



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

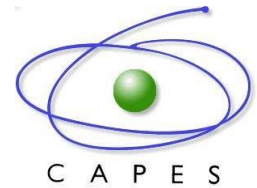
ELSON FELIPE SANDOLI ROSSETTO

**FILOGENIA DA TRIBO PISONIEAE (NYCTAGINACEAE):
DELIMITAÇÃO GENÉRICA E EVOLUÇÃO DE CARACTERES
MORFOLÓGICOS**

Londrina
2016



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Filogenia da tribo Pisonieae (Nyctaginaceae): Delimitação genérica e evolução de caracteres morfológicos

Elson Felipe Sandoli Rossetto

Centro de Ciências Biológicas – CCB
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro

Londrina, PR
2016

ELSON FELIPE SANDOLI ROSSETTO

**FILOGENIA DA TRIBO PISONIEAE (NYCTAGINACEAE):
DELIMITAÇÃO GENÉRICA E EVOLUÇÃO DE CARACTERES
MORFOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva
Ribeiro

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Rossetto, Elson Felipe Sandoli.

Filogenia da tribo Pisonieae (Nyctaginaceae): delimitação genérica e evolução de caracteres morfológicos / Elson Felipe Sandoli Rossetto. - Londrina, 2016.
53 f.

Orientador: José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Filogenia - Tese. 2. Nyctaginaceae - Tese. 3. ITS - Tese. 4. rps16 - Tese. I. Lahoz da Silva Ribeiro, José Eduardo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

ELSON FELIPE SANDOLI ROSSETTO

**FILOGENIA DA TRIBO PISONIEAE (NYCTAGINACEAE):
DELIMITAÇÃO GENÉRICA E EVOLUÇÃO DE CARACTERES
MORFOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva
Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. André Olmos Simões
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 12 de maio de 2016.

Ao Jeremy Hayward (1987-2015)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus orientadores José Eduardo Ribeiro e Aparecida Donisete de Faria pela ideia do projeto, orientação, apoio, e sobretudo, paciência em todos os momentos. Muito obrigado!

Ao Alex Popovkin pelas traduções de textos em alemão do Anton Heimerl e também por me enviar amostras.

Ao David Lorence, Daniel Silva, Eric Feltz e Fabiola Areces, pelo envio de amostras de plantas.

Ao Edison Mendes Francisco, pelo grande auxílio em campo. Também quero agradecer ao Gleison Viana e José Marcelo Molina pela ajuda nas coletas de material e à Patrícia Santos sempre pelo apoio que me deu.

Ao Norm Douglas pelas discussões e *insights* que foram essenciais para o trabalho.

Aos professores Claudete e Paulo Ruas por terem aberto as portas do laboratório de genética molecular onde pude obter as sequências de DNA.

À Sara Godoy pela grande ajuda no laboratório e ao João Fernando Marques pela ajuda inestimável com os softwares e análises de dados.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, Professores Welinton Silva, André Simões, José Antonio Pimenta e Halley Caixeta, pelos comentários e sugestões para o trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos meus queridos pais, Elson e Maria pelo apoio.

E a todos que embora não citei aqui, mas que me ajudaram muito, muito obrigado!

ROSSETTO, E.F.S. Filogenia da tribo Pisonieae Meisn. (Nyctaginaceae): delimitação genérica e evolução e caracteres morfológicos. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A família Nyctaginaceae Juss. compreende entre 300 a 400 espécies agrupadas em cerca de 30 gêneros com distribuição pantropical, sendo caracterizada pela presença de antocarpo, porção basal do cálice acrescente envolvendo o fruto. Tradicionalmente, Nyctaginaceae tem sido dividida em cinco ou seis tribos, mas rearranjos taxonômicos propostos pela recente reconstrução filogenética da família resultaram na sua atual divisão em sete tribos, sendo uma delas, a tribo Pisonieae Meisn., que se distingue das demais tribos pelo embrião reto, não-curvo. Os gêneros de Pisonieae, no entanto, não tem uma delimitação clara, e baseado na consistência do antocarpo, na posição dos estames no perianto e na presença de glândulas adesivas no antocarpo seco, diversas circunscrições genéricas tem sido propostas sem, no entanto, alcançarem uma classificação estável. Neste contexto, reconstruímos a filogenia molecular da tribo Pisonieae, a partir do segmento de DNA nuclear (ITS) e plastídeo (rps16) de 44 espécies (grupo-interno) de quatro dos sete gêneros com utilização dos métodos de parcimônia e análise bayesiana. Nossos resultados indicam que alguns gêneros dessa tribo não são monofiléticos, sendo os caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados na sua circunscrição plesiomórficos ou homoplásticos.

Palavras-chave: Nyctaginaceae. Filogenia. Biologia comparada. ITS. Rps16.

ROSSETTO, E.F.S. Phylogeny of the tribe Pisonieae Meisn. (Nyctaginaceae): generic delimitation and morphological character evolution. 2016. 53 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Nyctaginaceae Juss. is a pantropical family with 300-400 species distributed along ca. 5-6 genera, which is recognized by the presence of anthocarp, the acrescent basal portion of the calyx envolving the fruit. Traditionally, Nyctaginaceae has been divided in 5-6 tribes, but rearrangements proposed by the recent phylogeny of the family resulted in its current division of seven tribes, and among them, the tribe Pisonieae Meisn., which is distinguished from another tribes by the straight embryo. The genera of Pisonieae, however, do not have a clear delimitation, and based on anthocarp consistency, stamen position and the presence of sticky glands in the dry anthocarp, several generic circumscriptions have been proposed, without achieving a stable classification. In this context, molecular phylogeny of the tribe Pisonieae was estimated, through maximum parsimony and Bayesian inference using nrDNA (ITS) and cpDNA (rps16) from 44 species representing four of seven recognized genera. The results indicate some genera are not monophyletic and the morphologic characters traditionally utilized in its circumscription are plesiomorphic or homoplastic.

Keywords: Nyctaginaceae. Phylogeny. Comparative biology. ITS. Rps16.



Ilustração original de *Pisonia olfersiana* Link, Klotzch & Otto, publicada no *Icones Plantarum Rariorum Horti Regii Botanici Berolinensis*. Descrita em 1841 sob o gênero *Pisonia*, foi transferida para *Torrubia* por Paul C. Standley em 1916 e, posteriormente, para *Guapira*, por Cyrus Lundell em 1968. Por fim, em 1996, Antonio Furlan sinonimizou a então *Guapira olfersiana* sob *Guapira opposita*, em sua ampla delimitação, porém, a publicação só ocorreu em 2014, de forma póstuma.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Imagens de campo de caracteres morfológicos da tribo Pisonieae. **A)** *Neea pendulina*, flor pistilada. **B)** *Neea pendulina*, flor estaminada. **C)** *Neea hermaphrodita* var. *calvata*, flores com estames insertos. **D)** *Guapira cafferiana*, flor com estames exsertos. **E)** *Guapira laxa*, antocarpos drupáceos com ausência de glândulas. **F)** *Pisonia aculeata*, antocarpo seco com glândulas estipitadas (indicadas pela seta branca). **G)** *Pisonia umbelifera*, antocarpos secos com glândulas inconspícuas ao longo dos ângulos (indicada pela seta branca). Crédito das Imagens: A-B e D: Elson Felipe Rossetto, C e F: José Marcelo Molina, E. Leonardo Jales Leitão, e G: Ching-I Peng..... 33
- Fig. 2.** Esquema do histórico da classificação genérica da tribo Pisonieae. Gêneros e suas seções são representados por retângulos cinza-claros, inseridos em retângulos cinza-escuros que representam os principais tratamentos taxonômicos para a tribo. Os retângulos escuros estão alinhados de forma a mostrar mudanças na composição dos gêneros da tribo entre os principais tratamentos. As flechas indicam as mudanças nos principais tratamentos taxonômicos, através da transferência de espécies e seções entre os gêneros 34
- Fig. 3.** Comparação das árvores individuais de ITS e rps16, obtidas pelo método de máxima parcimônia (MP). Táxons com posições conflituosas nas árvores de genes são destacados em negrito. Valores de *bootstrap* (BS) são indicados nos clados com presença de incongruência, sendo evidente a ausência de incongruências fortemente sustentadas (>85%) em ambas as árvores..... 35

- Fig. 4.** Árvore de consenso de maioria da tribo Pisonieae, obtida através de máxima parcimônia e inferência bayesiana em análise combinada de ITS e rps16. Valores de probabilidade posterior (PP) estão indicados na parte superior dos ramos, os de *bootstrap* (BS), na inferior. “-“ indica valores de BS <50%. Clados obtidos apenas na inferência bayesiana são indicados com linhas traçadas. Os terminais estão coloridos de acordo com os gêneros atualmente aceitos, como mostrado na legenda à esquerda. Os clados e subclados reconhecidos são indicados na direita da árvore, por letras. A árvore de Pisoniae com comprimento dos ramos é apresentada no canto inferior esquerdo, sendo notável ramos curtos no clado C, especificamente na linhagem de Guapira/Neea. Abreviações se referem aos estados do Brasil dos quais os terminais amostrados são provenientes. AC= Acre, AM=Amazonas, BA=Bahia, MS= Mato Grosso do Sul, MT= Mato Grosso, PR= Paraná, SP=São Paulo. Grupo externo, *Bougainvillea glabra*, *B. infesta* e *B. spectabilis* foram podadas da árvore 36
- Fig. 5.** Estimativa dos estados de caracteres ancestrais por mapeamento estocástico bayesiano da consistência do antocarpó (a) e (b) glândulas adesivas sobre o antocarpó. Gráficos de pizza nos nós das árvores indicam a probabilidade posterior dos estados ancestrais dos caracteres analisados 37
- Fig. 6.** Estimativa dos estados de caracteres ancestrais por mapeamento estocástico bayesiano da posição dos estames no perianto (a) e (b) diócia. Gráficos de pizza nos nós das árvores indicam a probabilidade posterior dos estados ancestral dos caracteres analisados..... 38

LISTA DE TABELAS

Tab. 1. <i>Primers</i> e suas respectivas sequências utilizadas no estudo.....	39
Tab. 2. Caracteres e seus estados utilizados na estimativa do estado ancestral	39

SUMÁRIO

1. Introdução geral	1
Avanços na sistemática de Nyctaginaceae	1
A tribo Pisonieae Meisn: histórico taxonômico.....	3
Literatura citada.....	6
2. Capítulo 1. Filogenia da tribo Pisonieae (Nyctaginaceae): delimitação genérica e evolução e caracteres morfológicos.....	8
Resumo	9
Introdução	9
Material e métodos	13
Resultados	16
Discussão	19
Literatura citada.....	26
Anexo	40

Introdução Geral



Pisonia aculeata L. Extraída de Blanco, M.- Flora de Filipinas, t.394 (1875)

Introdução Geral

AVANÇOS NA SISTEMÁTICA DE NYCTAGINACEAE

A família Nyctaginaceae Juss. é composta por cerca de 300 a 400 espécies de árvores, arbustos e ervas, perenes ou anuais, distribuídas em aproximadamente 30 gêneros (Brittich & Kühn, 1993). A família ocorre em áreas tropicais e subtropicais do globo, com predominância no Novo Mundo, onde estão os dois centros de diversidade da família, os neotrópicos e a região árida do oeste da América do Norte (Douglas & Spellenberg, 2010). Nyctaginaceae se caracteriza pelo perianto uniseriado derivado do cálice (Brittich & Kühn, 1993), não havendo corola (Bogle, 1974; Levin, 2000), e a maioria das espécies apresentam um fruto do tipo aquênio ou núcula circundado pela região basal do cálice, formando uma estrutura chamada antocarpó (Brittich & Kühn, 1993, ver Bogle, 1974 para maior discussão acerca desse termo), com consistência drupácea e seca, podendo ter linhas longitudinais com glândulas adesivas ou modificadas em asas, as quais são adaptativas para a dispersão.

Nyctaginaceae foi descrita por Jussieu (1789) e tem sido incluída em Caryophyllales s.s., ou Centrospermae, um grupo formado por táxons com placentação do tipo central a basal e óvulo campilótropo (Eichler, 1871), bem como a presença de pigmentos betalânicos, e feixes proteicos periféricos circundando cristais proteicos nos plastídeos de elemento de tubo crivado (plastídeo P3) (Mabry, 1977; Behnke, 1993).

Análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA (Downie *et al.*, 1997; Meimberg, *et al.* 2000; Savolainen *et al.*, 2000; Soltis *et al.* 2000), confirmaram Caryophyllales como linhagem monofilética, porém não se restringindo a apenas a Centrospermae. Nyctaginaceae está posicionada no “clado da inclusão globular” das Caryophyllales-núcleo (Centrospermae) como irmã de Phytolaccaceae rivinoídea, compartilhando o gineceu monocarpelar (Cuénod *et al.*, 2002; Brockington *et al.*, 2009).

Estudos sistemáticos de Nyctaginaceae foram iniciados por Meisner (1841) e Choisy (1849), nos quais foram descritas as tribos Pisonieae Meisn., Mirabilieae Meisn., Bougainvilleae Choisy e Boerhaavieae Choisy com base na presença e morfologia das brácteas florais. Bentham & Hooker (1880), por sua vez, descreveram a tribo Leucastereae Benth. & Hook., e expandiram Mirabileae, reduzindo Bougainvilleae e Boerhaavieae como subtribos (Mirabileae-Bougainvilleae e Mirabileae-Boerhaavieae), além da descrição de Mirabileae-Abronieae e Mirabileae-Boldoeae.

Posteriormente, nas revisões de Heimerl (1889, 1934), Mirabileae-Boldoeae foi elevada à categoria tribal (tribo Boldoeae Heimerl), enquanto Colignonieae Standl. (Standley, 1918) foi reconhecida. Desta forma, Nyctagineae passou a ser composta por cinco tribos: Boldoeae, Colignonieae, Leucastereae, Mirabileae e Pisonieae, sendo Mirabileae a maior tribo, com a delimitação expandida em relação aos trabalhos anteriores, compreendendo quatro subtribos: Phaeoptilineae, Boerhaaviinae, Abroniinae e Bougainvilleinae.

A última atualização classificação pré-filogenética de Nyctagineae foi realizada por Bittrich & Kühn (1993). Em relação à classificação tribal de Heimerl (1934), algumas mudanças foram realizados como: (1) reconhecimento da tribo Mirabileae como Nyctagineae Horan.; (2) a elevação de Mirabileae subtribos Abroniinae e Bougainvilleinae para tribos Abronieae e Bougainvilleae, respectivamente; (3) a redução da tribo Colignonieae para a categoria de subtribo de Nyctagineae (Colignoniinae); (4) e a separação da subtribo Boerhaviinae (tribo Nyctagineae) em duas subtribos: Boerhaviinae *sensu strictu* e Nyctagininae.

A primeira reconstrução filogenética de Nyctagineae foi realizada por Levin (2000) utilizando segmentos de DNA nuclear (ITS) e de cloroplasto (accD 5' e accD 5'-rbcL). No entanto, o trabalho foi limitado a elucidar relações de parentesco de alguns gêneros de Nyctagineae subtribos Nyctagininae e Boerhaavinae (*sensu* Bittrich & Kühn, 1993), como *Abronia*, *Acleisanthes*, *Allionia*, *Boerhavia*, *Mirabilis* e *Selinocarpus*. Posteriormente, Douglas & Manos (2007) realizaram um estudo filogenético, até agora o mais amplo para a família, a partir de sequências de três segmentos de cpDNA (ndhF, rps16 e rpl16) e um nuclear (nrITS) de representantes de todas as tribos de Nyctagineae *sensu* Bittrich & Kühn (1993). Os resultados mostraram que a tribo Nyctagineae não é monofilética, visto que os representantes das subtribos Nyctagineae-Phaeoptilineae (*Phaeoptilum*) e Nyctagineae-Colignoniinae (*Colignonia*) estão distantemente relacionadas das demais Nyctagineae, que por sua vez formam o clado “xerofítico da América do Norte” (clado NAX, Douglas & Manos, 2007). Por outro lado, Nyctagineae é parafilético em relação a Abronieae (*Abronia* e *Tripterocalyx*), já que os gêneros dessa tribo estão imersos no clado NAX. Quanto às subtribos Nyctagininae e Boerhaviinae, não foi encontrado suporte para a distinção desses grupos. As análises também mostram que Leucastereae é a linhagem irmã do restante de Nyctagineae, seguido pela divergência sucessiva de Colignonieae (*Colignonia*), Boldoeae (*Boldoa*), e o clado formado pelas irmãs Bougainvilleae e Pisonieae mais o clado NAX (Douglas & Manos, 2007). Bougainvilleae e Pisonieae, que abrigam a maioria das espécies lenhosas de Nyctagineae, são monofiléticas, desde que os

gêneros *Phaeoptilum* (Nyctagineae-Phaeoptilineae) e *Pisoniella* (Nyctagineae-Colignoniinae) sejam incluídas nestas tribos, respectivamente (Douglas & Spellenberg, 2010).

O gênero obscuro *Caribea*, provavelmente extinto (Douglas & Manos, 2007), também tradicionalmente incluída em Nyctagineae (Bittrich & Kuhn, 1993), foi transferida para uma tribo própria, Caribeeae (Douglas & Spellenberg, 2010), devido à morfologia altamente distinta de qualquer outra espécie de Nyctaginaceae, embora não houvessem dados moleculares suficientes para esclarecer sua posição filogenética. Dessa forma, na atual classificação filogenética de Nyctaginaceae, são reconhecidas as sete tribos: Boldoeae Heimerl, Bougainvilleae Choisy, Caribeeae Douglas & Spellenb., Colignonieae Standl., Leucastereae Benth. & Hook.f., Nyctagineae Horan. e Pisonieae Meisn. Seguindo o avanço em direção à estabilidade na classificação tribal de Nyctaginaceae, o próximo passo é a reconstrução filogenética das tribos com histórico taxonômico confuso, como é o caso de Pisonieae.

A Tribo Pisonieae Meisn: histórico taxonômico

A tribo Pisonieae Meisn. é uma das sete correntemente aceitas para Nyctaginaceae, compreendendo sete gêneros e cerca de 200 espécies: *Cephalatomandra* Karst. & Triana, *Grajalesia* Miranda, *Guapira* Aubl., *Neea* Ruiz & Pav., *Neeopsis* Lundell, *Pisonia* L. e *Pisoniella* (Heimerl) Standl. (Douglas & Spellenberg, 2010), todos restritos a região Neotropical, com exceção de *Pisonia* que possui um segundo centro de diversidade nas ilhas do Indo-Pacífico. As espécies do grupo são, geralmente, lenhosas, dioicas e apresentam uma característica exclusiva, um embrião do tipo não curvado (Heimerl, 1934; Bittrich & Kühn, 1993; Furlan, 1996; Furlan & Giulietti, 2014).

Pisonieae é conhecido pela instabilidade na classificação a nível genérico, sendo notável o conflito entre diferentes tratamentos taxonômicos quanto à delimitação dos gêneros. Esse conflito está relacionado a baixa combinação de caracteres diagnósticos para a caracterização dos gêneros, que poderiam ser utilizados tanto na expansão da delimitação de certos gêneros, bem como sua fragmentação em gêneros segregados. Em outras palavras, a instabilidade taxonômica da tribo Pisonieae está em torno da circunscrição do gênero *Pisonia*, alternando de um conceito amplo (Heimerl, 1889) para um conceito estrito, concomitante ao reconhecimento de outros gêneros como *Guapira* e *Calpidia* (Heimerl, 1934), retornando novamente para um conceito amplo (Stemmerik, 1964).

Heimerl (1889), e, seu primeiro tratamento, reconheceu apenas *Neea* e *Pisonia*, sendo este último, com uma delimitação bastante ampliada, abrigando cinco seções. Em trabalhos

posteriores, Heimerl (1911; 1913) reconheceu os gêneros *Calpidia* e *Pisoniella*, além de criar o gênero *Rockia*, reduzindo, assim, a delimitação de *Pisonia*. Como resultado, em sua última revisão, Heimerl (1934), dividiu *Pisonia* em apenas duas seções, *Glanduliferae* e *Eupisonia*, sendo *Glanduliferae* abrigando antocarpos de consistência coriácea ou lenhosa com linhas logitudinais cobertas por glândulas adesivas conspícuas, e seção *Eupisonia* é caracterizada pelo antocarpo de consistência carnosa, com glândulas ausentes. Ainda assim, Britton (1904) não concordou com o posicionamento de táxons com antocarpos carnosos em *Pisonia* “*sensu lato*”, restaurando, então, o gênero *Torrubia* Vell. para acomodá-los; Standley (1911, 1916, 1931a, 1931b) descreveu e transferiu diversas espécies para esse gênero e, por fim, McVaugh (1968) recomendou a conservação de *Guapira* sobre *Torrubia*. Desde então, *Guapira* tem sido o nome mais aceito para abrigar parte das espécies com antocarpos carnosos, e novas combinações tem sido realizadas para esse gênero (Woodson & Kidd, 1961; Lundell, 1962; Lundell, 1968; Reitz, 1970). No entanto, o caminho inverso foi realizada por Stemmerik (1964), e a delimitação de *Pisonia* foi expandida novamente com a inclusão de táxons com antocarpos com glândulas inconspícuas dos gêneros *Calpidia* e *Rockia*, que por sua vez foram sinonimizados.

Embora seja consenso a distinção entre *Guapira* e *Pisonia*, proposta a partir da consistência do antocarpo, não significa que o conceito genérico de *Guapira* permaneça bem estabelecido. A semelhança morfológica de *Guapira* com *Neea*, um gênero também caracterizado pelos antocarpos carnosos, tem causado frequentes confusões e dificultando os autores na tarefa de delimitá-los. Em um estudo com as Nyctaginaceae da região Noroeste da América do Sul, Standley (1931b) diferenciou os gêneros *Torrubia* (= *Guapira*) e *Neea* pela posição dos estames em relação ao perianto (inserto em *Neea* e exserto em *Guapira*), porém, acreditou que essa delimitação fosse artificial, sendo um artifício decorrente da baixa amostragem das espécies desta região. Por outro lado, Pool (2001) levantou a hipótese de que *Guapira* e *Neea* não são grupos naturais, ao afirmar que uma revisão desses gêneros resultaria na sua fusão. De forma oposta, na revisão de Pisonieae com foco sobre as espécies ocorrentes no Brasil, Furlan (1996) defendeu a manutenção da distinção entre *Neea* e *Guapira*, considerando, como caracteres diagnósticos, a posição dos estames em relação ao perianto, que é exserto em *Guapira* e inserto em *Neea*, além da forma do perianto da flor estaminada, que é campanulada em *Guapira* e urceolada em *Neea*.

O histórico taxonômico de Pisonieae é um exemplo de que, se não for considerada a relação de parentesco entre os táxons abordados, os sistemas de classificação apresentam

delimitações de grupos de forma artificial, e caracteres homoplásicos e/ou plesiomórficos são utilizados para caracterização dos grupos taxonômicos, além de serem passíveis de instabilidade por não serem apoiadas em hipóteses filogenéticas.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo filogenético da tribo Pisonieae, a partir dos segmentos nrITS e o íntron do gene rps16 do cloroplasto, para testar o monofiletismo de *Pisonia*, bem como investigar a evolução dos caracteres tradicionalmente utilizados na distinção dos gêneros, como consistência do antocarpio, posição dos estames no perianto e tipo da glândula adesiva, além da dioicéia.

Literatura citada

- Behnke, H.-D. 1993. Further studies of the sieve-element plastids of the Caryophyllales including, *Barbeuia*, *Corrigiola*, *Lyallia*, *Microtea*, *Sarcobatus*, and *Telephium*. **Plant Systematics and Evolution** 186: 231-243.
- Bentham, G. & Hooker, J. 1880. **Genera plantarum ad exemplaria imprimis in herbariis kewensibus servata definite**, vol.3 pt.1 London: Reeve.
- Bittrich, V. & Kühn, U. 1993. Nyctaginaceae. Pp. 473-486. In Kubitzki, K.; Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (eds.) **The families and genera of flowering plants**. Berlim: Verlag.
- Brockington, S.F.; Alexandre, R.; Ramdial, J.; Moore, M.; Crawley, S.; Dhingra, A.; Hilu, K.; Soltis, P. & Soltis, D.E. 2009. Phylogeny of the Caryophyllales sensu lato: Revisiting hypotheses on pollination biology and perianth differentiation in the core Caryophyllales. **International Journal of Plant Science** 170(5): 627-643.
- Choisy, J.D. 1849. Nyctaginaceae. Pp. 425-458, In de Candolle, A.(ed.) **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis** vol. 13. Paris: Masson.
- Cuénod, P.; Savolainen, V.; Chatrou, L.W.; Powell, M.; Grayer, R.J. e Chase, M.W. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences. **American Journal of Botany** 89(1): 132-144.
- Douglas, N.A. e Manos, P.S. 2007. Molecular phylogeny of Nyctaginaceae: taxonomy, biogeography, and characters associated with a radiation of xerophytic genera in North America. **American Journal of Botany** 94(5): 856-872.
- Douglas, N. & Spellenberg, R. 2010. A new tribal classification of Nyctaginaceae. **Taxon** 59(3): 905- 910.
- Furlan, A. & Giulietti, A.M. 2014. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 32: 145-268.

- Downie, S.R.; Katz-Downie, D.S. & Cho, K.-J. 1997. Relationships in Caryophyllales as Suggested by Phylogenetic Analyses of Partial Chloroplast ORF2280 Homolog Sequences. **American Journal of Botany** 84(2): 253-273.
- Furlan, A. 1996. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Heimerl, A. 1889. Nyctaginaceae. Pp. 14-32. In Engler, A. & Prantl, K. (eds.) **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, vol. 1b. Leipzig: Engelmann.
- Heimerl, A. 1934. Nyctaginaceae. Pp. 86-134. In Engler, A. & Prantl, K. (eds.) **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, vol. 16c. Berlin: Duncker & Humblot.
- Jussieu, A.L. 1789. **Genera plantarum**. Paris: Herrisant.
- Levin, R.A. 2000. Phylogenetic relationships within Nyctaginaceae tribe Nyctagineae: evidence from nuclear and chloroplast genomes. **Systematic Botany** 25(4): 738-750.
- Lundell, C.L. 1962. Plantae Mayanae-V. **Wrightia** 2(3): 21-36.
- Lundell, C.L. 1968. Studies of American tropical plants V. **Wrightia** 4(2): 79-96.
- Mabry, T.J. 1977. The Order Centrospermae. **Annals of Missouri Botanical Garden** 64(2): 210-220.
- Meimberg, H.; Dittrich, P.; Bringmann, G.; Schlauer, J. & Heubl, G. 2000. Molecular phylogeny of Caryophyllidae s.l. Based on matK sequences with special emphasis on carnivorous taxa. **Plant biology** 2: 218-228.
- Reitz, R. **Flora Ilustrada Catarinense: Nictagináceas**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. 52p.
- Savolainen, V.; Chase, M.W.; Hoot, S.B.; Morton, C.M.; Soltis, D.E.; Bayer, C.; Fay, M.F.; de Bruijn, A.Y.; Sullivan, S. & Qiu, Y.L. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences. **Systematic Biology** 49(2): 306-362.
- Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Chase, M.K.; Mort, M.E.; Albach, D.C.; Zanis, M.; Savolainen, V.; Hahn, W.H.; Hoot, S.B.; Fay, M.F.; Axtell, M.; Swensen, S.M.; Prince, L.M.; Kress, W.J.; Nixon, K.C. & Farris, J.S. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society** 133: 381-46
- Standley, P.C. 1911. The Allioniaceae of Mexico and Central America. **Contributions from the United States National Herbarium** 13: 377-430.
- Standley, P.C. 1916. Studies of tropical american phanerogams: new or notable Allioniaceae. **Contributions from the United States National Herbarium** 18(3): 98-101.
- Standley, P.C. 1931a. Studies of American plants: Nyctaginaceae. **Field Museum Botanical Series** 8(5): 304-311.

- Standley, P.C. 1931b. The Nyctaginaceae of northwestern South America. **Field Museum Botanical Series** 11(3): 73-114.
- Stemmerik, J.F. 1964. Florae malesianae precursors XXXVIII: notes on *Pisonia* L. of the Old World (Nyctaginaceae). **Blumea** 12(2): 275-284.
- Woodson Jr., R.E. & Kidd, H.J. 1961. Pp. 51-65 in: Woodson Jr., R.E., Schery, R.W. et al. (eds.), Flora of Panama IV (Nyctaginaceae). **Annals of Missouri Botanical Garden** 48:51-65.

Capítulo 1: Filogenia da tribo Pisonieae (Nyctaginaceae): delimitação genérica e evolução e caracteres morfológicos

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Taxon.



Neea hirsuta Poepp. & Endl. Extraída de Poeppig, E.- Nova genera ac species plantarum, v. 2, t.161 (1838)

Filogenia da tribo Pisonieae (Nyctaginaceae): delimitação genérica e evolução e caracteres morfológicos

RESUMO: A tribo Pisonieae Meisn. (Nyctaginaceae) apresenta um histórico taxonômico instável, devido a diversas modificações na circunscrição dos seus gêneros, efetuadas com base na consistência do antocarpio, posição dos estames no perianto e presença e tipo de glândulas adesivas no antocarpio seco. O presente trabalho objetivou investigar esse grupo, a partir de estudo filogenético, realizado com utilização de sequências de DNA nuclear (ITS) e plastidial (*rps16*), de representantes de quatro dos sete gêneros reconhecidos para a tribo. Além disso, também foi estudada a evolução de caracteres morfológicos utilizados na delimitação dos gêneros, além de dioícia, através de mapeamento estocástico bayesiano. Os resultados da análise filogenética indicam a presença de três linhagens distintas, em que o gênero *Pisonia* é apresentado como parafilético; *Pisoniella* e as espécies de *Pisonia* anteriormente segregadas no gênero *Ceodes* formam um clado monofilético caracterizado pela ausência de brácteas na base da flor, e *Pisonia sandwicensis*, previamente incluída no gênero *Rockia*, está relacionado aos gêneros *Guapira* e *Neea*, que por sua vez não são monofiléticas. Os resultados indicam ainda que *Ceodes*, incluindo *Pisoniella*, e *Rockia* devem ser ressuscitados; *Guapira* e *Neea* devem ser unidas, e *Pisonia* deve ser reduzida a um conceito estrito, correspondendo ao clado onde está inserido a espécie tipo do gênero. Os estudos das análises da evolução de caracteres mostram que estames exsertos são ancestrais em Pisonieae, porém, reversões para esse estado de caráter ocorreram na linhagem de *Guapira/Neea*, a partir de ancestral com estames inclusos e que, nesta mesma linhagem ocorreu o surgimento do antocarpio drupáceo a partir do antocarpio seco ancestral; que as glândulas adesivas e as glândulas capitatas evidentes são ancestrais em Pisonieae, enquanto as glândulas inconspícuas evoluíram duas vezes de forma independente na tribo e que a dioícia é o estado ancestral em Pisonieae, havendo duas reversões para o hermafroditismo.

Palavras-chaves: Dioícia, *Guapira*, *Neea*, *Pisonia*.

INTRODUÇÃO

Pisonieae Meisn. é uma das sete tribos de Nyctaginaceae atualmente reconhecidas (Douglas e Spellenberg, 2010), se apresentando, em geral, como plantas lenhosas e dioicas, sendo as flores estaminadas e pistiladas distintas (embora possuam verticilo do outro sexo, mas não desenvolvido) (Heimerl, 1934; Furlan & Giulietti, 2014) (Fig. 1A-B), e as folhas, em geral se oxidando quando secas, tornando se escuras. Assim como as demais tribos (exceto alguns membros da tribo basal Leucastereae), Pisonieae tem o fruto envolvido por uma estrutura derivada da porção inferior do cálice, conhecida por antocarpio (Fig.1E-G). No entanto, Pisonieae se distingue por possuir o embrião não curvado (Heimerl, 1934; Bittrich & Kühn, 1993; Furlan & Giulietti, 2014).

Pisonieae compreende sete gêneros: *Cephalotomandra* H.Karst & Triana (1-3 sp.), *Guapira* Aubl. (70 spp.), *Grajalesia* Miranda (1 sp.), *Neea* Ruiz & Pav. (80 spp.), *Neeopsis* Lundell (1 sp.), *Pisonia* L. (40 spp.), e *Pisoniella* Standl. (1-2 spp.) (Douglas & Spellenberg,

2010). Todos os gêneros apresentam distribuição restrita às áreas tropicais e subtropicais da América, com exceção de *Pisonia*, que possui um segundo centro de diversidade no Indo-Pacífico (Bogle, 1974). Esses gêneros têm sido delimitados, principalmente, com base na consistência do antocarpio, posição dos estames em relação ao perianto, formato do cálice estaminado e presença de glândulas adesivas sobre o antocarpio (Heimerl, 1889; Heimerl, 1934; Stemmerik, 1964; Furlan & Giulietti, 2014).

Cephalotomandra, assim como *Neea*, apresentam estames inclusos no cálice (Fig.1C), mas os dois gêneros podem ser caracterizados por diferenças na consistência do antocarpio, formato do cálice estaminado e número de estames. *Cephalotomandra* apresentam antocarpio seco e cálice campanulado com até 30 estames (Woodson Jr. & Kidd, 1961) enquanto *Neea* apresentam antocarpio drupáceo e o cálice, em geral, urceolado com 5-13 estames (Heimerl, 1889; Heimerl, 1934). Caso semelhante ocorre com *Guapira* e *Pisonia*: ambos apresentam perianto com estames exsertos (Fig.1D), porém, com diferenças na consistência do antocarpio, sendo seco em *Pisonia* (Fig.1F-G) e drupáceo em *Guapira* (Fig.1E) (Furlan, 1996; Furlan & Giulietti, 2014). *Pisonia* e *Pisoniella* são os únicos gêneros que apresentam glândulas adesivas sobre as linhas longitudinais do antocarpio. Entretanto, em *Pisoniella* as glândulas são evidentes, com estrutura capitata (Fig.1F) (Standley, 1911), enquanto que em *Pisonia*, além de glândulas evidentes, ocorrem também glândulas inconspícuas, e a viscosidade é secretada ao longo das próprias linhas longitudinais (Stemmerik, 1964) (Fig.1G). Já *Grajalesia* e *Neeopsis*, são segregados monotípicos de *Pisonia* e *Neea*, caracterizados pela presença de antocarpos alados (Miranda, 1950) e cálice estaminado campanulado (Lundell, 1976), respectivamente.

O primeiro tratamento para a tribo foi realizado por Bentham e Hooker (1880), no qual foram reconhecidos quatro gêneros: *Cephalotomandra*, *Pisonia*, *Neea* e *Timeroya* Benth. & Hook.f. (Fig. 2). Nos anos seguintes, Anton Heimerl foi o autor dos principais trabalhos envolvendo a tribo, sendo o maior responsável pelas mudanças na delimitação de gêneros e seções. Em sua primeira revisão, Heimerl (1889) reconheceu apenas *Neea* e *Pisonia*, reduzindo *Cephalotomandra* e *Timeroya* como seções de *Pisonia*, além de descrever outras quatro seções (*Pisoniella* Heimerl, *Glanduliferae* Heimerl, *Eupisonia* Heimerl e *Prismatocarphae* Heimerl). Como resultado, *Pisonia* teve sua ampliação ampliada, formado por seis seções (Fig. 2) morfológicamente heterogêneas. Por exemplo, as seções *Pisoniella* e *Glanduliferae* apresentam antocarpos secos com glândulas viscosas capitatas, e estames exsertos, enquanto as espécies da seção *Timeroya* também apresentam frutos secos, porém,

com glândulas inconspícuas, enquanto as espécies da seção *Eupisonia* apresentam antocarpos drupáceos e sem glândulas.

No próximo tratamento, Heimerl (1934), alterou drasticamente a circunscrição do gênero *Pisonia*, reconhecendo apenas as seções *Glanduliferae* e *Eupisonia* (Fig. 2), com base na consistência do antocarpo e presença de glândulas, enquanto as demais seções foram elevadas à categoria genérica. O gênero *Calpidia* Thouars foi ressuscitado (Heimerl, 1913a) para acomodar táxons caracterizados pela ausência de brácteas na base das flores e antocarpos secos com glândulas inconspícuas. Desta forma, *Pisonia* seção *Timeroya* e *Pisonia* seção *Prismatocarpae*, foram transferidos para *Calpidia*, como *Calpidia* seção *Timeroya* Heimerl e *Calpidia* seção *Excelsae* Heimerl, respectivamente, se distinguindo entre si pelo número de estames presentes na flor masculina (Heimerl, 1934). Além disso, uma terceira seção foi descrita, *Calpidia* seção *Paucistaminate* Heimerl (Fig. 2), caracterizada pelo rostro, estrutura estéril no ápice do antocarpo. Por outro lado, o gênero monotípico *Rockia* Heimerl, descrito em 1913 para acomodar *Pisonia sandwicensis* Hillebr., espécie endêmica do Havaí com glândulas inconspícuas e rostro, teve seu *status* genérico mantido nesse tratamento, devido à presença de brácteas na base das flores (Heimerl, 1913b) (Fig. 2). Porém, contrariando o princípio da prioridade de nomenclatura (McNeill, *et al.*, 2012), *Calpidia* foi reabilitada ao invés do nome mais antigo *Ceodes* Foster. Skottsberg (1936), de acordo com esse princípio, reabilitou *Ceodes* J.R.Forst. & G.Forst., reestabelecendo *Ceodes umbellifera* J.R.Forst. & G.Forst. como espécie-tipo, que havia sido transferida para *Pisonia* por Seemann (1862).

Questionamentos à classificação de Heimerl surgiram a partir de Standley (1911), que elevou *Pisonia* seção *Pisoniella* à categoria genérica, mudança que foi reconhecida no tratamento de Heimerl (1934) e Britton (1904), que restaurou o gênero *Torrubia* Vell., até então tratado como sinônimo de *Pisonia* seção *Eupisonia* (Heimerl, 1934) (Fig.2). Britton notou que o binômio *Pisonia obtusata* era um homônimo para dois táxons, um com antocarpos secos (*P. obtusata* Sw.) e outro drupáceo (*P. obtusata* Jacq.), discordando assim da circunscrição ampla de *Pisonia*, com inclusão de uma seção para táxons com antocarpos carnosos. Entretanto, as transferências para o gênero *Torrubia* se limitaram a algumas espécies caribenhas, e a delimitação desse gênero só foi ampliada por Standley (1911, 1916, 1931a, 1931b, 1937), em seus diversos trabalhos focados nas plantas da América Tropical. Uma nova mudança nomenclatural aconteceu no início da década de 60, quando Woodson Jr. & Kidd (1961), reabilitaram *Guapira*, outro gênero tido como sinônimo de *Pisonia* seção *Eupisonia*. Esses autores propuseram a conservação de *Guapira* sobre *Torrubia*, sob o argumento de que a ilustração-tipo do primeiro é mais passível de análise do que a de

Torrubia. Por fim, a proposta de conservação de *Guapira* sobre *Torrubia* foi aceita pelo Comitê para Espermatófita (McVaugh, 1968) e, a partir de então, *Guapira* tem sido mais aceito para abrigar espécies com flores com estames exsertos e antocarpos carnosos, e novas combinações têm sido realizadas para esse gênero (Little, 1968; Lundell, 1968; Reitz, 1970; Furlan & Giulietti, 2014) (Fig. 2). Embora *Guapira* seja aceito como um gênero distinto de *Pisonia*, seu conceito genérico ainda não está estabelecido. *Guapira*, assim como *Neea*, apresenta antocarpos drupáceos, e esses gêneros são semelhantes morfológicamente (Standley, 1931b), sendo distinguidos com base apenas na posição dos estames em relação ao perianto, que é exserto em *Guapira* e incluso em *Neea*. Isso resulta na dificuldade em diferenciar as espécies de *Guapira* e *Neea*, que são muitas vezes confundidas em herbários (Furlan, 1996), principalmente, espécimens com antocarpos maduros.

Por fim, Stemmerik (1964), revisou *Pisonia*, porém considerando apenas as espécies dos trópicos do Velho Mundo, e a circunscrição desse gênero foi novamente ampliada, passando a incluir espécies com glândulas inconspícuas. *Calpidia* foi sinonimizada e *Pisonia* seção *Timeroya* e *Pisonia* seção *Prismatocarpae sensu* Heimerl (1934) foram restauradas (Fig. 2). Já *Rockia* (Hillebr.) Heimerl e *Calpidia* seção *Paucistamineae* foram sinonimizadas sob *Pisonia* seção *Paucistamineae*, caracterizadas apenas pela presença de rostro no antocarpo, não sendo considerada a presença de brácteas na base da flor. Desde então, a única revisão realizada para a tribo (Furlan, 1996; Furlan & Giulietti, 2014) se restringiu a mudanças a nível específico. Em resumo, a atual delimitação de Pisonieae permanece controversa, sendo o resultado de um histórico instável, onde os gêneros sofreram sucessivas mudanças na sua circunscrição, algumas delas propostas em trabalhos regionais, não havendo uma revisão global para o grupo em tempos recentes.

Filogenias prévias (Douglas & Manos, 2007; Hayward & Horton, 2014), mostraram que *Guapira*, *Neea* e *Pisonia* não são grupos monofiléticos, porém não houve discussão aprofundada a respeito da delimitação desses gêneros, além da baixa amostragem de representantes de *Guapira* e *Neea*.

O presente trabalho apresenta a reconstrução filogenética de Pisonieae com base nas sequências combinadas de ITS e *rps16*, e amostrando quatro dos seis gêneros reconhecidos para a tribo. A partir dessa filogenia, foram investigadas a monofilia de *Pisonia* e suas relações com gêneros próximos, e a evolução de caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados na delimitação genérica.

Material e métodos

Amostragem

Foram amostradas 44 espécies e uma variedade de quatro dos sete gêneros reconhecidos (*Guapira*, *Neea*, *Pisonia* e *Pisoniella*) para a tribo. É estimado que a tribo Pisonieae é composta por 200 sp. (Douglas & Spellenberg, 2010), e portanto, apenas 22% das espécies da tribo foram amostrada nesse trabalho. Porém, essa estimativa não é confiável, em vista da inexistência de revisão taxonômica global para a tribo a nível específico, de forma que muitos binômios que podem ser sinônimos ou mesmo inválidos estão sendo levados em consideração nessa estimativa; assim, a proporção de espécies amostradas na filogenia em relação ao número de espécies total que compõe a tribo é incerta. Para o grupo externo, foram utilizadas três espécies do gênero *Bougainvillea* Commerson, que são representantes da tribo Bougainvilleeae Choisy, a qual é resolvida como irmã de Pisonieae (Douglas & Manos, 2007) (Anexo 1). Especificamente para *Pisonia*, foram amostradas espécies da seção *Glanduliferae* (*sensu* Heimerl, 1889; 1934; Stemmerik, 1964), bem como das seções *Prismatocarpaceae*, *Paucistaminatae* e *Timeroya sensu* Stemmerik (1964). A amostragem de *Guapira* e *Neea* se concentraram no Brasil, e algumas espécies conhecidas pela ampla distribuição geográfica e polimorfismo morfológico, como *Guapira opposita* (Vell.) Reitz e *Guapira hirsuta* (Choisy) Lundell, tiveram sequências obtidas de mais de uma amostra. Táxons amostrados, informações das espécies, e números de acesso estão listados em Anexos.

Marcadores moleculares

Para as análises filogenéticas foram utilizados sequências do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA nuclear ribossomal (nrDNA) e o íntron do gene plastídeo *rps16*. Esses marcadores foram selecionados por terem maior disponibilidade de sequências no GenBank, para espécies cujo material não pode ser obtido. A região de ITS, inicialmente, foi amplificada com utilização de *primers* universais ITS4/ITS5 (Stanford *et al.*, 2000), mas, devido à presença de bandas inespecíficas, estes foram substituídos pelo par 17SE/26SE (Sun *et al.*, 1994) (Tab. 1), específico para Angiospermas. Os *primers* *rpsF* e *rpsR2* (Oxelman *et al.*, 1997) foram utilizados para o íntron do *rps16* (Tab. 1).

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA total foi extraído de folhas frescas desidratadas em sílica gel, através do método 2 x CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Embora as folhas de muitas espécies da tribo

sofram oxidação, tornando-se escuras logo após coletadas, a extração proporcionou alíquotas em alta concentração de DNA (>1000 ng/μL), que foram diluídas entre 20 a 50 ng/μl para as ampliações. As reações de amplificação de ITS e *rps16* foram conduzidas utilizando-se 1,0μL da alíquota de DNA diluído, 7,5μL de GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); 0,6 μL de cada *primer* (10 μM), e água ultra-pura para completar o volume da reação para 10 μL. As condições da reação de amplificação de ITS foram: 1 minuto a 97°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 97°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, com acréscimo de 4 segundos de extensão por ciclo e uma extensão final de 72°C por 7 minutos (Sun et al. 1994). Para *rps16*, as condições foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 56°C e 60 segundos a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,4%, e purificados com ExoProstar® (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Após esse passo, foram conduzidas as reações de sequenciamento, utilizando-se 0,67 μL de BigDye® (Perkin-Elmer Applied technologies), 2,33 μL de tampão BigDye 5x; 5μM de primer e 1 μL de alíquota de DNA amplificado e água ultra pura para completar a reação para 10 μL. Para cada amostra, houveram duas reações, uma com o primer *Forward*, e outra com o *Reverse*, e as condições das reações de sequenciamento foram as mesmas utilizadas para as ampliações de cada região.

Alinhamento e análise filogenética

Sequências foram montadas a partir dos eletroferogramas com auxílio dos programas pregap4 e gap4 do pacote Staden (Staden *et al.*, 1998). Durante esse processo, para o marcador ITS, foram encontrados picos duplos ou triplos, sendo alguns deles polimorfismos que ocorrem em menores frequências nas múltiplas cópias do ITS, e que não foram eliminadas pela evolução em concerto. Esses polimorfismos intraindividuais (2ISPs) foram codificados com símbolos de ambiguidade e foram utilizados nas análises. As sequências foram alinhadas com auxílio do ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado no BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999), com modificações manuais posteriores realizadas no Mesquite v.3.04 (Madison & Madison, 2015). Foram realizadas análises filogenéticas dos segmentos separados, bem como em conjunto para a obtenção das árvores da máxima parcimônia e inferência bayesiana. *Gaps* das sequências foram codificados através do modelo simples de Simons & Ochoterena (2000), implementado no programa SeqState v. 1.4 (Müller, 2005), e inseridos na análise, visto que não foi detectada incongruência entre os *gaps* e os caracteres de

DNA ($P < 0,7$), de acordo com o teste de incongruência da diferença do comprimento (ILD; Farris et al., 1994), indicando que os *gaps* não contribuem para uma árvore com maior quantidade de homoplasias retidas. A análise de parcimônia, foi conduzida utilizando o programa PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2001), através de 1000 réplicas de busca heurística com a permutação de ramos do tipo TBR e retenção de 10 árvores por réplica, com um limite de 10.000 árvores salvas ($\text{maxtrees}=10.000$). Em sequência, foram filtradas as árvores com melhor *score* ($\text{filter best=yes permDEL=yes}$), e a partir delas, foi gerada uma árvore de consenso de maioria. A sustentação dos nós foi acessado pela reamostragem por *bootstrap* não-paramétrico (BS), através de 1000 réplicas com 100 adições de sequência aleatórias para cada réplica de *bootstrap*. Para a inferência bayesiana, foi utilizado o programa MrBayes v.3.2.6 implementado na plataforma CIPRES (Ronquist & Huelsenbeck, 2003; Miller et al., 2010). Os modelos de substituição nucleotídicas foram obtidos através do software jModeltest v.2.1.7 (Darriba et al., 2012), sob o critério de informação bayesiana (BIC). Para uma modelagem de evolução molecular mais precisa, ITS foi particionado em ITS1, 5.8S e ITS2, visto que essas regiões tem diferentes taxas de substituição nucleotídica. Os modelos para ITS1, 5.8S e ITS2 foram TrNef+G, TrNef e TIM3ef+G respectivamente e F81+G para *rps16*. A inferência bayesiana consistiu em quatro corridas de 50×10^6 gerações de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC), com amostragem a cada 5000 gerações. O desempenho das corridas e convergência das cadeias foram cheçadas através do software Tracer v.1.6 (Rambaut et al., 2013), utilizando, para o último, o tamanho efetivo da amostra (sigla em inglês *ESS*), sendo $\text{ESS} > 200$ um indicativo de amostragem satisfatória. As primeiras 25% das árvores da distribuição posterior foram descartadas como *burnin*, e a partir das restantes foi obtida uma árvore de consenso de maioria. As árvores resultantes das análises de parcimônia e análise bayesiana, bem como os valores de suporte dos nós por probabilidade posterior (PP) foram visualizadas com auxílio do programa FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014). Para o suporte dos nós, no caso da probabilidade posterior (PP), clados com $\text{PP} \geq 0,95$ foram considerados fortemente sustentados, enquanto valores de $\text{BS} \geq 85\%$ são indicativos de alto suporte (Kress et al., 2002). Incongruências entre as árvores individuais foram cheçadas através da comparação das árvores de MP de cada segmento. Visto que os valores de PP podem superestimar suporte dos nós, (Douady et al. 2003; Erixon et al. 2003), foi utilizado suporte de *bootstrap* para identificar clados com posições conflituosas entre as árvores (Cardoso et al., 2015), de forma que diferenças nas topologias com forte sustentação de *bootstrap* foram tratadas como incongruências.

Estimativa dos caracteres ancestrais

Para a reconstrução dos caracteres morfológicos, foram selecionados aqueles tradicionalmente utilizados na delimitação genérica como consistência do antocarpo, glândulas viscídeas, posição do estames no perianto, além da dioicidia, cujos estados estão codificados na Tabela 2. As informações sobre os caracteres analisados foram obtidas através da literatura taxonômica do grupo (Heimerl, 1889; Heimerl, 1913; Heimerl, 1934; Skottsberg,

1936; Little Jr. & Wadsworth, 1964; Stemmerik, 1964; Bogle, 1974; Friedmann, 1986; Sykes, 1987; Furlan, 1996; DeFilipps & Maina, 2003), além de análise de materiais dos acervos dos herbários FUEL, HUEFS, INPA e NTB. Outros caracteres utilizados na delimitação dos gêneros, como a forma do cálice estaminado e do estigma (Furlan & Giulietti, 2014), foram excluídos da análise devido aos diferentes termos utilizados para esses caracteres entre os tratamentos taxonômicos considerados, impossibilitando a codificação dos seus estados, sendo, portanto, necessário uma revisão taxonômica para a padronização da descrição desses caracteres.

O estado ancestral dos caracteres analisados foi estimado através do mapeamento estocástico bayesiano (Bolback, 2006), implementado no pacote Phytools v.0.4.6 (Revell, 2012) no R (R Core Team, 2015) com utilização da árvore ultramétrica de máxima credibilidade dos cladogramas obtidas a partir dos segmentos combinados através do pacote de programas Beast v.1.8.2 (Drummond & Rambaud, 2007). Esta árvore foi podada de forma que houvesse apenas um terminal representando cada espécie, com exceção de *G. opposita*, no qual um terminal proveniente do estado da Bahia (Brasil) se trata de uma espécie distinta a ser descrita. Teste de log-verossimilhança foi utilizado para selecionar o modelo de transição dentre os três disponíveis, como o modelo de um parâmetro de taxas de transição iguais (ER), o modelo simétrico com taxas frente e reverso entre os estados de caracteres iguais (SYM) e o modelo com todas as taxas de transição distintas (ARD). O mapeamento estocástico dos caracteres foi realizado através da função `make.simmap`, utilizando 1000 simulações e `Q="mcmc"` com 100.000 gerações com amostragem a cada 100 gerações.

Resultados

Dados moleculares

Para o grupo interno, foram analisadas 103 sequências das quais 74 foram obtidas pela primeira vez, enquanto as demais foram obtidas do *GenBank*. O conjunto de terminais foi o mesmo para ITS e *rps16*, com exceção de *Neea hermafrodita* S. Moore e *Pisonia aculeata* L.

(Texas), para as quais não havia sequências disponíveis no Genbank para *rps16*, e *Guapira venosa* (Choisy) Lundell, para a qual não foi possível amplificar ITS. A matriz alinhada de ITS contém 782 caracteres, dos quais 718 caracteres são nucleotídeos e 64 são gaps codificados, enquanto em *rps16*, dos 955 caracteres, 920 são nucleotídeos e 35 são gaps codificados. A região do ITS se mostrou bem mais variável, com 163 caracteres parcimônio-informativos, representando 24,3% da matriz, enquanto que em *rps16*, 63 caracteres foram parcimônio-informativos, representando apenas 6,6% da matriz. Não foram encontradas inversões nos segmentos. No total, a matriz combinada apresentou 1737 caracteres, dos quais 253 são parcimônio-informativos.

Análises filogenéticas de ITS e *rps16* individuais

As árvores obtidas a partir das análises dos segmentos ITS e *rps16*, separadamente, se mostraram congruentes entre si (Fig. 3), e as diferenças entre as topologias se deram basicamente na resolução das linhagens. A análise de parcimônia do segmento ITS gerou 10000 árvores com comprimento de 443 passos, índice de consistência (IC) = 0,559 e Índice de retenção (IR) = 0,824. A análise de *rps16* gerou 48 árvores com comprimento de 92 passos, IC=0,695 e RI=0,909. A árvore de consenso de *rps16* teve uma resolução menor nas relações entre os clados, como em *Pisonia*, com parte de suas linhagens colapsadas em uma politomia (Fig. 3). *Pisoniella arborescens* (Lag. & Rodr.) Standl. tem diferentes posições nas árvores individuais, porém, no mesmo clado (Fig. 3), prevalecendo o suporte apenas na árvore de *rps16* (BS_{rps16}=100% vs. BS_{ITS}=55%). Ocorreu também incongruência nas posições de *Guapira fragrans* (Dum.Cours.) Little e *Neea tristis* Heimerl (Fig. 3), porém, com sustentação em apenas um dos segmentos (*N. tristis*: BS_{rps16}=53% vs. BS_{ITS}=96%) ou mesmo não havendo suporte em ambos os segmentos (*G. fragrans*: BS_{rps16}=64% vs. BS_{ITS}=65%). Dessa forma, os táxons incongruentes não foram excluídos das análises, e a discussão se deu da árvore resultante dos segmentos combinados.

Análises filogenéticas de ITS e *rps16* combinados

A topologia gerada a partir dos segmentos combinados de ITS e *rps16* mostra Pisonieae como um grupo monofilético (BS= 100%, PP=1), cujos nós profundos foram resolvidos com alto suporte. Foram identificados três clados, aqui nomeados como A, B e C, sendo que clado A é apresentado como grupo irmão dos clados B e C (BS=98%, PP=1) (Fig. 4). No clado A, *Pisoniella arborescens* e o “clado Ceodes” emergem como irmãs com alta sustentação (BS=100%, PP=1). O “clado Ceodes”, formado por espécies de *Calpidia*

[=Ceodes] seções *Excelsae* e *Timeroya sensu* Heimerl (1934) ou *Pisonia* seções *Prismatocarphae* e *Timeroya* (exceto *Pisonia sandwicensis*) *sensu* Stemmerik (1964), apresentou diferenças na topologia quanto ao tipo de análise utilizado, e, em ambas, com sustentação baixa ou moderada. Na árvore de máxima parcimônia, *Pisonia brunoniana* Endl. e *Pisonia artensis* Montrouz ex Heimerl divergiram sucessivamente, com suporte de *bootstrap* baixo para ambas as relações (BS=64% e BS=58%), enquanto na árvore resultante da análise bayesiana, essas espécies compartilharam o mesmo ancestral, formando um subclado com baixo suporte (PP=0.53) que, por sua vez, é apresentado, com suporte moderado (PP=0.91), como grupo-irmão das demais espécies do clado. O clado B compreende as espécies de *Pisonia* seção *Glanduliferae* (Heimerl, 1889; Heimerl, 1934; Stemmerik, 1964) (BS=88%, PP=1), e pode ser dividido em dois subclados, B1 e B2, de acordo com a presença de espinhos no ramo. O clado B1 ou “Clado espinescente”, no qual está a espécie tipo do gênero, *Pisonia aculeata* (BS=100%, PP=1), e o clado B2, formado por dois subclados (BS=88%, PP=0.99) geograficamente estruturados. Espécies do clado B1 compreende espécies endêmicas do Caribe e Indo-Pacífico. O subclado B2 compreende espécies arbóreas não espinescentes, endêmicas da América do Sul (Fig.4). No clado C, *Pisonia sandwicensis* (*Rockia sandwicensis*, *sensu* Heimerl, 1934), é irmã do clado formado pelos gêneros *Guapira* e *Neea* (BS=86%, PP=1), que, por sua vez, não são monofiléticos (BS=83%, PP=1) (Fig.4).

Estimativa dos caracteres ancestrais

Os testes de log-verossimilhança apontaram o modelo de 1-parâmetro ER como apropriado para todos os caracteres analisados. A estimativa do caráter ancestral por meio de mapeamento estocástico mostrou que em relação ao caráter 1 (consistência do antocarpo), o antocarpo seco é plesiomórfico em Pisonieae, havendo apenas uma transição para o antocarpo drupáceo no clado C, mais especificadamente no nó ancestral do clado de *Guapira/Neea* (Fig. 5). Em relação ao tipo de glândula adesivas (caráter 2), foi inferida que o antocarpo com glândulas capitadas evidentes como o estado ancestral da tribo Pisoniae, com as glândulas inconspícuas evoluindo independentemente no “Clado Ceodes” no clado A, e na linhagem de *Pisonia sandwicensis* no clado C, embora nesse clado, onde as glândulas foram perdidas ao longo da sua evolução, o estado ancestral não pode ser estimado (Fig. 5). Em relação à posição dos estames (caráter 3), estames exsertos foi estimado como o estado ancestral da linhagem de Pisonieae, havendo uma transição do estames exsertos para estames no nível do perianto no ancestral de *Pisonia brunoniana* Endl., enquanto uma história evolutiva mais complexa ocorreu no clado C, com o surgimento do perianto com estames inclusos no nó

ancestral da linhagem de *Guapira/Neea* com reversões de estames inclusos para estames exsertos ao longo dessa linhagem, seguido por uma segunda reversão para estames exsertos (Fig. 6). A dioiccia (caráter 4) é plesiomórfica em Pisonieae, ocorrendo duas transições independentes para a flor morfologicamente hermafrodita, ambas no clado A (Fig. 6).

Discussão

Visão geral e não-monofilia de *Pisonia*

Pisonieae, tanto no presente estudo como em trabalhos prévios (Douglas & Manos, 2007; Hayward & Horton, 2014) apresenta alta sustentação como grupo monofilético, corroborando o fato de que o embrião reto, tradicionalmente utilizado para a distinção da tribo, é sinapomorfia para o grupo, visto que nas demais tribos de Nyctaginaceae, o embrião é curvado ou em forma de ferradura (Heimerl, 1934; Bittrich & Kühn, 1993). Apesar da circunscrição de Pisonieae ter um histórico estável, com exceção da transferência de *Pisoniella* para a tribo Nyctagineae-Colignoniinae na classificação de Bittrich & Kühn (1993), os resultados do presente trabalho mostraram que a delimitação dos seus gêneros não reflete sua história evolutiva. *Pisonia* não é monofilética, com parte de suas espécies compartilhando ancestrais com *Pisoniella*, *Guapira* e *Neea*. Dessa forma, discute-se a seguir a delimitação genérica da tribo Pisonieae, proposta por tratamentos taxonômicos tradicionais, bem como a história evolutiva de caracteres utilizados na distinção dos gêneros, como a posição do estame no perianto, além do dimorfismo das flores, e, por fim, suas implicações para a reorganização taxonômica da tribo.

Delimitação genérica

Relações filogenéticas no clado A: *Pisoniella*+*Ceodes*

O clado A tem como sinapomorfia morfológica a ausência de brácteas na base da flor. *Pisoniella arborescens* ocorre nas áreas altas da região central do México, e também na região andina da Bolívia e Argentina, embora populações dessa última região, não amostradas neste trabalho, têm sido tratados como uma espécie distinta, *Pisoniella glabrata* (Heimerl) Standl. (Standley, 1911). Já as espécies do “clado *Ceodes*” ocorrem nos trópicos do velho Mundo, exceto África, principalmente, nas ilhas do Indo-Pacífico e Australásia, com algumas espécies se estendendo ao sudeste asiático.

Pisoniella se distingue dos demais gêneros de Pisonieae por apresentar inflorescências umbeladas, além de ter hábito arbustivo, incomum na tribo, indicando ser uma adaptação a

áreas de alta altitude. Nos resultados das análises filogenéticas, o “clado Ceodes” se mostrou monofilético, embora com sustentação baixa, corroborando a proposta de Heimerl (1913b; 1934) de tratar espécies com flores sem brácteas e antocarpos secos, com viscosidade secretada ao longo das linhas longitudinais por glândulas inconspícuas, como um gênero distinto de *Pisonia*. Porém, as glândulas inconspícuas não podem ser consideradas sinapomorfia para esse clado, visto que esse estado de caráter é homoplásico.

No clado A, o “clado Ceodes” compartilha com *Pisoniella* um ancestral comum mais recente. Interessantemente, essa relação já havia sido notada por Heimerl (1913b), a partir de dados palinológicos. De acordo com esse autor, *Pisoniella* e *Calpidia* compartilham o pólen do tipo pantoporado, enquanto que em *Pisonia* seção *Glanduliferae* e *Pisonia* seção *Eupisonia* [= *Guapira*], o pólen é do tipo tricolpado. A partir da reconstrução do estado ancestral da forma do pólen no estudo filogenético de Nyctaginaceae de Douglas & Manos (2007), é possível inferir que o pólen pantocolpado é o estado de caráter ancestral em Pisonieae, sendo conservado nas espécies do clado A. Uma análise mais detalhada da morfologia polínica em Pisonieae resultaria no incremento de dados para a caracterização dos seus clados.

Considerando apenas as espécies analisadas no presente trabalho, o hermafroditismo é restrito ao clado A (Fig. 5), tendo evoluído de forma independente em *Pisoniella arborescens* e *Pisonia brunoniana*. Skottsberg (1941) descreveu o gênero *Heimerliodendron*, transferindo *P. brunoniana* para esse gênero, com base no hermafroditismo floral. As análises filogenéticas não corroboram *Heimerliodendron* como um gênero distinto, ao invés disso, *P. brunoniana* está imersa no “clado Ceodes”, embora sua relação com outras espécies desse clado não indique sustentação. Além disso, Stemmerik (1964) considerou *P. brunoniana* como sinônimo de *Pisonia umbellifera*, o que também não apresentou sustentação nas análises. *Pisonia umbellifera* é uma espécie dioica com ampla distribuição geográfica e, nos resultados das análises filogenéticas, é apresentada como irmã de *Pisonia wagneriana* Fosberg, táxon endêmico da ilha de Oahu, no Havaí, que pode ser incluída entre as variações de *P. umbellifera* (Fosberg, 1987). Sob o modelo bPTP (*Bayesian poisson tree process*) para a delimitação de espécies filogenéticas (Zhang *et al.*, 2013), *P. wagneriana* e *P. umbellifera* podem ser considerados como uma única espécie, porém com suporte moderado (PP=0,86).

Foi observado também, no clado A (Fig. 4), a presença de táxons geograficamente isolados em ramos longos, como por exemplo, *Pisonia sechellarum* F.Friedmann, que é endêmica da ilha Silhouette (Seychelles), no Oceano Índico, Esta espécie é semelhante a *P. umbellifera* se diferenciando pelo lobo do cálice pistilado não reflexo (Friedmann, 1987). Seychelles é um arquipélago com origem Gonduânica, com histórico de isolamento de ca. 65

milhões de anos, quando se separou do subcontinente indiano (Plummer, 1998). O ramo longo em *P. sechellarum* poderia ser explicada pelo acúmulo de mudanças nas sequências de DNA através da deriva genética, decorrente do longo isolamento geográfico da espécie. Como ramos longos podem ser efeito da baixa amostragem de táxons (Heath *et al.*, 2008), é necessário avaliar o tamanho dos ramos no clado A com a inclusão de mais táxons, como as endêmicas da Polinésia Francesa *Pisonia amplifolia* (Heimerl) J.Florence, e *P. brownii* J.Florence (Florence, 2004), em estudos futuros.

Heimerl (1934) dividiu o gênero *Calpidia* [= *Ceodes*] em três seções, das quais duas foram amostradas no presente trabalho: *Calpidia* seção *Excelsae* e *Calpidia* seção *Timeroya*. Essas seções foram transferidas para o gênero *Pisonia* por Stemmerik (1964), com *Calpidia* seção *Excelsae* correspondendo a *Pisonia* seção *Prismatocarpae*. As análises mostraram que os representantes dessas seções estão intercalados no clado, porém, com baixa sustentação. *Calpidia* seção *Timeroya*, composta por *Pisonia artensis*, endêmica da Nova Caledônia, é caracterizada pela presença de flor estaminada com até 40 estames (Heimerl, 1934). Dessa forma, o alto número de estames deve ser considerado como um estado de caráter autopomórfico de *P. artensis*.

Relações filogenéticas no clado B: *Pisonia* s.s.

O clado B, formado por espécies de *Pisonia* seção *Glanduliferae* (Heimerl, 1889, 1934; Stemmerik, 1964), uma linhagem monofilética, sustenta a redução da circunscrição de *Pisonia*, de forma a corresponder apenas ao clado B, já que *Pisonia aculeata* L., a espécie-tipo do gênero, está incluída nesse clado. Apesar de monofilética, ainda não foi possível identificar sinapomorfias para *Pisonia* seção *Glanduliferae* (a partir de agora *Pisonia* s.s.). Glândulas capitatas evidentes ao longo das linhas do antocarpos têm sido tradicionalmente utilizadas na caracterização desse grupo (Heimerl, 1889, 1934; Stemmerik, 1964; Bogle, 1974), porém, esse estado de caráter é plesiomórfico, sendo apresentado também por *Pisoniella*, no clado A. Por outro lado, o clado B pode ser caracterizado por uma combinação de caracteres, tais como inflorescências em cimeiras, flores bracteoladas e antocarpos com glândulas evidentes.

No clado B, as espécies com espinhos e lianescentes, e as espécies arborescentes sem espinhos, apareceram em subclados distintos. O subclado B1 tem como sinapomorfia a presença de espinhos no ramo. No entanto, a baixa resolução na relação observada nesse subclado reflete observada a similaridade morfológica entre as suas espécies, as quais são fracamente diferenciadas. O gênero monotípico *Grajalesia* compartilha com os táxons do

subclado B1 a presença de espinhos e o padrão de ramificação, se diferenciando pela modificação das linhas longitudinais do antocarpo em asas. As análises baseadas em sequências de *matK* (N. Douglas, dados não publicados) corroboram a presença de uma linhagem espinescente em *Pisonia* s.s. na qual esta inclusa *Grajalesia fasciculata* (Standl.) Miranda. Isso indica que *Grajalesia* não tem sustentação como um gênero distinto, sendo um segregado de *Pisonia* s.s. baseado em estado de carácter automórfico. *Pisonia aculeata*, a única espécie de Pisonieae com distribuição pantropical, foi representada apenas por três amostras provenientes da América do Sul (Sul do Brasil), Caribe (Dominica), e do limite de distribuição da espécie na América do Norte (Texas). No entanto, não foram incluídas amostras dos trópicos do Velho Mundo, e a hipótese de que essa espécie foi introduzida nessas regiões (Spellenberg, 2003) poderia ser testada através de uma abordagem filogeográfica.

O subclado B2 de *Pisonia* s.s. é formado por duas linhagens irmãs de árvores não espinescentes, estreitamente relacionadas com sua distribuição geográfica. Uma das linhagens é formada por espécies restritas ao Caribe como *P. albida* (Heimerl) Britton, *P. rotundata* Griseb., *P. taina* Trejo e *P. subcordata* Sw., além da não caribenha *P. grandis* R.Brown, da região Indo-Pacífico, cujo padrão de distribuição pelas ilhas está relacionado à sua dispersão por aves marinhas (Burguer, 2005). De forma muito interessante, é notável a dominância de *P. grandis* em áreas de colônias de aves marinhas nas ilhas e atóis, o que sugere a preferência dessas espécies por áreas ricas em nutrientes do guano das aves para a germinação das sementes (Shaw, 1952). A observação de que espécies da linhagem caribenha apresentam associação com rochas calcáreas (Shaw, 1952, Little Jr. & Wadsworth, 1964; Spellenberg, 2003, Trejo-Torres, 2005) poderia ser um caso de conservatismo de nicho filogenético. O fato de *P. grandis* estar embebida na linhagem caribenha do subclado B2, sugere que houve um evento de colonização do Indo-Pacífico a partir do Caribe. No entanto, a dispersão para o Indo-Pacífico da linhagem caribenha necessita de maior investigação, de modo a testar a hipótese de que a linhagem caribenha apresente divergência mais antiga que aquela mostrada na datação de Hayward & Horton (2010), com a colonização do Indo-Pacífico ocorrendo antes da formação da mesoamérica como barreira geográfica entre essa região e o Caribe, no Plioceno, entre ca. 4,2-3,5 m.a.a. (Graham, 2003). Provavelmente, a associação com ambientes calcáreos é uma condição ancestral nessa linhagem, e foi conservada durante a colonização do Indo-Pacífico. Isso explicaria o predomínio de *P. grandis* em atóis de rochas calcáreas, mas não nas ilhas vulcânicas. Apesar do papel das aves marinhas na dispersão de *P. grandis*, o predomínio dessa espécie em atóis de rochas calcáreas, provavelmente, é uma retenção da preferência ancestral por esse substrato, o que pode ter impedido sua colonização

em larga escala de ambientes geologicamente distintos como ilhas vulcânicas. A linhagem irmã da linhagem caribenha é formada por espécies da América do Sul.

Na linhagem sul-americana do subclado B2, *Pisonia floribunda* Hook.f. é endêmica das Ilhas Galapagos, embora, possivelmente, ocorra na parte continental do Equador (Harling, 2010). Apesar de possuir antocarpos secos, essa espécie foi transferida erroneamente para o gênero *Torrubia* por Standley (1931b), a partir de um material com antocarpo jovem, cuja consistência não foi verificada por esse autor. *Pisonia ambigua* Heimerl e *Pisonia zapallo* Griseb. ocorrem no leste da Bolívia, com *P. zapallo* se estendendo ao norte da Argentina, e *P. ambigua* alcançando a região sul e até algumas regiões do leste do Brasil (Furlan & Giulietti, 2014). Essas espécies, no entanto, colapsaram em uma politomia, devido a insuficiência de caracteres informativos, o que impossibilita maiores discussões.

Relações filogenéticas no clado C: *Rockia*+*Guapira*/*Neea*

No clado C, *Pisonia sandwicensis*, endêmica do Havaí, compartilha o mesmo ancestral com a linhagem formada pelos gêneros neotropicais *Guapira* e *Neea*. Outros casos de estreita relação entre linhagens havaianas e neotropicais têm sido documentados, como em *Gunnera* (Gunneraceae) (Wanntorp & Wanntorp, 2003), Polyodiaceae (Geiger *et al.*, 2007) e a tribo Vinceae (Apocynaceae) (Simões *et al.*, 2016). Os resultados das análises do presente trabalho corroboram a proposta de Heimerl (1913b) de transferir *P. sandwicensis* para *Rockia*, um gênero distinto de *Calpidia* [= *Ceodes*], caracterizado pela presença de brácteas na base da flor, além de pólen tricolpado. O fato de *P. sandwicensis* estar distantemente relacionado do “grupo *Ceodes*” do clado A, sugere que a presença de glândulas inconspícuas é homoplásico em Pisonieae, apesar de ambos apresentarem glândulas nos antocarpos. Posteriormente, Stemmerik (1964) fez o caminho inverso, e *Rockia sandwicensis* (Hillebr.) Heimerl foi transferida para *Pisonia* seção *Paucistaminatae* que compreende espécies da Papua Nova Guiné, como *Pisonia longistrostris* T. & B. e *Pisonia diandra* Pulle, devido a presença do rostro, uma estrutura estéril na parte superior do antocarpo, subtendido por uma coroa apical derivado dos lobos do cálice persistente, podendo alcançar comprimento de cerca de 40cm em *P. longistrostris*, espécie que não foi incluída no presente trabalho.

É possível que o rostro seja derivado do espessamento de tecido que circunda parte do estilete, na parte superior do perigônio feminino. Essa estrutura parece isolar o ovário na flor, é encontrada em *P. sandwicensis* e nas espécies de *Guapira* e *Neea*, sendo uma potencial sinapomorfia do clado C. Porém, estudos ontogenéticos são necessários para confirmar o

rostro como sendo estrutura derivada do espessamento de tecido. Além disso, é necessário a realização de novas análises filogenéticas, com inclusão de outras espécies com rostro, como por exemplo, *P. diandra* e *P. longirostris*, para testar a relação dessas espécies com o clado C, mais especificamente com a linhagem de *Rockia*.

Dentro do clado C é encontrada a única linhagem da tribo Pisonieae com antocarpos drupáceos, formada por *Guapira* e *Neea*. No entanto, trabalhos prévios (Douglas & Manos, 2007; Hayward & Horton, 2010) mostraram que esses gêneros não correspondem a clados distintos. Ainda sim, não ficou claro se essa relação era de fato parafilética ou simplesmente melhor explicada pela baixa amostragem ou mesmo pela identificação dos terminais incluídos nas análises. Amostragem aumentada de terminais nesse trabalho confirma a não-monofilia de *Guapira* e *Neea*, no qual suas espécies estão mescladas entre si no clado. Esse resultado não é surpreendente, visto que não há uma clara distinção morfológica entre esses gêneros, a qual é baseada apenas na posição dos estames no perianto, sendo exerto em *Guapira* e incluso em *Neea*. Caracteres alternativos tem sido utilizados na distinção desses gêneros (Furlan & Giulietti, 2014), porém tem se mostrado inconstantes (Standley, 1931b). Dessa forma, as análises sustentam a transferência das espécies de *Neea* sob o nome mais antigo *Guapira*, como proposto em trabalhos de taxonomia tradicional (Burguer, 1983; Pool, 2001). A baixa resolução das relações entre as espécies e os ramos curtos (Fig. 4) são evidências de uma recente radiação de taxons com antocarpos drupáceos na evolução da tribo Pisonieae.

Evolução dos caracteres morfológicos e implicações taxonômicas em Pisonieae

Os resultados das análises de estimativa do estado de caráter ancestral mostram que o ancestral comum mais recente das linhagens de Pisonieae tinha antocarpos secos e glândulas adesivas capitatas. Isso explica a não-monofilia de *Pisonia*, cuja circunscrição tradicional (Heimerl, 1889, 1934; Stemmerik, 1964) é baseada em estados de caracteres plesiomórficos e homoplásicos. Dessa forma, a circunscrição de *Pisonia* deve ser reduzida de forma a apenas corresponder ao clado B, embora não seja conhecida sinapomorfia morfológica, visto que a presença de glândulas capitadas é um estado de carácter plesimórfico, retido nesse clado e em *Pisoniella*, no clado A. As glândulas inconspícuas, por sua vez, é um estado de carácter homoplásico, que evoluiu independentemente no “clado Ceodes” (clados A) e *Pisonia sandwicensis* (clado C) (Fig. 5). Essas linhagens apresentam distribuição insular, no Indo-Pacífico e também no sudeste asiático e partes da Australásia, o que sugere que, por favorecer dispersão a longa distância, a presença das glândulas é vantagem adaptativa. Porém, *P. sandwicensis* é endêmica do arquipélago havaiano, e a associação específica desta espécie

com um baixo número de fungos micorrízicos, possivelmente, endêmicos desta região (Hayward & Hynson, 2014), poderia estar impedindo sua dispersão para outras ilhas do Indo-Pacífico. Desta forma, as análises sugerem a reabilitação do gênero *Ceodes*, porém com a sinonimização de *Pisoniella* sob esse gênero, de forma a corresponder ao clado A, uma vez que a circunscrição desse gênero restrito ao “clado *Ceodes*” encontrou baixo suporte nas análises (Fig. 4). Por outro lado, *P. sandwicensis* como irmã de *Guapira/Neea* deve ser transferida para o gênero *Rockia* a ser ressuscitada. Além disso, a delimitação de *Rockia* pode ser novamente alterada em futuros estudos, dependendo da posição filogenética de outros táxons com antocarpos rostrados. *Pisonia sandwicensis* se separou antes da origem dos antocarpos carnosos, que evoluíram uma única vez em Pisonieae, na linhagem de *Guapira/Neea* (Fig. 5).

Os antocarpos drupáceos parecem ser uma inovação evolutiva em Pisonieae, pois estão associados com a mudança da estratégia de dispersão do antocarpo, baseada na endocoria. Essa forma de dispersão pode ter sido vantajosa na colonização de ambientes continentais, pois ao contrário dos antocarpos com glândulas adesivas, antocarpos endocóricos são dispersos em distâncias menores, o que pode ter permitido a colonização de diferentes formações vegetacionais dos Neotrópicos e, conseqüentemente, resultado em uma irradiação de táxons com antocarpos carnosos, como evidenciado pelo grande número de espécies descritas para *Neea*, por exemplo (Hernandez-Ledezma *et al.*, 2015), apesar do número de espécies descritas para Pisonieae não estar ainda claro, devido a ausência de uma revisão para a tribo. Apesar de *Guapira* e *Neea* compartilharem os antocarpos drupáceos, esses gêneros vêm sendo tratados como distintos, com base na posição dos estames no perianto, sendo exserto em *Guapira* e incluso em *Neea*. A história complexa da posição dos estames no clado C, mostra que esse caracter é altamente homoplásico (Fig. 6), não sendo útil para a delimitação dos gêneros com antocarpos carnosos. No entanto, as pressões evolutivas para a mudança da posição dos estames em *Guapira/Neea* ainda não são conhecidas e podem estar relacionadas com interações com polinizadores, sendo necessário testar a hipótese de que em *Guapira/Neea* está ocorrendo uma divergência de linhagens com diferentes posições de estames no perianto em resposta a mudanças de polinizadores. Apesar dos resultados das análises filogenéticas indicarem *Guapira* e *Neea* como um único gênero, a ausência de amostra da espécie-tipo de *Neea* (*Neea verticillata* Ruiz & Pav.), assim como a baixa sustentação obtida para relações entre os táxons desses gêneros, não permitem uma proposta para sua reorganização taxonômica no presente trabalho. Além, disso, é necessário confirmar se *Guapira eggersiana* Heimerl, amostrada nas análises, é sinônimo da espécie-tipo do gênero

(*G. guianensis* Aubl.) como tem sido sugerido (Woodson Jr. & Kidd, 1961). Por fim, estudos futuros, envolvendo técnicas de sequenciamento de próxima geração poderão fornecer maior resolução na relação entre as espécies de *Guapira* e *Neea*, como observado em outras linhagens de origem recente, como *Inga* (Nicholls *et al.*, 2015).

A estimativa de caráter ancestral mostra que o ancestral comum de Pisonieae era dióico, ocorrendo duas reversões independentes para hermafroditismo no clado A (Fig. 6). No entanto, a dioícia em Pisonieae é morfológica, devido ao dimorfismo morfológico das flores, ainda que órgãos não-funcionais do sexo oposto ocorram nas flores pistiladas e estaminadas. Funcionalmente, a sexualidade em Pisonieae é mais complexa, sendo que as espécies de Pisonieae não parecem estritamente dióicas, visto que foram observados antocarpos em inflorescências de flores estaminadas em *Guapira opposita*, por exemplo (F. Rossetto, obs. pess.), sendo portanto, indício de que o pistiloidio em flores estaminadas, sob certas condições ainda não compreendidas, passam a ser funcionais. Evolução de hermafroditismo em grupos dioicos foi também observado na tribo Vanguerieae (Rubiaceae) (Razafimandimbison *et al.*, 2009), e da mesma forma como observado em Pisonieae, não houve irradiação de táxons hermafroditas. Portanto, a dioícia morfológica pode ser uma vantagem adaptativa, mesmo na colonização de ilhas, cujas populações precisam ser fundadas por plantas pistiladas e estaminadas. A manutenção da dioícia morfológica ao longo da evolução de Pisonieae pode estar relacionada a processos ecológicos e genéticos (Barrett & Hough, 2012) que precisam ser esclarecidos. Por outro lado, *Pisonia brunoniana* e *Pisoniella arborescens*, são morfológicamente hermafroditas por causa da ausência de flores sexualmente dimórficas. Estudos reprodutivos são necessários para testar a hipótese da presença de auto-compatibilidade nas espécies hermafroditas de Pisonieae, além de avaliar se suas populações estão em um cenário de “garantia reprodutiva” (Weeks *et al.*, 2013), no qual o hermafroditismo seria vantajoso sobre a dioícia.

Os resultados dos estudos de evolução de caracteres mostram que estames exsertos são ancestrais em Pisonieae, porém, reversões para esse estado de caráter ocorreram na linhagem de *Guapira/Neea*, a partir de ancestral com estames inclusos e que, nesta mesma linhagem ocorreu o surgimento do antocarpo drupáceo a partir do antocarpo seco ancestral; que as glândulas adesivas e as glândulas capitatas evidentes são ancestrais em Pisonieae, enquanto as glândulas inconspícuas evoluíram duas vezes de forma independente na tribo e que a dioícia é o estado ancestral em Pisonieae, havendo duas reversões para o hermafroditismo.

LITERATURA CITADA

- Barrett, S.C.H. & Hough J.** 2012. Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*: 1-16. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers308>
- Bentham, G. & Hooker, J.** 1880. *Genera plantarum ad exemplaria imprimis in herbariis kewensibus servata definite*, vol.3 pt.1 London: Reeve.
- Bittrich, V. & Kühn, U.** 1993. Nyctaginaceae. Pp. 473-486 in: Kubitzki, K.; Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (eds.) *The families and genera of flowering plants*. Berlin: Verlag
- Bogle, A.L.** 1974. The genera of Nyctaginaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor*. 55: 1-37.
- Bollback, J.P.** 2006. SIMMAP: Stochastic character mapping of discrete traits on phylogenies. *BMC Bioinformatics* 7: 88.
- Britton, N.L.** 1904. On *Pisonia obtusata* and its allies. *Bull. Torrey Bot. Club* 31: 611-615.
- Burger, W.** 1983. Nyctaginaceae in: Burger, W. (ed.), *Flora Costaricensis, Fieldiana, Bot.* 13: 180-199.
- Burger, A.E.** 2005. Dispersal and germination of seeds of *Pisonia grandis*, an Indo-Pacific tropical tree associated with insular seabird colonies. *Journal of Tropical Ecology* 21: 263-271. <http://dx.doi.org/10.1017/S0266467404002159>
- Cardoso, D.; São-Mateus, W.B.; Cruz, D.T.; Zartman, C.E.; Komura, D.L.; Kite, G.; Prenner, G.; Wieringa, J.J.; Clark, A.; Lewis, G.; Pennington, R.T. & Queiroz, L.P.** 2015. Filling in the gaps of the papilionoid legume phylogeny: The enigmatic Amazonian genus *Petaladenium* is a new branch of the early-diverging Amburaneae clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 84:112-124.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D.** 2012. jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- DeFilipps R. A. & Maina S. L.** 2003. Nyctaginaceae. Pp.23-55 in: Jansen-Jacobs, M.J. (ed.), *Flora of the Guianas* 22A. Kew: Royal Botanical Gardens.
- Douady, C.J., Deusuc, J., Boucher, Y., Doolittle, W.F. & Douzery, E.J.P.** 2003. Comparison of bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetics reliability. *Mol. Biol. Evol.* 20: 248-254.
- Douglas, N.A. & Manos, P.S.** 2007. Molecular phylogenetic of Nyctaginaceae: taxonomy, biogeography and characters associated with a radiation xerophytic genera in North America. *Amer. J. Bot.* 94: 856-872. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.94.5.856>
- Douglas, N. & Spellenberg, R.** 2010. A new tribal classification of Nyctaginaceae. *Taxon* 59: 905-910.

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A.** 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analyses by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>
- Erixon, P.; Sennblad, B.; Britton, T. & Oxelman, B.** 2003. Reliability of Bayesian Posterior Probabilities and Bootstrap Frequencies in Phylogenies. *Syst. Biol.* 52: 665-673.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C.** 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Florence J.** 2004. *Flore de la Polynésie Française, vol.2*. Paris: IRD Editions.
- Forsberg, F.R.** 1987. A new *Pisonia* (Nyctaginaceae) from the Hawaiian Islands. *Phytologia* 62: 177-178.
- Friedmann, F.** 1986. Étude de la structure du périanthe chez des *Pisonia* paléotroupiques et description de *P. sechellarum* sp. nov. (Nyctaginaceae). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., B, Adansonia* 8: 383-392.
- Furlan, A.** 1996. *A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil*. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Furlan, A. & Giulietti, A.M.** 2014. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 32: 145-268.
- Geiger, J.M.O.; Ranker, T.O.; Ramp Neale, J.M. & Klimas, S.T.** 2007. Molecular biogeography and origins of the Hawaiian fern flora. *Brittonia* 59: 142-158.
- Graham, A.** 2003. Historical Phytogeography of Greater Antilles. *Brittonia* 55: 357-383.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Harling, G.** 2010. Nyctaginaceae in: Harling G. & Persson, C. (eds.). *Flora of Ecuador*, n. 86. Göteborg: Göteborg University, 79p.
- Hayward, J. & Horton, T.R.** 2014. Phylogenetic trait conservation in the partner choice of a group of ectomycorrhizal trees. *Molecular Ecology* 23: 4886-4898. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12903>
- Heath, T.A., Hedtke, S.M. & Hillis, D.M.** 2008. Taxon sampling and the accuracy of phylogenetics analyses. *Journal of Systematics and Evolution* 46: 239-257.
- Hayward, J. & Lynson, N.A.** 2014. New evidence of ectomycorrhizal fungi in the Hawaiian islands associated with the endemic host *Pisonia sandwicensis* (Nyctaginaceae). *Fungal Ecology* 12: 62-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2014.09.001>

- Heimerl, A.** 1889. Nyctaginaceae. Pp. 14-32 in: Engler, A. & Prantl, K.(eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, vol. 1b. Leipzig: Engelmann.
- Heimerl, A.** 1913a. Über die-Nyctaginaceen-Gattung *Calpidia*. *Oesterr. Bot. Z.* 63: 19-21.
- Heimerl, A.** 1913b. Die Nyctaginaceen-Gattungen *Calpidia* und *Rockia*. *Oesterr. Bot. Z.* 63: 279-290.
- Heimerl, A.** 1934. Nyctaginaceae. Pp. 86-134 in: Engler, A. & Prantl, K. (eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, vol. 16c. Berlin: Duncker & Humblot.
- Hernández-Ledesma, P.; Berendsohn, W.G.; Borsch, T.; Von Mering, S.; Hossein, A.; Arias, S.; Castañeda-Noa, I.; Eggli, U.; Eriksson, R.; Flores-Olvera, H.; Fuentes-Bazán, S.; Kadereit, G.; Klak, C.; Korotkova, N.; Nyffeler, R.; Ocampo, G.; Ochoterena, H.; Oxelman, B.; Rabeler, R. K.; Sanchez, A.; Schlumpberger, B;O. & Uotila.** 2015. A taxonomic backbone for the global synthesis of species diversity in the angiosperm order *Caryophyllales*. *Willdenovia* 45:281-383.
- Kress, W.J.; Prince, L.M. & Williams, K.J.** 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *Amer. J. Bot.* 89: 1682-1696.
- Little Jr., E.L. & Wadsworth, F. H.** 1964.*Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands*. Washington, DC.: U.S. Department of Agriculture, Forest Service.
- Little Jr., E.L.** 1968. Transfers to *Guapira* from *Torrubia* (Nyctaginaceae). *Phytologia* 17:367-368.
- Lundell, C.L.** 1962. Plantae Mayanae-V. *Wrightia* 2(3): 21-36.
- Lundell, C.L.** 1968. Studies of Tropical American Plants-V. *Wrightia* 4: 79-96. **Lundell, C.L.** 1976. Studies of Tropical American Plants-XII. *Wrightia* 5: 241-259. **Maddison, W.P. & Maddison, D.R.** 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, version 3.04, <http://mesquiteproject.org>
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'Homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H. & Turland, N.J. (eds.).** 2012. *International code of botanical nomenclature (Melbourne Code): Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011*. Regnum Vegetabile 154.
- McVaugh, R.** 1968. Report of the Committee for Spermatophyta. *Taxon* 17: 462-466.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T.** 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Pp. 1-8 in: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (CGE)*. New Orleans.

- Miranda, F.** 1950. Algunas novedades de la flora de Chiapas. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México* 21: 299-302.
- Müller, K.** 2005. SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics*, 4: 65-69. <http://dx.doi.org/10.2165/00822942-200504010-00008>
- Nicholls, J.A., Pennington, R.T., Koenen, E.J.M., Hughes, C.E., Hearn, J., Bunnefeld, L., Stone, G.N. & Kidner, C.** 2015. Using target enrichment of nuclear genes to increase phylogenetic resolution in the neotropical rain forest genus *Inga* (Leguminosae: Mimosoideae). *Frontiers in Plant Science* 6: 1-20.
- Oxelman, B., Liden, B. & Bergundi, D.** 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206: 393-410.
- Plummer, Ph.S.** 1995. Ages and geological significance of the igneous rocks from Seychelles. *Journal of African Earth Sciences* 20: 91-101.
- Pool, A.** 2001. Nyctaginaceae. Pp. 1581-1592 in: Stevens, W.D., Ulloa, C., Pool, A. & Montiel, O.M, (eds.), *Flora de Nicaragua*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.
- R Core Development Team.** 2015. R: A Language and Environment for Statistic Computing. <http://www.r-project.org>
- Rambaut, A.** 2014. FigTree, version 1.4.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rambaut, A. & Drummond, A.J.** 2013. Tracer, version 1.6. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Razafimandimbison, S.G., Lantz, H., Mouly, A. & Bremer, B.** 2009. Evolutionary trends, major lineages, and new generic limits in the dioecious group of the tribe Vanguerieae (Rubiaceae): insights into the evolution of the functionally dioecy. *Annals of the Missouri Botanical Gardens* 96:161-181. <http://dx.doi.org/10.3417/2006191>
- Reitz, R.** 1970. *Flora Ilustrada Catarinense: Nictagináceas*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Revell, L.J.** 2012. Phytools: An R package for phylogenetics comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* 3: 317-223.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Shaw, H.K.A.** 1952. On the Distribution of *Pisonia grandis* R.Br. (Nyctaginaceae), with Special Reference to Malaysia. *Kew Bulletin* 7: 87-97.
- Simmons, M.P. & Ochoterena, H.** 2000. Gaps as Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses. *Syst. Biol.* 49: 369-381.
- Simões, A.O., Kinoshita, L.S., Koch, I., Silva, M.J. & Endrees, M.E.** 2016. Systematics and character evolution of Vinceae (Apocynaceae). *Taxon* 65: 99-122.

- Skottsberg, C.** 1936. The arboreal Nyctaginaceae of Hawaii. *Svensk Bot. Tidskr.* 30: 722-743.
- Skottsberg, C.** 1941. Heimerliodendron nov. nom. *Svensk Bot. Tidskr.* 30: 364.
- Spellenberg, R.** 2003. Nyctaginaceae. In: Flora of North America Editorial Committee (ed.), *Flora of North America north of Mexico*, vol. 4, New York, Oxford: University Press. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=10617 (accessed 2 Feb 2016).
- Staden, R., Beal, K. and Bonfield, J.K.** 1998. The Staden package. Pp. 115-130 in: Misener, S. and Krawels, S.A. (eds.), *Computer Methods in Molecular Biology* 132, Bioinformatics Methods and Protocols. Totowa: Humana Press Inc.
- Standley, P.C.** 1911. The Allioniaceae of Mexico and Central America. *Contributions from the United States National Herbarium* 13: 377-430.
- Standley, P.C.** 1916. Studies of tropical american phanerogams: new or notable Allioniaceae. *Contributions from the United States National Herbarium* 18(3): 98-101.
- Standley, P.C.** 1931a. Studies of American plants-V: Nyctaginaceae. *Field Museum Botanical Series* 8(5): 304-311.
- Standley, P.C.** 1931b. The Nyctaginaceae of northwestern South America. *Field Museum Botanical Series* 11(3): 73-114.
- Stanford, A.M., Harden, R. & Parks, C.R.** 2000. Phylogeny and biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data. *Am. J. Bot.* 87: 872-882.
- Stemmerik, J.F.** 1964. Florae praecursores XXXVIII. Notes on *Pisonia* L. on the Old World (Nyctaginaceae). *Blumea* 12: 275-284.
- Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G.H. & Huang, S.H.** 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 89: 26-32.
- Swofford, D.L.** 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10 Beta. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Sykes, W.R.** 1987. The parapara, *Pisonia brunoniana* (Nyctaginaceae). *New Zealand Journal of Botany* 25: 459-466.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

- Trejo-Torres, J.C.** 2005. A new rare tree species from Puerto Rico, *Pisonia taina* (Nyctaginaceae). *Harvard Papers in Botany* 10: 117-122.
- Wanntorp L. & Wanntorp H.E.** 2003. The biogeography of *Gunnera* L.: Vicariance and dispersal. *Journal of Biogeography* 30: 979–987.
- Weeks, S.C., Brantner, J.S., Astrop, T.I., Ott, D.W. & Rabet, N.** 2013. The Evolution of Hermaphroditism from Dioecy in Crustaceans: Selfing Hermaphroditism Described in a Fourth Spinicaudatan Genus. *Evol. Biol.* 41:251-261. <http://dx.doi.org/10.1007/s11692-013-9265-0>
- Woodson Jr., R.E. & Kidd, H.J.** 1961. Pp. 51-65 in: Woodson Jr., R.E., Schery, R.W. et al. (eds.), Flora of Panama IV (Nyctaginaceae). *Annals of Missouri Botanical Garden* 48:51-65.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A.** 2013. A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. *Bioinformatics* 29: 2869-2876.

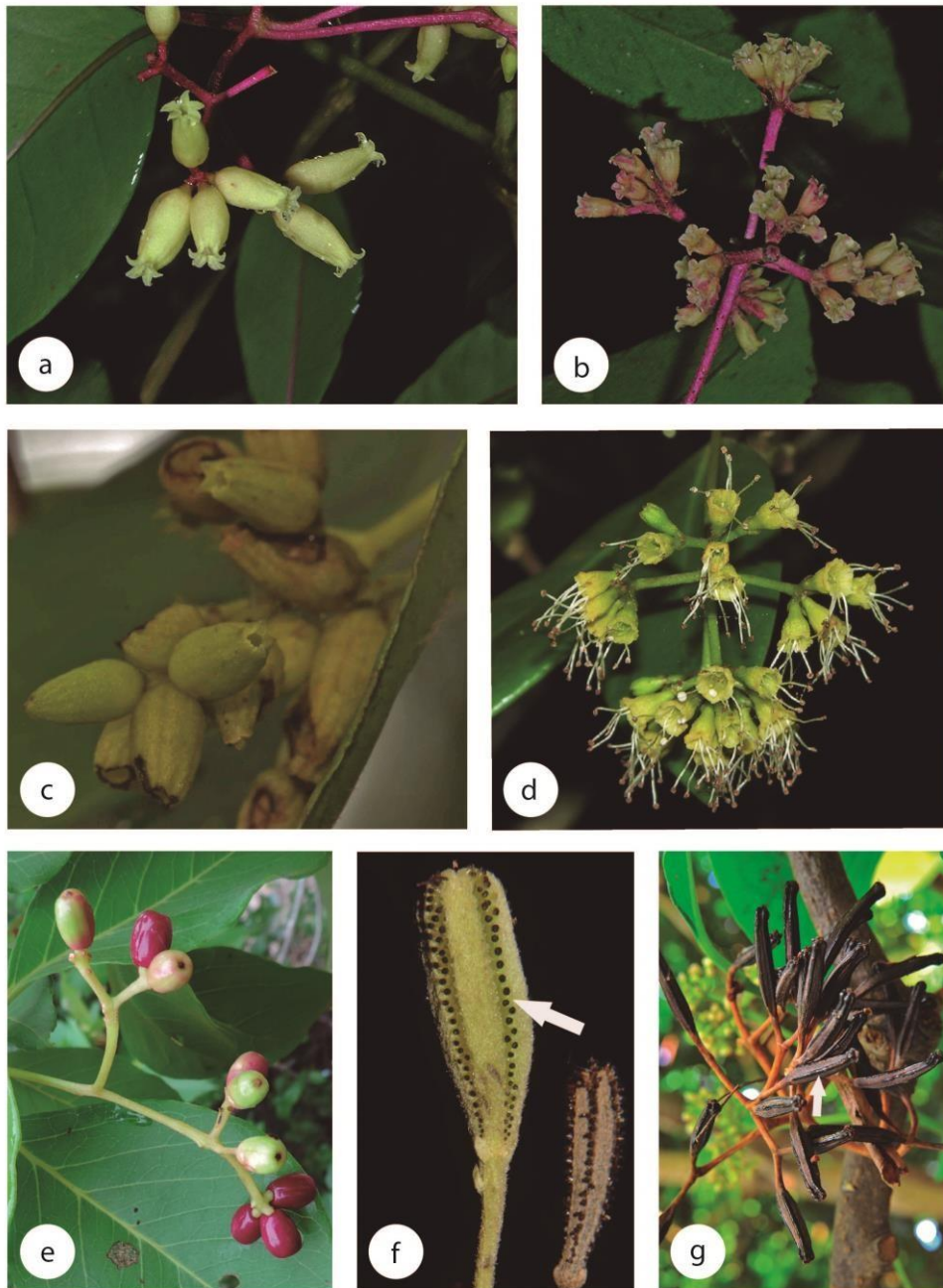


Fig. 1. Imagens de campo de caracteres morfológicos da tribo Pisonieae. **A)** *Neea pendulina*, flor pistilada. **B)** *Neea pendulina*, flor estaminada. **C)** *Neea hermaphrodita* var. *calvata*, flores com estames insertos. **D)** *Guapira cafferiana*, flor com estames exsertos. **E)** *Guapira laxa*, antocarpos drupáceos com ausência de glândulas. **F)** *Pisonia aculeata*, antocarpo seco com glândulas estipitadas (indicadas pela seta branca). **G)** *Pisonia umbellifera*, antocarpos secos com glândulas inconspícuas ao longo dos ângulos (indicada pela seta branca). Crédito das Imagens: A-B e D: Elson Felipe Rossetto, C e F: José Marcelo Molina, E: Leonardo Jales Leitão, e G: Ching-I Peng.

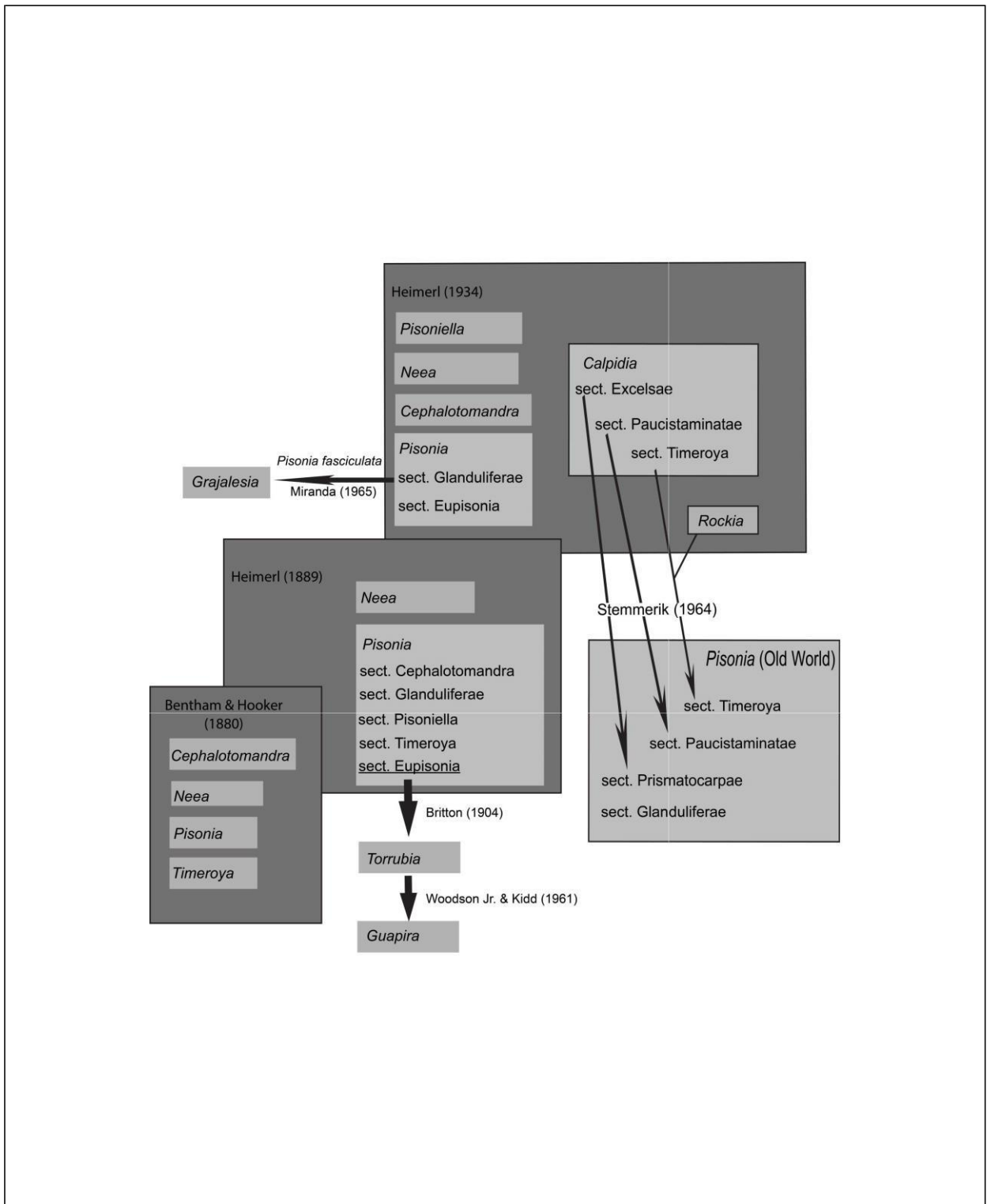


Fig. 2. Esquema do histórico da classificação genérica da tribo Pisonieae. Gêneros e suas seções são representados por retângulos cinza-claros, inseridos em retângulos cinza-escuros que representam os principais tratamentos taxonômicos para a tribo. Os retângulos escuros estão alinhados de forma a mostrar mudanças na composição dos gêneros da tribo entre os principais tratamentos. As flechas indicam as mudanças nos principais tratamentos taxonômicos, através da transferência de espécies e seções entre os gêneros.

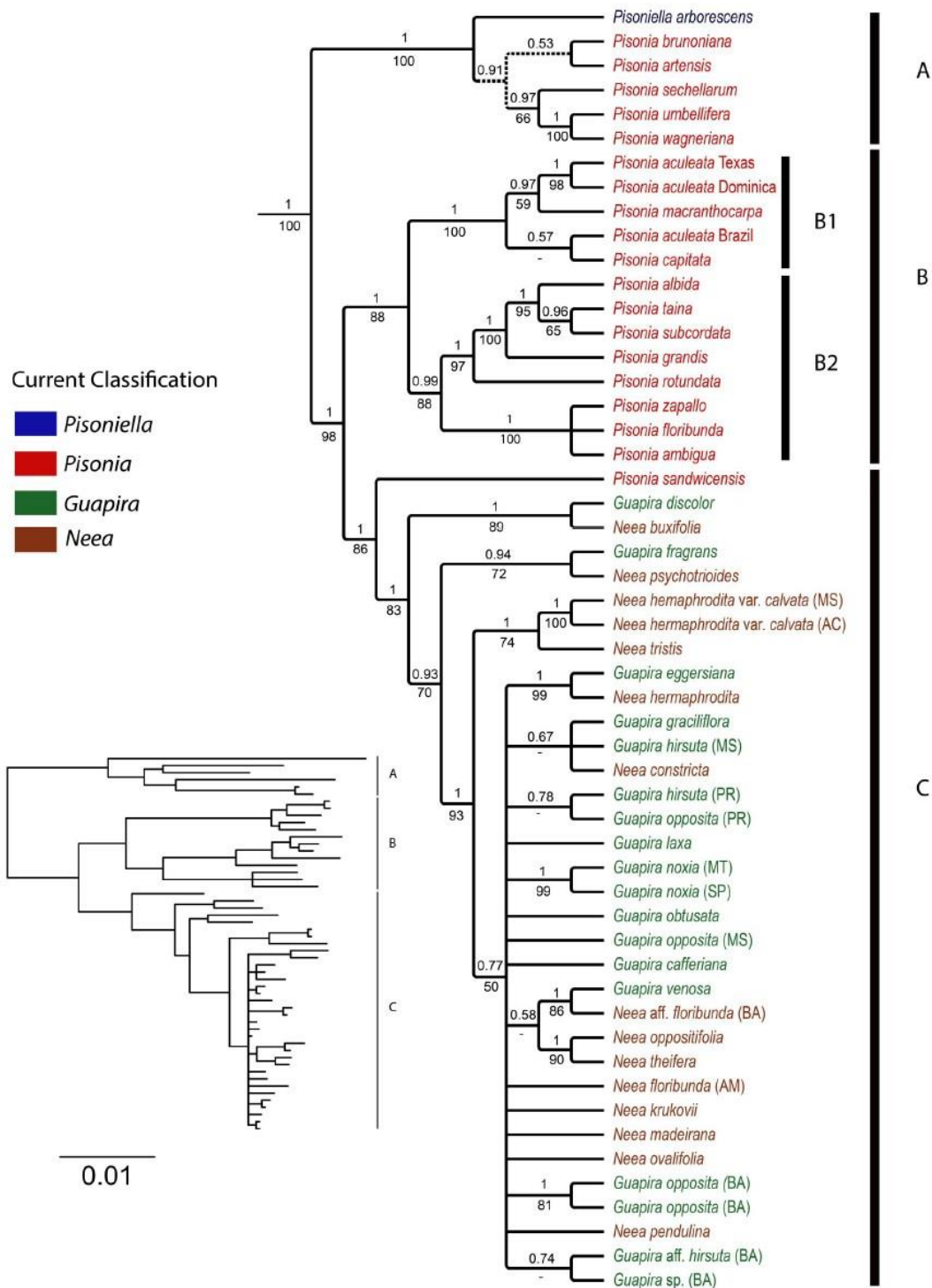


Fig. 4. Árvore de consenso de maioria da tribo Pisonieae, obtida através de máxima parcimônia e inferência bayesiana em análise combinada de ITS e rps16. Valores de probabilidade posterior (PP) estão indicados na parte superior dos ramos, os de *bootstrap* (BS), na inferior. “-” indica valores de BS <50%. Clados obtidos apenas na inferência bayesiana são indicados com linhas traçadas. Os terminais estão coloridos de acordo com os gêneros atualmente aceitos, como mostrado na legenda à esquerda. Os clados e subclados reconhecidos são indicados na direita da árvore, por letras. A árvore de Pisoniae com comprimento dos ramos é apresentada no canto inferior esquerdo, sendo notável ramos curtos no clado C, especificamente na linhagem de *Guapira*/*Neea*. Abreviações se referem aos estados do Brasil dos quais os terminais amostrados são provenientes. AC= Acre, AM=Amazonas, BA=Bahia, MS= Mato Grosso do Sul, MT= Mato Grosso, PR= Paraná, SP=São Paulo. Grupo externo, *Bougainvillea glabra*, *B. infesta* e *B. spectabilis* foram podadas da árvore.

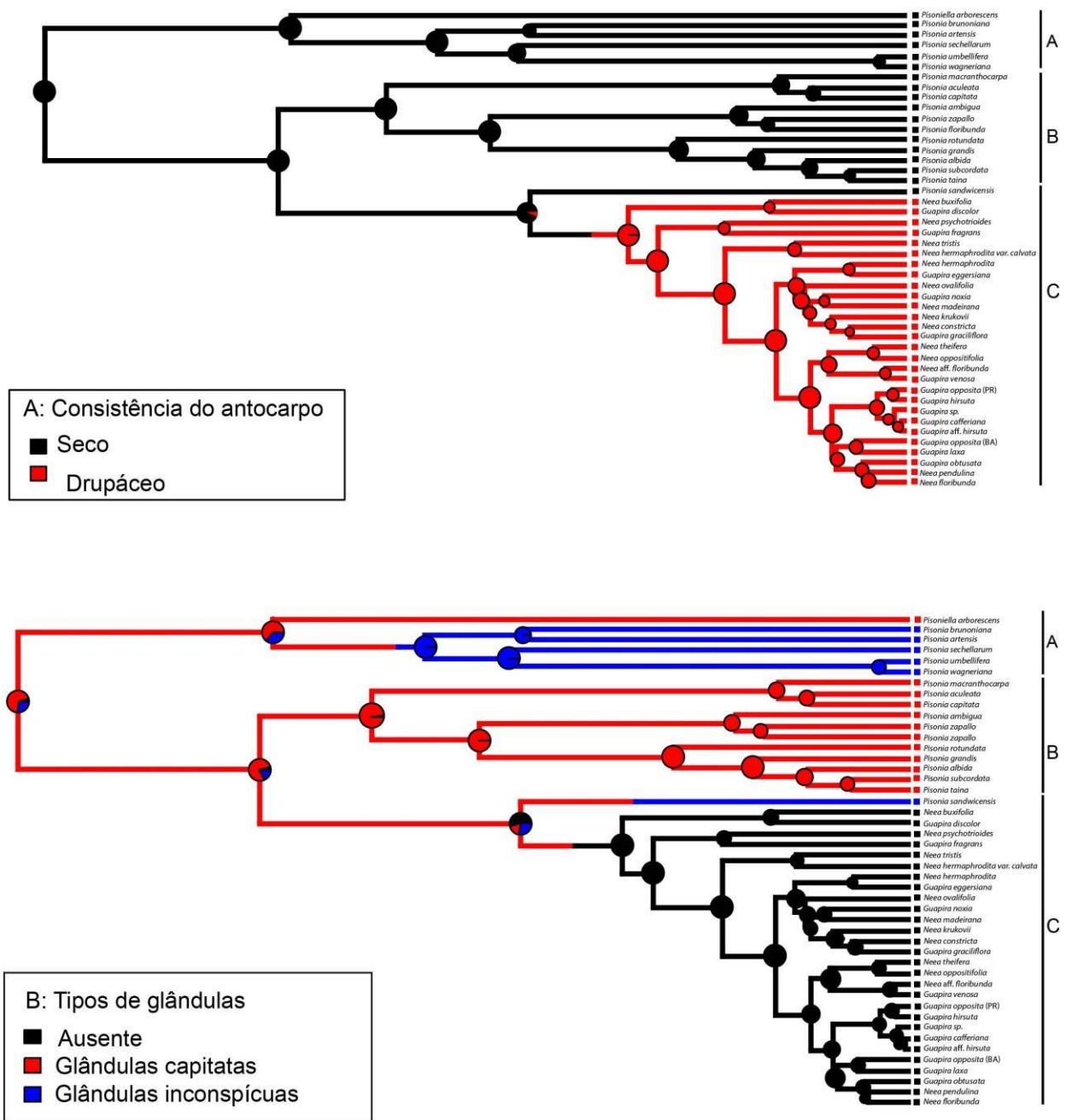


Fig. 5. Estimativa dos estados de caracteres ancestrais por mapeamento estocástico bayesiano da consistência do antecarpo (a) e (b) glândulas adesivas sobre o antecarpo. Gráficos de pizza nos nós das árvores indicam a probabilidade posterior dos estados ancestrais dos caracteres analisados.

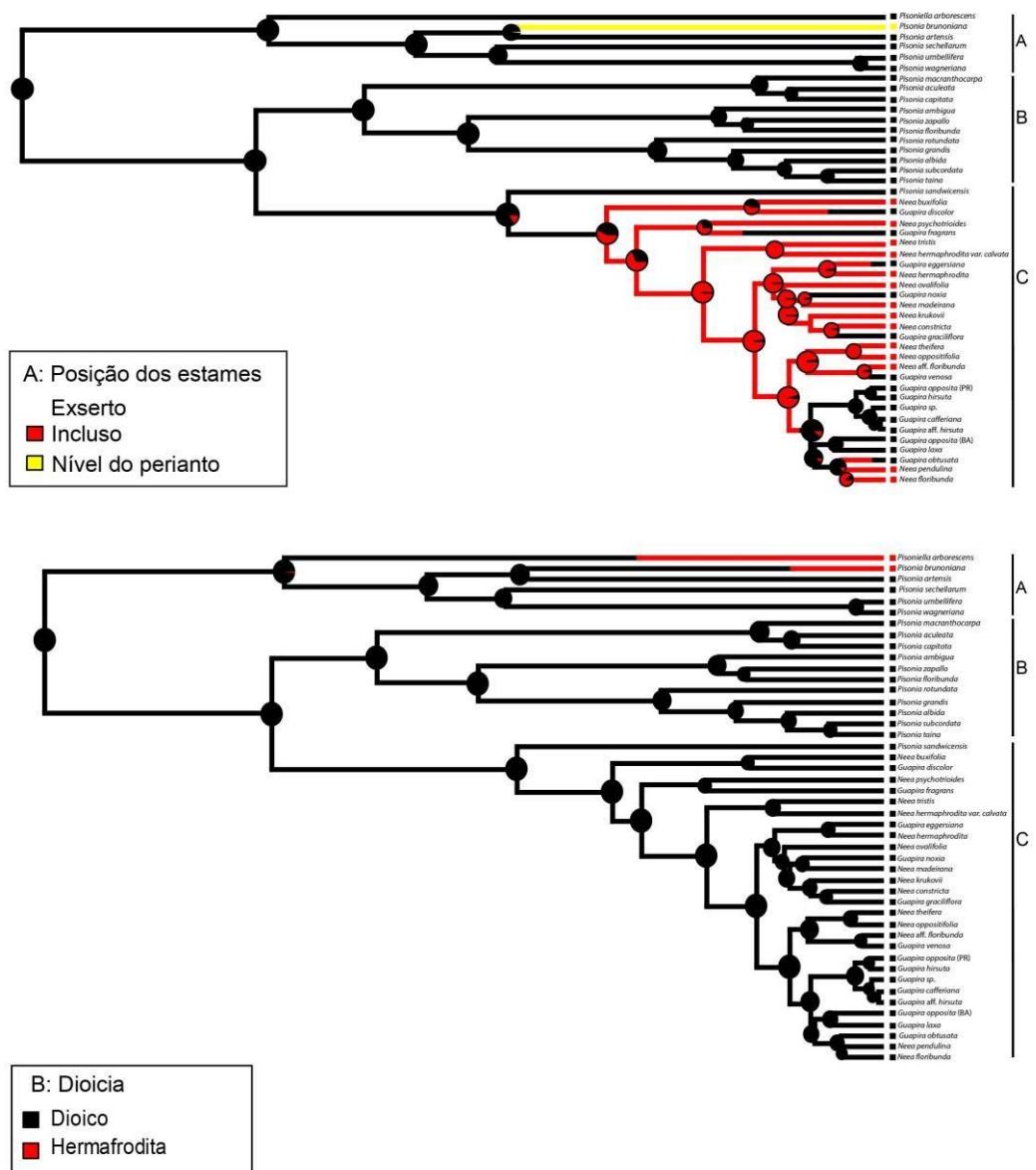


Fig. 6. Estimativa dos estados de caracteres ancestrais por mapeamento estocástico bayesiano da posição dos estames no perianto (a) e (b) dioicia. Gráficos de pizza nos nós das árvores indicam a propabilidade posterior dos estados ancestral dos caracteres analisados.

TABELAS

Tab. 1. *Primers* e suas respectivas sequências utilizadas no estudo

Região	Primer	Sequências 5'-3'	
ITS	17SE (F)	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTC	Sun et al., 1994
	26SE (R)	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	
rps16	rpsF (F)	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	Oxelman <i>et al.</i> , 1997
	rpsR2 (R)	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	

Tab. 2. Caracteres e seus estados utilizados na estimativa do estado ancestral

1.	Consistência do antocarpo: 0 seco, 1 drupáceo
2.	Tipos de glândulas: 0 Ausente, 1 Capitadas, 2 Inconspícuas
3.	Posição dos estames no cálice: 0 Exserto, 1 Inserto, 2 Altura do perianto
4.	Dioicéia: 0 Hermafrodita, 1: Dioico

Anexo 1. Nome das espécies, localidade, informações de *voucher* e número de acesso do *GenBank* para as sequências utilizadas na reconstrução filogenética (ITS, rps16, respectivamente). O traço “-” indica sequência não disponível para o segmento. O asterisco (*) indica as sequências que ainda não foram depositadas no *GenBank*.

Guapira cafferiana (Casar.) Lundell, Brazil, Paraná, *Rossetto*, 325 (FUEL)*.
Guapira discolor (Spreng.) Little, USA, Florida, *Spellenberg*, 13294 (NMC), EF079476, EF079626.
Guapira eggersiana (Heimerl) Lundell, French Guiana, *Mori*, 25540 (NY), EF079496, EF079643.
Guapira fragrans (Dumm.Cours.) Little, Puerto Rico, JX844233, JX844270.
Guapira graciliflora (Mart. ex J.A.Schmidt) Lundell, Brazil, Mato Grosso, *Rossetto 310* (FUEL)*.
Guapira aff. hirsuta (Choisy) Lundell, Brazil, Bahia, *Popovkin*, 1432 (HUEFS)*.
Guapira hirsuta (Choisy) Lundell, Brazil, Mato Grosso do Sul, *Rossetto*, 383 (FUEL)*.
Guapira hirsuta (Choisy) Lundell, Brazil, Paraná, *Rossetto*, 408 (FUEL)*.
Guapira laxa (Netto) Furlan, Brazil, Pernambuco, *Oliveira*, 2325 (HVASF, FUEL)*.
Guapira noxia (Netto) Lundell, Brazil, Mato Grosso, *Rossetto*, 318 (FUEL)*.
Guapira noxia (Netto) Lundell, Brazil, São Paulo, *Rossetto*, 407 (FUEL)*.
Guapira obtusata (Jacq.) Little, Brazil, Bahia, *Popovkin & Mendes*, 1599 (HUEFS)*.
Guapira opposita (Vell.) Reitz, Brazil, Mato Grosso do Sul, *Rossetto*, 345 (FUEL)*.
Guapira opposita (Vell.) Reitz, Brazil, Paraná, *Rossetto*, 412 (FUEL)*.
Guapira opposita (Vell.) Reitz, Brazil *Popovkin*, 1577 (HUEFS)*.
Guapira opposita (Vell.) Reitz, *Popovkin*, 1602 (HUEFS), *.
Guapira venosa (Choisy) Lundell, Brazil, Bahia, *Popovkin*, 1358 (HUEFS).
Guapira sp, Brazil, Bahia, *Popovkin*, A.V. 1477 (HUEFS), *.
Neea buxifolia Heimerl, Puerto Rico, JX844242, JX844272.
Neea constricta Spruce ex J.A.Schmidt, Brazil (Mato Grosso), *Rossetto*, 314 (FUEL), *.
Neea aff. floribunda Poepp. & Endl., Brazil, Bahia, *Popovkin*, 1362 (HUEFS)*.
Neea floribunda Poepp. & Endl., Brazil, Amazonas, *Rossetto*, 420 (FUEL) *.
Neea hermafrodita S.Moore, Bolivia, *Nee*, 51426 (NY), EF079489.
Neea hermafrodita var. calvata Chodat & Hassl., Brazil, Mato Grosso do Sul, *Rossetto*, 358 (FUEL)*.
Neea hermafrodita var. calvata Chodat & Hassl., Brazil, Acre, *Perdiz*, 2373 (UFACPZ, FUEL)*.
Neea krukovii Standl., Brazil, Amazonas, *Rossetto*, 419 (FUEL)*.
Neea madeirana Standl., Brazil, Amazonas, *Vicentini*, 754 (INPA)*.
Neea oppositifolia Ruiz & Pav., Brasil, Amazonas, *Rossetto*, 423 (FUEL)*.
Neea ovalifolia Spruce ex J.A.Schmidt, Brazil, Amazonas, *Souza*, 286 (INPA)*.
Neea pendulina Heimerl, Brazil, Paraná, *Rossetto*, 328 (FUEL)*.
Neea theifera Oerst., Brasil, Mato Grosso, *Rossetto*, 317 (FUEL)*.
Neea tristis Heimerl, Brasil, Acre, *Costa*, 415 (UFACPZ, FUEL), *.
Pisonia aculeata L., Brazil, Paraná, *Rossetto*, 305 (FUEL)*.
Pisonia aculeata L., Dominica, JX844235, JX844269.
Pisonia aculeata L., USA, Texas, DQ317077.
Pisonia albida (Hemerl) Britton, Puerto Rico, JX844237, JX844273.
Pisonia ambigua Heimerl, Brazil, Paraná, *Rossetto*, 304 (FUEL)*.
Pisonia ardensis Mountrouz ex Heimerl, New Caledonie (NOU)*.
Pisonia floribunda Hook.f., Ecuador, Galapagos, *Jeppensen*, 3042 (AAU)*.
Pisonia brunoniana Endl. USA, Hawaii, JX844243, JX844277.
Pisonia capitata (S.Watson) Standl., Mexico, Sonora, *AL Reina, G.* (20000-193) (NMC) EF079484, EF079635.
Pisonia grandis R.Br., Rota, CNMI, JX844234, JX844276.
Pisonia macranthocarpa (Donn.Sm.) Donn.Sm. Nicaragua, Nueva Segovia, *Stevens*, 33602, (MO)*.
Pisonia rotundata Griseb. USA, Florida, *Spellenberg*, 13293 (DUKE), EF079475, EF079625.
Pisonia sandwicensis Hillebr., USA, Hawaii, Kauai, *Perlman*, 24080 (NTBG, FUEL)*.
Pisonia sechellarum F.Friedmann, Seychelles, JX844240, JX844275.
Pisonia subcordata Sw., Puerto Rico, *Taylor*, 11689 (MO)*.
Pisonia umbellifera (J.R.Forst. & G.Forst.) Seem. USA, Hawaii, Kauai, *Lorence*, 10451 (NTBG, FUEL), *.
Pisonia wagneriana Fosberg, USA, Hawaii, Kauai, *Lorence*, 10450 (NTBG, FUEL) *.
Pisonia zapallo Griseb., Brazil, Mato Grosso do Sul, *Rossetto*, 388 (FUEL)*.
Pisoniella arborescens (Lag. & Rodr.) Standl. Mexico, Oaxaca, *LeDuc*, 231 (NMC), EF079485, EF079636.
Bougainvillea glabra Choisy, USA, North Carolina *Douglas*, 2121 (DUBG), EF079463, EF079614.
Bougainvillea infesta Griseb., Bolivia, *Nee*, 51442 (NY), EF079498, EF079644.
Bougainvillea spectabilis Willd., USA, California, *Stone*, s.n. (DAV) L78087.

Bougainvillea spectabilis Willd., South Africa, *Klak*, 987, -, AJ532732.
