

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Fernanda Sampaio**

**HIPÓTESES FILOGENÉTICAS DE ESPÉCIES SUL  
AMERICANAS DO GÊNERO LIPPIA SPP.  
(VERBENACEA) COM BASE EM SEQUÊNCIAS  
NUCLEOTIDICAS**

Juiz de Fora – MG - Brasil

2009

**FERNANDA SAMPAIO**

**HIPÓTESES FILOGENÉTICAS DE ESPÉCIES SUL  
AMERICANAS DO GÊNERO LIPPIA SPP. (VERBENACEAE)  
COM BASE EM SEQUÊNCIAS NUCLEOTIDICAS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas: Área:  
Genética/Biotecnologia, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências Biológicas:  
Área: Genética/Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora – MG - Brasil

2009

Sampaio, Fernanda.

Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* Spp. (Verbenacea) com base em sequências nucleotídicas / Fernanda Sampaio. -- 2009.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Filogenia. 2. Genética molecular. I. Título

CDU 575.86

Fernanda Sampaio

**HIPÓTESES FILOGENÉTICAS DE ESPÉCIES SUL  
AMERICANAS DO GÊNERO LIPPIA SPP. (VERBENACEAE)  
COM BASE EM SEQUÊNCIAS NUCLEOTIDICAS**

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Mestrado em Ciências Biológicas Área: Genética e Biotecnologia

Aprovada em 13 de fevereiro de 2009

---

Dr. Lyderson Facio Viccini  
Doutor em Genética e Melhoramento pela UFV  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dra. Karla S. C. Yotoko  
Doutora em Genética e Evolução Filogenômica pela Unicamp  
Universidade Federal de Viçosa

---

Dr. Marco Antônio Machado  
Doutor em Genética e Melhoramento pela UFV  
Embrapa Gado de Leite – CNPGL Juiz de Fora

*“Nada faz sentido em Biologia exceto à luz da Evolução.”*

*(Theodosius Dobzansky 1900 - 1975)*

*À minha família,  
ofereço.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à meus pais, Sérgio e Vera, meus alicerces, pelo apoio e carinho incondicionais.

Ao meu irmão, Ique, pelo carinho, conversas e momentos engraçados e a minha cunhada, Tati, pelas conversas e conselhos .

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À UFJF e à Capes pela bolsa concedida.

Ao CNPq e à Fapemig pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini, por ter aceito ser meu orientador desde a Iniciação Científica, pelas conversas (muitas vezes metafóricas!), puxões de orelha, ensinamentos, incentivo e por me mostrar que “nada resiste ao trabalho!”

Ao Dr. Marco Antônio Machado por ter me abrigado em seu laboratório permitindo a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e momentos hilários de descontração.

À Profa. Dra Karla Suemy Clemente Yotoko por ter despertado em mim o interesse por evolução, pelos ensinamentos sobre filogenia molecular, pela paciência e parceria.

À Profa. Dra. Fátima Regina Salimena, pelos ensinamentos, conversas jogadas fora e por me mostrar o que é ser Bióloga!

Ao Prof. Dr Marcelo de Oliveira Santos pelos ensinamentos e conversas hilárias no laboratório.

À Profa. Dra. Cíntia Marques Coelho pelas conversas intermináveis sobre genética ou qualquer assunto, por despertar meu lado crítico e pelos bons conselhos.

Aos meus queridos amigos Pâmela Souza Silva e Saulo Marçal de Sousa por terem sido meus “desorientadores”, pela amizade, pelos conselhos, incentivo, por terem feito os fins de semana no laboratório mais divertidos.

À amiga Camila Queiroz por ter me iniciado no mundo da genética molecular, pelas conversas e amizade.

De maneira muito especial, aos amigos Aline Amália do Vale (Alinóida), Robert Domingues, Priciane Ribeiro e Tamires Rezende (Tamis) primeiro pelo carinho e amizade imensuráveis, depois pelas conversas muito “produtivas”, pelo apoio, ensinamentos (científicos ou não!) e pela ajuda na realização deste trabalho.

Às amigas Sabine Wohlfres e Débora Pausini que apesar do pouco tempo de convívio se mostraram grandes companheiras.

À todos meus amigos do Laboratório de Genética da UFJF: Ana Paula, Junya, Letícia, Cássia, Diego, Joice, Lucas, José Marcello, Chrystian e Silvioney pelo convívio e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa CNPGL: Ariosto (pessoa mais inteligente que já conheci!), Karla, Livia, Karina, Bel, Ana Luisa, Isabela, Gustavo e Ana Lúcia pelo auxílio e amizade.

Aos meus amigos e amores: Adriano, Fer Bitencourt, Ramom, Rogério, Wanessa, Dani, Luis, Fer Gomes, Lara, Mariana, Karina Ferraz, Ana Paula Tasca, Raphael, Pato, Ledson e Fabinho pelo companheirismo, carinho e por terem me mostrado que essa vida é boa demais!

Aos amigos Sabrina, Vitor, Paula, Adriano Mendes, Marcela e Mirele pelo companheirismo, carinho e por tornarem, durante esses muitos anos de amizade e convívio, Juiz de Fora um lugar melhor para se viver!

Agradeço a todos que de certa forma tornaram meu caminho mais feliz e, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

SAMPAIO, F. **Hipóteses Filogenéticas de Espécies Sul Americanas do Gênero *Lippia* spp. (Verbenaceae) com Base em Sequências Nucleotídicas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, 2009.

O gênero *Lippia* é um dos principais da família Verbenaceae e em sua maior parte está concentrado no Brasil, México, Paraguai e Argentina com poucas espécies endêmicas na África. O objetivo deste trabalho foi a construção de uma hipótese filogenética para 39 espécies do gênero *Lippia* ocorrentes no Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai com base em dados moleculares das regiões ITS, Waxy, TrnL-F e trnQ-rps16. As sequências foram amplificadas e purificadas para posterior seqüenciamento. As análises foram feitas utilizando-se Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. O presente trabalho revelou, pela primeira vez, aspectos filogenéticos de espécies do gênero *Lippia* com base em caracteres moleculares. De modo geral, as árvores filogenéticas baseadas nas diferentes regiões gênicas estudadas revelaram questões importantes como é o caso do monofiletismo da seção *Goniostachyum*. Outro ponto importante envolve a falta de resolução das seções *Dipterocalix*, *Rhodolippia* e *Zapania*. Dentre elas destaca-se a seção *Zapania* que constitui em vários aspectos estudados, a seção mais diversa. Embora o presente trabalho tenha mostrado aspectos inéditos com relação à organização filogenética de espécies e seções do gênero *Lippia*, a questão da especiação no gênero permanece em aberto. É possível que para resolver este problema sejam necessários estudos populacionais e filogeográficos, embasados por uma análise filogenética com maior número de genes e principalmente, envolvendo um maior número de espécies.

Palavras-chave: Verbenaceae, *Lippia*, filogenia molecular, ITS, Waxy, trnL-F, trnQ-rps16.

## ABSTRACT

SAMPAIO, F. **Phylogenetic hypothesis of South American species of the genus *Lippia* spp. (Verbenaceae) based on nucleotide sequences.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, 2009.

*Lippia* is one of the most important genus of the Verbenaceae family. It is mainly concentrated in Brazil, Mexico, Paraguay and Argentina with few endemic species in Africa. The present study was done in order to construct a phylogenetic hypothesis for 39 species of the genus *Lippia* from Brazil, Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay based on molecular data of regions ITS, Waxy, TrnL-F and rps16-trnQ. The sequences were amplified and purified for subsequent sequencing. The phylogenetic analyses were done using the Maximum Likelihood and Bayesian Inference. It was possible to show for the first time, phylogenetic aspects of the genus *Lippia* based on molecular data. In general, the phylogenetic trees based on different gene regions revealed important points such as the monophyly of *Goniostachyum* section. Another important point involves the lack of resolution of the sections *Dipterocalix*, *Rhodolippia* and mainly *Zapania* which is the most diverse among them. Although this work has shown new aspects about the phylogenetic organization of sections and species of the genus *Lippia*, the speciation process of the genus remains an open question. To resolve this problem, additional studies using phylogeographic and population genetics approaches, based on a phylogenetic analysis with greater numbers of genes and mainly involving a great number of species should be necessary.

Keywords: Verbenaceae, *Lippia*, molecular phylogeny, ITS, Waxy, trnL-F, trnQ-rps16.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Mapa de distribuição das espécies do gênero <i>Lippia</i> estudadas	21
Figura 2-	Mapa do relevo da área onde estão localizadas as espécies do gênero <i>Lippia</i> estudadas	22
Figura 3-	Árvore da região ITS gerada a partir de análise Bayesiana	25
Figura 4 -	Árvore da região ITS gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança	26
Figura 5 -	Árvore da região Waxy gerada a partir de Análise Bayesiana.	29
Figura 6 -	Árvore da região Waxy gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança.	30
Figura 7-	Árvore da região trnL-F-tabAB gerada a partir de Análise Bayesiana.	33
Figura 8-	Árvore da região trnL-F-tabAB gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança.	34
Figura 9-	Árvore da região trnL-F-tabCF gerada a partir de Análise Bayesiana.	37
Figura 10-	Árvore da região trnL-F-tabCF gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança.	38
Figura 11-	Árvore da região trnQ-rps16 gerada a partir de Análise Bayesiana.	40
Figura 12-	Árvore da região trnQ-rps16 gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança.	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seções de <i>Lippia</i> , suas características, espécies envolvidas no presente trabalho e suas respectivas localizações.	14
Tabela 2 - Mix para reação de PCR	16
Tabela 3 - Regiões gênicas e <i>primers</i> utilizados	16
Tabela 4 - Condições da reação de PCR	17
Tabela 5 - Condições para reação de sequenciamento	18
Tabela 6 - Sumário da característica das sequências	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

APG – *The Angiosperm Phylogeny Group*

Aut - autoapomorfia

°C – grau Celsius

µL , µg, µM – microlitro, micrograma, micromolar

cpDNA – DNA cloroplastidial

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribunucleotídeos trifosfato

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

g - grama (unidade de peso) / gravidade (centrífuga)

GBSSI – granule-bound starch synthase I

ITS – *Internal Transcribed Spacer*, região espaçadora dos genes ribossomais

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

DTT - Ditiotreitól

Kb – quilobases

m - metro

M – Molar (unidade de molaridade)

mA – mili amper

MCMC – Markov Chain Monte Carlo

mg – miligrama

mL – mililitro

ML – Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*)

MP – Máxima Parcimônia

mtDNA – DNA mitocondrial

M13 – DNA da fita simples purificado usado como controle em reações de sequenciamento

ng – nanograma

NJ – *Neighbor Joining*

NTS – número total de sítios

NSC – número de sítios conservados

OTU – Unidade taxonômica operacional (*Operational taxonomic unit*)

pb - pares de bases nucleotídicas

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

pH – inverso do logaritmo da concentração de H +

PP – probabilidade posterior

psbA-trnH – espaçador intergênico plastidial psbA-trnH

rpm – rotações por minuto

SI – Instituto de Botânica Darwinion

Sin - sinapomorfia

Taq – *T. aquaticus*

TBR - *Tree-Bisection-Reconnection*

TE – tampão contendo Tris-HCl e EDTA

trnL-F – região cloroplastidial que compreende o íntron trnL e o espaçador trnL-trnF

trnL – região cloroplastidial correspondente ao íntron trnL

trnQ-rps16 – espaçador intergênico cloroplastidial trnQ-rps16

U - unidade de enzima

UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*

UV - ultravioleta

V – volume

## SUMÁRIO

1 – Introdução	1
1.1 – A sistemática molecular em plantas	1
1.2 – A Família Verbanaceae	4
1.3 – Caracterização do gênero <i>Lippia</i>	5
1.4 – O gênero <i>Lippia</i> : distribuição geográfica e sua importância	6
1.5 – Reconstrução da Filogenia	8
2 – Objetivo	12
3 – Material e métodos	13
4 – Resultados	23
5 – Discussão	42
6 – Conclusão	49
7 – Referências bibliográficas	50

## 1 – Introdução

### 1.1 - A sistemática molecular em plantas

A sistemática molecular tem revolucionado os estudos filogenéticos em plantas através da incorporação de técnicas de biologia molecular, especialmente os dados de seqüências de DNA nas reconstruções filogenéticas (DALY *et al.* 2001, JUDD *et al.* 2002). Os estudiosos da filogenia consideram as árvores filogenéticas como reconstruções das relações genealógicas e propõem que as classificações taxonômicas devam ser baseadas nestas árvores. A classificação taxonômica contendo apenas grupos monofiléticos e/ou espécies é um sistema natural, pois uma vez que delimita-se grupos baseados em ancestrais comuns pode-se desenvolver uma hierarquia que reflete as relações entre os indivíduos. Em 1998, um grupo formado por sistematas, autodenominado de “*The Angiosperm Phylogeny Group*” apresentou uma nova proposta de sistema de classificação das famílias de plantas com flores (APG 1998). Essa proposta de sistema de classificação foi baseada na análise cladística de um grande número de seqüências de DNA com suporte teórico e metodológico da análise filogenética, e vem sendo revista incorporando-se diversos trabalhos de outros grupos (QIU *et al.* 1999, SAVOLAINEN *et al.* 2000, SOLTIS *et al.* 2000), com atualização mais recente conhecida como APG II (2003).

Nas análises filogenéticas através das seqüências de DNA são utilizadas três diferentes fontes potenciais de caracteres: os genomas de cloroplasto, mitocondrial e nuclear (KARP *et al.* 1996). A combinação de diferentes genomas é uma das melhores ferramentas para ser usada em reconstruções filogenéticas (QIU *et al.* 1999). Seqüências provenientes do genoma do cloroplasto (cpDNA) são as mais usadas para inferir relações filogenéticas em plantas (SHAW *et al.*, 2005). A seqüência do DNA do cloroplasto é altamente conservada em termos de tamanho, estrutura, conteúdo e ordem dos genes (JUDD *et al.* 2002). Com tais características, o uso de seqüências de cpDNA apresenta vantagens em relação aos outros tipos de seqüência. Por ser estável, pode ser usado para inferir filogenias, o que não ocorre no DNA mitocondrial (mtDNA) onde os rearranjos são tão freqüentes que um mesmo indivíduo pode ter diferentes cópias (SOLTIS *et al.*, 1991). O reduzido tamanho do



cpDNA, frente a outros genomas presentes nas células vegetais, permitiu que, em muitas espécies, a sequência completa deste genoma fosse conhecida. Isto levou ao reconhecimento de regiões que evoluem em diferentes taxas, que podem ser usadas para propósitos diversos em inferências filogenéticas.

Genes como o *rbcL*, que codifica a subunidade maior da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e que possui uma taxa de evolução lenta, apresentam boa resolução ao nível de família, para angiospermas (SOLTIS et al., 1991). Para níveis taxonômicos mais baixos, em geral, gêneros e espécies, onde a divergência é mais recente, são usados íntrons e espaçadores de genes nucleares que são regiões que tendem a acumular mutações mais rapidamente (DOYLE & LUCKOW, 2003).

Entre eles estão os espaçadores intergênicos (ITS) localizados entre os genes nucleares de rDNA, os espaçadores cloroplastidiais *trnL-trnF*, *psbA-trnH* e *trnQ-rps16* e o íntron cloroplastidial do gene *TrnL*. Essas regiões provaram ser de grande utilidade para estudos filogenéticos em níveis infragenéricos devido as suas rápidas taxas de evolução de sequências e sítios de flanqueamento dos *primers* bem conservados (SHAW et al., 2005).

A região ITS tem sido amplamente utilizada em estudos filogenéticos de plantas devido a presença da alta taxa de substituição de nucleotídeos nessa região (BALDWIN, 1992; BALDWIN et al., 1995; BAYLY & LADIGES, 2007) e a seu poder de elucidar as relações em níveis infragenéricos em plantas de várias famílias, incluindo Poaceae (CATALAN & OLMSTEAD, 2000; GUO et al., 2002; BAUMEL et al., 2002), Solanaceae (LEVIN et al., 2005, 2006), Malvaceae (TATE & SIMPSON, 2003) e Zingiberaceae (KRESS et al., 2005a).

Os outros fragmentos foram apontados como sendo filogeneticamente informativos, sendo que para o gênero *Paspalum* o comprimento da região *psbA-trnH* foi aproximadamente de 600 pares de base adequado para sequenciamento direto (SANG et al., 1997 ; ESSI & SOUZA-CHIES, 2007). Já para as espécies do gênero *Paris* o tamanho variou entre 1078 e 1103 pb e entre 645 e 1120 pb nas espécies de *Trillium* (YUNHENG et al., 2006) sugerindo que o comprimento desta região é variável entre diferentes espécies. Kress et al. (2005b) em seu estudo obtiveram grande sucesso na amplificação dessa região e sugere que esta seja utilizada como “barcode” para identificação de espécies vegetais.

A região trnQ-rps16 apresentou, segundo Calviño *et al.* (2007), mais caracteres informativos para parcimônia, ou seja, substituições e deleções. Análises de Máxima Parcimônia (MP) revelaram que a mesma região produz teorias melhor resolvidas e com ramos bem suportados do que outras regiões para espécies do gênero *Eryngium* (CALVIÑO *et al.*, 2008).

Dentre as regiões cloroplastídias a mais utilizada para estudos como o aqui proposto é a região trnL-trnF. Esse locus tem sido capaz de detectar variação inter e intraespecífica em diversas espécies vegetais (TSAI *et al.*, 2006). Em orquídeas do gênero *Bulbophyllum*, dados moleculares dessa região corroboram dados morfológicos que comprovam o monofiletismo de cinco das 18 seções encontradas nesse táxon (FISCHER *et al.*, 2007).

O gene nuclear *Waxy* (GBSSI), responsável pela síntese de grânulos de amido em plantas, é outra região que vem sendo muito utilizada para estudos filogenéticos infragenéricos. Evans *et al.* (2000) utilizaram a porção 5' deste gene para inferir a filogenia de alguns gêneros da família Rosaceae. Yuan & Olmstead (2008a) em seu estudo sugeriram o monofiletismo de dois gêneros da família Verbenaceae baseadas em análises de sequências deste mesmo gene. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que as sequências de aproximadamente 3.0Kb do gene *Waxy* possuem cinco vezes mais caracteres filogeneticamente informativos do que uma região não codificadora do DNA cloroplastídial. Isso sugere que para se resolver problemas filogenéticos a níveis hierárquicos baixos, especialmente em grupos recentes, o DNA nuclear é também indispensável como fonte de variação.

A região *Waxy* também foi usada para investigar a poliploidização do gênero *Spartina* (FORTUNE *et al.*, 2007), do gênero *Bromus* (FORTUNE *et al.*, 2008) e do gênero *Santalum* (HARBAUGH *et al.*, 2008) já que por ser nuclear se multiplica conforme o genoma vai se duplicando.

Com o desenvolvimento atual das tecnologias de sequenciamento de DNA e computação, a Sistemática Molecular vem passando por algumas mudanças. Os sequenciamentos baseados na técnica tradicional de Sanger (SANGER & COULSON, 1975), antes muito demorados e caros, passaram por um processo de automatização e estão cada vez mais rápidos e baratos, o que faz com que cada vez mais sequências sejam depositadas nos bancos de dados públicos. A técnica de pirosequenciamento, que é capaz de seqüenciar um genoma inteiro de um

procarioto (ou organelas) em poucas horas (cerca de 100 milhões de nucleotídeos em 7 horas) já vem também sendo empregada (RONAGHI *et al.* 1998; RONAGHI *et al.* 1996, ROESCH *et al.*, 2007; SAEED, 2009). Estas facilidades já começaram a ser usadas (MOORE *et al.* 2006) e, à medida que mais sequências completas de genomas tornarem-se disponíveis, é possível fazer estudos mais acurados de evolução de genes e genomas, buscar melhores marcadores para reconstruções filogenéticas ou, até mesmo, utilizar genomas inteiros nesta tarefa. Portanto, o potencial da Sistemática Molecular para compreensão da evolução em diferentes níveis taxonômicos é imensurável.

## 1.2 - A Família Verbenaceae

A família Verbenaceae reúne cerca de 36 gêneros e 1000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005) e é constituída por subarbustos e ervas anuais a perenes (SALIMENA, 2000). De acordo com Sanders (2001) a família ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, África e Índia, sendo um dos centros de mais alta diversidade as regiões subtropicais da América do Sul.

A família pertence à ordem Lamiales cuja relação entre famílias permanece mal resolvida (SOLTIS *et al.*, 2005) e se encontra no clado das Asterides, subclado Asterides I, um grupo de plantas considerado monofilético formado por 10 ordens (BREMER *et al.*, 2003).

Nos tratamentos mais clássicos (CRONQUIST, 1981 e 1988) a família Verbenaceae foi dividida em duas subfamílias, Verbenoideae e Viticoideae, numa delimitação claramente polifilética. Suas relações de parentesco com a família Lamiaceae foram destacadas através das análises cladísticas e a partir da transferência de todos os táxons incluídos na subfamília Viticoideae para a família Lamiaceae. Ambas foram circunscritas como grupos monofiléticos, passando a família Verbenaceae a ser representada exclusivamente pelos táxons incluídos na subfamília Verbenoideae (CANTINO *et al.*, 1992; OLMSTEAD *et al.* 1992).

Três tribos foram propostas por Schauer (1847) para a família Verbenaceae, baseadas na morfologia das inflorescências e características dos óvulos -

Verbeneae, Viteae e Avicennieae. O gênero *Lippia* L. foi incluído na tribo Verbenae, que abrange gêneros com inflorescências indeterminadas e óvulos anátropos, sendo esta tribo posteriormente dividida em sete subtribos com base no número de óvulos, morfologia das inflorescências e das flores - *Spielmannieae*, *Monochileae*, *Casselieae*, *Duranteae*, *Petraeae*, *Verbeneae* e *Lantaneae* (SALIMENA, 2000).

Estudos filogenéticos feitos com espécies da família Verbenaceae são escassos, podendo-se citar os feitos por Yuan & Olmstead (2008a e b) que inferiram o monofiletismo dos gêneros *Verbena* e *Glandularia* pertencentes ao complexo *Verbena* através do uso de sequências nucleares e cloroplastidiais.

### **1.3 - Caracterização do gênero *Lippia***

O gênero *Lippia*, foi descrito por Linnaeus em 1753. Schauer (1851) propôs a primeira subdivisão no gênero, reconhecendo padrões diferentes na arquitetura das inflorescências, estabelecendo cinco seções: *Lippia*, *Dipterocalyx*, *Goniostachyum*, *Zapania* e *Rhodolippia*.

Posteriormente, Briquet (1895) subdividiu o gênero em dois subgêneros: *Zapania* e *Aloysia*, reconhecendo as seções propostas por Schauer. Esta nova delimitação foi seguida por Moldenke (1964) em estudo monográfico sobre o gênero *Lippia*.

Troncoso (1974) apresentou um amplo estudo sobre a taxonomia de *Lippia*, no qual foram revistas as delimitações dos táxons infragenéricos resultando em uma proposta que tem sido seguida pelos especialistas na família. O gênero foi então subdividido em sete seções: *Lippia*, *Dipterocalyx*, *Goniostachyum*, *Zapania*, *Rhodolippia*, *Pseudoaloyisia* e *Dioicolippia*. Posteriormente, a única espécie contida na seção *Pseudoaloyisia* foi sinonimizada por Troncoso e Salimena-Pires (1997), diminuindo então o número de seções para seis.

As espécies estudadas aqui pertencem a quatro das sete seções propostas por Troncoso (1974). As características e espécies pertencentes a cada seção estão na Tabela 1.

#### 1.4 - O gênero *Lippia*: distribuição geográfica e sua importância

Os principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* estão localizados no Brasil e no México (SALIMENA-PIRES, 1998).

No Brasil, o maior número de espécies se encontra na Cadeia do Espinhaço, que está localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. Pode-se citar dentre as espécies de *Lippia* presentes na Cadeia do Espinhaço: *L. lupulina* Cham., *L. salviifolia* Cham., *L. hermannioides* Cham., *L. sidoides* Cham., *L. florida* Cham., *L. rubella*, *L. rosella* Mold., *L. diamantinensis* Glaz., *L. rotundifolia* Cham., *L. pseudos-thea* (St. Hil.) Schau., *L. martiana* Cham., *L. corymbosa* Cham. e *L. filifolia* Cham. entre outras. Com exceção das quatro primeiras, que têm distribuição mais ampla, as demais são todas endêmicas da Cadeia do Espinhaço.

Embora o Brasil possua um grande número de espécies, algumas delas estão ameaçadas de extinção como *L. elliptica* Schau., que foi recoletada apenas uma única vez após a coleta do material tipo, na região de Alegres, Goiás, e *L. lindmanii* Briq., provavelmente extinta e só conhecida pela coleção-tipo, procedente de Morro Vermelho em Mato Grosso do Sul, uma região totalmente descaracterizada floristicamente pela exploração agrícola (SALIMENA-PIRES, 1998).

Uma interessante característica do gênero é que diversas espécies apresentam propriedades medicinais comprovadas. Pessoa *et al.* (2005), detectaram ação anti-bacteriana do extrato aquoso de folhas frescas de *Lippia* aff. *gracilis*. Com relação aos constituintes dos óleos essenciais da espécie sul-africana *L. javanica*, Viljoen *et al.* (2005) têm observado uma forte ação antimicrobiana e, além disso, efeitos contra problemas respiratórios. O óleo essencial de *L. chevalieri* apresentou atividade antibacteriana e antifúngica contra seis microorganismos testados (MEVY *et al.*, 2007). Similarmente, o óleo extraído de folhas da espécie *L. origanoides* também demonstrou atividade antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Os constituintes químicos de *Lippia alba* (MILL.) N.E. BR., por exemplo, tem ação como sedativo, antiespasmódico e estomáquico (GOMES *et al.*, 1993). *L. alba* é também utilizada para o tratamento de gripe, bronquite, problemas no fígado, infecções cutâneas, diarreia, disenteria e distúrbios menstruais, além de agir como

antipirético, antiinflamatório e estomáquica (MORTON, 1981; OLIVEIRA et al., 2006). O extrato aquoso de *Lippia sidoides* Cham. é dotado de acentuado efeito antisséptico, antiinflamatório e cicatrizante (COSTA et al., 1998) além disso, seu óleo essencial mostrou atividade contra a larva do mosquito *Aedes Aegypti* (CARVALHO et al., 2003) e *Culex quinquefasciatus* (COSTA et al., 2005). Esta espécie mostrou também propriedade gastroprotetora, antioxidante, antinociceptiva (MARÇAL, 2006) e antiinflamatória tópica (MONTEIRO et al., 2007). *Lippia multiflora* tem ação eficaz contra malária (VALENTIN et al., 1995), no tratamento da hipertensão (NOAMESI, 1977) e também é eficaz no combate à sarna (OLADIMEJI et al., 2000).

Leitão et al. (2008) ao estudarem duas espécies de *Lippia* nativas do Brasil (*L. lacunosa* e *L. rotundifolia*) detectaram que ambas possuíram efeito acentuado contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Algumas espécies de *Lippia* têm sido utilizadas também no reflorestamento de áreas que foram devastadas pela atividade mineradora. Na Venezuela, por exemplo, *Lippia oreganoides* tem sido usada como espécie pioneira em regiões de minério de ferro que foram desativadas ou abandonadas. Essa espécie apresenta-se extremamente adaptada a estas regiões de minério com seus solos ácidos e pedregosos (GUEVARA et al., 2005).

Apesar de muitas espécies apresentarem tais utilidades, várias outras ainda não foram estudadas e de acordo com alguns autores (ABADE et al., 1995; PASCUAL et al., 2001) são materiais promissores para o isolamento de novas substâncias químicas com diferentes potenciais, principalmente farmacológicos.

### **1.5 - Reconstrução da Filogenia:**

Existem duas vertentes na reconstrução de filogenias: a Fenética e a Cladística. A primeira utiliza taxonomia numérica para fazer inferências evolutivas, sendo que deve-se presumir que os caracteres analisados evoluem independentemente para validação das correlações entre taxa, enquanto a segunda, cujo o precursor foi Hennig (1950), parte do pressuposto que todo passo evolutivo

marca uma dicotomia de ramos que produz dois grupos geneticamente separados (grupos irmãos) (STRICKBERGER, 1995). A cladística se diferencia pelo fato de usar apenas caracteres derivados (apomorfias) ou seja, estados ancestrais de caracteres (plesiomorfias) não devem ser utilizados para definir grupos, e caracteres derivados que ocorrem em um único grupo (autoapomorfias) não devem ser considerados na análise.

Existem métodos que buscam e constroem árvores que melhor explicam a história evolutiva de um determinado táxon. Entre eles pode-se citar o UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) Evolução Mínima, Neighbor Joining, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana.

### **UPGMA** (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*)

O método UPGMA é o mais simples método de construção de árvores filogenéticas. Ele foi desenvolvido para a construção de fenogramas que apresentem as similaridades fenotípicas entre OTUs (*Operational Taxonomic Units*), mas pode também ser utilizado para construir árvores filogenéticas se as taxas de evolução são aproximadamente constantes entre diferentes linhagens (relação mais ou menos linear entre a distância evolutiva e o tempo de divergência) (FELSENSTEIN, 2004). Para uma correlação segura, a medida dessa distância linear deve estar relacionada ao número de substituições de nucleotídeos ou de aminoácidos por intervalo de tempo. A desvantagem desse método é que quando a taxa de substituição de nucleotídeos varia de uma linhagem para outra ele fornece a topologia incorreta (GRAUR, 1999).

### **Evolução Mínima (Cavalli-Sforza & Edwards - 1967)**

Este constrói a árvore dentre todas as possíveis aquela cuja soma dos tamanhos dos ramos é a menor (FELSENSTEIN, 2004). Porém, como o número de

topologias possíveis é muito grande a busca pela melhor árvore pode-se tornar-se lenta.

### **Neighbor Joining – NJ ( Saitou & Nei, 1987 )**

Este método assim como os anteriores é baseado em distância, porém, ao contrário do UPGMA não assume que as taxas de evolução são constantes entre os taxa estudados. É um método baseado na Evolução Mínima embora não examine todas as topologias possíveis, assim a análise é mais rápida e não exige computadores muito robustos. Tem como objetivo construir a árvore que minimiza o somatório dos tamanhos dos ramos.

### **Máxima Parcimônia (Fitch, 1971)**

A máxima parcimônia é um método de busca que presume que a melhor hipótese filogenética é aquela que envolve o menor número de passos evolutivos, ou seja, de mudanças que expliquem toda a variação de uma matriz de dados (seqüências de DNA ou de proteínas alinhadas, dados morfológicos, etc). Está diretamente ligada ao conceito de ancestralidade, isto é, um estado de caráter compartilhado por dois ou mais táxons foram potencialmente herdados de um ancestral comum. Desta forma, todos os sítios informativos para parcimônia devem ter uma hipótese de ancestralidade comum entre táxons, ou seja, um sítio informativo por parcimônia é aquele que apresenta variação e que os estados de caráter são compartilhados por pelo menos dois táxons. A árvore que requer menos mudanças para explicar as substituições nesses sítios informativos, é considerada a melhor hipótese filogenética para os dados em questão.



## Máxima Verossimilhança (ML – Fisher, 1922)

O método de máxima verossimilhança é um método probabilístico que define como ótima a topologia que apresenta a maior probabilidade de ter gerado os dados observados. Neste método é usado um modelo probabilístico de evolução de caracteres, onde uma série de parâmetros pode ser levada em consideração (e.g., frequência das bases, taxas de substituição nucleotídica). Desta forma, diferente do que ocorre na máxima parcimônia, todos os sítios são considerados. A partir desses sítios e baseados no modelo selecionado, o valor da verossimilhança de uma topologia é obtido pelo cálculo da probabilidade de ter ocorrido uma combinação de eventos naquela topologia e que resulte na distribuição dos dados observados (MEYER, 1995). A árvore com o maior escore de verossimilhança (a árvore mais provável) é escolhida como a melhor hipótese filogenética.

## Inferência Bayesiana

A inferência bayesiana tem sido descrita por Rannala & Yang (1996), Mau e colaboradores (MAU, 1996; MAU et al., 1997; MAU et al., 1999) e Li (1996). Ela é baseada na probabilidade posterior de um parâmetro (filogenia, tamanho dos ramos, parâmetros de substituição).

A inferência bayesiana em filogenia é baseada na probabilidade posterior de uma árvore filogenética  $\tau$ . A probabilidade posterior da *enésima* árvore ( $\tau_i$ ), condicionada a uma matrix de sequências de DNA alinhadas ( $X$ ) é obtida pela fórmula de Bayes a seguir:

$$f(\tau_i|X) = \frac{f(X|\tau_i)f(\tau_i)}{\sum_{j=1}^{B(s)} f(X|\tau_j)f(\tau_j)}$$

Onde,  $f(\tau_i|X)$  é a probabilidade posterior da *enésima* filogenia e pode ser interpretada como a probabilidade de que  $\tau_i$  seja a árvore correta gerada a partir das

sequências de DNA dadas. A verossimilhança da  $n$ -ésima árvore é  $f(\mathbf{X}|\tau_i)$  e a probabilidade *a priori* da mesma é  $f(\tau_i)$ . O somatório no denominador é todas as árvores possíveis ( $B_S$ ) para  $s$  espécies.

Para calcular a probabilidade posterior é usado um algoritmo conhecido com Markov Chain Monte Carlo (MCMC), que permite que a probabilidade posterior seja aproximada, visto que a sua formulação envolve o somatório de todas as árvores, integração de todas as combinações possíveis de tamanho de ramo e valores de parâmetros de modelos de substituição, o que não pode ser resolvido analiticamente (HUELSENBECK *et al.*, 2001).

## **2- Objetivo**

### **2.1-Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho é a construção de hipóteses filogenéticas para 39 espécies do gênero *Lippia* ocorrentes na América Latina com base em dados moleculares das regiões cloroplastidiais TrnL-F, trnQ-rps16 e das regiões nucleares ITS e Waxy.

### **2.2-Objetivos específicos:**

Pretende-se contribuir para a elaboração de um modelo de evolução nos Campos Rupestres.

Devido à existência de vários problemas taxonômicos, espera-se contribuir também para a resolução de alguns deles.

### 3 - Material e Métodos

#### Extração do DNA Vegetal

O material vegetal das 27 espécies Brasileiras foi coletado nos Campos Rupestres da Cadeia do Espinhaço e região de Cerrado do Estado Minas Gerais - Brasil. *Vouchers* foram depositados no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora. As outras 13 espécies foram cedidas pelo Instituto de Botânica Darwinion (SI)-Argentina (Tabela 1).

No Lab. de Genética do Dep. de Biologia/ICB, seguiu-se método CTAB modificado (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). Folhas jovens de cada espécie foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, que, então, foi colocado em microtubos de 1,5mL até a marca de 0,5mL (o que corresponde a aproximadamente 20mg de material vegetal). Ao microtubo foram adicionados 900µL de tampão de extração de DNA com RNase e 16µl de DTT 10%.

As amostras foram incubadas em banho-maria 37°C por duas horas e homogeneizadas a cada 30 min. Após este período, adicionou-se 20µl de Proteinase K (10mg/ml) a cada microtubo e as amostras foram incubadas em banho-maria 50°C *overnight*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14000rpm e a fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5ml. Para cada volume de amostra transferido, adicionou-se ½ parte de clorofórmio-isoamil (24:1) e ½ parte de fenol. As amostras foram vortexadas até obterem uma consistência leitosa e novamente centrifugadas a 14000rpm por 5 min. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo de 1,5ml adicionando-se o mesmo volume da amostra de clorofórmio-isoamil (24:1). Mais uma vez foi feita a centrifugação a 14000rpm por 5 min e transferindo-se em seguida a fase aquosa superior para um outro tubo de 1,5ml.

Tabela 1 – Seções de *Lippia*, suas características, espécies envolvidas no presente trabalho e suas respectivas localizações.

Seção	Caraterística	Espécie	Localização
<i>Dipterocalix</i> (Cham) Schauer	Arbustos com inflorescências semiglobosas, brevemente espiciformes na frutificação, dispostas em panículas ou corimbos terminais; brácteas imbricadas em 6 séries; cálice comprimido dorsiventralmente, com duas alas laterais vesiculosas	<i>L. sclerophylla</i> Briq. <i>L. trollii</i> Moldenke	Concepción/Paraguai Jujuy/Argentina
<i>Goniostachyum</i> Schauer	Arbustos com inflorescências axilares especiformes, 4-6 por axila, pedunculadas, brácteas côncavas ou conatas na base, plicado carenadas, imbricadas, dispostas em quatro fileiras livres ou conatas na base.	<i>L. aff gracilis</i> Schau. <i>L. aff microphylla</i> Cham. <i>L. glandulosa</i> Schau. <i>L. martiana</i> Schau. <i>L. origanoides</i> H.B. & K. <i>L. pohliana</i> Schau. <i>L. salviifolia</i> Cham. <i>L. sericea</i> Cham.  <i>L. sidoides</i> Cham. <i>L. velutina</i> Schau.	Diamantina/Brasil Diamantina/Brasil Serra do Cipó/Brasil Serra do Cipó/Brasil Diamantina/Brasil Diamantina/Brasil Serra do Cipó/Brasil Parque Est. do Ibitipoca//Brasil Serra do Cipó/Brasil Diamantina/Brasil
<i>Rhodolippia</i> Schauer	Inflorescências globosas; brácteas desenvolvidas, amplamente ovais ou orbicular-cordiformes, membráceas, coloridas, venoso-reticuladas que cobrem as corolas.	<i>L. florida</i> Cham. <i>L. felipei</i> Moldenke <i>L. hederæfolia</i> Mart & Schau <i>L. lupulina</i> Cham. <i>L. pseudo-thea</i> (St.Hil.) Schau <i>L. rhodocnemis</i> Mart & Schau <i>L. rosella</i> Moldenke	Serra do Cipó/Brasil Prata/Brasil Diamantina/Brasil Datas/Brasil Datas/Brasil Serro/Brasil Diamantina/Brasil
<i>Zapania</i> Schauer	Arbustos com inflorescências axilares, globosas a subcilíndricas após a antese, solitárias, geminadas ou terminais em racemo ou corimbo; brácteas côncavas ou planas, plurisseriadas; cálice tubuloso, membranáceo ou reduzido; flores monóclinas	<i>L. alba</i> (Mill.) N.E.Br. <i>L. arechavaletae</i> Moldenke <i>L. aristata</i> Schau. <i>L. bradei</i> Moldenke <i>L. brasiliensis</i> T.Silva & Salimena <i>L. coartacta</i> Tronc. <i>L. corymbosa</i> Cham. <i>L. diamantinensis</i> Glaz. <i>L. duartei</i> Moldenke <i>L. filifolia</i> Mart.&Schau. ex Schau <i>L. grisebachiana</i> Moldenke <i>L. hermannioides</i> Cham. <i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Moldenke <i>L. lacunosa</i> Mart. & Schau. <i>L. lippoides</i> (Cham.) Rusby. <i>L. rotundifolia</i> Cham. <i>L. rubella</i> Moldenke <i>L. salsa</i> Griseb. <i>L. tegulifera</i> Briq. <i>L. turnerifolia</i> Cham.	Diamantina/Brasil Entre Rios/Argentina Jujuy/Argentina Grão Mogol/Brasil Misiones/Argentina Paysandú/Uruguai Diamantina/Brasil Diamantina/Brasil Várzea da Palma/Brasil Diamantina/Brasil Salta/Argentina Serra do Cipó/Brasil Salta/Argentina Datas/Brasil Salta/Argentina Datas/Brasil Diamantina/Brasil Tucumán/Argentina Misiones/Argentina Salta/Argentina

A precipitação do DNA dessa fase aquosa foi feita com 10% do volume de acetato de sódio 3M e de 75 a 100% de isopropanol gelado, permanecendo no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 2 horas. O material foi centrifugado a 14000rpm por 10 min, o sobrenadante descartado e 400 $\mu\text{L}$  de etanol gelado foram adicionados. Realizou-se uma nova centrifugação a 14000rpm por 1 min e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O *pellet* foi deixado por aproximadamente 30 min a temperatura ambiente para secar e, depois, dissolvido em TE (Tris-EDTA) na geladeira por cerca de 24 horas. Após a dissolução, o DNA foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### **Quantificação do DNA em Espectrofotômetro**

A quantificação foi processada colocando-se 1 $\mu\text{L}$  de cada amostra no espectrofotômetro Nanodrop acoplado a um computador e com auxílio do programa Nanodrop ND1000, foram realizadas as medições nos comprimentos de onda 260nm, 280nm, bem como a relação 260/280 e a concentração final de DNA.

Neste caso, foram consideradas adequadas as amostras que apresentaram uma relação 260/280 entre 1,8 e 2,0 e a leitura em 320nm próxima a zero, comprimento de onda que corresponde às impurezas da amostra. As amostras que não obtiveram o padrão considerado adequado foram novamente precipitadas, conforme protocolo descrito acima.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para iniciar o preparo da reação de PCR, foi realizada a diluição das amostras em TE 0,1 para obter a concentração final de 20ng/ $\mu\text{L}$ , de acordo com a concentração indicada pela leitura feita no espectrofotômetro.

Em cada reação foram colocados 1,5µl de DNA diluído e 18,5µl de MIX PCR em cada poço da placa para PCR. O MIX PCR preparado foi preparado de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Mix para reação de PCR

Reagentes	[ ] no estoque	[ ] no MIX	Volume final (µl)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	11,50
Tampão X Kit	10	1	2,00
MgCl <sub>2</sub> mM	50	1,5	0,6
DNTPs mM	10	0,1	0,2
Primer Forward µl	5	0,5	2,0
Primer Reverse µl	5	0,5	2,0
Taq DNA polimerase	5 U/µl	1	0,2

Os *primers* usados para o seqüenciamento estão na tabela 3.

Tabela 3 – Regiões gênicas e *primers* utilizados

Região	Primer	Sequência 5' - 3'	TA (°C)	Referência Bibliográfica
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	52	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	52	
Waxy	10F	CATGCCATGCGATATGGAAC	54	Yuan & Olmstead, 2008a
	11R	ACYGTGTCAACAAGACCACC	54	
trnL-trnF	tab a	CATTACAAATGCGATGCTCT	52	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
	tab b	TCTACCGATTTGCGCCATATC	52	
	tab c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	52	
	tab d	GGGATAGAGGGACTTGAAC	52	
	tab e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	52	
	tab f	ATTTGAACTGGTGACACGAG	52	
trnQ-rps16	trnQ	CCCGCTATTCGGAGGTTCTGA	52	Calviño & Downey, 2007
	trnQ_R	GTCACTGAAATAGAACG	52	

Para cada região de uma determinada amostra foram realizadas duas repetições para o teste de anelamento de *primers* e oito repetições para a purificação desta banda de DNA.

As reações foram processadas no termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem) sob as condições presentes na tabela 4.

Tabela 4 - Condições da reação de PCR

94°C	4'		
95°C	45''	} 10 ciclos	↓ 1°C por ciclo
X+10°C	45''		
72°C	1'		
95°C	45''	} 30 ciclos	
X°C	45''		
72°C	1'		
72°C	10'		
4°C	"forever"		

X= temperatura de anelamento do *primer*

### Eletoforese em Gel de Agarose

O gel de agarose foi preparado em duas porcentagens, 1% para a purificação das bandas de TrnL-F, trnQ-rps16 e Waxy e, devido a contaminação por fungos, 1,5% para a purificação das bandas ITS. Para o teste de primers foi utilizado gel de agarose a 2%. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a 2000rpm por 1 minuto e então preparadas para serem aplicadas no gel. Para cada 20µl de reação foram adicionados 3,5µl de Tampão de carregamento 6X (com 0,125% de bromophenol blue e 40% de sacarose).

A corrida foi realizada a 110mA por cerca de 3 horas. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (3µM/mL) e então fotodocumentado sobre luz UV com auxílio do programa EagleSight Stratagene 3.22.

### Purificação do DNA a partir do Gel de Agarose

Após a corrida das amostras, o gel foi digitalizado sob luz UV. As bandas de DNA da mesma região de uma amostra foram cortadas com auxílio de um estilete, e colocadas em um microtubo de 2,0ml e posteriormente pesadas.

A purificação foi realizada com o auxílio do kit de purificação GFX PCR DNA an Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) de acordo com especificações do fabricante. As amostras já purificadas foram armazenadas a -20°C.



## Reação de Sequenciamento

Primeiramente, o DNA purificado foi descongelado em banho-maria 50°C. Para cada reação foram utilizados 4µl de MIX presente no kit DYEnamic ETdye Terminator Kit MegaBACE (GE Healthcare) contendo nucleotídeos marcados, 1µl de primer (somente o “forward” ou somente o “reverse”, para que uma única fita seja amplificada), um volume de DNA purificado com no mínimo 200ng DNA (até no máximo 5µl) e, quando necessário, o volume foi completado com água ultra pura para se obter 10µl de volume total. Adicionalmente utilizou-se o DNA (M13) presente no kit de sequenciamento como controle. Neste caso, a reação contera 1µl DNA, 2,50µl de água, 2,50µl de primer e 4µl de MIX.

As reações de sequenciamento foram processadas no termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem) sob as condições presentes na tabela 5.

Tabela 5 - Condições para reação de sequenciamento

94°C	4'	} 35 ciclos
94°C	20''	
X°C	15''	
60°C	1'	
4°C	“forever”	X= temperatura de anelamento do <i>primer</i>

Após o término da reação foi realizada a precipitação do DNA amplificado com nucleotídeos marcados. Para isso, as amostras foram centrifugadas a 2000rpm por 1 min. Foram adicionados 3µl de acetato de amônia 2,5M e 30µl de etanol 95% por reação. Para homogeneizar, foram feitas inversões sucessivas da placa de 96 poças.

Após tal procedimento as placas foram centrifugadas por 30 minutos a 2800 rpm. Posteriormente, a placa foi centrifugada invertida a 1000rpm por 1min , para retirar os reagentes e deixar somente o DNA precipitado. Após esse procedimento 30µl de etanol 70% foi acrescentado por reação. Novamente, a placa foi centrifugada a 700rpm por 10 min e a 1000rpm por 1min com a placa invertida.

Para cada reação, foram adicionados 10µl de “Loading solution for MegaBACE” (presente no kit se seqüenciamento); a placa foi agitada em aparelho

tipo Vortex e deixada na geladeira por no mínimo duas horas. Após esse período de tempo, a placa foi centrifugada a 2000rpm por 30s e armazenada a -20°C até o momento de injeção.

### **Injeção das Amostras para Seqüenciamento**

As seqüências de DNA foram obtidas através da injeção das amostras no aparelho MegaBACE 1000, com os seguintes parâmetros de corrida:

Voltagem de injeção das amostras = 2,5KV

Tempo de injeção das amostras = 80 s

Voltagem da corrida = 6KV

Tempo de corrida = 160 min.

### **Análise das Sequências e Construção das Árvores Filogenéticas**

Após a obtenção das seqüências, os cromatogramas foram avaliados com o auxílio do programa SeqmanPro (Lasergene). As seqüências foram alinhadas e avaliadas visualmente no programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007). Neste mesmo programa, depois de alinhadas, as seqüências foram avaliadas quanto à proporção de sítios polimórficos, quantidade relativa de transições/transversões, freqüências relativas dos quatro nucleotídeos.

A construção das árvores filogenéticas foi feita com dois métodos diferentes: Máxima Verossimilhança (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1967) e Análise Bayesiana (YANG e RANNALA, 1997).

As árvores baseadas em Máxima Verossimilhança (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1967) foram construídas com o programa PAUP4.0 b10 (SWOFFORD, 1993) com 100 repetições para o *bootstrap* e a escolha do modelo de substituição de bases foi realizado com o auxílio do programa ModelTest (POSADA e

KRANDALL, 1998). A Análise Bayesiana (YANG e RANNALA, 1997) foi realizada com a ajuda do programa Mr. Bayes (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), que utiliza métodos bayesianos baseados na cadeia de Monte Carlo para testar a probabilidade posterior de topologias dado o modelo de substituição previamente estabelecido com auxílio do programa MrModeltest 2.3 (NYLANDER, 2004). Para a estimativa desta probabilidade foram efetuadas 5.000.000 de gerações.

Como grupo externo foi utilizado a espécie *Duranta repens* que assim como as espécies do gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae. As sequências foram obtidas juntamente às sequências de *Lippia* utilizando a metodologia supracitada.

### **Localização das espécies**

Para construção de um mapa político e outro de relevo, afim de se obter a distribuição e localização das espécies de *Lippia*, as coordenadas geográficas do local de coleta de cada uma (dado não mostrado) foram inseridas no programa Arcview 3.2 (ESRI).

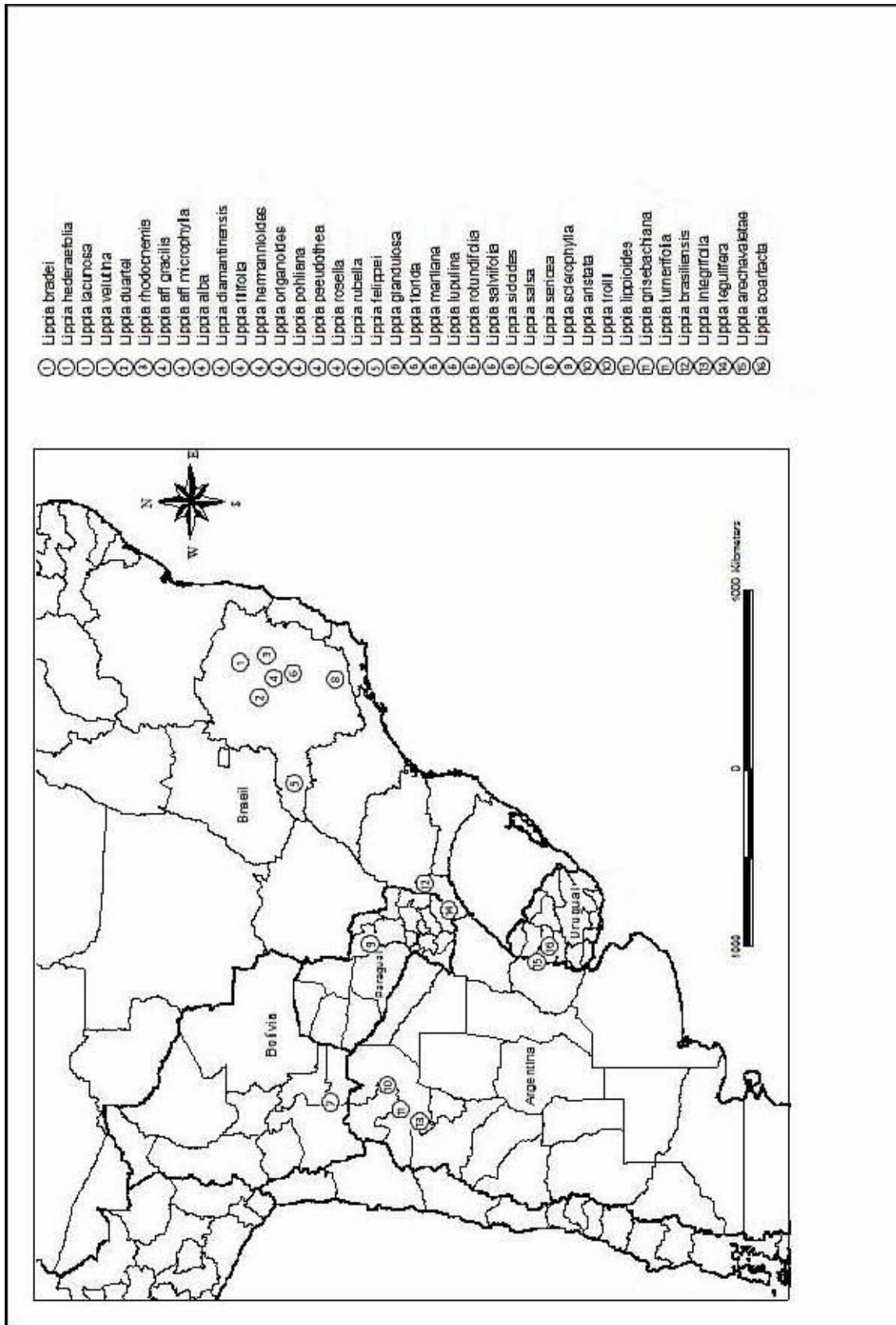


Figura 1 – Mapa de distribuição das espécies do gênero *Lippia* estudadas

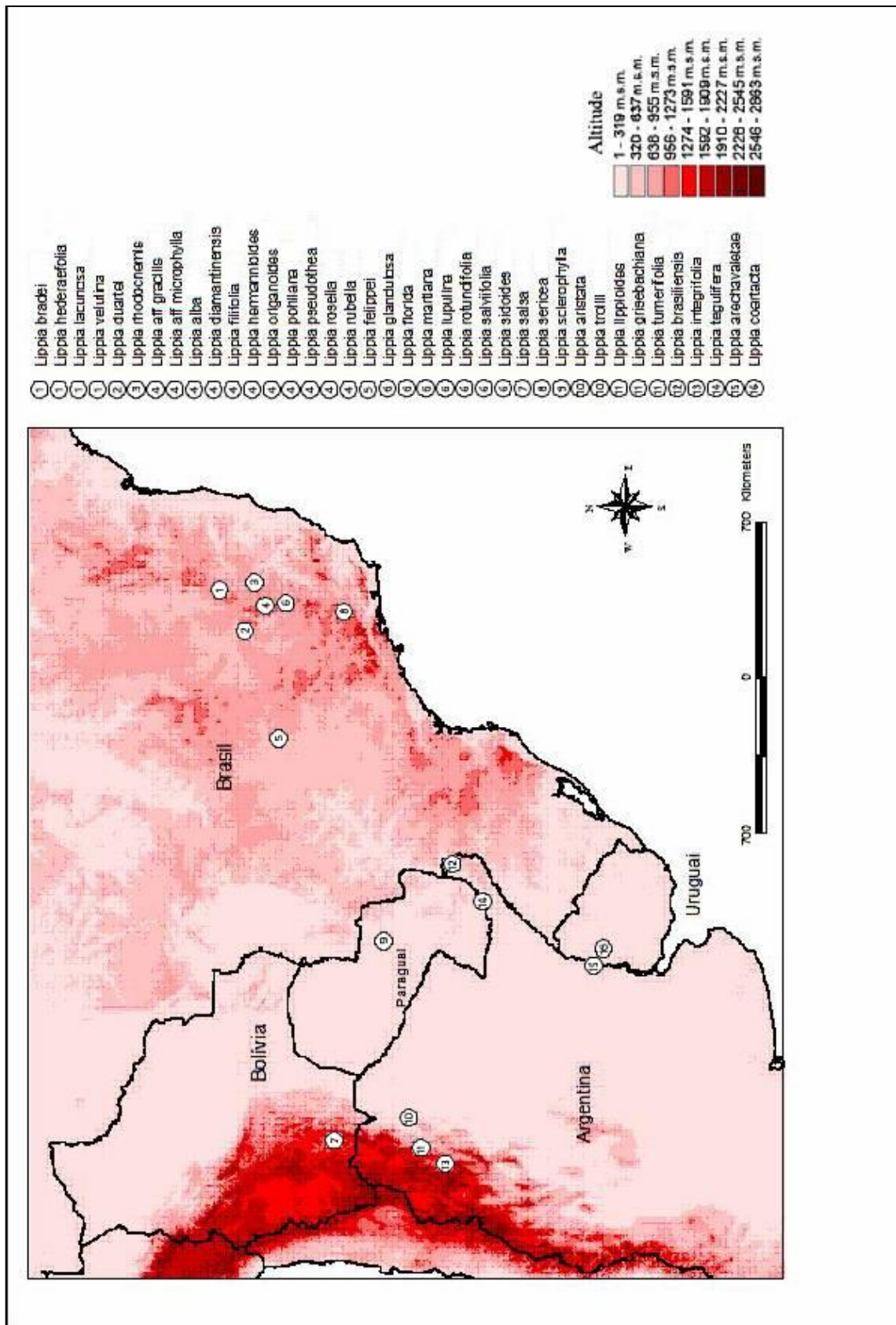


Figura 2 – Mapa do relevo da área onde estão localizadas as espécies do gênero *Lippia* estudadas.

## 4 – Resultados

### Região ITS

Para a região ITS foram analisados 294 sítios dos quais 104 são conservados, 83 são autoapomórficos (sítios não informativos) e 82 são sinapomórficos (informativos para parcimônia). A relação entre transições e transversões foi de 1,5 e a média de composição de bases foi de 16,1% de timina, 31,5% de citosina, 23,2% de adenina e 29,2% de guanina (Tabela 6).

A árvore dessa região gerada a partir da análise bayesiana (Figura 3) apresentou uma boa topologia com boa sustentação dos ramos.

O primeiro aspecto a ser observado é a delimitação das seções *Dipterocalix*, *Goniostachyum*, *Rhodolippia* e *Zapania*. Todas as espécies da seção *Goniostachyum* (*L. aff gracilis*, *L. aff martiana*, *L. sericea*, *L. organoides*, *L. glandulosa*, *L. sidoides*, *L. pohliana*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *L. velutina*) formaram um clado único com 83% de probabilidade posterior (PP) enquanto as espécies das demais seções ficaram em clados sobrepostos. As espécies da seção *Dipterocalix* (*L. sclerophylla* e *L. trollii*) agruparam-se em um clado com 100% de PP formando um clado maior com *L. salsa* e *L. integrifolia* (100% de PP) juntamente a *L. rubella* pertencentes à seção *Zapania*.

*L. florida*, *L. filifolia* e *L. hederæfolia* agruparam-se com 69% enquanto *L. coartacta*, *L. arechavaletae* e *L. turnerifolia* agruparam-se com 100% de PP. Outro clado bem sustentado foi o formado por *L. corymbosa* e *L. lacunosa* (97% de PP) juntamente a *L. diamantinensis* (*Zapania* - 100% de PP). *L. rosella*, *L. lupulina* e *L. felippei*, inseridas na seção *Rhodolippia*, agruparam-se com 100% de PP formando um clado maior com *L. alba* (*Zapania*) e as outras três espécies anteriores com 90% de PP.

As espécies *L. duartei* e *L. aristata* também formaram um clado com 100% de PP juntamente a *L. lippioides* (100% de PP).

A árvore de ML (Figura 4) mostrou topologia semelhante à gerada por inferência bayesiana apresentando as espécies da seção *Goniostachyum* bem

delimitadas em um clado único e as das outras três seções sobrepostas. As espécies *L. corymbosa* e *L. lacunosa* agruparam com 51% de *bootstrap* juntamente a *L. diamantinensis* (88% de *bootstrap*). O clado *L. rosella*, *L. lupulina* e *L. felippei* foi sustentado por 100% de *bootstrap*. Com este mesmo valor de sustentação foi formado o clado *L. aristata* e *L. duartei* com *L. lippioides* e outro formado por *L. coartacta*, *L. arechavelatae* e *L. turnerifolia*. *L. sclerophylla* e *L. trollii* também formaram um clado bem sustentado com 96% de *bootstrap*, assim como o formado por *L. salsa* e *L. integrifolia* (91% de *bootstrap*). *L. florida*, *L. filifolia* e *L. hederaefolia* agruparam-se com baixo valor de *bootstrap* (58%).

Não foi possível a amplificação dessa região para a espécie *L. tegulifera* provavelmente por seu DNA estar muito degradado.

Tabela 6 - Sumário da característica das sequências

RG	NTS	NSC	Aut	Sin	transições/ transversões	Média de composição de bases (%)			
						T	C	A	G
ITS	294	104	83	82	1,5	16,1	31,5	23,2	29,2
Waxy	313	16	64	218	0,8	32,2	15,7	33,5	18,6
tabAB	687	461	128	57	0,8	35,4	13,8	36	14,9
tabCF	944	703	145	80	0,9	28,1	19,5	33,9	18,5
trnQ- rps16	371	260	69	31	0,9	36,6	17,6	31,3	17,5

RG: região gênica; NTS: número total de sítios; NSC: número de sítios conservados; Aut: autoapomorfia; Sin: sinapomorfia

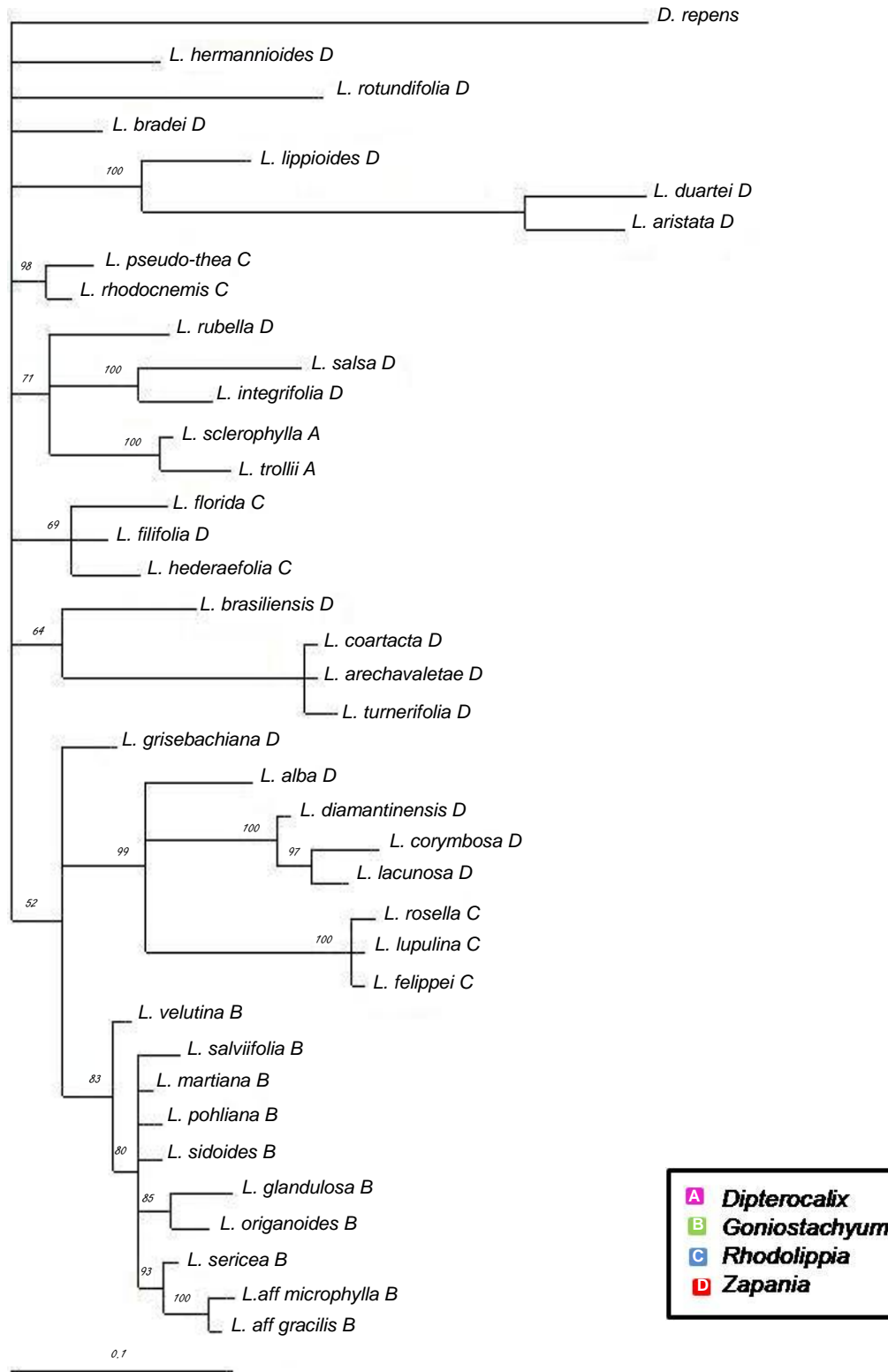


Figura 3 – Árvore da região ITS gerada a partir de Análise Bayesiana. Os valores acima dos ramos indicam as probabilidades posteriores. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.



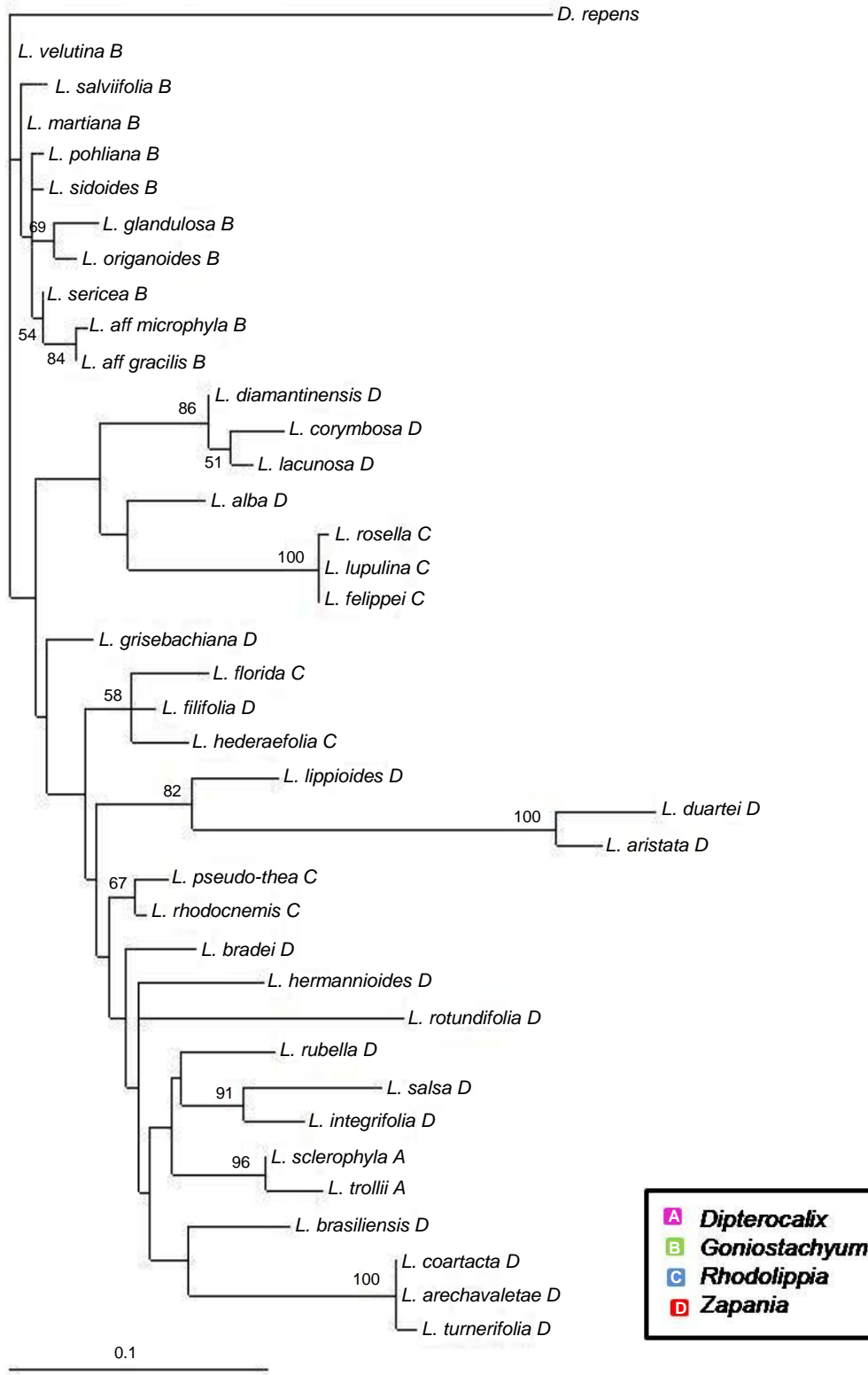


Figura 4 – Árvore da região ITS gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança. Os números acima e abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap*. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.

## Região Waxy

Foram analisados para a região Waxy 313 sítios dos quais 16 são conservados, 64 são autoapomórficos (não informativos) e 218 são informativos para parcimônia (sinapomorfias). A relação entre transições e tranversões foi de 0,8 e a média de composição de bases foi de 32,2% de timina, 15,7% de citosina, 33,5% de adenina e 18,6% de guanina (Tabela 6). A árvore de inferência bayesiana gerada para essa região (Figura 5) mostrou boa topologia e ramos bem sustentados assim como a árvore da região ITS (Figura 3). As espécies da seção *Gonistachyum* (*L. aff gracilis*, *L. aff martiana*, *L. sericea*, *L. organoides*, *L. glandulosa*, *L. pohliana*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *L. velutina*) agruparam-se com 98% de PP com exceção de *L. sidoides* que se agrupou com *L. filifolia* com 57% de PP. *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* formaram um clado com 80% de PP enquanto *L. diamantinensis* se agrupou com *L. lupulina* (96% de PP) e *L. felippei* (99% de PP).

Outros cladogramas formados foram: *L. florida* e *L. rubella* com 100% de PP e *L. pseudo-thea* e *L. rhodocnemis* com 99% de PP. *L. duartei* que anteriormente havia se agrupado com *L. aristata* (região ITS) agrupou-se com *L. salsa* e *L. integrifolia* com 96% de PP. *L. turnerifolia* e *L. arechavaletae* formaram um clado bem sustentado com 100% de PP que ficou separado do restante das espécies. Estas duas espécies, que na região anteriormente analisada, haviam se agrupado com *L. coartacta*, agora formou um clado com *L. aristata* com 63% de PP.

*L. grisebachiana* que não estava em um ramo bem definido na árvore da região anterior aqui agrupou-se com *L. sclerophylla* com 84% de PP. *L. trollii* que estava agrupada com *L. sclerophylla* apresentou-se em um clado com *L. hermannioides* com 98% de PP.

A árvore de ML (Figura 6) mostrou topologia semelhante a da inferência bayesiana com espécies da seção *Gonistachyum* (*L. aff gracilis*, *L. aff martiana*, *L. sericea*, *L. organoides*, *L. glandulosa*, *L. pohliana*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *L. velutina*) bem delimitadas (79% de *bootstrap*) e as espécies das outras três seções sobrepostas. *L. turnerifolia* e *L. arechavaletae* (100% de *bootstrap*) separaram-se do restante das espécies com 77% de *bootstrap*. *L. felippei*, *L. diamantinensis* e *L. lupulina* agruparam-se com 81% de *bootstrap* enquanto *L. duartei*, *L. salsa* e *L.*

*integrifolia* agruparam-se com 80%. *L. sidoides*, assim como na árvore de inferência bayesiana (Figura 5) ficou fora do clado das *Goniostachyum* agrupando-se com *L. filifolia* (menos de 50% de *bootstrap*). Houve também a formação do clado *L. florida* e *L. rubella* (81% de *bootstrap*).



Figura 5 – Árvore da região Waxy gerada a partir de Análise Bayesiana. Os valores acima e abaixo dos ramos indicam as probabilidades posteriores. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.

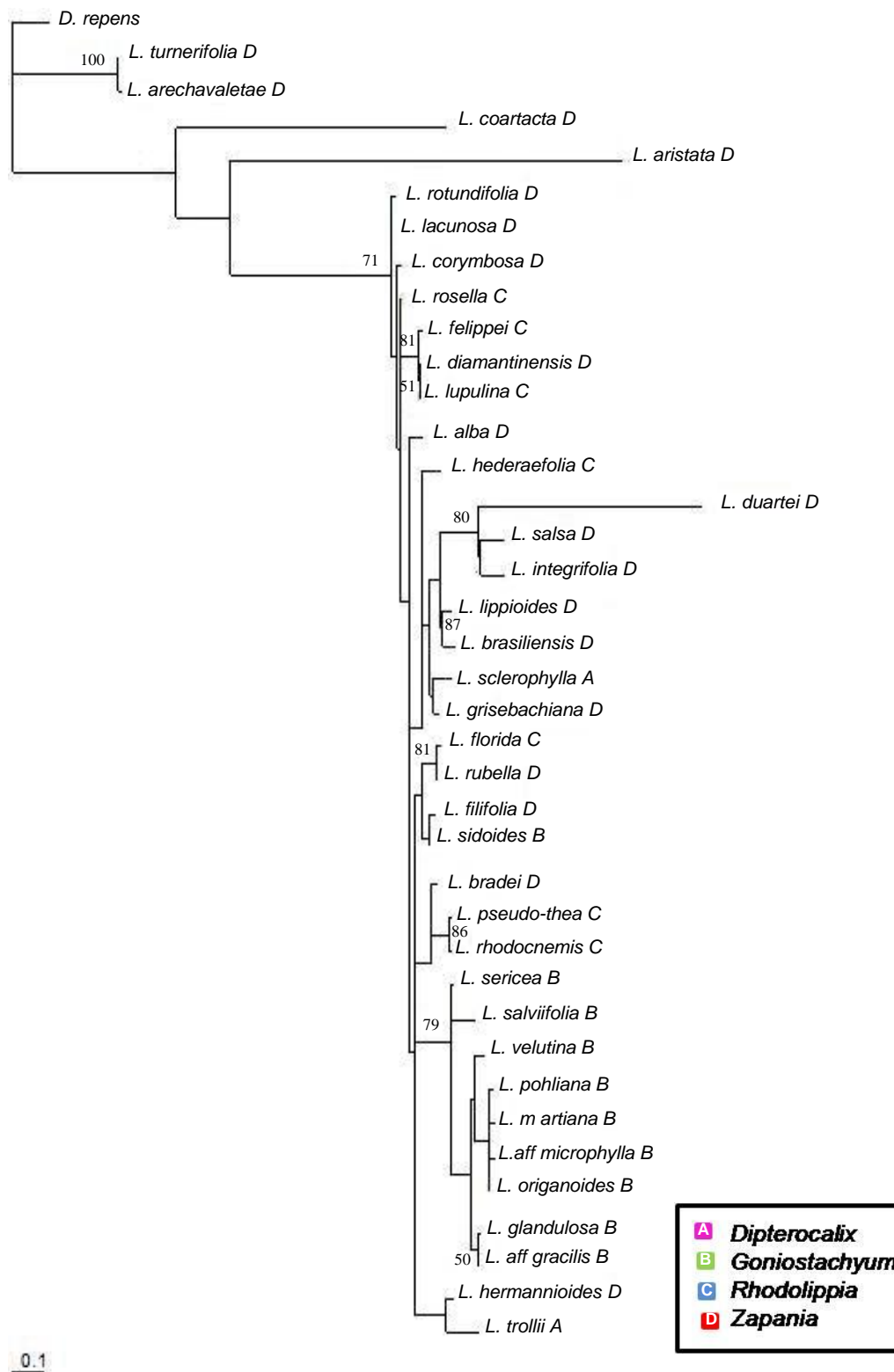


Figura 6 – Árvore da região Waxy gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.

## Região trnL-F

### tabAB

O número total de sítios analisados para esta região foi de 687 dos quais 461 são conservados, 128 são autoapomórficos (não informativos) e 57 sinapomórficos (informativos para parcimônia). A relação entre transições e transversões foi de 0,8 e média de composição de bases foi de 35,4% de timina, 13,8% de citosina, 36% de adenina e 14,9% de guanina (Tabela 6).

A árvore gerada a partir da análise bayesiana para essa região (Figura 5) apresentou boa topologia, porém, ao contrário das outras regiões a seção *Goniostachyum* (*L. aff gracilis*, *L. aff martiana*, *L. sericea*, *L. organoides*, *L. glandulosa*, *L. sidoides*, *L. pohliana*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *L. velutina*) não ficou delimitada em um clado único sobrepondo-se às outras seções.

*L. florida* agrupou-se com *L. integrifolia* com 86% de PP. *L. duartei*, assim como na região ITS, formou um clado com *L. aristata* (94% de PP). *L. sclerophylla* que, nas análises anteriores agrupou-se com *L. trolli* e com *L. grisebachiana*, aqui formou clado com *L. brasiliensis* (96% de PP). *L. bradei* agrupou-se com *L. rhodocnemis* (74% de PP) enquanto *L. salviifolia*, *L. alba* e *L. sericea* formaram um clado com 85% de PP.

*L. martiana* e *L. aff gracilis* agruparam-se com 58% de PP, já *L. arechavaletae* e *L. turnerifolia* mostraram-se juntas em um clado com 98% juntamente com *L. aff microphylla* (82% de PP). *L. coartacta*, que na região ITS (Figura 3) agrupou-se com *L. arechavaletae* e *L. turnerifolia* e na região Waxy (Figura 5) agrupou-se com *L. aristata*, agora formou clado com *L. hederaefolia* (96% de PP). Assim como na região ITS (Figura 3), *L. lacunosa* e *L. corymbosa* agruparam-se com alto valor de sustentação (100% de PP).

A árvore de ML (Figura 8) apresentou topologia semelhante a apresentada na análise anterior, porém os valores de sustentação dos ramos foram menores. As espécies de seção *Goniostachyum* (*L. aff gracilis*, *L. aff martiana*, *L. sericea*, *L.*

*origanoides*, *L. glandulosa*, *L. sidoides*, *L. pohliana*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *L. velutina*) ficaram sobrepostas às espécies das outras seções. *L. sclerophylla* agrupou-se com *L. brasiliensis* (68% de *bootstrap*) enquanto *L. florida* agrupou-se com *L. integrifolia* (53% de *bootstrap*). *L. duartei* e *L. aristata* formaram um clado com 60% e *L. arechavaletae* e *L. turnerifolia* com 74% de *bootstrap*. *L. coartacta* apareceu agrupada com *L. hederaefolia* com 70% de *bootstrap* e com 69% *L. corymbosa* e *L. lacunosa* agruparam-se em outro clado distinto.

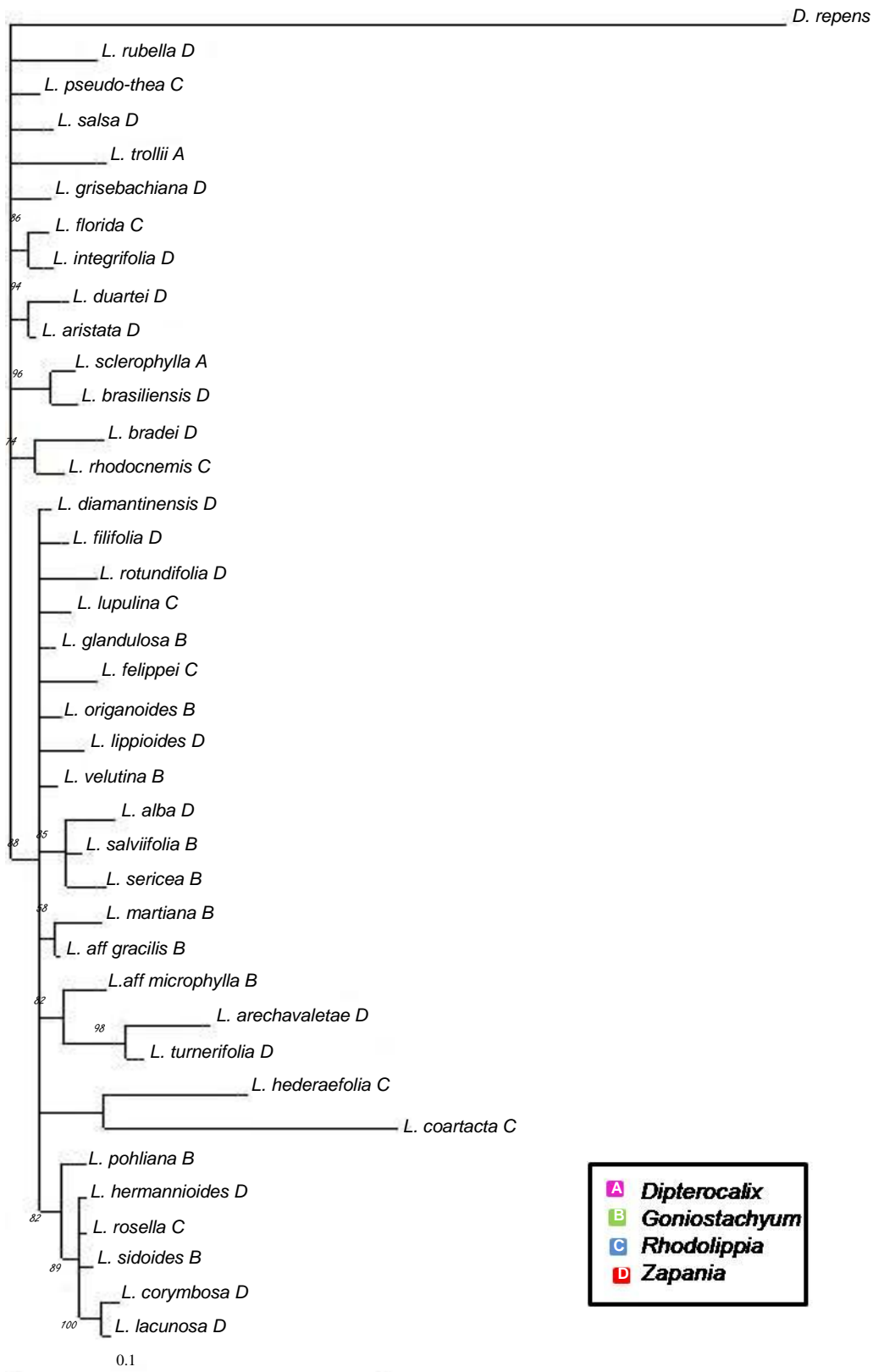


Figura 7 – Árvore da região trnL-F-tabAB gerada a partir de Análise Bayesiana. Os valores acima e abaixo dos ramos indicam as probabilidades posteriores. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.



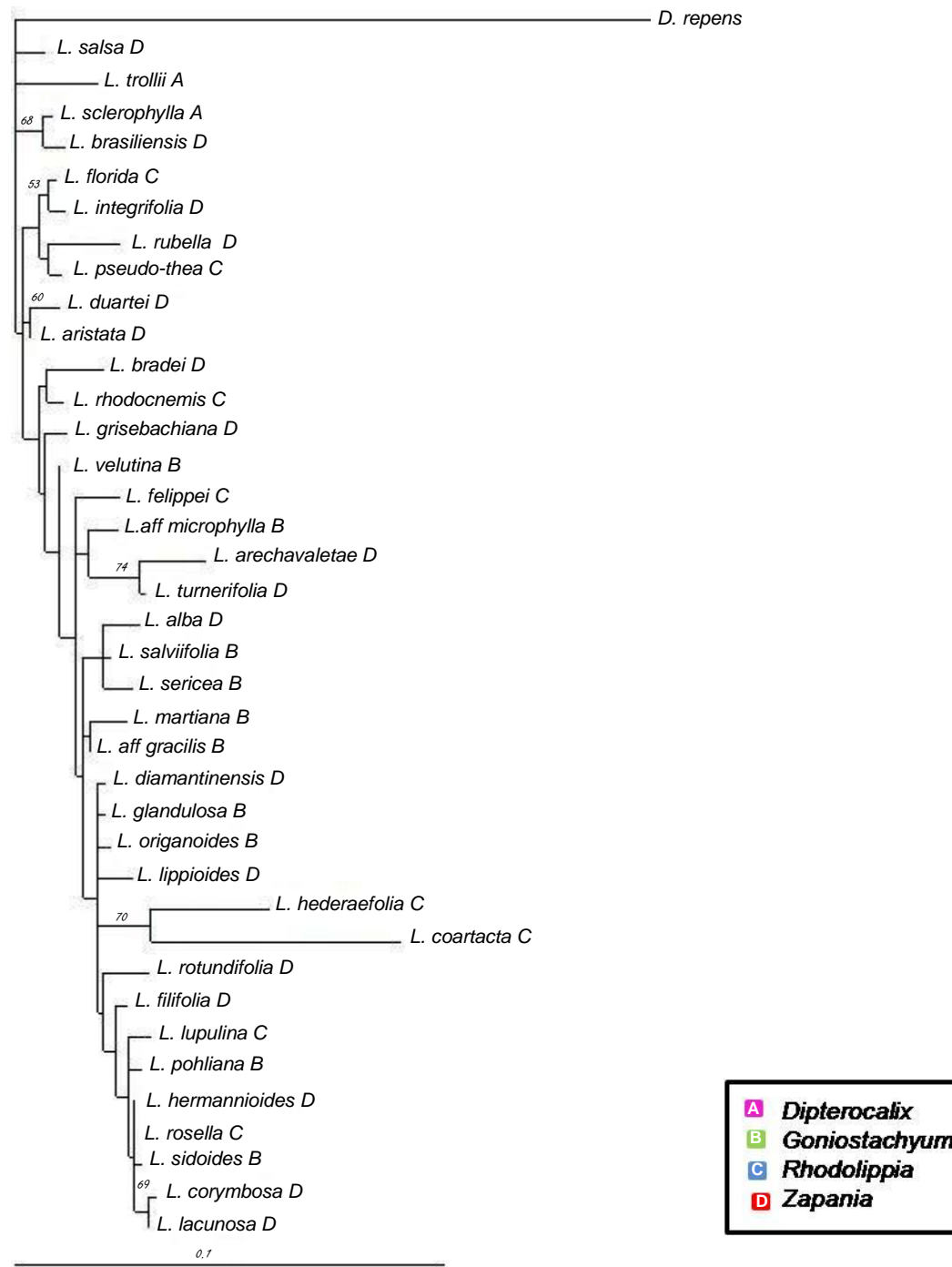


Figura 8 – Árvore da região trnL-F-tabAB gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.

## tabCF

Esta região apresentou 944 sítios dos quais 703 são conservados, 145 são autoapomórficos (não informativos) e 80 são sinapomórficos (informativos para parcimônia). A relação entre transições e transversões foi de 0,9 e a média de composição de bases foi de 28,1% de timina, 19,5% de citosina, 33,9% de adenina e 18,5% de guanina (Tabela 6).

Para esta região, a inferência bayesiana (Figura 9) gerou uma árvore com topologia razoável com algumas espécies não inseridas em clados bem resolvidos como é o caso de *L. hermannioides*, *L. diamantinensis*, *L. filifolia*, *L. rubella*, *L. glandulosa*, *L. alba*, *L. felippeii*, *L. salviifolia*, *L. aff gracilis*, *L. sidoides* e *L. arechavaletae*.

Nota-se que as espécies das quatro seções ficaram sobrepostas. Com 100% de PP foi formado um clado com *L. grisebachiana*, *L. trollii* e *L. velutina*. *L. salsa* e *L. integrifolia* formaram outro clado com 66% de PP juntamente a *L. sericea*, *L. coartacta*, *L. aristata* e *L. brasiliensis* (99% de PP).

*L. bradei*, *L. florida*, *L. pseudo-thea* e *L. rhodocnemis* agruparam-se com 98% de PP sendo que *L. pseudo-thea* e *L. rhodocnemis* formaram um clado menor com este mesmo valor de sustentação. Outros clados formados foram *L. lupulina* e *L. rosella* (92% de PP) e *L. pohliana*, *L. duartei* e *L. origanoides* (90% de PP).

*L. corymbosa* que anteriormente havia se agrupado com *L. lacunosa* agora apresentou-se em um clado com *L. rotundifolia* com 96% de PP. *L. lacunosa*, por sua vez, agrupou-se *L. hederaefolia* e *L. aff microphylla* com 90% de PP.

Por último, *L. sclerophylla*, que nas análises anteriores havia se agrupado com *L. trollii*, *L. grisebachiana* e *L. brasiliensis*, formou um clado com *L. lippoides* e *L. turnerifolia* (62% de PP).

A árvore de ML (Figura 10), assim como a de inferência bayesiana (Figura 9), apresentou as espécies das quatro seções sobrepostas, sendo que *L. grisebachiana* agrupou-se com *L. trollii* e *L. velutina* com valor baixo de sustentação (54% de bootstrap).

*L. lippoides*, *L. sclerophylla* e *L. turnerifolia* não formaram clado bem definido. *L. florida*, *L. bradei*, *L. pseudo-thea* e *L. rhodocnemis* agruparam com 60% de

*bootstrap*. *L. lacunosa* agrupou-se com *L. hederaefolia* e *L. aff microphylla* (78% de *bootstrap*), sendo que *L. rotundifolia* e *L. corymbosa* não formaram um clado bem delimitado assim como o restante das espécies.

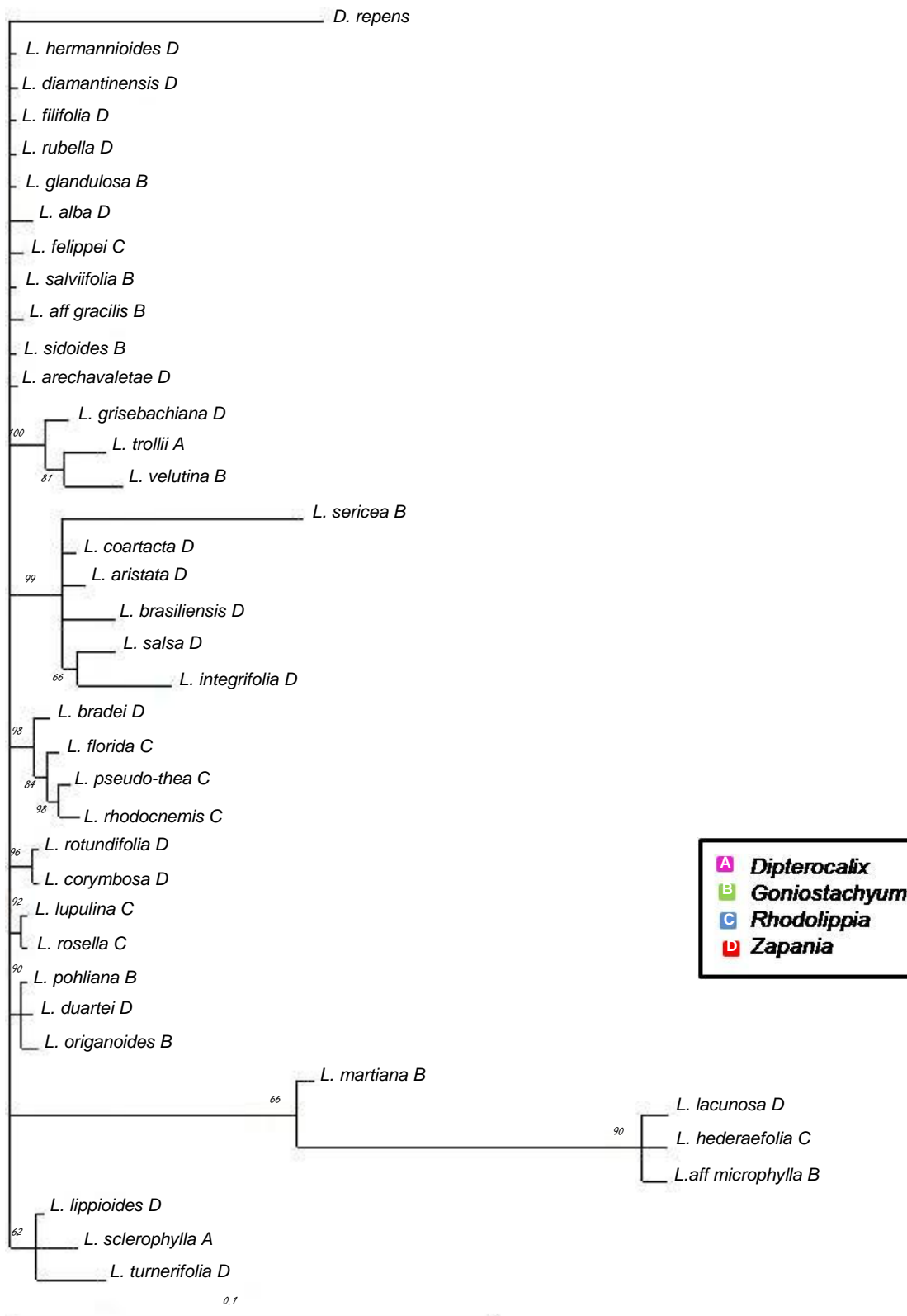


Figura 9 – Árvore da região trnL-F-tabCF gerada a partir de Análise Bayesiana. Os valores acima e abaixo dos ramos indicam as probabilidades posteriores. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.

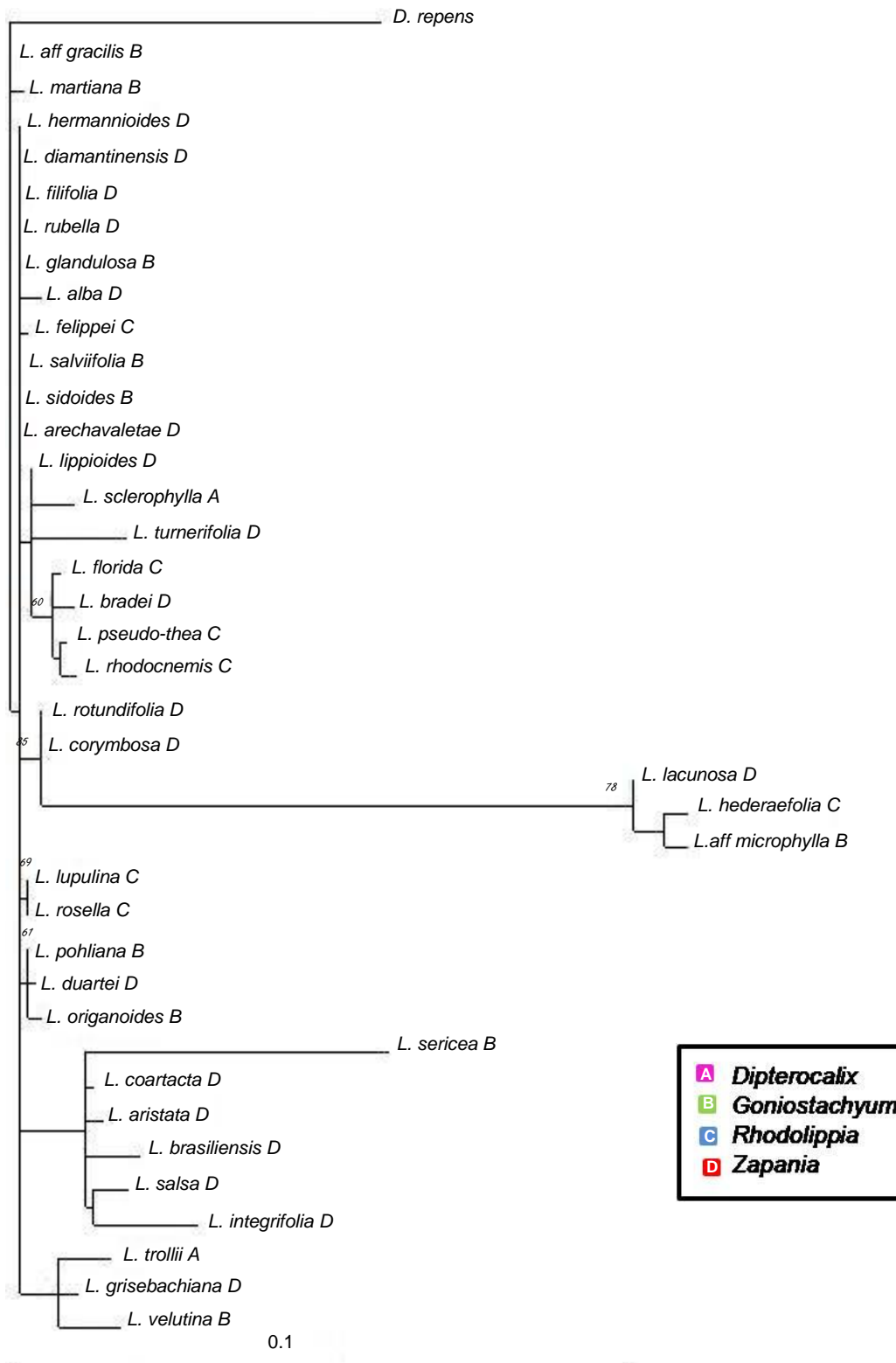


Figura 10 – Árvore da região trnL-F-tabCF gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança. Os números acima dos ramos indicam os valores de *bootstrap*. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.

## Região trnQ-rps16

O número de sítios analisados para esta região foi de 371 dos quais 260 são conservados, 69 são autoapomórficos (não informativos) e 31 são sinapomórficos (informativos para parcimônia). A relação entre transições e transversões foi de 0,9 e a média de composição de bases foi de 36,6% de timina, 17,6% de citosina, 31,3% de adenina e 17,5% de guanina (Tabela 6).

A topologia apresentada pela inferência bayesiana para esta região (Figura 11), apesar de mostrar algumas espécies em clados não muito bem definidos, apresentou alguns resultados interessantes.

Assim como na árvore da região ITS (Figura 3), todas as espécies da seção *Goniostachyum* (*L. aff gracilis*, *L. aff martiana*, *L. sericea*, *L. origanoides*, *L. glandulosa*, *L. sidoides*, *L. pohliana*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *L. velutina*) agruparam-se em um clado único bem sustentado com 100% de PP e *L. aristata* e *L. duartei* voltaram a agrupar-se (89% de PP).

Nesta análise, *L. sclerophylla* agrupou-se com *L. trollii* e *L. brasiliensis* (80% de PP), clado que não havia se formado nas análises das regiões anteriores. *L. lacunosa* que aparecia ora agrupada com *L. corymbosa*, ora agrupada com *L. rotundifolia* formou um clado bem sustentado (90% de PP) com ambas as espécies.

A árvore de ML (Figura 12) apresentou os mesmos clados que a árvore de inferência bayesiana (Figura 11) para esta região. As espécies da seção *Goniostachyum* foram as únicas a formar um clado separado e bem sustentado (100% de *bootstrap*). *L. lacunosa* agrupou-se a *L. corymbosa* e *L. rotundifolia* (58% de *bootstrap*). *L. duartei* e *L. aristata* formaram um clado com 56% de *bootstrap* e com valor semelhante de sustentação *L. sclerophylla*, *L. trollii* e *L. brasiliensis* se agruparam.

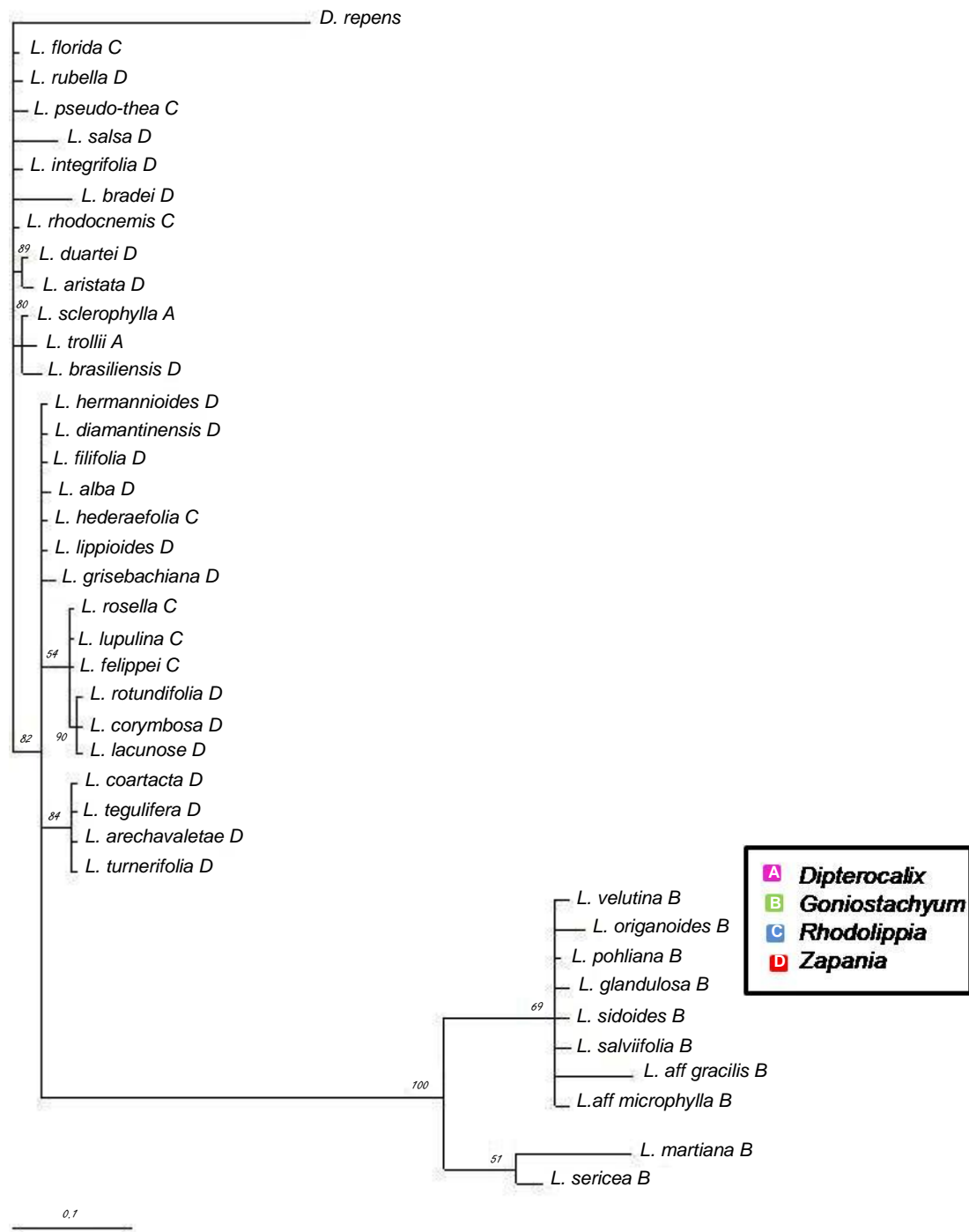


Figura 11 – Árvore da região trnQ-rps16 gerada a partir de Análise Bayesiana. Os valores acima dos ramos indicam as probabilidades posteriores. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.

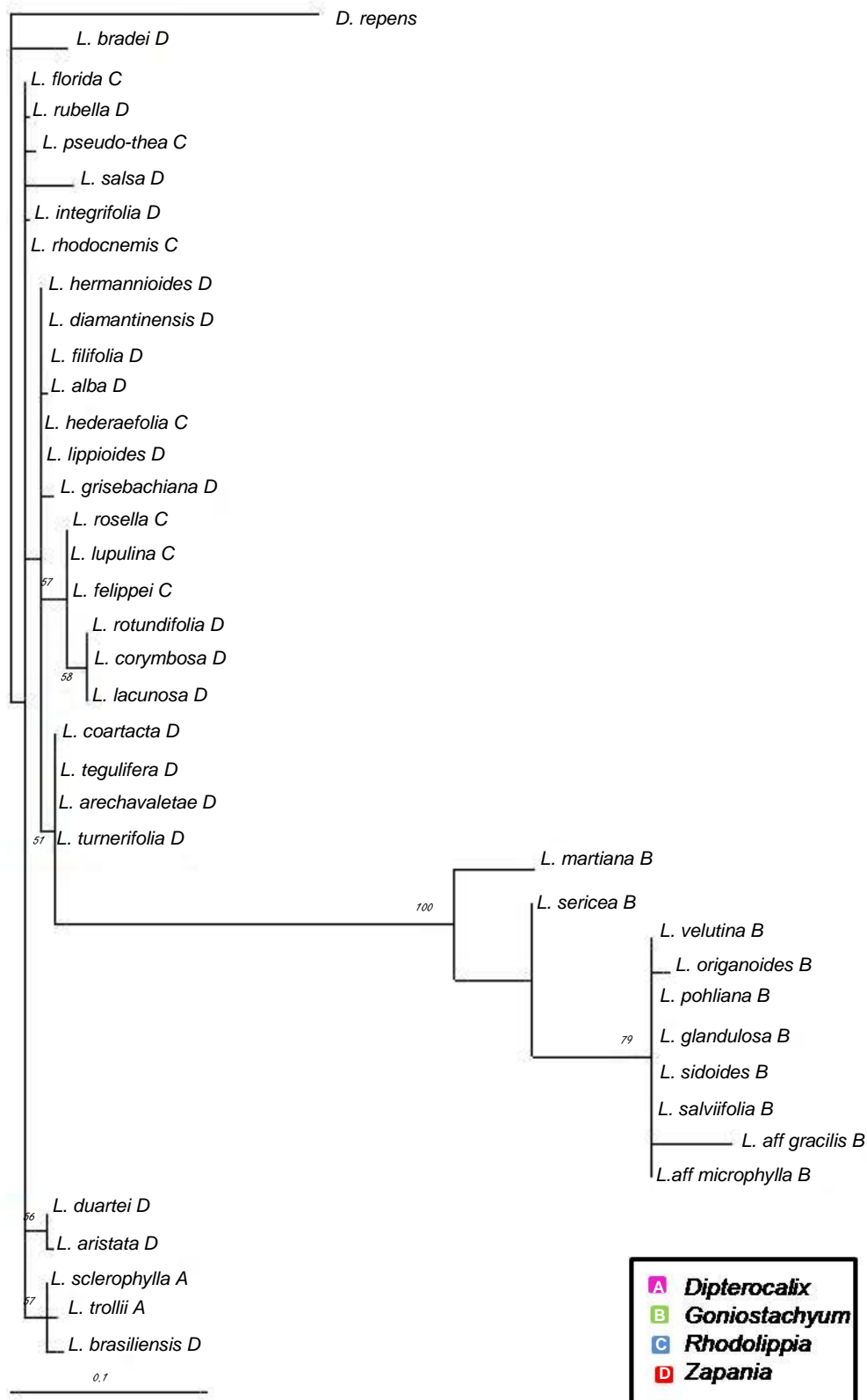


Figura 12 – Árvore da região trnQ-rps16 gerada a partir de Análise de Máxima Verossimilhança. Os números acima e abaixo dos ramos indicam os valores de *bootstrap*. Cada seção do gênero *Lippia* está representada por uma letra.



## Localização das espécies

Com a construção do mapa político (Figura 1) constatou-se que as espécies estudadas aqui abrangem uma área que vai desde o norte de Minas Gerais, passando pelo Paraguai, Uruguai, até os Andes Argentino e Boliviano. Com o mapa do relevo (Figura 2) observou-se que as espécies se distribuem em altitudes diversas, sendo que a maioria está entre 956m a 1273m de altitude numa área que corresponde às regiões da Cadeia do Espinhaço, do Triângulo Mineiro e da Serra do Ibitipoca. Outras encontram-se a mais de 1500m nos Andes, enquanto o restante está em regiões mais baixas (1m a 319m).

## 5 – Discussão

Sabe-se que filogenia molecular em plantas a níveis intra ou intergenéricos possui certa defasagem com relação aos estudos desse tipo em outros organismos, principalmente, devido ao fato de não haver um marcador molecular específico para os diversos taxa vegetais (SHAW et al., 2007; HUGHES et al., 2006). Sequências de DNA de cloroplasto e mitocondrial apresentaram muito pouca variação para os grupos de plantas a níveis de espécie e populacional porém, o mesmo não é válido para a região ITS que é muito usada em análises desta natureza (HUGHES et al., 2006).

Provavelmente as topologias das árvores das regiões ITS e Waxy (Figuras 3 a 6) diferiram das regiões trnL-F e trnQ-rps16 (Figuras 7 a 12) pelo fato de serem genes nucleares e de cloroplasto, respectivamente. A quantidade de sítios informativos dos genes nucleares foi maior que nos genes plastidiais (Tabela 7) o que pode ter favorecido a topologia das árvores das regiões ITS e Waxy. Yuan & Olmstead (2008b) concluíram que nas análises filogenéticas deve-se combinar dados de regiões plastidiais com regiões nucleares para se obter dendrogramas que mostrem a verdadeira história evolutiva a níveis infragenéricos. Isso porque a partir

do DNA de cloroplasto é possível traçar a herança materna (herança unidirecional), enquanto que com o DNA nuclear tem-se um maior número de sítios variáveis.

Neste estudo, as regiões que mostraram melhor topologia das árvores foram as regiões nucleares ITS e Waxy, com ramos bem sustentados e valores de bootstrap e probabilidade posterior altos (Figuras 3 a 6).

Nas árvores da região ITS (Figuras 3 e 4) e região trnQ-rps16 (Figuras 11 e 12) a seção *Goniostachyum* ficou bem delimitada com todas as espécies reunidas em único clado bem sustentado. Este resultado corrobora os resultados obtidos por Viccini et al. (2005) que observaram o mesmo número cromossômico ( $2n=24$ ) para todas as espécies estudadas desta seção. Além disso, Sousa (2008) observou que as espécies desta seção apresentam também as mesmas características palinológicas: exina psilada e escabrada. Estes resultados reforçam a classificação morfológica (MOLDENKE, 1965) e também a sugestão de que a mesma possa constituir um gênero a parte (SANDERS, 2001) evidenciam a existência de monofiletismo na seção.

As outras seções *Dipterocalix*, *Zapania* e *Rhodolippia* ficaram sobrepostas em todas as árvores geradas (Figuras 3 a 12). Contudo as duas únicas espécies da seção *Dipterocalix* (Tabela 1) formaram um clado bem sustentado nas árvores da região ITS (Figuras 3 e 4).

A falta de delimitação para a seção *Zapania* também foi encontrada em outros estudos. Sousa (2008) mostrou que as espécies da seção *Zapania* foram as que apresentaram maior variação palinológica. Essa variação também está presente nos números cromossômicos, sendo esta, a seção que apresentou maior variação numérica. Nela são encontrados, por exemplo, o menor ( $2n=20$ ) e o maior número cromossômico ( $2n=56$ ) descritos para o gênero (VICCINI et al., 2005). Estas observações tanto do ponto de vista molecular quanto palinológico e cromossômico adicionadas à ampla variação morfológica presente nas espécies da seção, reforçam o fato de que ela seja parafilética e que tenha que ser revista do ponto de vista morfológico.

As espécies *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* pertencentes à seção *Zapania* e apresentam problema de delimitação taxonômica. Elas apresentam o mesmo hábito, vários caracteres morfológicos similares, uma filotaxia semelhante, folhas coreáceas, densa camada de tricomas nas folhas e nas flores (SALIMENA, 2002) e números cromossômicos iguais ( $2n=56$ ) (VICCINI et al., 2005). Apesar de todas essas

semelhanças, a única região que as agrupou foi a região Waxy (Figuras 3 e 4), na qual formaram um clado com 80% de probabilidade posterior. Nas árvores das outras regiões observou-se o agrupamento tanto de *L. lacunosa* com *L. corymbosa* (regiões ITS e tabAB – Figuras 3,4 e 7,8) quanto de *L. rotundifolia* e *L. corymbosa* (tabCF – Figuras 10 e 11) sendo que as 3 se agruparam em um único clado na árvore da região trnQ-rps16 (Figuras 11 e 12). Embora algumas diferenças quanto ao padrão de heterocromatina, ao conteúdo de DNA, ao padrão morfológico da exina do grão de pólen e da anatomia foliar tenham sido observadas por Sousa (2008), o agrupamento de *L. corymbosa* com *L. rotundifolia*, *L. lacunosa* ou ambas nas diferentes árvores geradas reforça a existência de parentesco próximo entre elas. Na árvore do gene trnQ-rps16 por inferência bayesiana, *L. corymbosa*, *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* apareceram em um clado bem sustentado com 90% de probabilidade posterior. Adicionalmente, a semelhança morfológica das inflorescências (caráter dignóstico para estabelecer as seções do gênero), a distribuição geográfica (as três espécies possuem sobreposição de áreas de ocorrência), de número cromossômico e de quantidade de DNA sustentam fortemente a formação do clado citado. *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* possuem  $2n=56$  cromossomos enquanto *L. corymbosa* tem exatamente a metade ( $2n=28$ ) (VICCINI *et al.* 2005). Paralelamente, dados obtidos por meio da citometria de fluxo indicam o dobro da quantidade de DNA de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* em relação à *Lippia corymbosa* (dados não publicados), o que confirma a grande proximidade entre elas e possibilita o início de uma discussão sobre uma possível origem por poliploidização de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* a partir de *L. corymbosa*. A junção destas espécies em um ramo bem resolvido na árvore de alguma região plastidial deste estudo, fato que ocorreu na região trnQ-rps16 (Figuras 11 e 12), pode levar à conclusão de que o aparecimento de *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* deveu-se a um evento de autoploidia em *L. corymbosa*. Este resultado deixa aberta a possibilidade de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* serem a mesma espécie (variedades diferentes?). No entanto, a topologia gerada pelo ITS posiciona estas duas espécies em clados diferentes, mostrando que provavelmente apresentam diferenças significativas. Para explicar estes resultados contraditórios é preciso ter em conta que o trnQ-rps16 é um gene plastidial, portanto de herança materna, enquanto o ITS é uma seqüência nuclear e portanto de origem biparental. É sabido que além de autoploidia, as plantas podem se originar por aloploidia. Com isso, *L.*

*lacunosa* e *L. rotundifolia* seriam ambas frutos de eventos de aloploidia envolvendo *L. corymbosa* necessariamente como espécie-mãe em cada um dos eventos, mas teriam espécies-pai diferentes. Este cenário explicaria porque estas três espécies se agruparam na árvore de trnQ-rps16 e não se agruparam nas árvores do ITS e Waxy. No entanto, na região trnL-FtabAB e trnL-FtabCF, *L. corymbosa* aparece agrupada respectivamente com *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*. É possível que durante o evento de poliploidização cópias gênicas tenham se alterado (DOYLE et al., 2008) e conseqüentemente exista diferença nesta região que possa explicar o não agrupamento das três espécies.

As espécies *L. duartei* e *L. aristata* também pertencentes à seção *Zapania* ficaram agrupadas em três das regiões gênicas estudadas e corroboram a semelhança morfológica que poderia inclusive justificar a sinonimização das mesmas (SALIMENA, com. pessoal).

*L. glandulosa* e *L. microphylla*, pertencentes à seção *Goniostachyum*, também apresentam problema de delimitação taxonômica. Nas árvores de todas as regiões gênicas, elas aparecem no mesmo clado, porém agrupadas com espécies diferentes de *Lippia*. As duas espécies são arbustos bastante ramificados, com ramos tetragonais e flores de branco a amareladas (MOLDENKE, 1965). A forma e a cor das brácteas têm sido usadas como forma de identificação das espécies, que são amareladas e carenadas em *L. glandulosa* e verdes e lanceoladas em *L. microphylla* (MOLDENKE, 1965). Quanto ao número cromossômico ambas apresentam  $2n=24$  e quimicamente as duas são bastante semelhantes (dados não publicados). Os resultados obtidos indicam a existência de um complexo morfológicamente muito variado que leva a problemas na identificação dessas duas espécies e que a filogenia dos genes utilizados não conseguiu resolver. Todavia, a grande similaridade morfológica aliada aos dados químicos e citogenéticos continua indicando para uma possível sinonimização entre *L. glandulosa* e *L. microphylla*.

Ainda dentro da seção *Goniostachyum* é importante considerar a relação existente e a possível sinonímia entre *L. sidoides* e *L. salviifolia*. As espécies *L. sidoides* e *L. salviifolia*, têm ampla distribuição e sua separação morfológica é muito difícil pois, considera-se alguns caracteres não muito relevantes taxonomicamente e bastante polimórficos. Por exemplo, pode-se citar a secção dos ramos geralmente tetragonais em *L. sidoides* e circular em *L. salviifolia* e o comprimento do pedúnculo

da inflorescência igual ao do pecíolo em *L. sidoides* e maior que o pecíolo em *L. salviifolia* (MOLDENKE 1965; SALIMENA, 1991).

Os dados moleculares gerados neste trabalho não mostraram as duas espécies agrupadas em um ramo bem delimitado. As outras espécies da seção também não formaram clados bem definidos o que mostra que mais estudos devem ser feitos para resolução dos problemas taxonômicos da seção *Goniostachyum*. Aparentemente, a seção *Goniostachyum* está bem resolvida em relação às demais, mas apresenta um variado complexo de espécies de difícil delimitação e que provavelmente não será resolvido com o uso de uma única ferramenta.

Apesar de os dados obtidos por Viccini et al. (2005), Sousa (2008) e das considerações feitas por Salimena (2000) constituírem evidências sobre o monofiletismo da seção *Rhodolippia*, no presente estudo as espécies dessa seção não ficaram em um ramo bem delimitado para qualquer das regiões estudadas.

O fato de as seções *Dipterocalix*, *Rhodolippia* e *Zapania* não terem suas espécies bem delimitadas neste estudo pode ter ocorrido pelo fato de que árvores de genes e árvores de caracteres podem discordar (YUAN & OLMSTEAD, 2008a). Este problema é particular para espécies com diversificação rápida e recente, que pode ser o caso das espécies do gênero *Lippia*, pois a maioria dos ramos de todas as árvores apresentou-se curto. O que ocorre é que o tempo de divergência entre as espécies é muito curto para a perda do polimorfismo ancestral e assim a separação das espécies ainda é incompleta (YUAN & OLMSTEAD, 2008a).

Estes problemas reforçam a necessidade de revisão da distribuição de espécies e dos caracteres diagnósticos para as seções *Dipterocalix*, *Rhodolippia* e principalmente *Zapania*. Além disso, nota-se que as topologias como um todo não foram bem definidas, mostrando que há necessidade de se estudar outras regiões que possuam sítios mais variáveis para que a delimitação das seções genéricas seja mais consistente.

Segundo Troncoso (1974) e Salimena (2000), o gênero *Lippia* está, em sua maior parte concentrado no Brasil, México, Paraguai e Argentina com poucas espécies endêmicas na África. Assim pode-se inferir que o ancestral do gênero *Lippia* surgiu na época do Gondwana (cerca de 200 m.a.) quando o leste da América do Sul, oeste da África, e sudoeste da Ásia formavam um só continente com Antártica e Austrália.

O mapa da figura 1 mostra que o gênero está bem distribuído pela América do Sul sendo que as espécies incluídas neste estudo estão distribuídas desde o norte de Minas Gerais, abrangendo a Cadeia do Espinhaço, descendo em direção sudoeste até os Andes na Argentina. O mapa de relevo mostra que a maioria das espécies está inserida em locais de altitudes elevadas (900-1600m). Essas regiões compreendem os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço e os Andes Argentino e Boliviano.

A Cadeia do Espinhaço se formou durante a Era Paleozóica (570 a 245 m.a.) (KING, 1956). Os picos mais altos (1800-2107m) são remanescentes das velhas superfícies que se desgastaram com o tempo (GIULIET & PIRANI, 1988). A estrutura dos blocos da Cadeia data do período Pré-cambriano (ABREU, 1984). O grande dobramento que se estende no sentido noroeste-sudeste se formou devido a um grande processo de erosão e foi remodelado por movimentos tectônicos no começo do período Terciário (66 a 1.6 m.a.). O relevo é altamente acentuado, com vales profundos, onde as cordilheiras mais altas são de quartizito e arenito (MOREIRA, 1965). Os solos são rasos e arenosos, muito ácidos e pobres em nutrientes. Estes fatores são importantes para explicar as afinidades e divergências entre os agrupamentos das espécies do gênero *Lippia* nas árvores filogenéticas geradas neste estudo, pois o padrão do relevo formado neste período pode ter influenciado o processo de especiação.

Esporadicamente, elementos presentes em espécies da flora andina e do sul do Brasil aparecem na flora dos Campos Rupestres, presentes na Cadeia do Espinhaço. Isso se deve a semelhança de clima e solo dos lugares citados (GIULIET & PIRANI, 1988). O gênero *Paepalanthus* subgênero *Platycaulon* possui 46 espécies, sendo que destas 28 são restritas aos Campos Rupestres e 12 são endêmicas das montanhas da Colômbia. O gênero *Vellozia* seção *Radia* possui centros de diversidade nos Campos Rupestres brasileiros e em algumas montanhas da Venezuela e da Colômbia. Ligações assim também podem ser vistas nos grupo das Labiatae: *Eriope macrostachya* que ocorre em campos rupestres de margens de florestas, assim como *E. macrostachya* var. *platanthera*, também ocorre nos Andes venezuelanos (MENEZES & GIULIET, 1986). Aparentemente o mesmo ocorre no gênero *Lippia* já que existem espécies que ocorrem nos Campos Rupestres da Cadeia do Espinhaço e também nos Andes Argentinos, como é o caso de *L. salviifolia* que pode ser vista na cidade de Salta. No mapa em que é possível

visualizar a distribuição das espécies em relação ao relevo (Figura 2), percebe-se que a maioria das espécies está distribuída nos Campos Rupestres brasileiros (acima de 900m) e nos Andes argentinos em locais com altitudes semelhantes sugerindo que tanto as espécies brasileiras quanto as argentinas tenham passado pelo mesmo padrão de especiação, pois foram submetidas às mesmas pressões de seleção.

Outro aspecto importante é que as espécies de *Lippia* presentes nos Campos Rupestres da Cadeia do Espinhaço são geralmente encontradas em populações separadas, restritas a pequenas serras e muitas vezes isoladas geograficamente e reprodutivamente por barreiras naturais, o que também pode ter contribuído para o padrão de especiação dentro do gênero. Este fato ganha ainda mais importância se considerarmos a intensa oscilação climática ocorrida no período Quaternário (1,6 m.a.) logo após os grandes movimentos tectônicos que remodelaram a Cadeia do Espinhaço. Neste período as populações das mais diversas espécies se expandiram e contraíram havendo fluxo gênico entre indivíduos de populações vizinhas ocorrendo o surgimento de novas espécies (GIULIET & PIRANI, 1988).

## 6 – Conclusão

O presente trabalho revelou, pela primeira vez, aspectos filogenéticos de espécies do gênero *Lippia* com base em caracteres moleculares.

De modo geral, as árvores filogenéticas baseadas nas diferentes regiões gênicas estudadas revelaram questões importantes como é o caso do monofiletismo da seção *Goniostachyum*. Outro ponto importante envolve a falta de resolução das outras seções estudadas com destaque para a seção *Zapania* que constitui em vários aspectos estudados, a seção mais diversa.

Embora o presente trabalho tenha mostrado aspectos inéditos com relação à organização filogenética de espécies e seções do gênero *Lippia*, a questão da especiação no gênero permanece em aberto. É possível que para resolver este problema sejam necessários estudos populacionais e filogeográficos, embasados por uma análise filogenética com maior número de genes e principalmente, envolvendo um maior número de espécies.



## 7 - Referências Bibliográficas

ABADE, M.J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. 1995. Antiviral activity of some medicinal plants. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology** 17 (Supl. A):108.

ABREU, A.A. 1984 O Planalto de Diamantina: um setor da Serra do Espinhaço em Minas Gerais. **Orientação - Instituto de Geografia Univ. São Paulo** 5: 75-79.

APG 1998. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 85(4): 531-553.

APGII 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** 141(4):399-436.

BALDWIN, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositaogy. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 1: 3-16.

BALDWIN, B.G., SANDERSON, M.J., PORTER, J.M., WOJCIECHOWSKI, M.F., CAMPBELL, C. S. AND DONOGHUE, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Gardens**. 82: 247–277.

BAUMEL, A., AINOUCHE, M.L., BAYER, R.J., AINOUCHE, A.K., MISSET, M.T. 2002. Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb. (Poaceae) **Molecular Phylogeny and Evolution** 22:303–314.

BAYLY, M.J., LADIGES, P.Y. 2007. Divergent paralogues of ribosomal DNA in eucalypts **Molecular Phylogenetics and Evolution** 44, 346-356.

BREMER, B.; BREMER, K.; CHASE, M.W.; REVEAL, J.L.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; STEVENS, P.F.; ANDERBERG, A.A.; FAY, M.F.; GOLDBLATT, P.; JUDD, W.S.; KALLERSJO, M.; KAREHED, J.; KRON, K.A.; LUNDBERG, J.; NICKRENT, D.L.; OLMSTEAD, R.G.; OXELMAN, B.; PIRES, J.C.; RODMAN, J.E.; RUDALL, P.J.; SAVOLAINEN, V.; SYTSMA, K.J.; VAN DER BANK, M.; WURDACK, K.; XIANG, J.Q.Y.; ZMARZTY, S. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of Linnean Society** 141 (4): 399-436.

BRIQUET, I. 1895. Verbenaceae. In A. Engler & K. Prantl (eds.). **Natural Pflanzenfam.** 4 (3A): 132-182.

CALVIÑO, C.I., DOWNIE, S.R. 2007. Circumscription and phylogeny of Apiaceae subfamily Saniculoideae based on chloroplast DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 44, 175–191.

CALVIÑO, C.I., MARTÍNEZ, S.G., DOWNIE, S.R. 2008. The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Vol. 46(3), 1129-1150.

CANTINO, P.D.; HARLEY, R.M. & WAGSTAFF, S.J. 1992. Genera of Labiatae: status and classification. In R.M.Harley & T. Reynolds (eds.). **Advances in Labiatae Science**. Royal Botanic Gardens. Kew.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. 2003. Larvicidal Activity of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* L. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 98 :4: 569–571.

CATALA´N, P., OLMSTEAD, R.G. 2000. Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. **Systematic and Evolution** 220:1–19.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics** 19: 122-257.

COSTA, J.G.M., RODRIGUES, F.F.G., ANGÉLICO, E.C., SILVA, M.R., MOTA, M.L., SANTOS, N.K.A., CARDOSO, A.L.H., LEMOS, T.L.G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev Bras Farmacogn** 15: 304-309.

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A. 1998. Quinona dimérica (Tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **XV Simpósio de Plantas Mediciniais, Resumos**, p. 132.

CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press.

CRONQUIST, A. 1988. **The evolution and classification of flowering plants**. The New York Botanical Garden. New York.

DALY, D. C., CAMERON, K. M. & STEVENSON, D. W. 2001. Plant systematics in the age of genomics. **Plant Physiology** 127(4): 1328-33.

DOYLE J.J., LUCKOW M.A. 2003. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology** 131:900–910.

DOYLE, J. J.; FLAGEL, L.E.; PATERSON, A.H.; RAPP, R. A; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; WENDEL, J.F. 2008. Evolutionary Genetics of Genome Merger and Doubling in Plants. **Annual. Review of Genetics**. 42:443–61.

ESSI, L.; SOUZA-CHIES, T. 2007. Phylogeny of Linearia and Notata groups of *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) and related species **Genetic Resources and Crop Evolution**, Vol.54(4), pp. 779-791(13).

EVANS, R.C., ALICE, L.A., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., DICKINSON, T.A., 2000. The granule-bound starch synthase (GBSSI) gene in the rosaceae: multiple loci and phylogenetic utility. **Mol. Phylogenet. Evol.** 17, 388–400.

FELSENSTEIN, J. 2004. **Inferring Phylogenies.** Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 663 p.

FISCHER, G.A., GRAVENDEEL, B., SIEDER, A., ANDRIANTIANA, J., HEISELMAYER, P., CRIBB, P.J., SMIDT, E.C., SAMUEL, R., KIEHN, M. 2007. Evolution of resupination in Malagasy species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) **Molecular Phylogenetics and Evolution** Vol.45 (1), 358-376.

FISHER, R. A. 1922. On the mathematical foundations of theoretical statistics. **Philos. Trans. Roy. Soc. London Ser. A** 222 309-368. (CP18 em Bennett \_1971, vol. 1).

FITCH, W. M. 1971. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology** 20: 406-416.

FORTUNE, P.M., POURTAU, N., VIRON, N., AINOUCHE, M.L. 2008. Molecular Phylogeny and Reticulate Origins of the Polyploid *Bromus* Species from Section *Genea* (POACEAE) **American Journal of Botany** 95(4): 454–464.

FORTUNE, P.M., SCHIERENBECK, K.A., AINOUCHE, JACQUEMIN, A.K., J., WENDEL, J.F., AINOUCHE, M.L. 2007. Evolutionary dynamics of *Waxy* and the origin of hexaploid *Spartina* species (Poaceae) **Molecular Phylogenetics and Evolution** 43 1040–1055.

GIULIETTI E A. M.; PIRANI, J. R. 1988. **Patterns of geographic distribution of some plant species of the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil.** 39-69.

GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.;MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTI, A.; FILHO, A.W. 1993. Constituintes do óleo essencial de

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia** 60: 103-108.

GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. **Genetics** 137:1121-1137.

GRAUR, D., LI, W.-H. 1999. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Second Edition, Sinauer Associates.

GUEVARA, R.; ROSALES, J.; SANOJA, E. 2005. Pioneer vegetation on rocks a biological potential for revegetation of degraded areas by iron-ore mining. **Interciencia**; 30(10):644-652.

GUO, Z., CHEN, Y., LI, D. 2002. Phylogenetic studies on the *Thamnocalamus* group and its allies (Gramineae: Bambusoideae) based on ITS sequence data. **Molecular Phylogeny and Evolution** 22(2):20–30.

HARBAUGH, D.T. 2008. Polyploid and hybrid origins of Pacific Island Sandalwoods (*Santalum*, SANTALACEAE) Inferred from Low-Copy Nuclear and Flow cytometry Data. **Int. J. Plant Sci.** 169(5):677–685.

HENNIG, W. 1950. **Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik**. Deutscher Zentralverlag, Berlin, 370 p.

HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F., NIELSEN, R., BOLLBACK, J.P. 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology **Science** 294, 2310.

HUGHES C.E., EASTWOOD, R.J., BAILEY, C.D. 2006. From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. **Phil Trans R Soc B** 361:211–25.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. 2002. **Plant systematics : a phylogenetic approach**. 2nd. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., xvi, 576 p.

KARP, A., SEBERG, O. & BUIATTI, M. 1996. Molecular techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany** 78: 143-149.

KING, L.C. 1956. A geomorfologia do Brasil Oriental. **Revista Brasileira de Geografia** 18: 147-265.

KRESS, W. J., AI-ZHONG, L., NEWMAN, M., QING-JUN, L. 2005a. The Molecular Phylogeny of *Alpinia* (ZINGIBERACEAE): A complex and Poliphyletic Genus of Gingers **American Journal of Botany** 92(1): 167-178.

KRESS, W. J., WURDACK, K.J., ZIMMER, E.A., WEIGT, L.A., JANZEN, D.H. 2005b. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **PNAS** vol. 102 (23), 8369–8374.

LEITÃO, S.G., DE OLIVEIRA, D.R., SÜLSEN, V., MARTINO, V., BARBOSA, Y.G., BIZZO, H.R., LOPES, D., VICCINI, L.F., SALIMENA, F.R.G., PEIXOTO, P.H.P., LEITÃO, G.G. 2008. Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oils Extracted from *Lippia lacunose* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 19(7): 1388-1393.

LEVIN, R.A., MYERS, N.R., & BOHS, L. 2006. Phylogenetic relationships among the "spiny" solanums (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*). **American Journal of Botany** 93: 157-169.

LI, S. 1996. **Phylogenetic tree construction using Markov chain Monte carlo**. Ph. D. dissertation, OhioState University, Columbus.

MARÇAL, R.M., PTAK, D.M., KREMPSEK, M.R., CARDOSO, G.C., SANTOS, R.B., BLANK, A.F., ALVES, P.B. 2006. Antinociceptive effect of the essential oil *Lippia sidoides* on mice. **Planta Médica**, 72 (11).

MAU, B. 1996. **Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte carlo methods**. Ph. D. dissertation, University of Wisconsin, Madison.

MAU, B., and M. Newton. 1997. Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. **Journal of Computational and Graphical Statistics** 6:122–131.

MAU, B., M. NEWTON, B. LARGET. 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte carlo methods. **Biometrics** 55:1–12.

MENEZES, N.L., GIULIETTI, A.M. 1986. Campos rupestres. Paraíso botânico na Serra do Cipó. **Ciência Hoje** 4(26): 38-44.

MEVY, J.P., BESSIERE, J.M., DHERBOMEZ, M., MILLOGO, J., VIANO, J. 2007. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chem** 101:682–685.

MEYER, D. 1995. Árvores Evolutivas Humanas: Uma discussão sobre inferência filogenética). **Série Monografias** - no 3. Ribeirão Preto - SP, Sociedade Brasileira de Genética, 1-162.

MOLDENKE, H. N. 1964. Materials towards a monograph of the genus *Lippia* L. **Phytologia** 11: 65-72.

\_\_\_\_\_.1965. Materials towards a monograph of the genus *Lippia* L. **Phytologia** 12: 6-71.

MONTEIRO, M.V.B., DE MELO LEITE, A.K.; BERTINI, L.M., DE MORAIS, S.M.; SOUSA NUNES-PINHEIRO D. C. 2007. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Journal of ethnopharmacology** , vol. 111, n<sup>o</sup>2, pp. 378-382.

MOORE, M. J., DHINGRA, A., SOLTIS, P. S., SHAW, R., FARMERIE, W. G., FOLTA, K. M. & SOLTIS, D. E. 2006. Rapid and accurate pyrosequencing of angiosperm plastid genomes. **BMC Plant Biol** 6: 17.

MOREIRA, A.N. 1965. **Relevo**. In Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), *Geografia do Brasil*, vol. 5. *Grande Região Leste*. IBGE, Rio de Janeiro. Pp. 5-54.

MORTON, J.F. 1981. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**. Vol.1, Springfield, Illinois, USA, pp. 745-750.

NOAMESI, B.K. 1977. Power Tea (*Lippia multiflora*)- A potent hypertensive therapy. **West Afr. J. Pharmacol. Drug Res.**, 4(1):33-36.

NYLANDER, J. A. A. 2004. **MrModeltest v2**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

OLADIMEJI F.A.; ORAFIDIYA O.O.; OGUNNIYI T.A.B.; ADEWUNMI T.A 2000. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 72, Number 1, pp. 305-311(7).

OLIVEIRA, D.R., LEITAO, G.G., BIZZO, H.R., LOPES, D., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S., LEITAO, S.G. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* **HBK FOOD CHEMISTRY** 101: 236-240.

OLIVEIRA, D.R., LEITÃO, G.G., SANTOS, S.S., BIZZO, H.R., LOPES, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO, D.S., LEITÃO, S.G. 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, **Brazil. J Ethnopharmacol**; 108:103-8.



OLMSTEAD, R.G., SCOTT, K.M. & PALMER, J.D. 1992. A chloroplast DNA phylogeny for the Asteridae implications for the Lamiales. In R.M.Harley & T. Reynolds (eds.). **Advances in Labiatae Science**. Royal Botanic Gardens, Kew.

PESSOA, O.D.L., DE CARVALHO, C.B.M., SILVESTRE, J.O.V.L., LIMA, M.C.L., NETO, R.M., MATOS, F.J.A., LEMOS, T.L.G. 2005. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *Gracilis* **Fitoterapia** Volume 76(7-8): 712-714.

POSADA, D.; KRANDALL, K.A. 1998. Modeltest: testing the model DNA substitution. **Bioinformatics** 14: 817-818.

QIU, Y. L., LEE, J., BERNASCONI-QUADRONI, F., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., ZANIS, M., ZIMMER, E. A., CHEN, Z., SAVOLAINEN, V. & CHASE, M. W. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. **Nature** 402(6760): 404-407.

RANNALA, B., YANG, Z. 1996. **Journal of Molecular Evolution**. 43, 304.

ROESCH, L.F.W., FULTHORPE, R.R., RIVA, A., CASELLA, G., HADWIN, A.K.M., KENT, A.D., DAROUB, S.H., CAMARGO, F.A.O., FARMERIE, F.A.O., TRIPLETT, E.W. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, 1, 283–290.

RONAGHI, KARAMOHAMED, S., PETTERSSON, B., UHLEN, M. & NYREN, P. 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. **Analytical Biochemistry** 242(1):84-89.

RONAGHI, M., PETTERSSON, B., UHLEN, M. & NYREN, P. 1998. PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing. **Biotechniques** 25(5): 876-884.

RONQUIST, F; HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19: 1572–1574.

SAEED, F. 2009. **Pyro-Align:Sample-Align based Multiple Alignment system for Pyrosequencing Reads of Large Number**. Department of Electrical and Computer Engineering University of Illinois Press.

SAITOU, N., NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution** 4: 406-425.

SALIMENA, F.R. 2002. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* Sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiana** 40 (1-4): 121-125.

SALIMENA, F.R. 1991. **Verbenaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências – USP.

SALIMENA, F.R.G. 2000. **Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae)**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 562p.

SALIMENA-PIRES, F.R. 1998. *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae) do Brasil. In: Congresso latino-americano de Botânica, 7., México. **Resumos...** México: Sociedade Latino Americana de Botânica, 299pp.

SANDERS, R. W. 2001. The Genera of Verbenaceae in the Southeastern United States. **Harvard Papers in Botany** 5 (2): 303-358.

SANG, T., CRAWFORD, D.J., STUESSY, T.F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). **American Journal of Botany** 84(8):1120–1136.

SANGER, F. & COULSON, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology** 94(3): 441-448.

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.

SCHAUER, J.C. 1847. Verbenaceae in A.P. De Candolle (Ed.) *Prodomus Systema Naturalis* 11:522-700.

\_\_\_\_\_. 1851. Verbenaceae in **Flora Brasiliensis**. 9(10): 169-308.

SHAW, J., LICKEY, E.B., BECK, J.T. , FARMER, S.B., LIU, W., MILLER, J., SIRIPUN, K. C., WINDER, C.T., SCHILLING, E.E. , SMALL, R.L. 2005. The Tortoise and the hare II: Relative Utility of 21 Noncoding Chloroplast DNA Sequences for Phylogenetic Analysis. **American Journal of Botany** 92(1): 142-166.

SHAW, J., LICKEY, E.B., SCHILLING, E.E., SMALL, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany** 94, 275–288.

SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., CHASE, M. W., 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: 381-461.

SOLTIS, D.E., MAYER, M.S., SOLTIS, P.S., EDGERTON, M. 1991. Chloroplast DNA variation in *Tellina grandifora* (Saxifragaceae). **American Journal of Botany** 78: 1376-1390.

SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.A., ENDRESS, P.K., CHASE, M.W. 2005. **Phylogeny and Evolution of Angiosperms** Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA. 370pp.

SOUSA, S.M. 2008. **Contribuições a Sistemática do gênero Lippia L. (Verbenaceae)**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 131p.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. 2005. **Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum.

STRICKBERGER, M . W. 1995. **Evolution**. 2nd edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.

SWOFFORD, D.L., 1993. **PAUP – A computer program for phylogenetic inference using Maximum Parsimony**. The Journal of General Physiology 102: A9.

TATE, J., SIMPSON, B. 2003 Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. **Systematic Botany** 28: 723- 737.

TRONCOSO, N.S. & SALIMENA-PIRES, F. R. 1997. Nuevos Sinônimos de Lippia lasiocalycina (Verbenaceae). **Hickenia** 2 (52):249-250.

TRONCOSO, N.S. 1974. Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai y sur de Brasil). **Darwiniana** 18 (3-4): 295-412.

TSAI, L.C., YU, Y.C., HSIEH, H.M., WANG, J.C., LINACRE, A., LEE, J.C.I. 2006. Species identification using sequences of the trnL intron and the trnL-trnF IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. **Forensic Science Int.** 164 193–200.

VALENTIN, A., PÉLISSIER, Y., BENOIT, F., MARION, C., KONE, D., MALLIE, M. & BASTIDE J.M. 1995. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of Lippia multiflora. **Phytochemistry** 40:1439-1442.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M.O.; PRAÇA, M.M.; DA COSTA, D.C.S.; ROMANEL, E.C.; SOUSA, S.M.; PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G. 2005. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution** 256: 171-178.

VILJOEN, A.M., SUBRAMONEY, S., VAN VUUREN, S.F., BAŞER, K.H.C., DEMIRCI, B. 2005. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils **Journal of Ethnopharmacology** 96(1-2): 271-277.

YANG, Z., RANNALA, B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. **Molecular Biology and Evolution** vol.14, 717-724.

YUAN, Y., OLMSTEAD, R.G. 2008a. A species-level phylogenetic study of the *Verbena* complex (Verbenaceae) indicates two independent intergeneric chloroplast transfers. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 48.

YUAN, Y., OLMSTEAD, R.G. 2008b. Evolution and phylogenetic utility of the *PHOT* gene duplicates in the *Verbena Complex* (VERBENACEAE): Dramatic intron size variation and footprint of ancestral recombination. **American Journal of Botany** 95(9): 1166–1176.

YUNHENG, J.I., PETER, W. F., HENG, L., TIAOJIANG, X., ZHEKUN, Z. 2006. Phylogeny and Classification of Paris (Melanthiaceae) Inferred from DNA Sequence Data **Annals of Botany** 98: 245–256.

