sinopse:

Foi estudada a sistemática filogenética dos gêneros neotropicais *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* (Moraceae), com utilização de caracteres morfológicos, anatômico e moleculares. Os resultados apresentaram evidências sobre as relações entre os táxons analisados.

Palavras-chave: Moraceae, Sistemática filogenética, Taxonomia, Neotrópicos

À mulher mais importante da minha vida,
Meu suporte, meu refúgio,
Minha mãe Maria Lúcia,
Dedico,

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Ao Departamento do curso de Botânica.

À bolsa de mestrado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao prazer de fazer Ciência, de aprender mais sobre Botânica, de tentar responder algumas perguntas enquanto um leque de possibilidades se abre para realizar tantas outras.

À atenciosa orientação prestada pelos pesquisadores Aparecida de Faria e José Eduardo Ribeiro. Filogenia de plantas, na Amazônia, é um grande desafio. Obrigada por terem proporcionado o desenvolvimento deste trabalho e pelas preciosas informações adquiridas.

À Equipe do Laboratório de Taxonomia Vegetal –CPBO/INPA, pelo apoio nas idas à Reserva Ducke e coletas nos *Brosimuns* de 40m!

Ào herbário INPA, aos empréstimos de material providos dos herbários IB, BHCB, MG e RB, no Brasil, VEN, Venezuela e INB, Costa Rica.

Ao Departamento do Curso de Botânica pelo suporte na participação em Eventos e realização de Cursos.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron-Campinas,SP por disponibilizar sua infraestrutura e apoiar a realização das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura utilizadas neste estudo. Ao Centro de Biologia Molecular Estrutural – LNLS pela colaboração na obtenção de dados moleculares.

À todos os pesquisadores que, prontamente, respondem às minhas intermináveis perguntas sobre os variados assuntos que permeiam o mundo da Sistemática Filogenética.

Obrigada família amada e aos amigos de casa em Goiás, longe, mas nunca ausentes, com zelo e carinho inestimáveis.

Aos amigos de Manaus, do INPA, pessoas mais que queridas que me ensinaram muito desde o início dessa jornada, as vivências, alegrias, frustrações e muitas afinidades compartilhadas fazem das amizades aqui conquistadas, uma realização à parte.

RESUMO

O clado neotropical da tribo Dorstenieae Dumort. (Moraceae), composto pelos gêneros *Brosimum* Sw. com 15 espécies, *Helianthostylis* Baillon, com duas espécies, *Trymatococcus* Poepp. & Endl. com duas espécies, é bem representado na Amazônia, sendo que *Helianthostylis* e *Trymatococcus* são endêmicos desta região. A partir de estudos anteriores de filogenia para a família Moraceae, foi comprovado que o clado é monofilético, entretanto, as relações filogenéticas entre as espécies não foram elucidadas. O presente trabalho teve por objetivo a análise das relações filogenéticas entre as espécies desse clado, com utilização de um maior número de táxons do que os anteriormente utilizados para análises semelhantes. Caracteres macro e micro morfológicos de estruturas vegetativas e reprodutivas, e de caracteres moleculares da região *trnL-F* do DNA de cloroplasto da maior parte das espécies componentes do clado foram levantados. Os resultados mostraram que, como anteriormente observado, o clado neotropical de Dorstenieae é monofilético. Porém, o gênero *Brosimum* como proposto por Berg é parafilético devido à inclusão das espécies *H. sprucei* e *T. amazonicus* entre as espécies do gênero. Houve a formação de dois clados para as espécies de *Brosimum*, as quais, devido ao posicionamento inverso de *B. lactescens*, estes não correspondem aos agrupamentos taxonômicos infragenéricos propostos por Berg para o gênero. Além disso o filograma de máxima verossimilhança obtido a partir das sequências da região *trnL-F*, sustentou a hipótese proposta por Berg de diversificação do gênero *Brosimum* a partir da América Central. Análises filogenéticas utilizaram também outros métodos cladísticos, como a máxima verossimilhança e análise bayesiana a fim de verificar as diferentes abordagens propostas. Entretanto, devido ao baixo número de caracteres informativos, não foram obtidas resoluções suficientes para avaliação das relações inter-específicas e genéricas. A posição incerta dos gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus* entre os clados formados pelas espécies de *Brosimum* e a condição homoplásica dos caracteres morfológicos, indicam a necessidade de um maior número de dados para obtenção de uma filogenia melhor resolvida para o grupo.

ABSTRACT

The Dorstenieae neotropical clade (Moraceae) is formed by *Brosimum* Sw (15 spp.), *Helianthostylis* Baillon (two spp.), and *Trymatococcus* Poepp. & Endl. (two spp.), and is well represented in the Amazonian biome, with *Helianthostylis* and *Trymatococcus* genera endemic to this region. Previous phylogenetic studies of the Moraceae showed that the neotropical Dorstenieae clade is monophyletic, however, the phylogenetic relationships among the species and genera of the neotropical clade have remained unknown. The aim of the present study is to present an analysis of the phylogenetic relationships among species of the neotropical Dorstenieae clade, by using an improved sampling of taxa from this group. Both morphological and molecular characters were obtained for the majority of species from the neotropical Dorstenieae clade. The morphological data set included vegetative and reproductive structures, while the molecular one included the *trnL-F* region of the chloroplast DNA. The results showed that, as previously observed, the neotropical clade of Dorstenieae tribe is monophyletic. However, the genus *Brosimum* as proposed by Berg is paraphyletic due to inclusion of species *H. sprucei* and *T. amazonicus* between the species of *Brosimum*. It was observed the formation of two clades for the *Brosimum* species, which, due to the inverse position of *B. lactescens*, not corresponding to taxonomic infrageneric groups proposed by Berg for the genus *Brosimum*. Moreover, the phylogram of maximum likelihood from molecular *trnL-F* sequences supported the hypothesis proposed by Berg of geographic diversification of the genus *Brosimum* from Central America. The phylogenetic analyses also incorporated other cladistic methods such as maximum likelihood and bayesian analysis, in order to verify the different approaches. However, due to the low number of informative characters, it was not possible to attain enough resolutions for evaluation of the inter-specific and generic relationships of the neotropical clade of Dorstenieae tribe. The uncertain position of the genera *Helianthostylis* and *Trymatococcus* between the clades formed by the *Brosimum* species and the homoplastic condition of the morphological characters, indicates the necessity of a larger number of data to attain a phylogeny better resolved for the group.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1- Inflorescências e infrutescências do gênero <i>Brosimum</i>	17
Fig.2 – Inflorescências e infrutescências dos gêneros <i>Trymatococcus</i> e <i>Helianthostylis</i> . Inflorescências dos grupos-externos	18
Fig. 3- Mapa da região intergênica <i>trnL-F</i>	24
Fig. 4- - Árvore filogenética de consenso estrito gerada por parcimônia a partir de caracteres moleculares.....	29
Fig. 5 - Filograma obtido por análise de máxima verossimilhança	32
Fig. 6- Mapa de distribuição geográfica do clado neotropical de Dorstenieae.....	33
Fig. 7- Árvore filogenética de consenso estrito gerada por parcimônia a partir de dados morfológicos.....	36
Fig 8- Árvore consenso gerada por análise bayesiana a partir de dados moleculares e caracteres morfológicos combinados.....	37
Fig. 9- Diferentes estados de caracteres micromorfológicos da lâmina foliar das espécies do clado Neotropical de Dorstenieae.....	55
Fig. 10- Diferentes estados de caracteres micromorfológicos das inflorescências das espécies do clado Neotropical de Dorstenieae.....	56
Fig. 11- Diferentes estados de caracteres micromorfológicos da lâmina foliar e das inflorescências das espécies do clado Neotropical de Dorstenieae e em <i>Sorocea</i> <i>muriculata</i>	57
Fig. 12- Diferentes estados de caracteres anatômicos observados na lâmina foliar das espécies do clado Neotropical de Dorstenieae.....	58
Fig. 13- Mapeamento de caracteres morfológicos vegetativos, reprodutivos e anatômico- foliares representativos para as espécies do clado neotropical de Dorstenieae sob árvore mais parcimoniosa.....	61

SUMÁRIO

SINOPSE	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 A FAMÍLIA MORACEAE GAUDICH.	11
2.2. CLASSIFICAÇÃO INFRAFAMILIAR DE MORACEAE	13
2.3 A TRIBO DORSTENIEAE	14
3. OBJETIVO	19
3.1 GERAL	19
4. MATERIAL E MÉTODOS:.....	20
4.1 TÁXONS AMOSTRADOS	20
4.2 LEVANTAMENTO DE DADOS	21
4.3 ANÁLISE DE DADOS	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 INFORMAÇÕES MOLECULARES	28
5.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E FILOGENIA MOLECULAR.....	29
4.3 DIVERSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>BROSIMUM</i> PARA A REGIÃO <i>trnL-F</i>	333
5.4 DADOS MORFOLÓGICOS	35
5.5 ÁRVORES ENCONTRADAS PELAS ANÁLISES DE PARCIMÔNIA, MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E ANÁLISE BAYESIANA:	38
5.6 MAPEAMENTO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS	39
5.7 CARACTERES MORFOLÓGICOS EXCLUÍDOS.....	60
5.8 CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS	63
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS E APÊNDICES	72

1. INTRODUÇÃO

Os diversos métodos para estudos filogenéticos disponibilizados atualmente, permitem a obtenção de classificações cada vez mais naturais, resultantes de trabalhos realizados com base na utilização de dados tradicionais, como aqueles obtidos a partir de caracteres morfológicos e anatômicos, associados com informações de dados moleculares, entre outros.

Dados moleculares têm se apresentado como uma ferramenta poderosa por fornecerem uma maior quantidade de informações, o que propicia a construção de classificações a partir de cladogramas mais robustos e estatisticamente melhor sustentados. O uso dos métodos de sistemática filogenética são considerados de extrema importância para a aquisição de dados que possam resultar em hipóteses sobre a história evolutiva de grupos de organismos (Chase, 2000).

A família Moraceae Gaudich. está dividida em cinco tribos e compreende cerca de 38 gêneros e mais de 1.000 espécies, sendo representada nos neotrópicos por cerca de 270 espécies distribuídas em 19 gêneros, 14 dos quais, endêmicos (Rohwer, 1993). Ao apresentar altas taxas de abundância e diversidade relativas aos ecossistemas amazônicos, a família assume um importante papel ao contribuir com a manutenção de diversas populações animais (Berg, 1990).

A tribo Dorstenieae apresenta grande diversidade na Amazônia, compreendendo 129 espécies distribuídas em oito gêneros. Três deles, *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, são apresentados-se praticamente restritos ao bioma amazônico

As espécies de Dorstenieae são, em geral, arbóreas. Apenas o gênero *Dorstenia* possui hábito herbáceo, apresentam tricomas uncinados na maior parte das estruturas jovens da planta e são caracterizadas pela presença de uma a várias flores carpeladas e várias flores estaminadas inseridas em um receptáculo. De maneira geral, apresentam inflorescências cimosas bissexuais e complexas e brácteas normalmente peltadas distribuídas entre as flores (Berg, 2001).

Os resultados de um estudo filogenético de Moraceae, efetuado com utilização de dados do segmento gênico do cloroplasto *ndhF* (Datywiler & Weiblen, 2004), comprovaram o monofilestimo do clado neotropical de Dorstenieae composto pelas espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Porém, as relações filogenéticas existentes dentro do clado não foram elucidadas, permanecendo fraco os suportes estatísticos para as relações infragenéricas entre *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Poucos estudos

sobre as relações filogenéticas entre espécies de Moraceae têm sido realizados até o presente. Assim, mais estudos enfocando a sistemática filogenética deste grupo devem ser, sem dúvida, fontes de informações inéditas e valiosas.

O presente trabalho teve como objetivo analisar e compreender as relações filogenéticas entre as espécies de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* com a utilização de caracteres macro e micromorfológicos e sequências do DNA de cloroplasto da região *trnL-F* (Taberlet *et al.*, 1991). Devido a sua alta variabilidade, esta região tem sido amplamente utilizada para análises filogenéticas ao nível genérico e infragenérico (Bakker *et al.*, 1999; Brouat, 2001). As análises foram realizadas com a utilização dos métodos de Parcimônia (Fitch 1971), Máxima Verossimilhança (Felsenstein, 1981) e Análise Bayesiana (Huelsenbeck, 2001), com o intuito de testar as hipóteses geradas de acordo com abordagem feita por cada um destes métodos, apresentando implicações sobre a distribuição geográfica do grupo e para as topologias obtidas para os caracteres morfológicos e moleculares das espécies do clado neotropical da tribo Dorstenieae.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A família Moraceae Gaudich.

A família Moraceae compreende mais de 1.000 espécies distribuídas em aproximadamente 38 gêneros delimitados dentro de cinco tribos. Nos neotrópicos, a família é representada por cerca de 270 espécies distribuídas em 19 gêneros, 14 dos quais endêmicos.

Espécies de Moraceae apresentam formas de crescimento que incluem árvores, arbustos, hemiepífitas, trepadeiras e ervas. São caracterizadas por apresentar folhas, em geral, simples e alternas, com estípulas sempre presentes, geralmente caducas, podendo apresentar-se livres ou unidas ao circundar a gema terminal, e presença de látex leitoso. As inflorescências podem ser unissexuadas, bissexuadas ou ambas, racemosas, cimosas, capitulares ou sicônios complexos; as flores são unissexuadas e o perianto, quando presente, é tetra ou pentâmero, tepalóide e freqüentemente membranáceo. As flores estaminadas possuem filetes retos ou curvos, livres ou unidos e o pistilódio pode estar presente ou ausente. As flores pistiladas não possuem estaminódios, o ovário é unilocular, súpero a ínfero, com 1-2 estiletos e/ou estigmas e um óvulo (sub)apical, que pode ser anátropo ou campilótropo. Os frutos são, freqüentemente, drupáceos, em geral envoltos por um perianto carnoso e/ou um receptáculo carnoso, freqüentemente, a inflorescência toda assume a forma de um sincarpo. As sementes podem ser grandes e sem endosperma ou pequenas com endosperma (Rohwer, 1993).

Cerca de 50 das espécies neotropicais são herbáceas, aproximadamente 125 são hemiepífitas, entre 110-120 são arbóreas, e algumas arbustivas. Moraceae é melhor representada em florestas tropicais pluviais de baixa altitude, estando geralmente entre as três primeiras famílias em diversidade e abundância nesse tipo de vegetação (Ribeiro *et.al.*1999).

A família tem recebido diferentes classificações infrafamiliares ao longo do tempo, bem como diferentes posicionamentos interfamiliares. A circunscrição de Moraceae dentro da subclasse Hammamelidae Cronquist, ordem Urticales Dumort., formada pelas famílias Cannabaceae Martynov. , Barbeyaceae Rendle, Celtidaceae Link, Moraceae, Cecropiaceae C. C.Berg, Ulmaceae Mirbel e Urticaceae Jussieu, é virtualmente a mesma em nos principais sistemas de classificação (Takhtajan, 1997; Dahlgren, 1989; Cronquist, 1993; Thorne, 1992, 2000), sendo que uma única diferença é a exclusão de Barbeyaceae, por Takhtajan (1997) e Thorne (1992, 2000).

A subclasse Hammamelidae foi proposta a partir do agrupamento de famílias com flores reduzidas a apétalas, agrupadas em amentilhos, e polinizadas pelo vento. Essa delimitação está relacionada ao antigo conceito de "Amentiferae". Entretanto, segundo Qui *et al.* (1998) em seu estudo sobre a filogenia das Hammamelidae, a partir de caracteres do fragmento *rbcL*, o monofiletismo de Urticales, com a exclusão de Barbeyaceae, é fracamente suportado. Os membros deste clado, Cannabaceae, Cecropiaceae, Moraceae, Ulmaceae e Urticaceae, compartilham características sinapomórficas: ocorrência de glicoflavonas (Giannasi, 1986), corpos globulares não dispersivos de proteína-P nos elementos de vaso, a forma S desses plastídios, e estrutura similar e ontogenia dos tricomas e estômatos (Gangadhara & Inamdar, 1977).

A partir desses resultados, pode-se constatar também que, ao contrário do se supunha sobre a afinidade da ordem Urticales com Malvales Dumortier, as famílias de Urticales estão compreendidas dentro da ordem Rosales Perleb., agrupadas com as famílias Elaeagnaceae Jussieu, Rhamnaceae Jussieu e Rosaceae Jussieu. Essa relação recebeu maior suporte a partir da observação de que características moleculares, ontogenéticas, fitoquímicas e anatômicas são compartilhadas entre os componentes dos dois clados.

A partir dos resultados dos trabalhos de Systma *et al.*, 2002; Angiosperm Phylogeny Group - APG II, 2003), foi comprovado que Urticales é um dos membros da ordem Rosales. Atualmente, considera-se que o grupo compreende as famílias Cannabaceae, Celtidaceae, Ulmaceae, Moraceae e Urticaceae (incluindo Cecropiaceae).

Humphries & Blackmore (1989), em um estudo filogenético de Moraceae com utilização de 15 caracteres morfo-anatômicos de 12 táxons representativos (incluindo Cannabaceae, Ulmaceae e Barbeyaceae como representantes do grupo externo), apresentam Moraceae como polifilética. Os resultados desse trabalho mostram ainda que a presença de látex leitoso é um paralelismo, um caráter simplesiomórfico surgido em um ancestral de Moraceae e Cecropiaceae, e não uma apomorfia.

Nos trabalhos de filogenia de angiospermas (Chase *et al.* 1993; Soltis *et al.* 2000), e das Hammamelidae (Qui *et al.* 1998), foi utilizado um pequeno número de representantes de Moraceae para as análises. Porém, com um maior número de caracteres moleculares, os resultados evidenciaram uma estreita relação entre Moraceae e Urticaceae, mas com baixos suportes estatísticos. Entretanto, Systma *et al.* (2002), no estudo sobre as relações do grupo "Urticalean rosids" com utilização de caracteres moleculares dos segmentos *rbcL*, *trnL-F* e *ndhF*, e um número maior de representantes das famílias (Ulmaceae, Cannabaceae, Moraceae,

Urticaceae, Cecropiaceae, Celtidaceae e Cannabaceae) obtiveram cladogramas fortemente suportados (97% de *bootstrap*) para o monofiletismo do clado formado por Moraceae e Urticaceae, podendo estas serem consideradas famílias-irmãs. Cecropiaceae apresentou-se inclusa em Urticaceae, já o monofiletismo de Moraceae não foi evidenciado.

Somente com uma amostragem ampla de todas as tribos de Moraceae e utilização de sequências da região *ndhF* do DNA de cloroplasto e região 26S do DNA nuclear utilizadas nos estudos de Datywiller & Weiblen (2004), para investigação da evolução do sicônio e Zerega *et al.* (2005), abordando a biogeografia da família Moraceae, foi possível comprovar o monofiletismo dessa família. Estes estudos obtiveram índices estatísticos favoráveis para o monofiletismo de Moraceae, tanto considerando as seqüências combinadas, quanto apenas a região *ndhF* (100% e 98% de *bootstrap*).

2.2. Classificação infrafamiliar de Moraceae – Posição das espécies do clado neotropical da Tribo Dorstenieae

Corner (1962), trabalhando principalmente com espécies asiáticas, utilizou caracteres morfológicos reprodutivos para realizar a maior parte das delimitações da família, e dividiu Moraceae nas tribos Moreae Gaudich., Artocarpeae R.Br, Olmedieae C.C.Berg , Brosimeae C.C. Berg, Dorstenieae e Ficeae Gaudich. A Tribo Dorstenieae nesta classificação é monogenérica, contendo apenas o gênero *Dorstenia* Linneu. Os gêneros *Brosimum* e *Trymatococcus* estão compreendidos na Tribo Brosimeae, e *Helianthostylis*, por apresentar pistilódios bem desenvolvidos, na Tribo Artocarpeae.

Berg (1972) reduziu para quatro tribos as subdivisões da família: Moreae (incluindo Artocarpeae), Dorstenieae (incluindo Brosimeae), Olmedieae e Ficeae. O mesmo autor voltou a considerar a tribo Artocarpeae e dividiu a família em dois grupos informais: um com os gêneros que possuem estames urticáceos, e outro com estames de filetes eretos. O primeiro é representado pela tribo Moreae e o segundo pelas tribos Artocarpeae, Castilleae (com exclusão de *Olmedia*) , Dorstenieae e Ficeae (Berg, 1977).

Romaniuc Neto (1999) apresenta uma classificação alternativa para o grupo, semelhante a de Corner (1962), incluindo Cecropiaceae dentro de Moraceae, como subfamília Cecropioideae, e dividindo os demais gêneros da subfamília Moroideae em seis tribos: Moreae, Artocarpeae, Olmedieae, Brosimeae, Dorstenieae e Ficeae. Nessa classificação o gênero *Helianthostylis* está inserido na tribo Moreae.

Rohwer (1993), segue na totalidade o sistema de Berg (1972 e 1977), apresentando, de forma mais clara, a diagnose de todos os gêneros reconhecidos para as cinco tribos: Artocarpeae, Castilleae, Moreae, Dorsteniae e Ficeae. É importante ressaltar que nenhum dos sistemas de divisão anteriormente citados para a família Moraceae foi realizado com base em resultados de estudos filogenéticos, por não apresentar, de forma clara, quais seriam as características derivadas e primitivas para o grupo

Uma tentativa de estabelecer relações evolutivas entre as tribos foi feita por Berg (1989), levando em consideração a diversidade e diferenciação das inflorescências em Urticales e os prováveis tipos de polinização. Esse autor apresentou duas hipóteses, sem, entretanto, utilizar uma abordagem filogenética. Na primeira, a tribo Ficeae aparece como irmã de todas as outras, devido a sua especialização reprodutiva através do sicônio, e na segunda hipótese Dorsteniae e Moreae são apresentadas como irmãs, devido a ocorrência de espécies herbáceas e inflorescências bissexuais nessas tribos e, Artocarpeae é apresentada como irmã de Castilleae, ainda que sem apresentar um caráter que justificasse tal arranjo. Systma *et al.* (2002) a partir dos resultados obtidos da análise de sequências moleculares combinadas das espécies de Moraceae, verificou uma estreita relação entre Castilleae, Ficus e Dorsteniae. Já Moreae se apresentou parafilética.

Atualmente, o sistema de classificação aceito para a família a partir de uma abordagem filogenética é o proposto por Weiblen & Datwyller (2004), com base nos resultados da análise realizada com caracteres moleculares (região *ndhF*, do DNA de cloroplasto). A partir dos resultados obtidos, os autores reestruturaram as divisões da família, apresentando evidências sobre as relações entre as tribos. Além de confirmar, como anteriormente observado, que a tribo Moreae é parafilética (Humphries & Blackmore, 1989), e Artocarpeae, *sensu* Rohwer (1993), é polifilética (Systma *et al.* 2002). Com base em seus resultados, esses autores propuseram as transferências dos gêneros neotropicais *Bagassa* e *Sorocea* de Artocarpeae para Moreae, e as transferências de *Antiaropsis*, *Poulsenia* e *Sparattosyce* de Artocarpeae para Castilleae (Anexo 1).

2.3 A Tribo Dorsteniae – *sensu* Datwyller & Weiblen

A Tribo Dorsteniae compreende oito gêneros e 129 espécies: *Bosqueiopsis* E. de Wildeman & T. Durand com uma espécie na África; *Brosimum* com 15 espécies nos neotrópicos; *Dorstenia* com 105 espécies, das quais, 47 são encontradas nos neotrópicos, uma na Ásia, e as outras no continente africano, Madagascar, Socotra e Yemen; *Helianthostylis*,

com duas espécies neotropicais; *Syphosyce* Baillon, com duas espécies na África; *Trilepsium* Du Petit-Thouars com uma espécie na África; *Trymatococcus* com duas espécies nos neotrópicos e *Utsetela* Pellegrin com uma espécie na África (Rohwer 1993).

Datywiller & Weiblen (2004) encontraram suporte estatístico favorável para o monofiletismo da tribo Dorstenieae. Embora a posição de *Trilepsium* tenha permanecido incerta, e os gêneros africanos *Syphosyce* e *Bosqueiopsis* não tenham sido amostrados, é evidente a formação de um único clado Neotropical com forte sustentação (100% de *bootstrap*) para os gêneros *Brosimum*, *Trymatococcus* e *Helianthostylis* (Anexo 1).

As espécies do gênero *Brosimum* são caracterizadas por serem arbóreas, algumas de grande porte (mais de 40m de altura), monóicas ou dióicas, com folhas inteiras, algumas vezes, com margens denteadas ou onduladas, e com pêlos pluricelulares globosos ou oblongo-capitados na superfície de suas lâminas; estípulas livres ou conadas, completamente amplexicaules ou não. As inflorescências são bi ou unissexuadas, (sub)globosas, hemisféricas, turbinadas ou convexalmente discóides; receptáculo, inicialmente, todo coberto por brácteas peltadas; flores estaminadas numerosas, estames 1-4, pistilódios ausentes, flores pistiladas de uma a várias (Fig. 1).

De acordo com Berg (1973, 2001), *Brosimum* compreende 15 espécies e 12 subespécies resultantes da distribuição geográfica descontínua de algumas delas. O gênero se distribui desde o México, Antilhas, Cuba e Jamaica, até o sul do Brasil, predominantemente, em áreas de terra firme não inundáveis de floresta tropical Amazônica, mas apresenta três espécies que se estendem até a área de Cerrado e transição de Mata Atlântica.

De acordo com a classificação de Berg (1973), *Brosimum* está subdividido em dois subgêneros, *Brosimum* e *Ferolia*, com base em caracteres morfológicos reprodutivos e vegetativos, e em um padrão observado de distribuição alopátrica das espécies. O subgênero *Brosimum* é dividido nas seções *Brosimum*, *Bromopsis* e *Piratinera*, levando em consideração a distribuição simpátrica das espécies que as compreendem, assim como as características morfológicas das inflorescências e aspectos anatômicos das lâminas foliares.

Algumas espécies de *Brosimum* tem potencial madeireiro como *B. rubescens* e *B. guianense*. A espécie *B. alicastrum* possui potencial ornamental, sendo utilizada com esse fim nos países da América Central. Já o látex de espécies como *B. utile*, *B. potabile* e *B. alicastrum* é considerado potável, e o látex de *B. parinarioides* e *B. longifolium* é aplicado contra doenças pulmonares (Berg, 1973).

Brosimum é o gênero melhor estudado sob aspectos fitoquímicos, tendo sido registrado a presença de substâncias cumarínicas no cerne de *B. rubescens* (Gottlieb *et al.*

1971), no xilopódio de *B. gaudichaudii* (Vilegas & Pozetti, 1993; Monteiro *et. al* 2002), o qual é amplamente utilizada no tratamento de vitiligo e outras doenças de pele. Também foram registradas isoflavonas citotóxicas anticarcinogênicas na casca da raiz de *B. utile* (Ferrari *et. al.* 2005) e propriedades alucinógenas no látex de *B. acutifolium* subsp. *acutifolium* (Moretti *et. al.*, 2006).

O gênero *Helianthostylis* é caracterizado por apresentar arvoretas com androdioiccia, um sistema reprodutivo raro nas angiospermas (Renner & Ricklefs, 1995). As espécies desse grupo apresentam folhas inteiras com tricomas pluricelulares globosos captados na superfície das lâminas, e estípulas livres não amplexicaules, inflorescências bissexuadas ou estaminadas, globosas e pedunculadas; flores estaminadas em pequeno número na inflorescência bissexuada; flor pistilada imersa no centro do receptáculo e pistilódios bem desenvolvidos (Figs. **2B** e **2D**). Berg (2001) reconhece duas espécies para o gênero, endêmico da Amazônia, *H. sprucei*, ocorrendo em terra firme ao longo da média Bacia Amazônica até o Rio Tapajós, Colômbia e oeste do Equador e *H. steyermarkii* ocorre na parte norte da Alta Bacia Amazônica, Venezuela e Brasil (Noroeste do Amazonas). As espécies se diferenciam pelo tamanho do pistilódio e pistilo, número de tépalas e estames, além de caracteres vegetativos foliares.

No gênero *Trymatococcus* predominam espécies arbóreas, monóicas, com inflorescências bissexuais e pistilódios diminutos, algumas vezes ausentes; inflorescências turbinadas, flores estaminadas sobre a parte superior do receptáculo e uma única flor pistilada imersa no centro do receptáculo (Figs. **2A** e **2C**). As duas espécies reconhecidas para o gênero também são endêmicas da Floresta Amazônica. *T. amazonicus* ocorre em toda a Alta Bacia Amazônica, Suriname e Guiana Francesa, enquanto *T. oligandrus* está restrito às duas últimas áreas. Diferenças morfológicas entre as espécies estão relacionadas aos caracteres de inflorescência e lâmina foliar, como à presença de indumento nas folhas e forma da inflorescência.

Segundo Rohwer (1993), os três gêneros podem ser identificados a partir das seguintes características-

- Inflorescências com brácteas interflorais subpeltadas; estípulas livres; pistilódio presente, às vezes diminuto *Brosimum*
- Anteras introrsas, pistilódio diminuto *Trymatococcus*
- Anteras latrorsas a extrorsas, pistilódio bem desenvolvido *Helianthostylis*

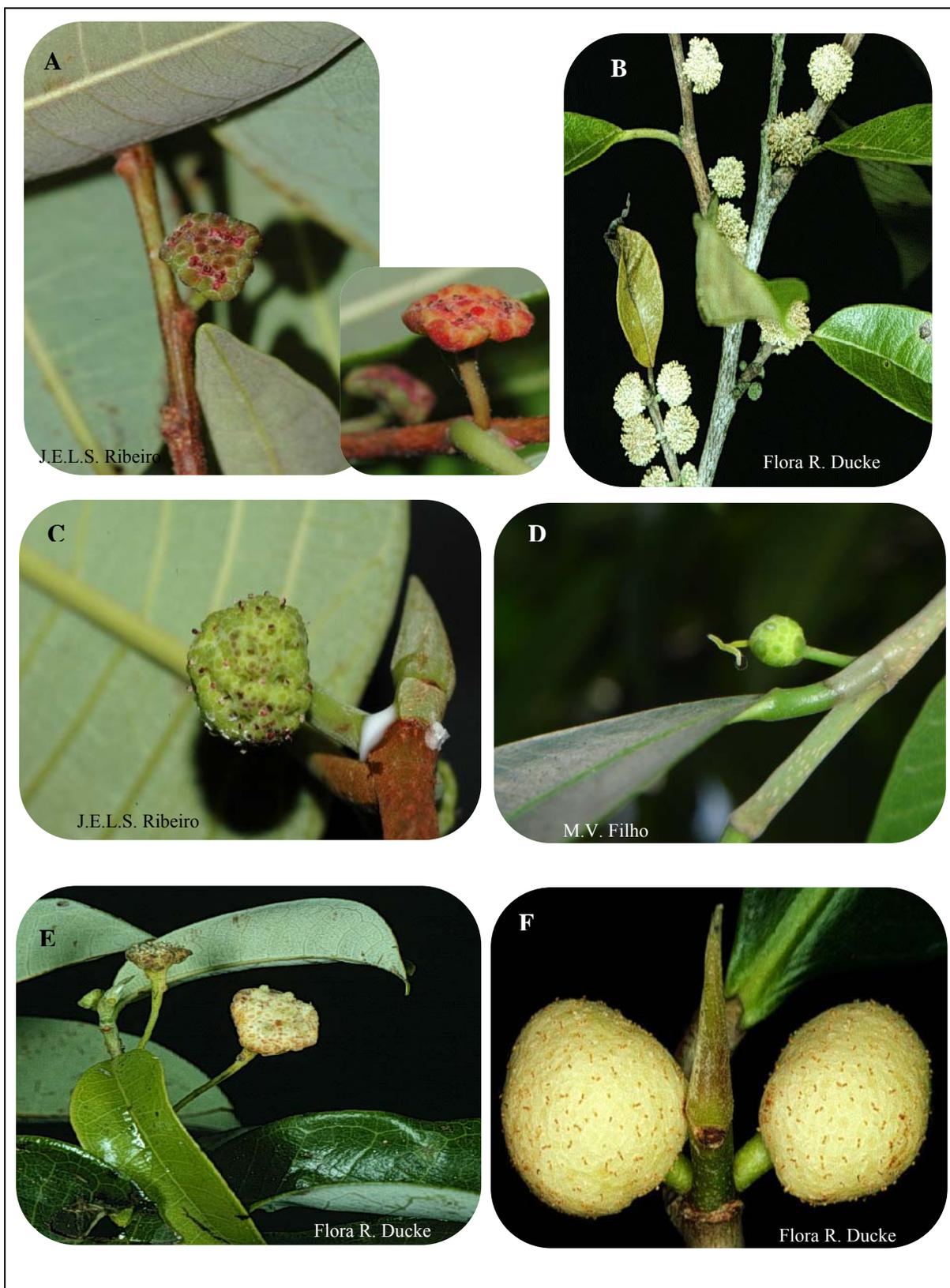


Fig 1. Inflorescências e infrutescências do gênero *Brosimum*. **A)** Inflorescência bissexuada discóide (detalhe) de *B. guianense*. **B)** Inflorescência globosa estaminada de *B. lactescens*. **C)** Inflorescência bissexuada subglobosa de *B. parinarioides*. **D)** Inflorescência globosa pistilada de *B. alicastrum*. **E)** Infrutescência de *B. guianense*. **F)** Infrutescência de *B. rubescens*.



Fig. 2. Inflorescências e infrutescências nos gêneros *Trymatococcus* e *Helianthostylis* e inflorescências nos grupos externos *Dorstenia* e *Sorocea*. **A)** Inflorescência turbinada bissexuada de *T. amazonicus*. **B)** Inflorescência globosa estaminada de *H. sprucei*. **C)** Infrutescência de *T. amazonicus*. **D)** Infrutescência de *H. sprucei*. **E)** Inflorescência discóide bissexuada de *D. brasiliensis*. **F)** Inflorescência racemosa estaminada de *S. muriculata*.

3. OBJETIVO

3.1 Geral

- Investigar as relações filogenéticas entre as espécies dos gêneros neotropicais *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, com utilização de dados morfológicos e moleculares. Com base nos resultados obtidos, propor, se possível, nova delimitação genérica e fornecer inferências sobre a evolução dos caracteres analisados e a distribuição geográfica do clado.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Táxons amostrados

Para a realização do presente trabalho foram utilizados dados morfológicos de estruturas vegetativas e reprodutivas, incluindo micromorfológicas (superfície de lâminas foliares e inflorescências) e anatômicas (epiderme da lâmina foliar), e moleculares (região *trnL-F*) de 15 espécies do gênero *Brosimum* (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii*, *B. glaziovii*, *B. glaucum*, *B. guianense*, *B. lactescens*, *B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. multinervium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*); duas do gênero *Helianthostylis* (*H. sprucei* e *H. steyermarkii*), e duas espécies do gênero *Trymatococcus* (*T. amazonicus* e *T. oligandrus*), de acordo com a classificação de Berg (1972, 2001). A espécie do gênero pantropical *Dorstenia* (*D. brasiliensis*) (Fig. 2E) foi utilizada como grupo externo, devido ao fato de *Dorstenia* ser um gênero irmão do clado formado pelo grupo dos gêneros neotropicais estudados no presente trabalho. Além dessa, também *Sorocea muriculata* (Moreae *sensu* Datwyler & Weiblen 2004) foi utilizada como grupo externo (Fig. 2F).

Amostras de espécimes de *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii*, *B. glaziovii*, *B. glaucum*, *B. multinervium*, *T. oligandrus* e *H. steyermarkii*, foram obtidas através de empréstimos solicitados aos herbários nacionais e internacionais (BHCB, RB, IB, MG, INB, VEN) (Holmgren *et al.*, 1990) (Apêndice 1).

A maior parte das espécies estudadas, entretanto, foi coletada na Reserva Florestal Ducke, localizada no município de Manaus-AM, sendo elas: *B. acutifolium*, *B. lactescens*, *B. longifolium*, *B. guianense*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens*, *B. utile*, *T. amazonicus* e *H. sprucei*. A espécie *B. melanopotamicum* (1185) foi coletada na Reserva 1103 (Gavião) do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF).

Ramos com estruturas vegetativas e reprodutivas foram devidamente prensados e secos em estufa para posterior análise sob microscópio estereoscópico. Amostras de inflorescências frescas foram levadas ao Laboratório de Taxonomia da Coordenação de Pesquisas em Botânica do INPA (CPBO/INPA), fixadas em FAA 70% e conservadas em álcool 70% glicerinado para a realização das análises.

4.2 Levantamento de dados

I. Dados Morfológicos

Estruturas morfológicas de folhas e inflorescências foram analisadas com auxílio de microscópio estereoscópico no Laboratório de Taxonomia da CPBO/INPA, para levantamento dos caracteres. Para obtenção desses dados, foram considerados, inicialmente, todos os caracteres morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas. Posteriormente, foram desconsiderados todos aqueles que apresentaram sobreposição de estados, que não se mostraram informativos ou que deixaram dúvidas quanto a seus estados.

Além da análise de amostras frescas e herborizadas, também a literatura especializada (Berg, 1972; 2001; Harris & Harris, 2001) foi utilizada para levantamento dos caracteres e seus estados.

II. Dados Micromorfológicos de Superfície

A superfície das lâminas foliares e inflorescências de todas as espécies (Apêndice 1) foi investigada com auxílio de Microscópio Óptico de Varredura (MEV) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron situado em Campinas, SP.

As amostras foram desidratadas com utilização da técnica do Ponto Crítico. A etapa de secagem em ponto crítico para inflorescências fixadas em álcool 70% foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas-UNICAMP. Após serem submetidas ao processo de desidratação em série etanólica (70, 80, 90, 95 e 100%), em um período total de 2 horas, as amostras foram colocadas no aparelho *Critical Point Dryer* (Balzers - modelo CPD030).

Em seguida, pequenos fragmentos da lâmina foliar, face abaxial e adaxial e fragmentos representativos das inflorescências foram recortados e montados em *stubs*, cobertos com um fino filme de ouro (4 – 10mm) com auxílio do aparelho Sputter (Balzers - modelo SCD050). A seguir, as amostras foram levadas Microscópio de Varredura de Alta Resolução JSM 6330F, analisadas e fotografadas.

III. Dados Anatômicos

O preparo e análise das epidermes da lâmina foliar de todas as espécies foi realizado no Laboratório de Botânica Agroflorestal- LABAF da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Folhas frescas foram armazenadas em álcool etílico 70% e recortadas em pequenos fragmentos. Para as folhas das espécies herborizadas foi realizado o mesmo procedimento, após hidratação em água destilada antes das secções. Os fragmentos foliares foram emersos em frascos contendo solução de Peróxido de Hidrogênio + ácido acético (1:1) e condicionados em estufa a 55 °C por um período de 24h ou mais, de acordo com a dissociação foliar da amostra. Depois da dissociação, os resíduos de mesofilo foram retirados e as epidermes da face adaxial e abaxial foram coradas com fucsina por dois minutos e lavadas em série etanólica (50, 70 e 100%) (Kraus & Arduim, 1997). Em seguida, as epidermes foram montadas em lâminas semi-permanentes. As análises anatômicas e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss Axiostar. As terminologias para os estados dos caracteres anatômicos seguiram Fahn (1990) e Metcalf & Chalk (1950).

IV. Informações moleculares

I. Extração de DNA

A extração do DNA das espécies em estudo foi realizada no Laboratório de Genética e Ecologia de Plantas (LABGEN), da Coordenação de Pesquisas em Botânica (CPBO) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

O DNA total foi extraído de folhas frescas, secas em sílica ou herborizadas, de acordo com o protocolo de extração com Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) de Doyle & Doyle (1987), com modificações, como segue:

- 1- 50 mg de folha moída foram inseridas em um eppendorf de 2 mL.
- 2- 800 µL d solução de CTAB aquecida (65° C) foi adicionada às folhas
- 3- As amostras foram incubadas a 65°C por 60' e agitadas a cada 10 minutos.
- 4- Deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos.

5- 800 μ L de clorofil (solução 24:1 de clorofórmio:álcool isoamílico) foi adicionado às amostras.

6- As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos.

7- A fase aquosa da solução obtida foi transferida para eppendorf limpo de 1,5 mL.

8- 800 μ L de clorofil foi adicionado à solução e agitada durante 5 minutos.

9- As amostras foram novamente centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos.

10- Repetida a etapa de transferência da fase aquosa da solução obtida para eppendorf limpo de 1,5 mL.

11- 300 μ L de isopropanol (0,6 do volume da fase aquosa) foi adicionado à amostra e misturado por inversão por 1 minuto.

12- As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos.

13- Descartados os sobrenadantes das soluções e adicionado 1 mL de etanol 70% gelado às amostras.

14- As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos.

15- Descartados os sobrenadantes, os “pellets” foram secos com ajuda de papel absorvente, em seguida, 400 μ L de tampão TE foi adicionado.

16- Adicionado também 1 μ L de Rnase (10 mg/ mL) à soluções do DNA extraído. Estas foram deixadas por, no mínimo, 2h a temperatura ambiente.

17- As soluções foram mantidas a -20°C .

Na tentativa de obter DNA de espécies herborizadas, outros protocolos de extração foram testados, como o de Chomczynski (1997), que indica a extração do DNA através da utilização do reagente de extração Plant DNAzol (InvitrogenTM), e o de Drábková (2002), que indicou a utilização de soluções tampão mais concentradas em menores temperaturas de precipitação. Entretanto, devido à falta de exemplares vivos das espécies *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii*, *B. multinervium*, *B. glaziovii*, *B. glaucum*, *T. oligandrus*, *H. steyermarkii* na Reserva Ducke e às condições do material, não foi possível a obtenção do DNA da maior parte das espécies herborizadas. A secagem com álcool é um procedimento bastante utilizado no processamento de espécimes da flora Amazônica e apresenta-se como um obstáculo para obtenção de DNA nessas amostras. Somente o DNA das espécies *B. costaricanum* e *B. gaudichaudii* foi obtido, estes exemplares apresentavam folhas herborizadas em bom estado de conservação, resultante do não tratamento de secagem com álcool.

Dessa forma, foi possível a extração de DNA, apropriado para amplificação, de 16 das 21 espécies em estudo (*B. acutifolium*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii*, *B. guianense*, *B.*

lactescens, *B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens*, *B. utile*, *H. sprucei* e *T. amazonicus*).

II. Amplificação do DNA

Foram amplificadas as sequências do fragmento da região não-codificadora de DNA de cloroplasto *trnL-F* (**Fig. 3**) de 16 espécies.

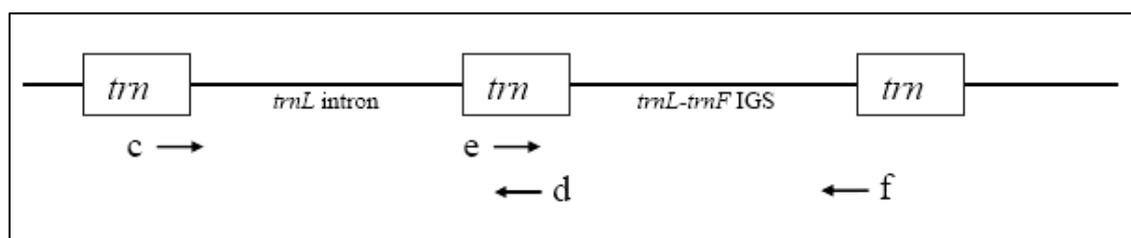


Figura 3. Mapa da região *trnL-F*. Setas indiciam as posições dos primers utilizados (Taberlet *et al.* 1991 modificado)

A amplificação e sequenciamento foi realizada no Centro de Biologia Molecular Estrutural pertencente ao complexo do Laboratório Nacional de Luz Síncrontron, Campinas – SP.

A região *trnL-F*, que consiste do íntron *trnL* e do espaçador intergênico *trnL-F*, foi amplificada em termociclador com o uso dos primers c (5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3') e f (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3') (Taberlet *et al.*, 1991). A amplificação para um sistema de volume final de 30 μ L incluiu ~20ng de DNA, 10 μ M de cada primer, 0.2 mM de cada dNTP, 1mM de $MgCl_2$, 75 mM de Tris-HCl, 1.0U de Taq Polymerase Platinum (InvitrogenTM), com utilização das seguintes condições cíclicas termais: temperatura inicial de desnaturação de 94°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 1 minuto e 30s de anelamento a 62°C, 2 minutos de extensão a 72°C. Após esses 35 ciclos, foi feita a extensão final à 72 °C por mais 6 minutos.

O resultado das reações de amplificação foi avaliado em gel de agarose. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o DNA do fago ϕ x 174, digerido com *Hae* III, misturado ao DNA do fago λ digerido com o marcador *Hind* III, empregado para quantificar fragmentos de DNA com peso molecular entre 0,118 a 23,130 kb. Os produtos das amplificações foram purificados com utilização de colunas para purificação de DNA (“QIAquick PCR purification Kit Protocol” - Qiagen Ltda, Dorking, Surrey, UK).

Nos produtos da amplificação que apresentaram bandas inespecíficas no gel, foram utilizadas as mesmas colunas de purificação para eluição do gel de agarose e obtenção da banda de interesse.

Os produtos purificados do PCR foram sequenciados com a utilização do Kit de reagentes para seqüenciamento “ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit” (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster, California, USA) e analisados em seqüenciador automático ABI 377, da Applied Biosystems.

Como proposto no plano inicial deste trabalho, o fragmento de DNA ribossomal “espaço transcrito interno” (ITS) – regiões ITS 2 (5'-CATCGATGAAGAACGTAGC-3') e ITS3 (5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3') (Weiblen 2000) também seria analisado. Entretanto, devido a problemas de otimização da amplificação, tempo e recursos escassos, sua obtenção, até o presente, não foi possível.

4.3 Análise de Dados

I. Sequências e Métodos de análise filogenética

A edição das seqüências foi realizada com os programas “Sequence Navigator™” e “Autoassembler™” e, inicialmente, alinhadas usando a opção de múltiplo alinhamento ClustalX do programa de alinhamento de seqüências BioEdit versão 7.0.4.1. Posteriormente, o alinhamento manual também foi realizado no mesmo programa. “Gaps” foram codificados como valores ausentes. A seqüência de uma espécie do gênero em estudo, *Brosimum alicastrum*, foi obtida do *GenBank* (Apêndice 1).

Todas as análises filogenéticas, com utilização de caracteres moleculares e morfológicos foram realizadas com o programa PAUP versão 4.0 β10 (Swofford, 2001).

As análises de parcimônia foram conduzidas com todos os caracteres com mesmo peso e não ordenados (Fitch, 1971). Foi realizada uma busca heurística inicial, composta por 10000 replicações com a inclusão aleatória de cada táxon (*random stepwise addition*) utilizando o algoritmo TBR (*Tree bisection and reconnection*) para a troca dos ramos, com a opção MULTREES ativada para salvar dez árvores por replicação. Uma árvore de consenso estrito foi então calculada a partir das árvores mais parcimoniosas resultantes.

Para cada análise, o índice de consistência (IC), excluindo caracteres não-informativos, e índice de retenção (IR) foram calculados. O suporte para sustentação de ramos

registrados nas árvores foi avaliado com a utilização da análise não-paramétrica de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 replicações, com dez árvores salvas para cada adição aleatória de cada táxon. Os índices de suporte de *bootstrap* foram categorizados da seguinte forma: pobre, <50%; fraco, 50-70%; moderado, 75-80%; forte, 85-100%, de acordo com Monro (2006).

Como medida estatística de conflito entre os dois conjuntos de dados moleculares e morfológicos, foi empregado o Teste de Divisão da Homogeneidade (*Partition Homogeneity Test*), também chamado de teste de incongruência no comprimento dos ramos (ILD) (Farris *et al.* 1995), com utilização do programa PAUP versão 4.0 β 10. Este teste foi realizado a partir de 1000 replicações, utilizando o algoritmo TBR, com adição simples dos ramos e opção MULTREES desativada, salvando 10 árvores por replicação.

Com o objetivo de verificar a taxa de variação nucleotídica entre as espécies estudadas, foi realizada a análise de Máxima Verossimilhança com auxílio do programa Modeltest 3.4 (Posada & Crandall, 1998) para selecionar o modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado para os dados moleculares e com o menor número de parâmetros adicionais. No presente trabalho, utilizou-se o modelo GTR+ G, obtido pelo critério de informação Akaike (AIC), este modelo assume uma taxa de variação nucleotídica sítio-específica seguindo uma distribuição gama para os caracteres moleculares. A partir do modelo evolutivo proposto, uma busca heurística sob o critério *likelihood* foi realizada utilizando o programa PAUP 4 β 10 (Swofford, 2001) sobre uma árvore inicial gerada por pelo algoritmo de distância evolutiva *neighbour joining*. Após a busca, localizou-se a árvore com maior *score* sob os parâmetros previamente escolhidos. Os valores de *bootstrap* para a árvore mais provável foram obtidos a partir de 200 replicações, com adição rápida dos ramos (*fast stepwise addition*), utilizando algoritmo TBR.

O teste estatístico de razão de verossimilhança (LTR) foi realizado para indicar se, sob os parâmetros fornecidos pelo programa Modeltest 3.4, as taxas de variação nucleotídica entre os ramos gerados pelas sequências da região *trnL-F* para evolução por relógio molecular são significativas (Cummings, 2006).

A inferência Bayesiana da filogenia foi realizada utilizando o programa Mr. Bayes versão 3.1.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Como na análise de verossimilhança, o modelo de substituição nucleotídica GTR+ G foi empregado. Para os dados morfológicos, as probabilidades *a priori* foram fornecidas pelos comandos *default* do programa Mr. Bayes. A probabilidade *a posteriori* (PP) na distribuição de árvores foi criada usando algoritmo MCMC (*Metropolis-coupled Markov Chain Mont Carlo*). As buscas consistem de três

corridas independentes, cada uma com quatro cadeias simultâneas. Comandos *default* do programa Mr. Bayes foram utilizados para o esquema de temperatura (três cadeias “aquecidas” e uma “fria”), bem como para os parâmetros propostos para a taxa da matriz (0-100), comprimento dos ramos (0–10), modelo gama (0-10) e para a proporção de sítios invariáveis. Cada corrida foi realizada com 100.000 gerações e frequência amostral das cadeias de 10 para o arquivo das árvores. Somente PPs de 0.95 ou maiores foram consideradas significativas ($\alpha=0.05$). O cálculo da árvore de consenso e de probabilidade *a posteriori* dos clados foi feita para as duas corridas baseadas no maior contingente de árvores retidas depois da melhor temperatura obtida (geração 68.850 e 72.111, respectivamente), a partir dos comando *sumpt* do programa Mr.Bayes 3.1.1.

Para o mapeamento e reconstrução filogenética do grupo em estudo, os caracteres morfológicos informativos foram otimizados sobre a árvore mais parcimoniosa randomicamente escolhida (MPT), obtida a partir dos caracteres moleculares, com auxílio do Programa Mesquite versão 1.12 (otimização ACCTRAN Maddison & Maddison, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Informações moleculares

I. Estrutura e variabilidade da região *trnL-F*

O comprimento do *trnL* e *trnL-F* foi de 1-230 pb e 231-1020, respectivamente. O alinhamento final resultou numa sequência de 980 caracteres, dos quais 890 apresentaram-se constantes, 74 variáveis, mas não informativos, e apenas 16 informativos.

Foram encontrados 10 *indels*, que são pequenas inserções ou deleções nucleotídicas presentes nas sequências moleculares. Nas sequências analisadas, dois deles foram evidenciados no íntron *trnL* e os restantes no espaço intergênico *trnL-F*. A maioria destes eventos mutacionais aparecem como sequências repetidas de 4-10 pb compartilhadas por mais de uma espécie ou encontradas somente nas espécies do grupo externo. *Indels* maiores foram observados em algumas espécies, como a inserção de 20 pb em *B. melanopotamicum* e a deleção de 150 pb em *Dorstenia brasiliensis*.

II. Parcimônia

A análise por parcimônia realizada com os caracteres moleculares gerou 11.218 árvores, sendo 29 árvores mais parcimoniosas com 98 passos, IC = 0.93 e IR= 0.87. Além disso, foram geradas árvores com os *indels* excluídos, entretanto, nenhuma diferença foi encontrada quanto ao comprimento da árvore e índices de consistência e retenção que refletissem maior homoplasia.

O cladograma de consenso estrito (Fig. 4) corrobora as informações anteriores obtidas pelo estudo da filogenia de Moraceae (Datywiller & Weiblen, 2004) ao apresentar o **clado A**, formado pelos gêneros neotropicais da tribo Dorstenieae, *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* como um agrupamento monofilético, com suporte estatístico (*bootstrap*) de 83%.

O **clado B** formado pelas espécies de *Brosimum* + *Helianthostylis* apresentou baixo suporte *bootstrap* (54%). Este clado apresenta-se subdividido em três (clados **C**, **D** e **E**). O **clado C**, composto pelas espécies de *Brosimum*, com inclusão de *Helianthostylis sprucei*, apresentou 57% de *bootstrap*. O **clado D**, formado por *B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B.*

costaricanum, *B. gaudichaudii* e *B. guianensis* também apresenta-se fracamente sustentado com suporte de 60% de *bootstrap*. Já o **clado E**, formado por *B. lactescens*, *B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*, apresenta-se fortemente suportado com 98% de *bootstrap*. Dentro do **clado E**, há o agrupamento de *B. parinarioides* e *B. potabile* com suporte moderado de 64% de *bootstrap* (**Fig. 4**).

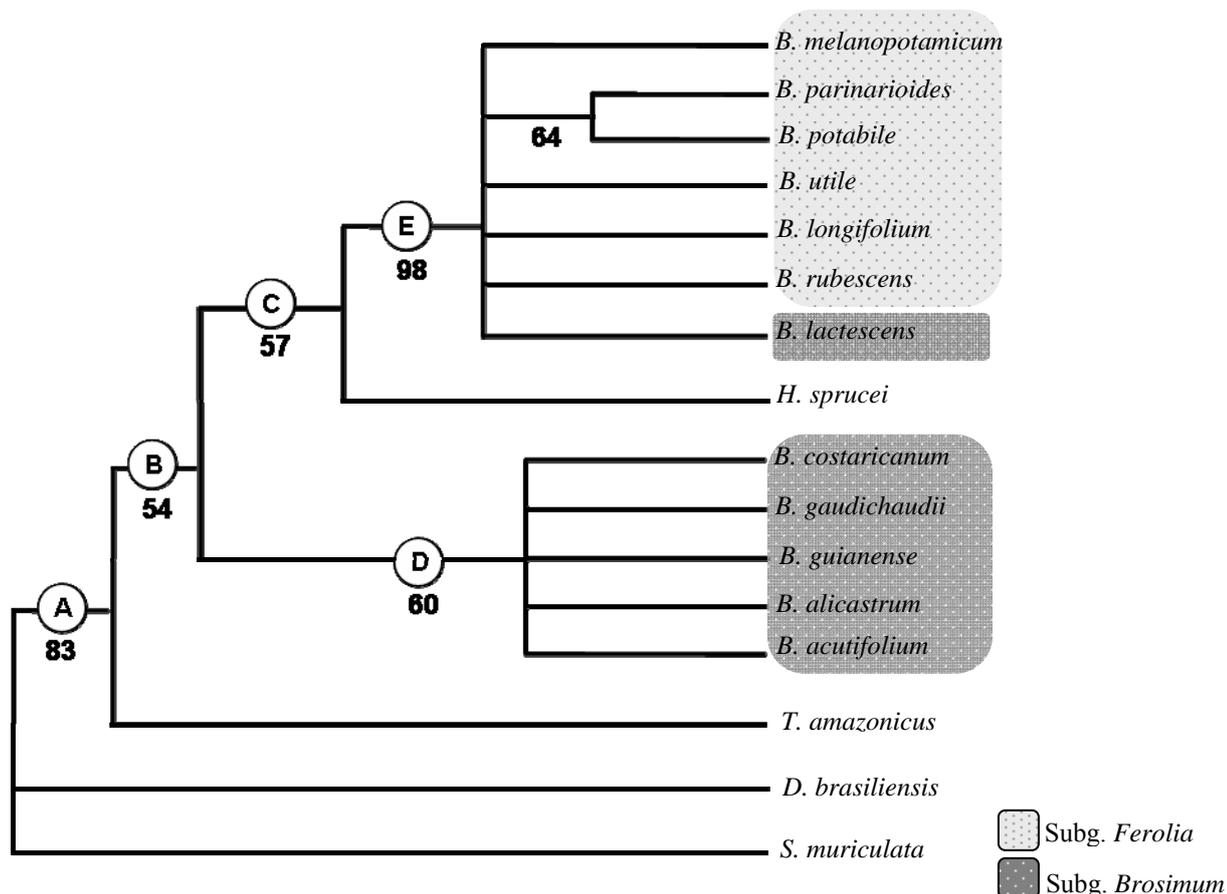


Fig. 4. Árvore filogenética de consenso estrito gerada a partir de caracteres moleculares. Clados formados indicados nos círculos. Valores de *bootstrap* maiores ou iguais a 50% indicados abaixo dos círculos. Áreas sombreadas representam a divisão subgenérica proposta por Berg (1972) para o gênero *Brosimum*.

5.2 Classificação taxonômica e filogenia molecular

No presente estudo, o monofiletismo do clado neotropical de Dorstenieae formado pelas espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* é evidenciado na análise por parcimônia dos dados moleculares, o que comprova os resultados anteriormente obtidos por Datwyler & Weiblen (2004) e Zerega *et al.* (2005). Entretanto, o baixo suporte fornecido para a formação dos clados **B**, **C** e **D** demonstrou, como também evidenciado na filogenia de Moraceae, que o gênero *Brosimum* como proposto por Berg (1972) é um grupo

parafilético ao incluir as espécies *Helianthostylis sprucei* e *Trymatococcus amazonicus* dentro do clado melhor sustentado (clado **A**).

Quando comparadas às árvores obtidas nos trabalhos iniciais de filogenia e biogeografia da família Moraceae (Datywiler & Weiblen, 2004; Zerega *et al.* 2005), os quais utilizaram dados da região *ndhF* do DNA de cloroplasto e da subunidade 26S do DNA ribossomal, um número superior de caracteres parcimoniosamente mais informativos que a região *trnL-F* foi registrado, porém, com um menor número de *taxa* amostrados (Anexo 1).

Por se tratarem de trabalhos com objetivos distintos e análise de outras regiões moleculares, a amostragem de espécies neotropicais da tribo Dorstenieae foi representada por *B. alicastrum*, *B. guianense*, *B. lactescens*, *B. rubescens*, *B. utile*, *T. amazonicus*, *T. oligandrus* e *H. sprucei*. Onde as relações encontradas entre as espécies de *Brosimum* amostradas diferem das encontradas no presente estudo.

A árvore mais parcimoniosa gerada a partir dos dados moleculares da região *ndhF* (Datywiler & Weiblen, 2004), registrou estreita relação entre as espécies *B. utile* e *B. alicastrum* (98% de *bootstrap*). Outro ramo fracamente suportado é registrado entre *B. rubescens* e *B. guianense* (55% de *bootstrap*). Enquanto as análises realizadas com o marcador para a subunidade 26S resultaram em uma árvore sem suporte para as relações entre as espécies de *Brosimum*.

Na análise combinada destas duas regiões (Zerega *et al.* 2005), o gênero *Brosimum sensu* Berg (1972) também se apresenta parafilético com um suporte de 100% de *bootstrap* pela inclusão de *H. sprucei* entre as demais espécies de *Brosimum*. e exclusão de *B. lactescens* apresentando baixo suporte (54% de *bootstrap*). As duas espécies do gênero *Trymatococcus* apresentam-se fortemente relacionadas (92% de *bootstrap*), mas também inclusas entre as espécies do gênero *Brosimum*.

No presente estudo, a região *trnL-F* do DNA de cloroplasto mostrou-se pouco informativa. Bremer *et al.* (1999) no trabalho sobre a filogenia da família Rubiaceae, verificou que o aumento no número de táxons diminui proporcionalmente o suporte dos ramos na árvore, e este é positivamente relacionado ao aumento de dados.

Dessa forma, mesmo resultando em baixos suportes para os cladogramas **B**, **C** e **D**, a adição de mais espécies do gênero *Brosimum*, apresentou melhores definições para a provável delimitação natural do clado neotropical de Dorstenieae (clado **A**), onde também é evidenciado a formação de um clado fortemente sustentado (96% de *bootstrap*), composto por espécies de *Brosimum* (clado **E**).

Baseado nas diferenças morfológicas consideradas diagnósticas, Berg (1972) realiza uma subdivisão do gênero *Brosimum* em dois subgêneros. De acordo com sua classificação, o gênero *Brosimum* é formado pelos subgêneros *Brosimum* e *Ferolia*. O subgênero *Brosimum* é formado pelas espécies *B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. guianensis*, *B. gaudichaudii* e *B. lactescens*, enquanto o subgênero *Ferolia* é composto por *B. rubescens*, *B. utile*, *B. melanopotamicum*, *B. longifolium*, *B. parinarioides* e *B. potabile*. O autor ainda efetua a divisão do subgênero *Brosimum* em três seções: *Brosimum*, *Bromopsis* e *Piratinera*.

A partir do cladograma obtido (Fig.4), é possível indicar que as subdivisões taxonômicas do gênero *Brosimum* propostas por Berg também são parafiléticas. A espécie *B. lactescens*, delimitada no subgênero *Brosimum*, apresentou-se inclusa no clado **E**, composto pelas espécies do subgênero *Ferolia*. Logo, a posição de *B. lactescens* se mostrou melhor resolvida no cladograma obtidos neste estudo com a utilização da região *trnL-F*, onde a espécie está fortemente suportada dentro do **clado E**, do que no estudo de Datywiller & Weiblen (2004).

Os fragmentos moleculares das regiões *ndhF* e *trnL-F* do DNA de cloroplasto, entre outras, têm fornecido bons resultados para a resolução de filogenias ao nível interfamiliar e subfamiliar entre os grupos das *Urticalean Rosids*, principalmente quando combinados (Richardson, 2000; Systma, 2002), bem como para estudos interespecíficos (Monro, 2006; Hadiah, 2003; Weiguo, 2005; Andreasen, 2000; Sattarian,2006). Para estes, houve a necessidade da inclusão de outros marcadores moleculares ou dados não moleculares para a elucidação das relações filogenéticas entre as espécies estudadas e para inferências quanto sua classificação.

À despeito dos trabalhos que utilizaram a região de DNA de cloroplasto *trnL-F* para a resolução de estudos filogenéticos em níveis intergenéricos e infraespecíficos (Brouat, 2001; Hadiah, 2003; Chen, 2005) por ser considerada uma região de evolução “rápida”, todos recorreram a utilização de outro marcador na busca de melhores resoluções entre as espécies e suportes dos cladogramas. Devido ao parafiletismo do gênero *Brosimum sensu* Berg (1972) e suporte ainda não favorável, a inclusão de um maior número de dados é necessária para entender a relação entre as espécies do clado neotropical de *Dorstenieae*.

III. Análise de Máxima Verossimilhança

A melhor árvore obtida pela busca heurística (Fig. 5). apresentou *score* de $-\ln L = 2059.25345$, com a taxa de substituição na matriz 1.941, 1.636, 2.985, 3.276, alfa = 0.154 e

frequências de bases A=0.30180, C=0.32230, G=0.11800 T=0.25790. Os suportes de *bootstrap* para o filograma apresentado se mostraram fracos, com valor de 56% para o monofiletismo do clado neotropical de *Dorsteniae* e 63% para o **clado D**. Suporte favorável foi observado apenas para o **clado E**, com 96% de *bootstrap*.

A hipótese de datação por relógio molecular, sob o pressuposto de igualdade de taxas de evolução entre os ramos fornecido pelos parâmetros da análise por máxima verossimilhança, foi rejeitada ($P < 0.001$).

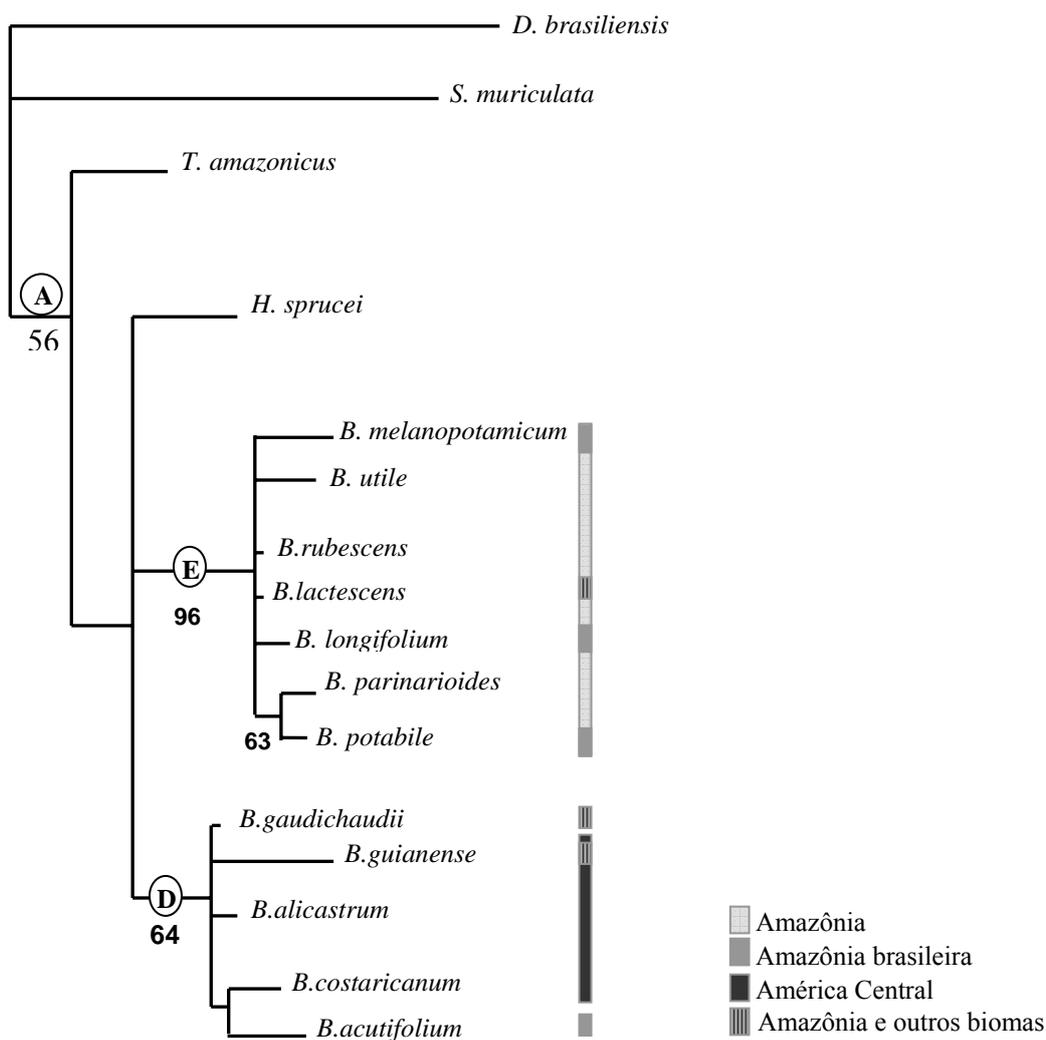


Figura 5- Filograma obtido por máxima verossimilhança encontrada com o modelo de substituição GTR+G. Escala representa 0.01 substituições por sítio. Somente valores de *bootstrap* > 50% são amostrados abaixo dos ramos. Barras representando a área de ocorrência das espécies de *Brosimum*.

5.3 Diversificação Geográfica do Clado Neotropical de *Dorstenieae* para a região *trnL-F*

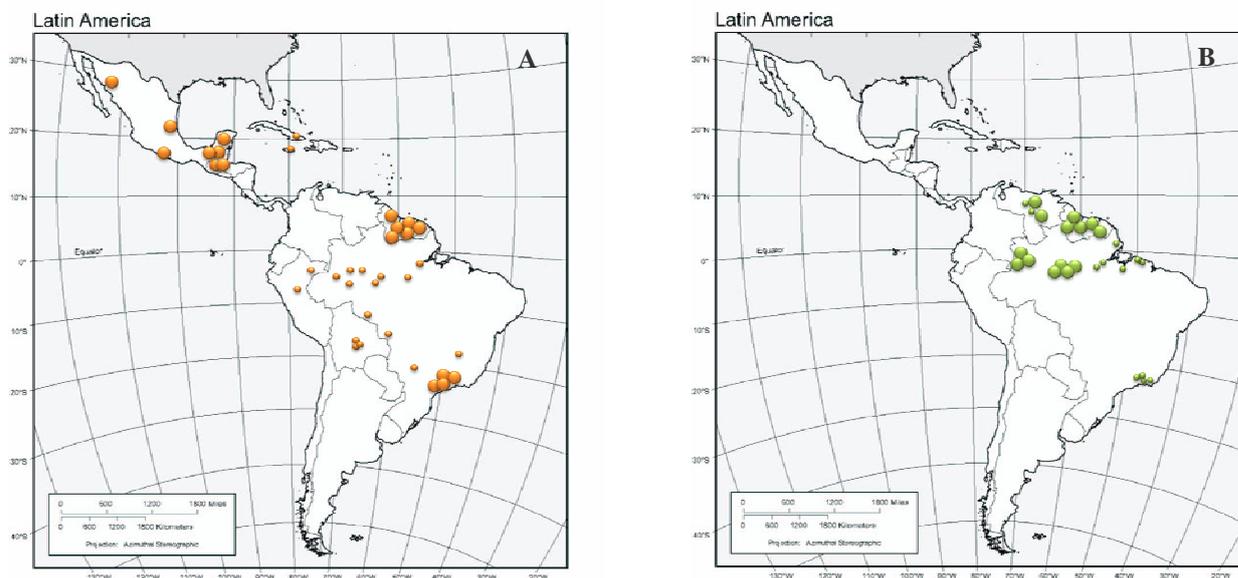


Fig. 6. Mapa de distribuição das espécies de *Brosimum* componentes dos clados formados **A.** Clado **D** **B.** Clado **E.** Círculos maiores representam maior área de concentração das espécies.

O filograma de máxima verossimilhança gerado a partir da região *trnL-F* apresentou o comprimento dos ramos curtos para a maior parte das espécies de *Brosimum* com uma taxa de substituição de 0.01 por sítio, o que é esperado devido ao baixo grau de variação encontrado no fragmento utilizado. Contudo, a distribuição geográfica das espécies do clado neotropical de *Dorstenieae* (clado **A**), quando relacionado ao filograma de máxima verossimilhança obtido, pode fornecer indícios sobre a diversificação do grupo.

As espécies de *Brosimum* do clado **D** (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *B. guianense*) apresentam ampla distribuição, com *B. acutifolium*, *B. alicastrum* e *B. guianense* ocorrendo desde o México, Grandes Antilhas, Cuba e Jamaica, sendo bem representado na América Central, até a região sul da Amazônia. A espécie *B. guianense* mostra uma distribuição ainda mais extensa, ocorrendo até o sudeste do Brasil. Já *B. gaudichaudii* é o único representante do clado a não apresentar ocorrência na América Central, sua ocorrência está restrita desde norte da América do Sul até o centro do Brasil. (Fig. **6A**).

Neste subgênero, o endemismo é observado em *B. costaricanum*, espécie restrita à Costa Rica e oeste do Panamá. Com exceção de *B. gaudichaudii* que é encontrado em regiões de campo Cerrado no centro da América do Sul (do Paraná, Goiás ao Pará) e em algumas

regiões isoladas de Savana da Bacia Amazônica (Bolívia, Colômbia, Venezuela), todos os demais componentes são de Terra Firme.

Já as espécies de *Brosimum* do clado **E** (*B. rubescens*, *B. utile*, *B. melanopotamicum*, *B. longifolium*, *B. parinarioides* e *B. potabile*) apresentam-se praticamente restritas às matas de Terra Firme na América do Sul. Todas as espécies deste clado ocorrem nos países da Região Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela). O endemismo é observado nas espécies *B. longifolium*, *B. melanopotamicum* e *B. potabile*, que apresenta ocorrência restrita aos estados brasileiros do Amazonas e Pará, enquanto *B. parinarioides*, *B. rubescens* e *B. utile* apresentam distribuição mais abrangente, com registros de ocorrência para os demais países da Amazônia e regiões brasileiras. (Fig. **6B**).

Berg (1972) sugere que a segregação do gênero *Brosimum* pode estar relacionada à separação espacial entre as espécies que ocorrem na América Central, norte do Istmo do Panamá, Grandes Antilhas e Andes das que ocorrem na parte sul (Peru e Bolívia) e parte norte (Colômbia, Venezuela e Guianas) da Amazônia. Sendo que esta última divisão, devido a sua maior abrangência, pode ter causado uma segunda radiação do gênero dentro da Amazônia brasileira,

O filograma obtido da análise de verossimilhança gerada a partir da região *trnL-F* corrobora a hipótese de separação geográfica sugerida por Berg pela formação dos dois clados de *Brosimum*. Onde as espécies que compõe o clado **D** se estendem a partir da América Central, enquanto as espécies do clado **E** ocorrem a partir da região norte da Floresta Amazônica.

A partir da distribuição geográfica das espécies que formam os clados observados, é possível sugerir que a segregação do gênero tenha se iniciado na América Central, onde o clado **D** apresenta o ramo resultante das taxas de variações nucleotídicas mais curto, quando comparado ao ramo do clado **E**. O que indica que sejam as espécies do clado **D** (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *B. guianense*) mais próximas do possível ancestral do grupo. Essa inferência também corrobora a hipótese de Berg em relação a um segundo evento de diversificação ocorrendo dentro da Amazônia Brasileira, no qual as espécies do clado **E** teriam se diversificado.

Richardson (2001) num estudo sobre a riqueza do gênero neotropical *Inga* utilizando o fragmento *trnL-F*, sugere que em decorrência do baixo número de substituições entre as espécies, resultando em ramos curtos, a rápida diversificação e distribuição do grupo ao longo da América do Sul e América Central pode ter ocorrido recentemente. Os eventos geográficos

que permitiram esta diversificação foram a formação do Istmo do Panamá e soerguimento da parte noroeste dos Andes, os quais ocorreram entre 3,5 m.a. e 5 m.a., respectivamente.

A partir da análise de verossimilhança com relógio molecular realizada para o estudo biogeográfico e tempo de divergência de Moraceae (Zerega *et al.* 2005), utilizando as sequências rDNA 26S e cpDNA *ndhF*, observou-se discrepância na estimativa do tempo de divergência entre as tribos pantropicais e neotropicais, com variação entre 73-110 m.a. Neste estudo, a árvore de dados moleculares combinados apresenta o clado neotropical da tribo Dorstenieae com idade mínima de divergência estimada entre 15.7- 43.2 m.a, calibrados a partir do registro fóssil da tribo no Velho Mundo (35.3-62.9 m.a.).

Com intuito de inferir sobre a biogeografia do clado neotropical de Dorstenieae, análises posteriores para a datação por relógio molecular das sequências da região *trnL-F* utilizada neste estudo, serão realizadas. Devido à rejeição da hipótese de taxas constantes entre as sequências analisadas com e sem relógio molecular a partir do modelo evolutivo proposto, considera-se apropriado a utilização de outros métodos que estimem tempo de divergência na ausência de taxas constantes de variação nucleotídica, como por exemplo os métodos NPRS (*Non-parametric rate smoothing*) ou PL (*Penalized Likelihood*) (Sanderson,1997).

Embora não codificados na análise filogenética, um número de *indels* foram consistentes com a topologia do filograma baseado na substituição nucleotídica (Lohmann, 2006). São evidenciados *indels* compartilhados entre as espécies dos dois subgêneros de *Brosimum*, inserções nas posições 41-47 do íntron *trnL* e 857-861 do espaço intergênico da região *trnL-F* foram encontradas nas espécies que compõe o clado **E**, o que reforça a proximidade evolutiva observada entre essas espécies.

5.4 Dados morfológicos

Dentre os 39 caracteres morfológicos levantados para o desenvolvimento do presente trabalho, 13 são vegetativos, relacionados às diferenças observadas na estípula, pecíolo, indumento e outras variações na lâmina foliar (Apêndice 2). Oito são anatômico-foliares, referentes às formas das células epidérmicas e a estrutura dos tricomas simples e capitados, e 18 são caracteres reprodutivos, relacionados às diferenças do sistema reprodutivo, às flores e demais estruturas que compõe as inflorescências das espécies do clado neotropical de Dorstenieae.

A análise por parcimônia realizada com os 38 caracteres morfológicos e oito anatômicos gerou 8.126 árvores com 128 passos, Índice de Consistência = 0,38 e Índice de Retenção = 0,49. A árvore de consenso estrito não apresentou indícios de relacionamento filogenético entre as espécies estudadas (Fig.7).

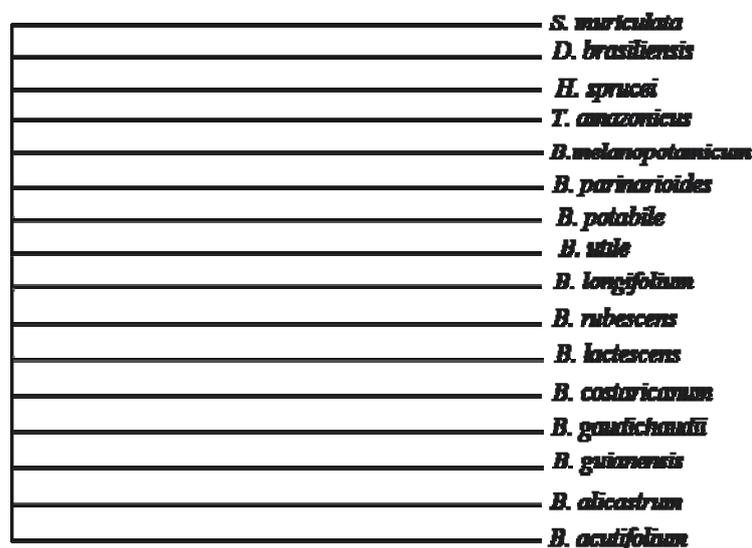


Fig. 7- Árvore filogenética de consenso estrito gerada a partir de caracteres morfológicos.

III. Dados moleculares e morfológicos combinados

1. Parcimônia

O teste de divisão da homogeneidade forneceu uma medida estatística de incongruência de caracteres entre os conjuntos de dados analisados. Os resultados desta análise para o clado neotropical de Dorstenieae indicaram que o conjunto dos caracteres morfológicos e moleculares são significativamente diferentes com uma probabilidade de 99% ($P < 0.001$). A filogenia produzida pelos dados analisados separadamente apresenta árvores mais curtas (passos=98) que as produzidas a partir dos dados combinados (passos=234), resultante do alto grau de homoplasia presente no conjunto de dados morfológicos (Evans, 2003).

2- Análise Bayesiana

Para a inferência bayesiana a árvore de consenso (**Fig. 8**) obtida apresentou probabilidades significativas de distribuição dos dados combinados sobre a árvore consenso apresentada, suportando o monofiletismo do clado neotropical formado pelas espécies de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* (**clado A**) com 100% de probabilidade *a posteriori*. Valores significativos de probabilidades *a posteriori* também foram observadas para a divisão das espécies dos gêneros *Brosimum* e *Helianthostylis* em dois cladogramas iniciais, o **clado B** (*B. rubescens*, *B. utile*, *B. melanopotamicum*, *B. longifolium*, *B. lactescens*, *B. parinarioides* e *B. potabile* e *H. sprucei*) e o **clado C** (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *B. guianense*), ambos apresentando 100% de probabilidade *a posteriori*. Dentro do **clado B** observa-se a formação de três cladogramas (**D, F e G**). O **clado D** formado pelas espécies de *Brosimum* (*B. rubescens*, *B. utile*, *B. melanopotamicum*, *B. lactescens*, *B. longifolium*, *B. parinarioides* e *B. potabile*) com *H. sprucei* como espécie-irmã, recebeu suporte menos favorável de 93% de probabilidade *a posteriori*, enquanto o clado **F**, com *B. lactescens* como irmão do clado e o **clado G**, com *B. melanopotamicum*, como irmão do clado, apresentam 100% de probabilidade *a posteriori*.

Dentro do **clado C** (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *B. guianense*), ocorre a formação de dois cladogramas, o **clado E**, com *B. costaricanum* como irmão do clado E, e **clado H**, com *B. acutifolium* irmão do clado H. Estes apresentam 99% e 100% de probabilidades *a posteriori*, respectivamente

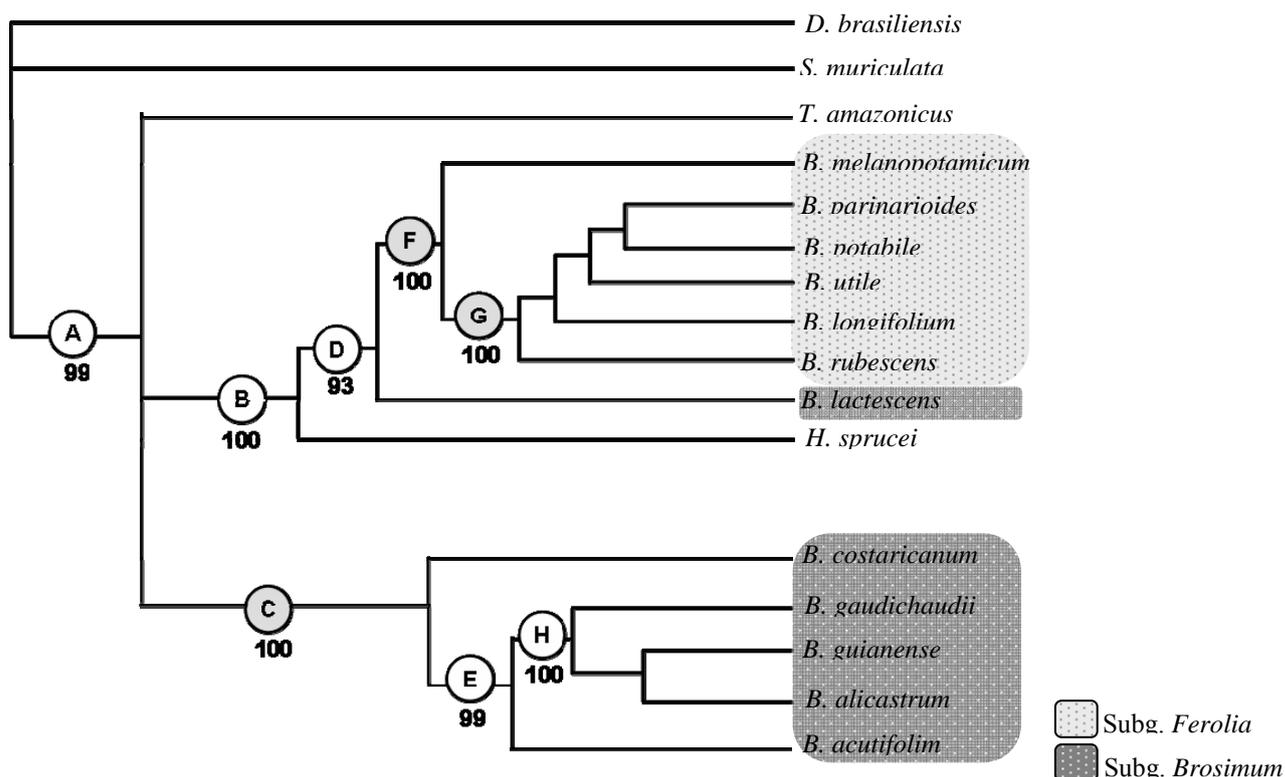


Fig. 8. Árvore de consenso obtida por análise bayesiana para os dados combinados, aplicando o modelo de substituição GTR+G. Clados formados indicados em círculos, em sombreado os clados não formados na árvore mais parcimoniosa. Valores de probabilidades *a posteriori* indicados abaixo dos círculos. Áreas sombreadas representam a divisão subgenérica proposta por Berg (1972) para o gênero *Brosimum*.

5.5 Árvores encontradas análises de parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana

A topologia da árvore gerada a partir de dados moleculares por parcimônia foi similar àquela encontrada por máxima verossimilhança, diferindo apenas pelo agrupamento das espécies *B. acutifolium* e *B. costaricanum*. Este agrupamento pode ser justificado pela menor sensibilidade que a análise por verossimilhança apresenta para a atração de ramos longos. Isso ocorre porque linhagens de taxóons que evoluíram rapidamente, em geral, não são evidenciadas para a formação de clados na análise por parcimônia e apresentam-se colapsados ao clado terminal (Bergsten, 2005).

Quanto aos valores dos índices de *bootstrap* que suportam os clados formados, é observado equivalência para os suportes apresentados nas árvores geradas por parcimônia e máxima verossimilhança (Figs 4 e 5). Devido às diferenças entre os parâmetros adotados *a priori*, como o modelo evolutivo proposto para a análise de verossimilhança, a confiabilidade dos suportes de *bootstrap* se mostram mais conservadores que os apresentados para a parcimônia (Abele, 1995).

Fato semelhante ocorre para as análises com dados combinados. Apesar da incongruência significativa apontada pelo teste de homogeneidade (ILD) para os caracteres morfológicos e moleculares na análise sob parcimônia, a análise bayesiana admite a utilização de dados combinados, mesmo quando considerados topologicamente distintos. Ao estabelecer probabilidades *a posteriori* para a distribuição desses caracteres na topologia da árvore consenso, levando em consideração não apenas o ganho e a perda do caráter, a inferência bayesiana permite que hipóteses evolutivas sob modelos estocásticos sejam prováveis (Nylander, 2004; Huelsenbeck 2003).

A árvore de dados combinados obtida pela análise bayesiana (Fig.9) mostrou-se similar à topologia da árvore gerada pelo método da parcimônia com dados moleculares, ambos apresentando os mesmos clados para as espécies de *Brosimum*. Entretanto, como evidenciado por Neinhuis (2005) no estudo da filogenia de Aristolochiaceae, a partir dos dados moleculares da região *trnL-F*, já é esperado que árvores geradas sob análise bayesiana, frequentemente, apresentem índices de suporte superestimados se comparados aos dos métodos de parcimônia e máxima verossimilhança

Segundo Suzuki (2002), os suportes da análise bayesiana devem ser tratados com cautela quando comparados aos do método não-paramétrico de *bootstrap*, o qual aborda estimativas mais conservadoras de credibilidade. Estas podem ser mais acuradas na busca de árvores mais prováveis, principalmente em análises com números menores de táxons terminais e dados, como é o caso do presente estudo. Contudo, Archibaldi (2003) ressalta que, para interpretar os valores da probabilidade *a posteriori*, em comparação aos de *bootstrap*, é necessário levar em consideração que os altos valores de suporte estatístico não indicam a probabilidade de que o clado seja natural. Mas que, sob o modelo e parâmetro previamente escolhidos, maior é o consenso dos dados analisados distribuídos sobre as árvores obtidas.

5.6 Mapeamento de caracteres morfológicos

Segundo Givnish & Systma (1997), a probabilidade de uma inferência filogenética correta é mais provável para o cladograma que apresenta um maior índice de consistência, o qual está diretamente associado ao conjunto de dados que apresentam menores graus de homoplasia. No presente trabalho, o maior índice de consistência foi registrado nos cladogramas gerados, sob parcimônia, a partir de caracteres moleculares (IC=0.93). De acordo

com os autores, cladogramas gerados por caracteres moleculares são moldes de orientação mais confiáveis para filogenia que os de dados morfológicos.

Scotland *et al.* (2003) defende que a inclusão de mais caracteres morfológicos na reconstrução filogenética é problemática. Pois, mesmo que essenciais para as classificações de todos os organismos, dados morfológicos apresentam alto grau de homoplasia e ambiguidade na maior parte dos cladogramas. Ressalta ainda que, um grande número de caracteres morfológicos em uma ampla amostragem de taxa, tende a diminuir os níveis de acurácia e suporte para a interpretação filogenética.

É observado que trabalhos de filogenia que utilizam apenas dados morfológicos, apresentam baixa resolução para os clados internos, e, em geral, baixo suporte para os ramos terminais. No estudo das relações filogenéticas em Commelinaceae, por exemplo, realizado por Evans (2000), o cladograma obtido a partir de dados morfológicos foi discordante com a classificação atual para o grupo e não apresentou suportes para o monofiletismo dos clados. Porém, a utilização de alguns caracteres morfológicos combinados aos caracteres moleculares, apresentou melhores evidências para o monofiletismo das tribos e se mostrou congruente com a classificação taxonômica proposta para a família (Evans, 2003).

Em nível subfamiliar, trabalhos como a filogenia do gênero neotropical *Tococa* (Melastomataceae) realizado por Michelangeli (2000), com utilização apenas de caracteres morfológicos, resultou em clados fracamente suportados, onde todos os caracteres se mostraram homoplásicos no cladograma, o que pode estar diretamente associado ao alto polimorfismo dos caracteres selecionados e a baixa quantidade de caracteres filogeneticamente informativos em relação a uma maior quantidade de *taxa*.

No trabalho de revisão do gênero *Pilea* (Urticaceae), Monro (2006) também não obteve suportes favoráveis para o cladograma resultante de análise efetuada com utilização de 60 caracteres morfológicos de 109 espécies. Segundo o autor, os altos níveis de homoplasia encontrados em cladogramas resultantes de análises feitas apenas com caracteres morfológicos, podem ocorrer devido à maior suscetibilidade desses dados a frequentes reversões e convergências, e à possível insuficiência nos estudos destes caracteres para distinguir, por completo, homologias de não-homologias.

Entretanto, Sancho (2004), ao estudar as relações filogenéticas do gênero *Onoseris* (Asteraceae), com utilização de 32 caracteres morfológicos, obteve resultado com suporte satisfatório para a taxonomia do gênero de 31 espécies, onde, a reconstrução filogenética e inferência biogeográfica foram congruentes com a formação de dois clados referentes aos subgêneros do *taxa*.

Assim, mesmo em árvores geradas por caracteres moleculares, é essencial a utilização de caracteres morfológicos para a compreensão da filogenia de um grupo. Uma vez que, a história evolutiva das espécies só pode ser explicada através da diversificação fenotípica ocorrida entre elas.

Devido à baixa resolução e suporte dos ramos internos do clado neotropical da tribo Dorstenieae, os caracteres morfológicos traçados sobre a topologia da árvore de consenso estrito, gerada a partir de caracteres moleculares sob parcimônia, apresentam mudanças variando dentro e fora dos clados formados (Fig.13).

No presente estudo, o monofiletismo do clado neotropical de Dorstenieae foi evidenciado nos cladogramas gerados por parcimônia e máxima verossimilhança a partir de dados moleculares e na análise bayesiana de dados combinados. Entre os caracteres morfológicos que reforçam a naturalidade do clado neotropical formado pelos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, o hábito arbóreo predominante dessas espécies, em relação à autapomorfia do grupo-irmão de hábito herbáceo *Dorstenia brasiliensis*, pode ser considerado uma característica relevante.

Serão descritos e abordados abaixo, os caracteres mais significativos para a análise filogenética resultante do clado neotropical de Dorstenieae, entretanto, todos os caracteres utilizados no presente estudo estão listados no apêndice 2.

Estípulas

Estípulas intrapeciolares estão presentes em todas as espécies da família Moraceae. Estas estruturas são formadas por um par de apêndices foliares que podem se apresentar unidos ou livres em torno do pecíolo. Os gêneros da tribo Dorstenieae apresentam estípulas unidas e livres. Nas espécies do clado neotropical são observadas estípulas unidas em algumas espécies do gênero *Brosimum* (*B. longifolium*, *B. potabile*, *B. parinarioides*, *B. melanopotamicum*, *B. rubescens* e *B. utile*) (Fig. 1C). Nas demais espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, as estípulas são livres

Tipos de estípulas

Em Moraceae são encontradas estípulas amplexicaules, que circundam todo o pecíolo, e as não-amplexicaules, que circundam parcialmente o pecíolo. No clado neotropical de Dorstenieae estípulas completamente amplexicaules são observadas apenas em algumas espécies do gênero *Brosimum* (*B. longifolium*, *B. potabile*, *B. parinarioides*, *B. melanopotamicum*, *B. rubescens* e *B. utile*) (Figs.1A e 1F). Nas demais espécies dos gêneros,

as estípulas são quase amplexicaules, mas apresentam uma falha no lado oposto à inserção das folhas (Figs. 1A).

Os caracteres “estípula livre” (**caráter 1**) e “estípula não amplexicaule” (**caráter 2**) de acordo com Berg (1972), caracterizam o subgênero *Brosimum* (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *B. guianense*), propostos, enquanto o subgênero *Ferolia* (*B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*) apresenta estípulas unidas e amplexicaules, estado plesiomórfico para o **clado A**. De acordo com o cladograma obtido no presente trabalho, estes caracteres podem ser considerados uma sinapomorfia para o **clado D**, mas apresentam-se como um paralelismo para *B. lactescens*, componente do **clado E**.

Escamas no pecíolo

A presença de uma epiderme escamosa ocorre em pecíolos de um grupo de espécies do gênero *Brosimum* (*B. potabile*, *B. parinarioides*, *B. melanopotamicum*, *B. rubescens* e *B. utile*) e na espécie *Helianthostylis sprucei*, sendo apontada por Berg (2002) como um caráter útil para identificação destas espécies. A presença de escamas epidérmicas transversais é observada mesmo nos pecíolos das folhas jovens (Fig. 1C).

A presença de escamas no pecíolo (**caráter 3**), é um exemplo de um caráter diagnóstico que pode ser considerado uma sinapomorfia para o clado **C**, formado por *H. sprucei* e pelas espécies de *Brosimum* *B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile* do clado **E**).

Cor do látex

Diferenças na cor do látex das espécies do clado neotropical de Dorstenieae foram levantadas por Ribeiro *et al.* (1999). A cor do látex das espécies de *Brosimum* não observadas neste trabalho (*B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *B. melanopotamicum*) foi obtida a partir das informações das fichas de coleta desses espécimes. Látex branco ocorre na maior parte das espécies de *Brosimum* (Fig 2C), látex amarelo ocorre em *B. acutifolium*, *B. guianense* e *B. lactescens*, enquanto látex castanho-claro foi observado nas espécies *H. sprucei* e *T. amazonicus*.

O látex branco (**caráter 6**) apresenta-se como uma plesiomorfia para os **clados D e E** do gênero *Brosimum*, com exceção de *B. lactescens*, *B. guianense* e *B. acutifolium* que possuem, paralelamente, látex amarelo. A evolução do caráter ‘látex castanho-claro’ nas

espécies *Trymatococcus amazonicus* e *Helianthostylis sprucei* também não pode ser definida a partir do cladograma apresentado.

Indumento na face adaxial da lâmina foliar

A maior parte das espécies dos gêneros *Brosimum* e *Helianthostylis* apresentam a superfície da face adaxial da lâmina foliar glabra, exceção para *B. acutifolium*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *T. amazonicus* que apresentam indumento esparsamente puberulento sobre a lâmina adaxial,

Dentre os caracteres vegetativos utilizados na matriz morfológica, a face adaxial da lâmina foliar é glabra (**caráter 7**) para a maior parte das espécies do clado neotropical de Dorstenieae., podendo caracterizá-lo. Entretanto, algumas espécies de *Brosimum* (*B. acutifolium*, *B. costaricanum* e *B. gaudichaudii*) e *Trymatococcus amazonicus* apresentam lâminas esparsamente puberulentas, o que confere aspereza à superfície foliar dessas espécies, enquanto *Dorstenia brasiliensis* apresenta indumento piloso na folha adaxial da lâmina foliar.

.Quanto aos demais caracteres relacionados ao indumento, verifica-se que as variações intraespecíficas encontradas entre espécimes observados em campo e espécimes herborizados podem estar relacionadas à fatores ambientais como exposição à luz, entre outros fatores como idade da planta e o manuseio dos exemplares. Berg (1972) utiliza o caráter indumento como diagnóstico para separações de subespécies, porém, este não se mostra um bom caráter para filogenia.

Formação de aréolas na face adaxial da lâmina foliar

Em algumas espécies do gênero *Brosimum* (*B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. lactescens* e *B. gaudichaudii*) ocorre a formação de aréolas, que são pequenos espaços limitados por veias anastomosadas (duas veias que se unem diretamente ou por meio de uma terceira), rodeadas com nervuras terciárias e quaternárias (Ribeiro *et al.* 1999). Nas espécies estudadas, estas aréolas apresentam-se cobertas por tricomas (Fig.9A).

Tipo de nervuras terciárias

No clado neotropical da tribo Dorstenieae são observados dois tipos principais de nervuras terciárias, o tipo escalariforme e o tipo reticulado. O tipo escalariforme é caracterizado por apresentar nervuras percurrentes formando um ângulo oblíquo, perpendicular ou paralelo em relação às nervuras centrais. Este tipo de nervuras terciárias foi observado nas espécies do gênero *Brosimum* (*B. melanopotamicum*, *B. utile*, *B. longifolium* e *B. alicastrum*). O tipo reticulado é caracterizado por apresentar nervação terciária e

quaternária, quando existente, em forma de rede. Nervuras terciárias do tipo reticulado foram observadas em todas as outras espécies dos gêneros *Brosimum* e nas espécies de *Helianthostylis* e *Trymatococcus*.

A formação de aréolas na face adaxial da lâmina foliar (**caráter 12**) pode ser considerada uma sinapomorfia para *B. lactescens*, *B. parinarioides* e *B. potabile*, componentes do **clado E**. Entretanto, este caráter também ocorre em *B. gaudichaudii*, uma das espécies do **clado D**, como um paralelismo. Nestas espécies, as nervuras terciárias são reticuladas (**caráter 13**). Entretanto, a maior parte das espécies de *Brosimum* que não possuem aréolas, apresentam nervuras secundárias reticuladas, sem que aréolas sejam formadas.

Comprimento do tricoma simples na face abaxial da lâmina foliar

O tricoma tector é caracterizado como unicelular em forma de espinho, podendo apresentar o ápice uncinado, característico das espécies da tribo Dorstenieae. Tricomas simples curtos, menores que 20 µm, foram observados nas epidermes da lâmina foliar adaxial e abaxial da maior parte das espécies de *Brosimum* e nas espécies de *Helianthostylis*. Tricomas simples longos (**Fig.9B**), maiores que 25 µm foram observados nas espécies *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii*, *B. utile* e *T. amazonicus*.

Formato das células epidérmicas da face adaxial da lâmina foliar

Células com forma poligonal são caracterizadas por apresentar tamanhos e ângulos variados, irregulares. Em geral, as espécies de *Brosimum* apresentaram as células epidérmicas da lâmina foliar adaxial com formato poligonal (**Fig. 12A**). Células com formato isodiamétrico são caracterizadas por apresentar formas iguais, com mesma quantidade de lados, exceto quando ocorrem sobre as nervuras, onde se tornam mais estreitas. Células epidérmicas da face adaxial são isodiamétricas em *B. acutifolium*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii*, *B. potabile*, *H. sprucei* e *T. amazonicus*.

Entre os caracteres anatômicos, o formato das células epidérmicas da face abaxial da lâmina foliar é poligonal (**caráter 15**) para quase todas as espécies de *Brosimum* (**clado B**), com exceção das espécies *B. acutifolium*, *B. costaricanum*, *B. gaudichaudii* e *B. potabile* que apresentam células epidérmicas isodiamétricas, o que, de acordo com o cladograma obtido, pode ser considerado um caráter plesiomórfico para o clado neotropical de Dorstenieae.

Forma da parede anticlinal das células epidérmicas da face adaxial da lâmina foliar

As paredes das células epidérmicas apresentam-se levemente sinuosas (**caráter 16**) em *B. melanopotamicum* e *B. lactescens*, enquanto todas as outras espécies de *Brosimum* apresentam-se retas (Fig. **12A**). As paredes das células epidérmicas da lâmina adaxial das espécies de *Helianthostylis* e *Trymatococcus* são isodiamétricas e apresentam-se profundamente sinuosas a ponto das células serem separadas uma das outras (Fig. **12B**), este caráter pode ser considerado um paralelismo compartilhado por estes dois gêneros

Segundo Appezzato da Glória & Carmello-Guerreiro (2003), a sinuosidade da parede deve-se, provavelmente, às tensões ocorridas na folha e ao endurecimento da cutícula durante a diferenciação celular. Entretanto, a sinuosidade das paredes anticlinais das células epidérmicas pode, possivelmente, ser um caráter influenciado pelo ambiente (Metcalf & Chalk 1979).

Forma dos tricomas capitados na face abaxial da lâmina foliar, número de células e distribuição nas espécies do clado neotropical de Dorstenieae

Além de tricomas simples, as espécies estudadas podem apresentar tricomas capitados, caracterizados por possuir um corpo diferenciado em pé, haste e cabeça, uni ou pluricelular. Nas espécies dos gêneros estudados, diferenças quanto à forma do tricoma glandular foram observadas. Tricomas ovóide-capitados possuem a base da cabeça mais larga que o ápice (Fig. **12C**), sendo encontrados em *B. alicastrum*, *B. gaudichaudii* e *B. guianense*. Os tricomas oblongo-capitados possuem a base da cabeça mais estreita que o ápice (Fig. **12D**) e foram observados nas demais espécies de *Brosimum* e em *Trymatococcus* e *Helianthostylis*.

Tricomas simples e capitados em Moraceae estão registrados nos trabalhos de Metcalf & Chalk (1950) e estão presentes em vários gêneros de todas as tribos da família, tais como *Ficus*, *Maclura*, os quais são chamados de tricomas glandulares. Contudo, segundo Rohwer (1993) essa característica ainda precisa ser comprovada nos tricomas capitados.

No presente estudo, os tricomas capitados da maior parte das espécies do clado neotropical de Dorstenieae (**clado A**) são formados por quatro células, possuem a forma oblonga (**caracteres 19 e 20**), e estão localizados próximos ou sobre as nervuras da lâmina foliar (**caráter 21**) (Fig. **12D**). Entretanto, *B. guianense*, *B. alicastrum*, *B. gaudichaudii* (**clado D**) e *Dorstenia brasiliensis* apresentam tricomas ovóide-capitados com 2 células e encontram-se distribuídos por toda a lâmina foliar abaxial (Fig. **12C**).

A diferença observada em relação à forma e número de células dos tricomas capitados em Moraceae foi registrada no trabalho de Sha & Kachroo (1975), o qual descreve ontogeneticamente a formação destas estruturas. O tricoma bicelular é mais alongado e ovóide

devido sua única divisão anticlinal, logo após a formação da haste ou pé do tricoma. Nos tricomas oblongo-capitados apresentando quatro células, a primeira divisão também é anticlinal, no entanto, a segunda é periclinal, com duas células proximais e duas distais à lâmina.

Com base nos resultados do cladograma, é possível assumir que tricomas capitados de quatro células evoluíram, independentemente, no mínimo duas vezes para o clado neotropical de Dorstenieae (**clado A**) e são uma sinapomorfia para as espécies *B. acutifolium* e *B. costaricanum* do clado **D**, para todas as espécies do clado **C** e para *Trymatococcus amazonicus*.

Tais variações no número de células não foram evidenciadas por Berg (1972) em sua monografia sobre o grupo, as quais apontam a não naturalidade de sua delimitação infragenérica para o gênero *Brosimum*.

Epiderme papilosa na face abaxial da epiderme foliar

Berg (1972), em sua monografia sobre o clado neotropical de Dorstenieae, registrou a presença de epiderme papilosa apenas em espécies de *Brosimum*. Este tipo particular de epiderme foi verificado em *B. alicastrum*, *B. gaudichaudii*, *B. guianense* e *B. potabile* (Figs. **9D** e **10A**).

A presença de epiderme papilosa (**caráter 21**), já descrita por Berg (1972), apresenta-se como um caráter diagnóstico para o agrupamento de *B. guianense* e *B. gaudichaudii*, (**clado D**), na seção *Piratinera* do subgênero *Brosimum*. A presença de epiderme papilosa na espécie *B. alicastrum* também foi observada pelo autor, mas a relação de *B. alicastrum* com estas as espécies *B. guianense* e *B. gaudichaudii* não foi abordada. Em *B. potabile*, a presença de epiderme papilosa nas criptas estomáticas não se mostrou constante como nas espécies acima citadas variando entre indivíduos analisados.

A presença de epiderme papilosa é evidenciada estritamente na face abaxial das lâminas foliares de espécies de outros gêneros neotropicais da família Moraceae, como *Ficus* e *Helicostylis* (Metcalf & Chalk, 1950). Segundo Metcalf & Chalk (1979) e Barthlott (1981), epiderme papilosa pode ser considerado controverso por estar associado à plasticidade fenotípica foliar, relacionado com fatores ambientais, como excesso de luz.

Entretanto, variações estruturais encontradas nas papilas podem ser consideradas apropriadas para serem utilizadas como caracteres diagnósticos a nível infragenérico. Diferenças relacionadas ao agrupamento, tamanho e distribuição das papilas epidérmicas são descritas para as espécies de *Brosimum*. Em *B. guianense* e *B. alicastrum* as papilas se

distribuem homoganeamente pela lâmina foliar abaxial e apresentam forma cônica (**Fig 9D**). Em *B. gaudichaudii* as papilas são alongadas, quase filiformes e restritas à criptas estomáticas (**Fig. 10A**). Este caráter pode ser considerado uma sinapomorfia para estas espécies componentes do clado **D**.

Sistema Reprodutivo

Nas espécies dos gêneros neotropicais da tribo Dorstenieae podem ser encontradas uma representividade significativa dos principais tipos de sistemas reprodutivos verificados em Moraceae, apresentando espécies monóicas, dióicas e androdioicas. Em *Brosimum* há ocorrência de espécies monóicas (*B. gaudichaudii*, *B. guianense*, *B. longifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*) e dióicas (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. lactescens* e *B. melanopotamicum*). Em *Trymatococcus* as espécies são monóicas, enquanto o gênero *Helianthostylis* é androdioico. A espécie utilizada como grupo externo *Dorstenia brasiliensis* é monóica, já todas as espécies de *Sorocea* são dióicas.

Sexualidade da inflorescência

As inflorescências na família Moraceae são sempre compostas por flores unissexuadas. Na tribo Dorstenieae a distribuição dos sexos nas inflorescências dos gêneros neotropicais estudados se mostrou diversa. Inflorescências unissexuadas ocorrem nas espécies dióicas do gênero *Brosimum* (*B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. lactescens* e *B. melanopotamicum*) e também em algumas espécies registradas como monóicas (*B. parinarioides* e *B. rubescens*). Tais espécies monóicas, como registrado por Berg (1972), podem apresentar somente flores estaminadas nas inflorescências de um indivíduo. Nestas espécies ocorre, geralmente, uma única flor pistilada na inflorescência feminina, enquanto nas inflorescências com flores estaminadas, elas ocorrem em um número variável.

Inflorescências bissexuadas ocorrem nas espécies monóicas do gênero *Brosimum* (*B. gaudichaudii*, *B. guianense*, *B. longifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*) e do gênero *Trymatococcus*. Nestas espécies, as inflorescências apresentam uma ou mais que uma flor pistilada imersa no centro do receptáculo e um número variável de flores estaminadas distribuídas na parte superior da inflorescência. Já no gênero *Helianthostylis* ocorrem inflorescências uni e bissexuadas. Nestas espécies, as inflorescências unissexuais apresentam várias flores estaminadas, enquanto a inflorescência bissexuada apresenta uma flor pistilada e um número menor de flores estaminadas.

A evolução dos sistemas reprodutivos monóico e dióico para o clado neotropical de Dorstenieae (**caráter 22**) se mostrou incerta, com a dioícia evoluindo paralelamente, no mínimo, duas vezes no **clado A**. A monoícia está presente na maior parte das espécies de *Brosimum* do **clado E** (*B. longifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*), e nas espécies *B. gaudichaudii* e *B. guianense* (**clado D**). A partir dos resultados apresentados no cladograma, é possível assumir que a monoícia é o estado plesiomórfico para o clado neotropical de Dorstenieae.

Entretanto, segundo Datywiller & Weiblen (2004), a dioícia é a condição ancestral para família, e a monoícia evoluiu independentemente de duas a quatro vezes neste grupo. No cladograma obtido neste estudo (**Anexo 1**), as linhagens monóicas dos grupos que se apresentam relacionados estão divididas em espécies com inflorescências bissexuais (*Ficus* e Dorstenieae), e em espécies com inflorescências unissexuais (Artocarpeae e Castilleae).

No cladograma apresentado para o presente estudo do clado neotropical da tribo Dorstenieae (Fig. **13**), a condição dióica observada em *Sorocea muriculata*, atualmente incluída na tribo Moreae *s.l* (Datywiller & Weiblen, 2004)., permanece como uma apomorfia para o clado formado pelas espécies de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* (**clado A**), com evolução paralela para os dois cladogramas de *Brosimum*, nas espécies do **clado D**, *B. alicastrum*, *B. acutifolium* e *B. costaricanum* e em *B. melanopotamicum* e *B. lactescens* do **clado E**.

A variação já registrada por Berg (1972), da ocorrência de inflorescências uni e bissexuadas (**caráter 24**) nas espécies *B. parinarioides* e *B. rubescens*, pode ser indícios da provável evolução da monoícia para dioícia no gênero *Brosimum*, pois, na descrição da espécie, o autor realiza esse questionamento. Contudo, estudos de biologia reprodutiva das espécies do grupo devem ser realizados para compreensão dos sistemas reprodutivos dentro do clado.

A androdioícia é evidenciada em duas tribos de Moraceae, Dorstenieae com *Helianthostylis* e Castilleae com *Castilla*, porém, sua evolução é independente para a família. O cladograma obtido para este estudo também não elucidou como ocorreu a evolução da androdioícia em *Helianthostylis sprucei* para o clado neotropical de Dorstenieae.

Brácteas como perianto na inflorescência

Uma característica marcante da tribo Dorstenieae é a presença de brácteas interflorais distribuídas pelo receptáculo da inflorescência. As espécies *B. acutifolium* e *B. gaudichaudii*

não possuem perianto, mas apresentam duas a três brácteas interflorais circundando os estames, como um perianto (Fig. 11B).

Receptáculo foveado da inflorescência

Um grupo de espécies do gênero *Brosimum* (*B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. utile* e *B. longifolium*) apresenta inflorescências com depressões ou fôveas. Como essas espécies não apresentam perianto desenvolvido, os estames ficam inseridos dentro dessas cavidades (Fig. 10A).

A presença de receptáculo foveado (**caráter 27**) está restrito às espécies de *Brosimum* do **clado E**, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. longifolium* e *B. utile*. Segundo Berg (1989), a redução ou perda do perianto nas flores estaminadas, aparentemente promove o desenvolvimento de estruturas acessórias de proteção funcionais antes da antese. A presença dessas cavidades no receptáculo da inflorescência das espécies do **clado E** seriam adaptações para proteção dos estames.

A presença de brácteas como perianto (**caráter 26**) em *B. acutifolium* e *B. gaudichaudii* (Fig. 10B), componentes do **clado D**, desempenham função similar àquela das fossas no receptáculo, uma vez que essas também possuem flores estaminadas aperiantadas. Estes caracteres são considerados apomórficos para estas espécies.

Perianto na flor estaminada

Um perianto está presente nas flores estaminadas das espécies dos gêneros *Helianthostylis* (Fig. 10B). e *Trymatococcus*, e em algumas espécies de *Brosimum* (*B. costaricanum*, *B. guianense*, *B. lactescens*, *B. melanopotamicum* e *B. rubescens*). As demais espécies de *Brosimum* apresentam flores estaminadas aperiantadas, como *B. utile* (Fig. 10C)

Comprimento do perianto na flor estaminada

As espécies dos gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus* apresentam perianto desenvolvido de 1,5 a 3,0 mm de comprimento. Dentre as cinco espécies de *Brosimum* que apresentam perianto, apenas *B. lactescens* e *B. costaricanum* possuem perianto maior que 1,5 mm, as demais espécies apresentam perianto reduzido, menor que 1 mm.

Número de estames em relação ao número de tépalas

No clado neotropical de Dorstenieae, somente as espécies do gênero *Trymatococcus* apresentam as flores estaminadas com três estames, e perianto com três tépalas. As demais

espécies dos gêneros, *Brosimum* (*B. costaricanum*, *B. guianense*, *B. lactescens*, *B. melanopotamicum* e *B. rubescens*) e *Helianthostylis* apresentam flores variando de um a quatro estames, e perianto com duas a quatro tépalas.

União das tépalas na flor estaminada

Somente as espécies com perianto desenvolvido (*B. costaricanum*, *B. lactescens*, *T. amazonicus* e *H. sprucei*) apresentam tépalas livres, completamente divididas em lobos sobre o receptáculo. Já as espécies *B. melanopotamicum*, *B. guianense* e *B. rubescens* apresentam tépalas unidas entre si.

Os caracteres presença de perianto na flor estaminada (**caráter 28**) e comprimento do perianto na flor estaminada (**caráter 29**), quando relacionados à evolução dos sistemas reprodutivos encontrados no clado, apresentam uma história distinta no gênero *Brosimum*. Todas as espécies monóicas do **clado E** (*B. longifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*), bem como, *B. gaudichaudii* e *B. guianensis*, componentes do **clado D**, apresentam redução ou perda total do perianto. Enquanto nas espécies dióicas *B. lactescens*, *B. melanopotamicum* e *B. costaricanum* ele se apresenta mais desenvolvido e livre no receptáculo (**caráter 30**), exceção para as espécies *B. alicastrum* e *B. acutifolium* do clado **D**, que não apresentam perianto.

Em Moraceae, é observado uma redução gradativa do perianto entre as tribos que apresentam flores encerradas em receptáculos, onde a substituição das tépalas por outra estrutura de proteção, neste caso brácteas, podem envolver toda a inflorescência, como ocorre em *Ficus*, envolverem parcialmente a inflorescência como em Castilleae ou estarem distribuídas por toda inflorescência como no clado neotropical de Dorstenieae (Datywiller & Weiblen, 2004).

Berg (1989) aponta que a redução do perianto é regularmente precedida por variações no número e forma das tépalas que, conseqüentemente, ocasionam diferenças em relação ao número de estames observados. Em *B. potabile*, *B. parinarioides* e *B. utile* ocorre a presença de um perianto vestigial em algumas inflorescências, além da variação já registrada no estudo de Berg (1972), o que demonstra a não uniformidade no número de estames em relação ao número de tépalas nas espécies de *Brosimum*. Com exceção de *Trymatococcus amazonicus* que é monóico e possui três tépalas e três estames em cada flor, todas as demais espécies monóicas dos clados **D** e **E** apresentam anisostemonia (**caráter 31**).

A partir do cladograma obtido, é possível assumir que a perda ou redução gradativa do perianto e conseqüente anisostemonia observados na maior parte das espécies do gênero

Brosimum são sinapomorfias para o grupo, mas evoluíram paralelamente duas vezes dentro do clado neotropical de Dorstenieae (**clado A**).

Abertura da antera

No clado neotropical da tribo Dorstenieae foram observados os três principais tipos de abertura de antera, que são extrosa, latrorsa e introrsa. A maior parte das espécies de *Brosimum* (*B. guianense*, *B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*) possuem abertura latrorsa das anteras. A abertura introrsa foi observada nas espécies *B. gaudichaudii* e *T. amazonicus*, já a abertura extrorsa foi observada nas espécies *B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. lactescens* e *H. sprucei* (Fig. **10D**).

Conectivo das anteras

Em *B. guianense*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*, foi observada a presença de uma expansão de formato abaulado no conectivo das anteras (Fig. **10C**). As demais espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* apresentam conectivos planos, rente às anteras (Fig. **10D**).

Largura do filete em relação à largura do conectivo

As espécies *B. alicastrum*, *B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile* e *B. rubescens* apresentam a largura do filete menor do que a do conectivo (Fig. **10A**). Mesma medida para o filete e conectivo foi observada nas espécies *B. acutifolium*, *B. costaricanum*, *B. utile*, *H. sprucei* e *T. amazonicus* (Fig. **10C**). Já uma largura maior do filete em relação à largura do conectivo foi observada nas espécies *B. gaudichaudii* e *B. guianense*.

Na tribo Dorstenieae os estames são sempre retos no botão floral, uma característica considerada avançada para a família Moraceae, que também apresenta estames inflexionados, também chamados de estames urticáceos nos botões das espécies de alguns gêneros da tribo Moreae, o quais estão relacionados à liberação explosiva de pólen (Datywiller & Weiblen, 2004). Entretanto, diferenças na forma dos estames podem estar diretamente relacionadas à estrutura das inflorescências observadas em Moraceae, onde a tribo Moreae apresenta racemos simples ou espigas, enquanto Dorstenieae possui as flores condensadas em um receptáculo. Nos estames urticáceos, a abertura da antera é inicialmente extrorsa e após a antese introrsa, nos estames retos são observadas anteras com os três tipos de abertura (Corner, 1969).

A abertura extrorsa da antera (**caráter 32**) apresenta-se como uma plesiomorfia para o clado neotropical de Dorstenieae, compartilhada paralelamente por *B. lactescens* e *H. sprucei*

presentes do **clado C**, e por *B. alicastrum*, *B. acutifolium*, *B. costaricanum* (**clado D**). A abertura latrorsa apresenta-se como uma sinapormofia para as espécies de *Brosimum* componentes do **clado E** (*B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*), mas compartilhada por *B. guianense* do **clado D**. A abertura introrsa apresenta evolução independente, ocorrendo em *B. gaudichaudii* e *T. amazonicus*.

As anteras são desenvolvidas antes do alongamento do filamento do estame reto em Dorstenieae, por isso, sua forma e tamanho do filamento estão diretamente associados ao tipo de abertura (Berg, 1989). Foi observada uma relação direta entre abertura latrorsa (**caráter 32**), conectivos abaulados (**caráter 33**), e largura do filete menor em relação a largura do conectivo (**caráter 34**). para as espécies do **clado E**, *B. longifolium*, *B. melanopotamicum*, *B. parinarioides*, *B. potabile* e *B. rubescens*. No cladograma, estes caracteres podem ser considerados apomorfias para estas espécies.

As espécies com inflorescências unissexuadas, *B. lactescens*, *H. sprucei*, componentes do **clado C**, *B. acutifolium*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum* (**clado D**), apresentam abertura da antera extrorsa, com conectivos estreitos e planos e largura da antera igual a do conectivo. A espécie *B. gaudichaudii* apresenta um conectivo expandido (Fig. 10B), mas sua protuberância não é definida e envolve toda a antera introrsa, onde o filamento apresenta largura igual à do conectivo.

É possível correlacionar a presença desse abaulamento da antera à falta de perianto das flores estaminadas nas inflorescências das espécies do **clado E** atuando como uma estrutura de proteção e também auxiliando na dispersão do pólen. Uma vez que, as espécies do clado neotropical que possuem perianto desenvolvido (*B. costaricanum*, *B. lactescens*, *H. sprucei* e *T. amazonicus*) ou brácteas como perianto (*B. acutifolium* e *B. gaudichaudii*), não apresentam essa estrutura e a abertura das anteras é introrsa ou extrorsa.

Um tipo peculiar de abertura da antera é encontrado em *B. alicastrum* subsp. *alicastrum*, caracterizada pela abertura circunscrita ao redor do estames, com anteras peltadas e tecas fusionadas, característica apontada por Berg (1972) que a difere da subespécie *bolivariensis* utilizada neste estudo, as duas subespécies são caracterizadas por apresentar a abertura da antera extrorsa.

Perianto na flor pistilada

Os gêneros do clado neotropical da Tribo Dorstenieae não apresentam perianto nas flores pistiladas. Apenas o grupo-irmão *Dorstenia brasiliensis* e o grupo externo *Sorocea muriculata* apresentam esta estrutura visível na inflorescência (Fig. 11C).

A presença de perianto na flor pistilada (**caráter 35**) em *Dorstenia brasiliensis* apresenta-se como uma autopomorfia para espécie no clado neotropical de Dorsteneae. Em algumas espécies dos gêneros *Brosimum* e nas espécies examinadas de *Helianthostylis* e *Trymatococcus* (**clado A**) é possível observar uma concrecência ao redor do estilete, mas não um perianto formado por tépalas. Berg (1990) justifica essa característica devido ao alto nível de fusão dos carpelos, tépalas e brácteas interflorais alcançado pela tribo, onde as espécies do clado neotropical frequentemente apresentam apenas uma flor pistilada, enquanto em *D. brasiliensis* um número variável de flores pistiladas é observado. O autor ainda sugere que o enclausuramento da flor pistilada atue como um mecanismo de proteção do óvulo. Dessa forma, a ausência de perianto nas flores pistiladas das espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, resultante da fusão de tépalas e brácteas interflorais, constitui uma sinapomorfia para o todo o clado neotropical.

Pistilo conspícuo na inflorescência

O estilete e estigma das espécies monóicas de *Brosimum* (*B. gaudichaudii*, *B. guianense*, *B. longifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile*) são quase inconspícuos, principalmente, depois que as flores estaminadas estão abertas. Nestas espécies os pistilos apresentam-se menores que 5 mm (Fig. **6D**). As espécies dióicas de *Brosimum* apresentam pistilos conspícuos, maiores que 8 mm, com exceção de *B. acutifolium* que apresenta pistilos com 1.5mm de comprimento. Nos gêneros *Trymatococcus* e *Helianthostylis* o pistilo é conspícuo. Em *H. sprucei* o pistilo é bem desenvolvido, alcançando até 20 mm de comprimento e permanecendo persistente na infrutescência (Fig. **2B**).

Forma do estigma

Foram observados dois tipos de estigma nas espécies estudadas, filiforme e vitiforme.. O estigma filiforme é caracterizado por apresentar braços longos e finos, chegando a medir 8 mm em *B. alicastrum* (Fig. **2D**) e 20 mm em *H. sprucei*. Este tipo de estigma é observado também em *B. lactescens* e *T. amazonicus*. O estigma vitiforme “band shaped” é caracterizado por apresentar os braços largos e curtos, não ultrapassando 2 mm de comprimento (Fig. **6D**), e foi observado nas demais espécies de *Brosimum*.

Indumento no estigma

As espécies *B. acutifolium*, *B. gaudichaudii*, *B. guianense*, *B. longifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens*, *B. utile* e *H. sprucei* apresentam indumento

puberulento a piloso sobre o estigma (Fig. 6D). Nas espécies *B. alicastrum*, *B. lactescens* e *T. amazonicus* foi observado estigma glabro.

Associado a características como a fusão de carpelos, ausência de perianto e número reduzido de flores pistiladas nas inflorescências das espécies do clado neotropical de Dorstenieae, encontrou-se relação entre o tamanho (**caráter 36**), forma (**caráter 37**) e indumento (**caráter 38**) observados nos pistilos das inflorescências de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. As espécies dióicas de *Brosimum*, *B. alicastrum*, *B. costaricanum* (**clado D**) e *B. lactescens* e *B. melanopotamicum* (**clado E**), em geral, apresentam estigma conspicuo na inflorescência, filiforme e sem indumento, exceção para *B. acutifolium*. Entretanto, *T. amazonicus*, que é monóico apresenta estigma filiforme e glabro. Na inflorescência bissexuada de *H. sprucei* o estigma é conspicuo, filiforme e com presença de indumento piloso sobre suas projeções em forma de braços. Entre as espécies monóicas *B. longifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* e *B. utile* do **clado E**, e nas espécies *B. gaudichaudii* e *B. guianense* do **clado D**, observa-se estigmas inconspícuos, vitiformes e com a presença de indumento. Estas características são consideradas diagnósticas para a delimitação das espécies de *Brosimum* no subgênero *Ferolia* (**clado E**) sem *B. lactescens* (Berg, 2002), e podem ser consideradas sinapomorfias para o clado, mas paralelamente compartilhadas pelas espécies *B. guianense* e *B. gaudichaudii* do subgênero *Brosimum* (**clado D**).

Pistilódio

Nas espécies do clado neotropical de Dorstenieae, os gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus* apresentam pistilódios. Pistilódios de 10-20 mm de comprimento são encontrados em *Helianthostylis* (Figs. **2B** e **10B**). Já em *Trymatococcus* o pistilódio é diminuto, não ultrapassando 0,5 mm. Nas espécies do gênero *Brosimum* não foi observada presença desta estrutura.

.Em Moraceae, outros gêneros como *Paratocarpus* Baill. e *Treculia* Decne. apresentam pistilódios vestigiais similares aos que ocorrem em *Trymatococcus*. Enquanto, espécies dos gêneros *Antiaropsis* K. Schum e *Sparattosyce* Bureau, apresentam esta estrutura desenvolvida como em *Helianthostylis*. Corner (1969) por considerar a presença desta característica um caráter primitivo, colocou *Helianthostylis* em Artocarpeae, justificando que a presença desta estrutura nas inflorescências de Moraceae seria uma evidência da flor bissexuada ancestral, onde, entre os caracteres taxonômicos na família, o pistilódio é o mais demonstrativo em relação à herança vestigial.

No cladograma obtido para o clado neotropical de Dorstenieae, a presença de pistilódio (**caráter 40**) apresenta evolução independente no clado neotropical de Dorstenieae, ocorrendo no gênero *Trymatococcus* como uma estrutura vestigial, algumas vezes ausente na inflorescência, e em *Helianthostylis* como uma estrutura bem desenvolvida.