



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – BOT

**O USO DE UM FRAGMENTO DO MARCADOR *matK* COMO
SEQUÊNCIA *DNA barcode* EM ARACEAE**

LUCIANO COELHO MILHOMENS CEMIN

Brasília

2012



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – BOT

**O uso de um fragmento do marcador *matK* como
sequência *DNA barcode* em *Araceae*.**

Luciano Coêlho Milhomens Cemin

Orientador: Dr. Eduardo Gomes Gonçalves
(Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG)

Tese apresentada ao Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para à obtenção do título de Doutor em Botânica.

Brasília
Fevereiro, 2012



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – BOT

Defesa de Tese

**O uso de um fragmento do marcador *matK* como
sequência *DNA barcode* em *Araceae*.**

Aprovada por:

Dr. Eduardo Gomes Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Dra. Marta Camargo de Assis
Embrapa Meio Ambiente
Membro Externo Titular da Banca Examinadora

Dra. Dulce Maria Sucena da Rocha
Universidade de Brasília – UnB / Campus Planaltina
Membro Externo Titular da Banca Examinadora

Dr. David John Bertoli
Universidade de Brasília – UnB
Membro Externo Titular da Banca Examinadora

Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira
Universidade de Brasília - UnB
Membro Interno Titular da Banca Examinadora

Dra. Carolyn Elinore Barnes Proença
Universidade de Brasília - UnB
Membro Interno Suplente da Banca Examinadora

Brasília, 24 de fevereiro de 2012.

Ó glorioso Deus altíssimo, iluminai as trevas do meu coração, concedei-me uma fé verdadeira, uma esperança firme e um amor perfeito. Dai-me, Senhor, o (reto) sentir e conhecer, a fim de que possa cumprir o sagrado encargo que na verdade acabais de dar-me. Amém.

Oração de São Francisco diante do crucifixo de São Damião.

(Escritos e biografias de São Francisco de Assis, Ed. Vozes, 1983).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, a Deus.

Agradeço a minha amada esposa Daniela (Daniela da Silveira Cemin) pela sua paciência, incentivo e amor.

Agradeço a minha mãe, Maria Coêlho Milhomens, e ao meu pai, Lucas Milhomens Fonsêca (*In Memoriam*), por terem cultivado em mim o gosto pelo estudo e por terem me mostrado sua importância como “ferramenta” transformadora não apenas de minha realidade. Agradeço também a minha irmã, Luciana Helena C. M. Fonsêca, por compartilhar sua caminhada comigo.

Agradeço meu amigo e orientador, Prof. Dr. Eduardo Gomes Gonçalves, por ter confiado a mim tão grande tarefa. Até mesmo distante, soube me ensinar a “calçar” suas sandálias. Agradeço, realmente, o carinho e as oportunidades que tem me dado e confiado ao longo dos anos.

Agradeço aos professores da Universidade Católica de Brasília – UCB por toda a confiança e incentivo ao longo desta jornada. Especialmente, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira e ao Prof. Dr. Ruy Caldas pela sempre pronta ajuda e por permitirem e subsidiarem minha estada nos laboratórios da Pós-Graduação em Biotecnologia e Ciências Genômicas da UCB. Agradeço também a Profa Dra. Lourdes Maria Abdu El-moor Loureiro, Diretora do Curso de Ciências Biológicas da UCB, por toda ajuda, paciência e incentivo. Agradeço ainda todos os técnicos e funcionários com que tive o imenso prazer de conviver. Por último, mais de forma igualmente especial, gostaria ainda de agradecer aos meus amigos Virgílio Hipólito Lemos de Castro, Ciro de Sousa, Valéria Lemos Sales, Adriana Ribeiro Silva Batista, Thiago de Roure Bandeira de Mello e Josiane Barros de Carvalho que me ensinaram, ajudaram e socorreram várias vezes.

Também gostaria de agradecer aos professores do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília – UnB pela amizade, atenção e preocupação ao longo

destes quatro anos. Em especial, agradeço a Profa. Dra. Carolyn Elinore Barnes Proença, minha sempre orientadora, o Prof. Dr. Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara, o Prof. Dr. Fabian Borghetti e o Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira. Sem vocês esta tese não teria se concretizado. Agradeço ainda minhas amigas e “colegas de caminhada”, Andrielle Câmara Amaral Lopes e Nádja Sílvia Dalla Nora Somavilla. Agradeço também todos os funcionários e técnicos dos laboratórios da UnB.

Agradeço a Profa. Dra. Ivanilza Moreira de Andrade, da Universidade Federal do Piauí – UFPI, por toda atenção e pelas valiosas contribuições que fez. O texto ora apresentado também é fruto de sua criteriosa análise.

Agradeço minha amiga, Profa. Dr. Dulce Maria Sucena da Rocha, por tudo. É sempre bom saber que temos alguém preocupado conosco e pronta para nos auxiliar, principalmente, nos momentos onde “os caminhos já não estão sobre os nossos pés”.

Gostaria ainda de agradecer a todos, que de alguma forma contribuíram para que este momento chegasse. Aqui incluo não apenas as pessoas que encontrei nestes quase cinco anos, mas todas as outras que ajudaram e permitiram que a vida me trouxesse até aqui.

Finalmente, gostaria de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por continuarem a “acreditar no amanhã”.

Que Deus abençoe e proteja a todos.

ÍNDICE

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS	27
HISTÓRICO DA TESE	43
APRESENTAÇÃO DA TESE	48
CAPÍTULO 1. O uso de um fragmento do marcador <i>matK</i> como sequência <i>DNA barcode</i> em Araceae.	50
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1. Introdução	52
2. Metodologia	57
2.1. Obtenção das sequências	57
2.2. Obtenção do fragmento-alvo de <i>matK</i> (sequência <i>barcode</i>)	57
2.3. Análise das sequências	58
2.4. Testes de reconhecimento	59
2.4.1. Método de distância genética	59
2.4.1.1. Construção do Perfil de Referência	59
2.4.1.2. Capacidade de reconhecimento genérico e específico	60
2.4.2. Busca BLAST®	61
2.5. Avaliação dos padrões de similaridade entre os táxons de Araceae	62
3. Resultados e Discussão	63
3.1. Considerações sobre o fragmento-alvo de <i>matK</i>	63
3.2. Variação inter e intraespecífica	64
3.3. Testes de reconhecimento genérico e específico	67
3.4. Avaliação dos padrões de similaridade entre os táxons de Araceae	69
4. Conclusão	85
5. Recomendações	86
6. Referências Bibliográficas	86

CAPÍTULO 2. Aplicabilidade dos <i>DNA barcodes</i> na identificação molecular e na elucidação das relações evolutivas nas espécies cultivadas de <i>Xanthosoma</i> Schott (Araceae).	109
RESUMO	109
ABSTRACT	110
1. Introdução	111
2. Metodologia	116
2.1. Obtenção das amostras	116
2.2. Extração, Amplificação e Seqüenciamento de DNA	118
2.3. Obtenção do fragmento-alvo (sequência <i>barcode</i>)	119
2.4. Análise das sequências	120
2.5. Análise de sítios diagnósticos	120
3. Resultados e Discussão	121
4. Conclusão	135
5. Recomendações	136
6. Referências Bibliográficas	137
CAPÍTULO 3 – <i>Lorenzia umbrosa</i> E.G. Gonç. sp. nov. inéd.: um estudo de caso do uso de <i>DNA barcodes</i> na identificação molecular de um novo táxon em Araceae.	154
RESUMO	154
ABSTRACT	155
1. Introdução	156
2. Metodologia	160
2.1. Obtenção da sequência desconhecida	160
2.2. Construção do Perfil de Referência	161
2.3. Obtenção do fragmento-alvo de <i>matK</i> (sequência <i>barcode</i>)	161
2.4. Análise das sequências	161
3. Resultados e Discussão	162
4. Considerações adicionais	165
5. Conclusão	166
6. Referências Bibliográficas	167
CONCLUSÃO GERAL	178

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

- Figura 1.** Posicionamento do fragmento-alvo (sequência *barcode*) em relação ao gene *matK* da sequência de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. É possível ainda observar a orientação dos *primers* XXF e ALI_R, próprios para Alismatales, propostos por Dunning & Savolainen (2010). 58
- Figura 2.** Obtenção do Perfil de Referência para a identificação, tanto das “amostras desconhecidas”, quanto das “inicialmente ausentes” pertencentes à família Araceae. 60
- Figura 3.** Avaliação da capacidade de reconhecimento genérico e de reconhecimento específico do fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*), com base no Método de distância genética. 61
- Figura 4.** Avaliação da capacidade de reconhecimento genérico e de reconhecimento específico do fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*) através da busca BLAST® (Altschul *et al.* 1990). 62
- Figura 5.** Detalhe dos alinhamentos, mostrando a correspondência entre os *primers* XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010) e as regiões flangeadoras das sequências de Araceae. As bases sublinhadas nas regiões flangeadoras apresentam polimorfismos.*Para efeito comparativo a sequência do *primer* ALI_R (*reverse*) está em *reverse complement* (a sua sequência original é 5'-CACGAAAGTCGAAGTATAATY-3'). 64
- Figura 6.** Distribuição relativa da variação interespecífica (barras pretas) e intraespecífica (barras brancas) para o fragmento-alvo de *matK* (Kimura – 2P, MEGA 5®). 65
- Figura 7.** A família Araceae e suas principais subfamílias (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008), (6) Wong *et al.* (2010). 71
- Figura 8.** Subfamília Aroideae (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008), (3) Cusimano *et al.* (2010), (7) Wong *et al.* (2010). 76

Figura 9. Tribo Thomsonieae Blume (<i>Neighbor-joining</i> – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera <i>et al.</i> (2008), (4) Gonçalves <i>et al.</i> (2007).	78
Figura 10. Grupo <i>core</i> de Schismatoglottideae Nakai (<i>Neighbor-joining</i> – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera <i>et al.</i> (2008); (7) Wong <i>et al.</i> (2010).	79
Figura 11. Tribo Spathicarpeae (<i>Neighbor-joining</i> – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera <i>et al.</i> (2008), (4) Gonçalves <i>et al.</i> (2007).	81
Figura 12. Tribos Caladieae-Zomicarpeae (<i>Neighbor-joining</i> – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (1) Acesso pertencente ao estudo de Batista (2008); (2) Cabrera <i>et al.</i> (2008); e (3) Cusimano <i>et al.</i> (2010).	82
Figura 13. Tribo Areae (<i>Neighbor-joining</i> – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (1) Acesso pertencente ao estudo de Batista (2008); (2) Cabrera <i>et al.</i> (2008); e (3) Cusimano <i>et al.</i> (2010).	84

CAPÍTULO 2.

Figura 1. Posicionamento do fragmento-alvo (sequência <i>barcode</i>) em relação ao gene <i>matK</i> das sequências obtidas para as diferentes espécies de <i>Xanthosoma</i> Schott e a sequência de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. É possível ainda observar a orientação dos <i>primers</i> XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010).	120
Figura 2. Árvore com as espécies de <i>Xanthosoma</i> Schott, baseada nas sequências do fragmento-alvo (sequência <i>barcode</i>) de <i>matK</i> (<i>Neighbor-joining</i> – NJ, Kimura – 2P, MEGA 5®).	122
Figura 3. Espécies cultivadas de <i>Xanthosoma</i> Schott (Araceae). A. Folhas de <i>X. robustum</i> Schott. B. Detalhe do caule epígeo de <i>X. robustum</i> Schott. C. Detalhe da folha de <i>X. maffafa</i> Schott. D. Detalhe da espádice de <i>X. maffafa</i> Schott. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves.	127
Figura 4. Espécies cultivadas de <i>Xanthosoma</i> Schott (Araceae). A. Hábito de <i>X. brasiliense</i> (Desf.) Engl. B. Hábito de <i>X. blandum</i> Schott. C. Detalhe da folha de <i>X. atrovirens</i> K. Koch & C.D. Bouché. D. Detalhe da espádice de <i>X. violaceum</i> Schott. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves.	128

Figura 5. Espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae). A. Detalhe das folhas de *X. appendiculatum* Schott. B. Hábito de *X. taioba* E.G. Gonç. C. Hábito de *X. sagittifolium* (L.) Schott. D. Detalhe da espádice de *X. sagittifolium* (L.) Schott. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves. 129

Figura 6. Distribuição geográfica original das 10 espécies de *Xanthosoma* Schott (Araceae) estudadas e de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. 131

Figura 7. Possíveis processos de expansão e colonização das espécies cultivadas de taioba (*Xanthosoma* Schott, Araceae). 133

CAPÍTULO 3.

Figura 1. Árvore com as subfamílias e tribos de Araceae, baseada nas sequências do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura – 2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008) e (7) acesso pertencente ao estudo de Wong *et al.* (2010). 164

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1.

Tabela 1. Variação interespecífica e intraespecífica para o fragmento-alvo de <i>matK</i> (sequência <i>barcode</i>).	65
---	----

CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Lista em ordem alfabética dos acessos amostrados pertencentes ao gênero <i>Xanthosoma</i> Schott (Araceae), mantidos em cultivo no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília – UCB, Distrito Federal – Brasil. UB: sigla do Herbário da Universidade de Brasília – UnB. ⁽¹⁾ Principais espécies de taioba cultivadas no mundo; ⁽²⁾ Espécies estreitamente relacionadas a essas espécies cultivadas; e ⁽³⁾ Espécie pertencente a uma linhagem diferente das demais.	117
Tabela 2. Variação interespecífica entre as espécies de <i>Xanthosoma</i> Schott.	121
Tabela 3. Posição relativa e composição dos sítios diagnósticos para cada uma das 10 espécies de <i>Xanthosoma</i> Schott (Araceae) analisadas. ⁽¹⁾ Fragmento-alvo de <i>matK</i> de 695pb recortado a partir das sequências originais de <i>Xanthosoma</i> Schott utilizando os primers XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010). ⁽²⁾ Sequência de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Total = 1536pb (originalmente, 1515pb + 21 <i>gaps</i> nas posições 599-608, 616-623 e 774-774).	124

ANEXOS

HISTÓRICO DA TESE

Anexo I. Lista das espécies de Araceae amostradas e dos respectivos fragmentos de *matK* obtidos. Para o sequenciamento completo da região *matK* foram utilizados os seguintes *primers*: -19F (Gravendeel *et al.* 2001) e 2R (Steele & Vigalys 1994), 390F e 1326R (Cuénoud *et al.* 2002) e 1034F e 533R (Batista *et al.* 2008) e os protocolos propostos por Gonçalves *et al.* (2007), Batista (2008) e Hollingsworth *et al.* (2009b). X: fragmento sequenciado com sucesso. 46

CAPÍTULO 1.

Anexo I. Sequências de *matK* utilizadas no presente estudo. Os acessos estão em ordem alfabética e foram separados de acordo com os estudos onde foram publicados. Além dos números de acesso do GenBank®, quando presentes, foram também incluídas informações sobre o *voucher*. 98

CAPÍTULO 2.

Anexo I. Matriz de distâncias genéticas para as diferentes espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae), baseada nas sequências do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* (Kimura – 2P, MEGA 5®). 149

Anexo II. Sequências completas do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* das diferentes espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae) (MEGA 5®). Os sítios diagnósticos puros estão em negrito. 151

CAPÍTULO 3.

Anexo I. *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp. nov. inéd. (Gonçalves, *no prelo*). A. Hábito. B. Hábito em cultivo. C. Planta em estágio reprodutivo. D. Detalhe da espádice e da espata. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves. 177

RESUMO

O uso de código de barras de DNA ou *DNA barcodes* pode, teoricamente, permitir a identificação de qualquer material biológico portador de DNA intacto. As dificuldades de identificação e circunscrição taxonômica, o número insuficiente de especialistas e o crescente interesse no uso e na comercialização de suas espécies fazem das Araceae um grupo ideal para o estabelecimento de uma ferramenta de identificação molecular como esta. Assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade e o funcionamento de um fragmento do marcador *matK* como código de barras de DNA, utilizando como modelo a família Araceae. Pela primeira vez dentro de Araceae, o uso de um marcador como sequência *barcode* foi avaliado em grande escala. O fragmento-alvo de *matK*, de aproximadamente 725pb, mostrou-se suficientemente variável para tal tarefa, sendo capaz de recuperar, na maioria dos casos, identificações inequívocas para os diferentes gêneros e espécies amostrados. A busca BLAST® mostrou-se mais eficiente que o método de distância em recuperar identificações ao nível específico (68% e 81,5%, respectivamente). O fragmento-alvo apresentou ainda forte sinal filogenético, refletindo grande parte das relações entre os diferentes táxons de Araceae. Embora o fragmento-alvo apresente limitações no reconhecimento de espécies proximamente relacionadas, os resultados obtidos apontam para uma nova circunscrição taxonômica em *Xanthosoma* Schott, na qual as principais espécies cultivadas de taioba seriam, na verdade, uma única espécie, com marcada amplitude de variação fenotípica, alcançada tanto por processos naturais quanto pela intervenção do homem. O fragmento-alvo de *matK* mostrou-se ainda como uma ferramenta capaz de proceder a identificação de um táxon desconhecido, servindo como base para a descrição de um novo gênero em Araceae: *Lorenzia* E.G. Gonç. *gen. nov.* inéd., instituído pela criação da espécie *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. *sp. nov.* inéd. Finalmente, a utilização de uma abordagem *DNA barcoding* pode, futuramente, auxiliar na conservação e o uso sustentável das espécies de Araceae.

Palavras-chave: *DNA barcodes*, Araceae, *Xanthosoma*, taioba, *Lorenzia*.

ABSTRACT

The use of DNA barcodes can, theoretically, allow the identification of any biological material carrier of DNA intact. The difficulties of identification and taxonomic circumscription, the insufficient number of specialists and the growing interest in the use and marketing of species make Araceae an ideal group for the establishment of a molecular identification tool. Thus, the main objective of this study was to evaluate the applicability and operation of a marker fragment of *matK* as a barcode DNA, using the family Araceae as a model. For the first time in the Araceae, the use of a marker as barcode sequence was evaluated on a large scale. The target fragment of *matK*, approximately 725pb, was sufficiently variable for the task, which was able to recover in most cases, unambiguous identification of different genera as well as species level. The BLAST® search was more efficient than the method of retrieving distance identification specific level (68% and 81.5%, respectively). The target fragment presented a strong phylogenetical signal, largely reflecting the relationships between different taxa of Araceae. Although the target fragment showed limitations in the recognition of closely related species, the results suggested a new taxonomic circumscription of *Xanthosoma* Schott, in which the most cultivated species of taro were, in fact, a single species, with large phenotypical variation as a result of both natural processes and human intervention. The target fragment of *matK* was capable of identifying an unknown taxon, which was as the basis for the description of a new genus of Araceae: *Lorenzia* E.G. Gonç. *gen. nov.* ined., established by the creation of *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. *sp. nov.* ined. Finally, the use of a DNA barcoding approach may further assist in the conservation and sustainable use of Araceae species.

Kew words: DNA barcodes, Araceae, *Xanthosoma*, taioba, *Lorenzia*.

INTRODUÇÃO GERAL

A classificação é um dos feitos mais antigos do intelecto humano e, provavelmente, surgiu de forma indiscernível da própria linguagem (Bock 1973). Com o advento da capacidade de organizar conjuntos e trabalhar com níveis hierárquicos de inclusão, o homem desenvolveu habilidades que permitiram a generalização de conceitos (Zander 2010), culminando na capacidade de predição (Bock 1973). A aplicação desta habilidade aos seres vivos remonta à própria origem desta forma de pensamento, sendo encontrada em, virtualmente, todas as culturas humanas, civilizadas ou não (Diamond 1966; Hunn 1982).

Entretanto, apesar da antiguidade do conceito, a formalização teórica da classificação dos seres vivos é encontrada, inicialmente, apenas em Aristóteles (Grene 1972; Franklin 1986). Fortemente baseada nos pensamentos platônicos, essa classificação baseia-se na existência de uma essência imutável (*eidos*) à qual se refere cada uma das espécies de seres vivos observadas na natureza (Grene 1972; Coonen 1977). Assim, o conceito do que é uma espécie advém, em última análise, da nossa capacidade de perceber esta essência e delimitar sua ocorrência dentro de um grupo finito de indivíduos, com especial atenção no reconhecimento de suas discontinuidades (Colman 1932).

Este foi apenas o ponto inicial. Vários conceitos para delimitar ou reconhecer espécie, semelhantes ou distintos desse, foram cunhados ao longo da história. Não cabe ao presente estudo avaliá-los ou discuti-los, porém, é possível perceber que, a busca pela correta circunscrição de uma espécie, invariavelmente, também esteve acompanhada de uma questão utilitária (Dobzansky 1937). Assim, o conceito de espécie deve ser também útil e prático (Bock 1973). Outro forte componente na detecção desta essência parece ser a subjetividade (Brothers 1983). No processo de reconhecimento do conceito de espécie, muitas vezes os seus limites parecem estar condicionados a visão de mundo do próprio estudioso, deixando de lado, por vezes, o seu real significado biológico (Brothers 1983; Bezerra & Fernandes 1984; Mayr 1998; Judd *et al.* 2009).

Após séculos de busca por uma unidade conceitual de significação biológica, dois avanços marcaram a história da classificação. O primeiro, ainda no século XIX com a difusão das idéias darwinistas, é o desejo de que o conceito de espécie reflita

sua evolução (Bock 1973). O segundo avanço, característico do século XX, é a necessidade de métodos objetivos para a inferência taxonômica (Holmes 1980). Estes dois aspectos foram contemplados na sistemática filogenética, originalmente proposta por Hennig (1966), cuja capacidade de recuperar a melhor explicação evolutiva parece superar suas desvantagens (Wiley 1975). Assim, estava pronto o arcabouço que permitiu a utilização de métodos moleculares para o reconhecimento taxonômico. Aliás, nos últimos 30 anos, métodos moleculares têm sido largamente utilizados para a detecção de unidades biológicas e como uma das principais ferramentas de reconstrução filogenética, permitindo inferências evolutivas nos mais variados organismos e níveis hierárquicos (Hall 2001; Amorim 2002; Schneider 2003; Avise 1997; Judd *et al.* 2009).

Dentre os avanços mais difundidos nesta área, encontram-se os conceitos baseados em linhagens evolutivas (Balakrishnan 2005), dentre os quais, o "Conceito Filogenético de Espécies" é o principal deles (Mayden 1997; Amorim 2002; Avise 1997; Judd *et al.* 2009). Esse conceito baseia-se, sobretudo, na observação e identificação do "... menor e/ou diagnosticável grupo de organismos individuais dentro dos quais existe um padrão parental de ancestralidade e linhagem" (Cracraft 1983). Este aspecto oferece uma metodologia unificada de reconhecimento de espécies por monofiletismo recíproco ou agrupamento de clados (Baum & Shaw, 1995; Herbert *et al.* 2003a; Knowles & Carstens 2007). Isso é possível, pois a sistemática filogenética, conforme proposta por Hennig (1966), permite detectar quando a tocoênese (que é reticulada em organismos sexuados) é substituída pela cladogênese, que é predominantemente hierárquica e permite o monofiletismo exclusivo (Davis 1997; Nei & Kumar 2000; Amorim 2002).

Uma das mais recentes e promissoras aplicações dos métodos moleculares na detecção de unidades biológicas é a utilização de pequenos fragmentos de DNA, denominados códigos de barra de DNA ou *DNA barcodes*, como ferramenta de identificação e circunscrição de espécies. Inicialmente, proposto pelo zoólogo canadense Paul Hebert (Hebert *et al.* 2003a), seu conceito se apóia na idéia de que seqüências de DNA de *loci* ortólogos podem prover caracteres distintivos para a identificação taxonômica em qualquer nível biológico (Hebert *et al.* 2003a; Hebert *et al.* 2003b; Dalebout *et al.* 2004). A idéia consiste em selecionar uma região relativamente curta do DNA (de, aproximadamente, 400-800 pares de bases) que seja amplamente variável e correlacionar um padrão único de variação para cada

espécie. Tal abordagem poderia, potencialmente, permitir a identificação específica de qualquer material biológico portador de DNA (intacto ou fragmento deste) desde que uma matriz de seqüências para as espécies conhecidas seja estabelecida. Isso facilitaria não só a identificação de espécies já catalogadas (independente do estágio de desenvolvimento ou de variações fenotípicas) como também o reconhecimento de espécies ainda inéditas ou crípticas (Hebert *et al.* 2003a; Hebert *et al.* 2004b).

Para recuperar a identificação de um espécime desconhecido contra um banco de seqüências catalogadas, duas metodologias têm sido mais utilizadas. A primeira, utilizada por Hebert *et al.* (2003a) e adotada pela maioria dos estudos que utilizam *DNA barcodes*, se baseia na distância genética entre pares de espécies. Nessa metodologia, além do alinhamento prévio das seqüências, deve ser escolhido um modelo de substituição nucleotídica adequado. Normalmente, é utilizado o modelo Kimura 2-parâmetros ou K2P, proposto por Kimura (1980), sendo as árvores construídas utilizando *Neighbor-Joining* (NJ). Esse arcabouço de análise é adotado, pois distâncias simples apresentam menor variância, característica desejável ao estudarmos espécies relacionadas (Nei & Kumar 2000). A segunda seria a utilização da busca BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.* 1990), onde um algoritmo procura trechos de similaridade local entre as seqüências amostradas. Tal metodologia dispensa o uso de uma matriz alinhada prévia, facilitando o uso de seqüências ricas em *indels* (inserções / deleções). Em linhas gerais, cada seqüência-alvo é comparada com outras depositadas em um banco de dados, sendo calculada a significância estatística dos alinhamentos coincidentes de maior similaridade. Atualmente, cada vez mais, essas abordagens são combinadas para uma melhor avaliação da capacidade de discriminação em estudos com código de barras de DNA.

Aqui é importante salientar que, independentemente da metodologia empregada, a abordagem código de barras de DNA é extremamente sensível à riqueza do banco de seqüências de referência (Meyer & Paulay 2005). Então, para validar os diagnósticos moleculares é imperativo que essas seqüências de referência sejam provenientes de espécimes adequadamente identificados e de procedência conhecida, se possível, depositados em coleções biológicas (Dalebout *et al.* 2004; Lorenz *et al.* 2005; Schander & Willassen 2005).

Além das similaridades genéticas entre as sequências, o *Barcoding gap* também é utilizado para avaliar a eficiência da sequência *barcode* em discriminar entre as diferentes espécies analisadas. Segundo Meyer & Paulay (2005), idealmente, os *DNA barcodes* devem apresentar uma alta divergência interespecífica e uma baixa divergência intraespecífica, particularidade que garantiria uma correta circunscrição entre as diferentes espécies. A existência de um *gap* (uma lacuna) entre a distribuição das frequências de suas divergências seria um indicativo de que esta sequência seria adequada como ferramenta de identificação molecular. Por outro lado, quanto mais sobreposição houver entre as divergências intra e interespecíficas, menos eficaz seria a sequência *barcode* em discriminar entre as diferentes espécies (Hebert *et al.* 2003a; Moritz & Cícero 2004; Meyer & Paulay 2005; Gonçalves 2009; Ortiz 2010). Contudo, são vários os exemplos, presentes na literatura, como os estudos de Chen *et al.* (2010), Gao *et al.* (2010) e Liu *et al.* (2010), que demonstram que a existência ou não de sobreposição pode ser também um artefato da própria metodologia de análise, o que não, necessariamente, interferiria no poder discriminante da sequência *barcode* considerada. Assim, normalmente, são também aplicados testes estatísticos, como o *Two-way Chi-squared*, para uma maior confiabilidade dos resultados.

Ainda, mesmo reconhecendo a funcionalidade do método, é preciso saber que a adoção e o uso dos *DNA barcodes* apresentam algumas limitações (Moritz & Cícero 2004; Meyer & Paulay 2005; Moniz & Kaczmarek 2010). Nesse aspecto, uma das maiores seria a dificuldade desta ferramenta em identificar e reconhecer, de forma inequívoca, espécies recentemente irradiadas, principalmente se essas ainda estiverem compartilhando haplótipos (Hebert *et al.* 2003a; Hebert *et al.* 2009; Lukhtanov *et al.* 2009; Valdez-Moreno *et al.* 2009). Mesmo assim, são vários os exemplos de sucesso que apontam os *DNA barcodes* como uma ferramenta útil, prática e objetiva para a identificação molecular de diferentes espécies, pertencentes aos mais variados grupos biológicos.

Em animais, o gene para a citocromo c oxidase subunidade 1 (COI ou *cox1*) foi escolhido como sequência *barcode* alvo, sobretudo, pela alta taxa de variação que apresenta (Hebert *et al.* 2003a). Baseados neste gene do DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido realizados vários estudos de caracterização e identificação molecular, em diferentes grupos de insetos e animais: aranhas (Barret & Hebert 2005), invertebrados aquáticos (Ball & Hebert 2005), moscas parasitas e seus

hospedeiros relacionados (Smith *et al.* 2006), mosquitos (Cywinska *et al.* 2006), grupos de pássaros terrestres extintos (Lambert *et al.* 2005) ou não (Hebert *et al.* 2004a; Kerr *et al.* 2009; Gonçalves 2009), poríferos (Erpenbeck *et al.* 2005), lepidópteros (Hajibabaei *et al.* 2006; Hebert *et al.* 2004b; deWaard *et al.* 2009), primatas (Lorenz *et al.* 2005), peixes (Ward *et al.* 2005; Carvalho 2009; Ardura *et al.* 2010; Ortiz 2010), besouros (Monaghan *et al.* 2005), gastrópodes (Remigio & Hebert 2003) e anfíbios (Vences *et al.* 2005). A maioria destes estudos relata quase 100% de acurácia na identificação das espécies amostradas. Assim, praticamente, não existe dúvida sobre a eficiência e universalidade da COI como região *barcode* para os animais.

No entanto, sabe-se que tal marcador não varia o suficiente para servir como ferramenta de identificação entre as diferentes espécies de plantas terrestres, pois, ao contrário dos animais, seu genoma mitocondrial apresenta menores taxas de substituição nucleotídica e taxas muito mais elevadas de reorganização estrutural, características que restringem a sua eficiência como sequência *barcode* (Kress *et al.* 2005; Chase *et al.* 2005; Chase *et al.* 2007; Pennisi 2007; Fazekas *et al.* 2008; Lahaye *et al.* 2008; Newmaster *et al.* 2008; Hollingsworth *et al.* 2009a). Para suprir esta lacuna e encontrar sequências alternativas igualmente poderosas para a identificação de organismos vegetais, ao longo dos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos utilizando, principalmente, o genoma do cloroplasto (cpDNA).

O primeiro estudo a avaliar, de forma abrangente, diferentes *loci* foi conduzido por Kress *et al.* (2005). Estes autores, após compararem 10 *loci* diferentes (*trnH-psbA*, *rpl36-rps8*, *trnK-rps16*, *trnV-atpE*, *trnC-ycf6*, *ycf6-psbM*, *psbM-trnD*, *atpB-rbcL*, *trnL-F* e ITS), propuseram o *trnH-psbA* como um marcador universal para as plantas terrestres. Newmaster *et al.* (2006), após avaliarem mais de 10.000 sequências de *rbcL* depositadas no GenBank® (Benson *et al.* 2010), descobriram ser este marcador, em separado, capaz de identificar corretamente 85% das amostras testadas. Em 2007, Kress & Erickson, basearam-se no estudo de Newmaster *et al.* (2006) e propuseram a combinação do *trnH-psbA* com o *rbcL* como DNA *barcodes* para as plantas. Paralelamente, Chase *et al.* (2007) propuseram, também numa abordagem *multiloci*, a combinação de três marcadores, o *rpoC1*, o *rpoB* e o *matK* ou, numa segunda abordagem, o *rpoC1*, o *matK* e o *trnH-psbA*. Além disso, Taberlet *et al.* (2007) sugeriram o intron *trnL* como sequência *barcode* mais adequada. No ano seguinte, Newmaster *et al.* (2008) identificaram diferentes espécies do gênero

Compsonaura Ward. (Myristicaceae) utilizando o *matK* aliado ao *trnH-psbA*. Ainda nesse mesmo ano, Lahaye *et al.* (2008), analisando de forma exaustiva centenas de espécies de orquídeas, demonstraram que uma porção do gene *matK* poderia ser um forte candidato a *DNA barcode* universal para as angiospermas. Já para Kress *et al.* (2009) o uso do *matK*, do *rbcL* e do *trnH-psbA* combinados seria a melhor escolha possível. Além desses marcadores, outros mais foram propostos em diferentes estudos, tais como o *accD*, o *ndhJ*, o *ycf5*, o *atpF-H*, o *psbK-psbI*, além do nuclear nrITS2 (Chase *et al.* 2005; Fazekas *et al.* 2009; Petersen & Seberg 2009; Hollingsworth *et al.* 2009a).

Sobretudo, com o intuito de uniformizar e direcionar os esforços na abordagem *DNA barcoding* em plantas, em 2009, o CBOL - *Plant Working Group* (*Consortium for Barcoding of Life*, Hollingsworth *et al.* 2009b), que reunia à época 52 pesquisadores, pertencentes a 25 instituições de todo o mundo, após deliberar sobre o conhecimento disponível até então, num total de sete sequências candidatas (quatro codificantes: *matK*, *rbcL*, *rpoB* e *rpoC1*; e três não-codificantes: *atpF-H*, *trnH-psbA* e *psbK-psbI*), recomendou, após avaliar os prós e contras de cada uma dessas sequências e de suas possíveis combinações, a adoção de uma abordagem *multiloci* que combinava um marcador mais lento e conservado, o *rbcL*, com outro mais variável e de maior resolução, o *matK*. Ressalta-se que *trnH-psbA*, embora defendido por parte dos pesquisadores, não foi incluído, principalmente por apresentar uma evolução molecular complexa, com acentuada variação no tamanho das sequências. Além disso, uma abordagem com três *loci* seria, comparativamente, mais onerosa, já que a inclusão do *trnH-psbA* não aumentava de forma significativa a capacidade de discriminação entre as espécies analisadas (Hollingsworth *et al.* 2009b). Mesmo sem consenso e criticada, principalmente, considerando-se a falta de *primers* universais e a dificuldade em obter sequências viáveis para o *matK* (Kress *et al.* 2009), finalmente, surgia uma abordagem *barcode* para as plantas terrestres (Hollingsworth *et al.* 2009b; Hollingsworth *et al.* 2011).

Embora vários avanços já tenham sido alcançados e diferentes *primers* e protocolos tenham, desde então, sido propostos para o *matK* (Dunning & Savolainen 2010; Yu *et al.* 2011; Li *et al.* 2011), atualmente, pesquisadores como Hollingsworth *et al.* (2011) admitem também a utilização, em paralelo e quando necessário, de outros marcadores, plastidiais (como o próprio *trnH-psbA*) ou nucleares (como o

nrITS e o nrITS2), além da combinação *matK* + *rbcL*, para que uma maior eficiência na identificação das amostras vegetais seja alcançada.

É ainda conveniente ressaltar que alguns pesquisadores e grupos de pesquisa, sobretudo asiáticos, ao contrário da recomendação do CBOL, defendem a utilização do nrITS e o nrITS2 como sequências *barcodes* para as plantas. Nessa linha, também são vários os exemplos de sucesso, seja com ampla amostragem taxonômica, como nos estudos de Chen *et al.* (2010), que identificaram quase 6000 espécies de plantas medicinais e o de Gao *et al.* (2010), com resultados semelhantes, ou com abordagem mais restritiva, em famílias como Primulaceae (Yan *et al.* 2011), Juglandaceae (Xiang *et al.* 2011), Orobanchaceae (Dong *et al.* 2011), Vitaceae (Fu *et al.* 2011), Rubiaceae (Guo *et al.* 2011), Potamogetonaceae (Du *et al.* 2011), Zingiberaceae (Shi *et al.* 2011), entre outras.

Este breve apanhado histórico demonstra a forte controvérsia que envolve a escolha de uma sequência *barcode* universal em plantas, contudo, podemos notar que resultados eficazes puderam ser alcançados tanto através de uma abordagem *multiloci*, quanto através do uso de apenas um marcador, especialmente considerando o *matK*, o *rbcL*, o *trnH-psbA* e o ITS. Aliás, estes quatro marcadores não figuram apenas como *DNA barcodes*. Muitas vezes, são também utilizados, em separado ou em conjunto, na reconstrução filogenética de diversos grupos vegetais (Hilu *et al.* 2003; Cabrera *et al.* 2008; Kress *et al.* 2009; Kress *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011; Yoo & Jang 2010; Hollingsworth *et al.* 2011).

Embora existam muitas sequências de *rbcL* disponíveis e o ITS seja cada vez mais utilizado, o *matK* ainda é um dos marcadores mais usados na construção de filogenias (Soltis *et al.* 1998; Hilu *et al.* 2003; Hilu *et al.* 2008; Judd *et al.* 2009). Isso ocorre, principalmente, pela sua taxa de mutação que é três vezes maior que a do *rbcL* (Soltis *et al.* 1996), característica que confere ao *matK* capacidade discriminatória ao nível familiar e infragenérico (Hilu & Liang 1997; Hilu *et al.* 2003). Além disso, o genoma do cloroplasto não apresenta múltiplas cópias, como no caso nuclear (Soltis *et al.* 1998; Hollingsworth *et al.* 2011).

O *matK* é uma ORF (*Open Reading Frame*), de cerca de 1500bp, localizada dentro de um íntron classe II, entre os exons 5' e 3' do gene que codifica o tRNA para a lisina^(UUU), o *trnK* (Soltis *et al.* 1998; Hilu *et al.* 2003; Shaw *et al.* 2005; Hilu *et al.* 2008). Os íntrons classe II são *self-splicing* RNAs encontrados em archaea, eubactérias, fungos, algas e plantas (Saunders *et al.* 2003; Hausner *et al.* 2006; Hilu

et al. 2008). Porém, nem todos os íntrons classe II consistem apenas de RNA. Muitos podem codificar uma transcriptase reversa (*reverse transcriptase*, RT) que confere a esse íntron a capacidade de invadir novos sítios em um genoma. Esta proteína tem ainda a função de atuar no dobramento do íntron, estimulando o *self-splicing* do RNA. Como na maioria dos casos, esta função de *splicing* é específica para o íntron em questão, estas proteínas são chamadas maturases, como é o caso do *matK* (Soltis *et al.* 1998; Hausner *et al.* 2006).

Hoje já se sabe também que o *matK*, em seus cerca de 1500pb, apresenta regiões mais conservadas e mais variáveis, característica desejável na sua utilização filogenética (Hilu & Liang 1997; Hilu *et al.* 2003; Hausner *et al.* 2006; Hilu *et al.* 2008). Já, considerando sua aplicação como *DNA barcode*, cada vez mais *primers* têm sido desenhados especificamente para que fragmentos deste marcador, dotados de maior variação, sejam obtidos e aplicados na identificação molecular dos diferentes grupos vegetais (Dunning & Savolainen 2010; Yu *et al.* 2011; Li *et al.* 2011). Esse desenho atenderia a importantes premissas em uma abordagem *DNA barcode*, tais como a utilização de sequências curtas e dotadas de variabilidade suficiente para o reconhecimento específico, sem, necessariamente, comprometer sua universalidade (Hollingsworth *et al.* 2009b; Hollingsworth *et al.* 2011). Nessa linha, Dunning & Savolainen (2010), após avaliarem diferentes pares de *primers*, propuseram a adoção de *primers* grupo-específicos para o *matK*, como a combinação 1R_KIM / 3F_KIM (Kim, dados não publicados), principalmente, para as Eudicotiledôneas, a combinação 390F / 1326R (Cuénoud *et al.* 2002) para parte das Monocotiledôneas e a combinação XXF / ALI_R (Dunning & Savolainen 2010) para ordens como Acorales, Alismatales e Arecales.

Aliás, a utilização de marcadores moleculares como o *matK* tem imprimido aos *DNA barcodes* um enfoque filogenético (Ward *et al.*, 2005; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Kress *et al.* 2010; Hollingsworth *et al.* 2011). Mesmo sabendo que esse não é seu objetivo, sobretudo, considerando seu arcabouço de análise, que utiliza, na maioria dos casos, métodos de distância genética e não de parcimônia (Meyer & Paulay 2005), o forte sinal filogenético existente nestes marcadores, tem conferido aos agrupamentos algum tipo de significado biológico. Esta característica híbrida, que combina o poder discriminante dos *DNA barcodes* à filogenia, tem sido utilizada para elucidar as relações evolutivas em diferentes níveis (Lahaye *et al.* 2008; Kress *et al.* 2009; Kress *et al.* 2010; Hollingsworth *et al.* 2011).

Outro desdobramento da utilização de marcadores dotados de sinal filogenético como *DNA barcodes* é a sua aplicação na identificação de outros níveis hierárquicos, como gêneros, tribos, subfamílias e famílias, embora tenham sido, originalmente, pensados apenas para a identificação em nível específico (Hebert *et al.* 2003a). Estudos que utilizam as sequências *barcodes* nesse enfoque mais amplo seguem uma abordagem *DNA barcoding latu sensu*, enquanto os estudos voltados estritamente para sua aplicação primordial seguem uma abordagem *DNA barcodes stricto sensu* (Xue & Li 2011). Porém, seja qual for a abordagem os agrupamentos continuam a ser circunscritos e reconhecidos por monofiletismo recíproco, conforme o “Conceito Filogenético de Espécie”, citado anteriormente (Baum & Shaw 1995; Mayden 1997; Hebert *et al.* 2003a; Knowles & Carstens 2007).

A família Araceae, pertencente à ordem Alismatales (*Angiosperm Phylogeny Group – APG*, 2003), é composta por 102 gêneros e mais de 3500 espécies, distribuídas por todo o globo, especialmente nas regiões tropicais da Ásia e das Américas. Apresentam ainda ampla variação ecológica, podendo ocorrer desde o nível do mar até 4.500 metros de altitude, colonizando ambientes diversos como florestas, cursos d’água e até mesmo regiões desérticas (Grayum 1990; Mayo *et al.* 1997; Govaert & Frodin 2002; Gonçalves *et al.* 2004; Cabrera *et al.* 2008; Cusimano *et al.* 2011).

Considerando seus hábitos, podem ser plantas terrestres, tuberosas ou não, trepadeiras, epífitas, aquáticas helofíticas ou flutuantes. Apresentam caules aéreos ou subterrâneos muitas vezes de filotaxia bastante complexa. Suas folhas podem ser simples, compostas, inteiras ou partidas, lobadas ou não, variando enormemente em sua coloração, tamanho e forma. Quanto a suas estruturas reprodutivas, podem apresentar diferentes padrões de distribuição e arranjo em suas inflorescências. Aliás, este último aspecto é determinante (diagnóstico) para a identificação da família, pois suas inflorescências consistem em uma espádice unissexual ou bissexual, guarnecida por uma única bráctea modificada, a espata (Grayum 1990; Mayo *et al.* 1997; Cusimano *et al.* 2011).

Essencialmente, as Araceae são plantas ornamentais, sendo largamente utilizadas para o paisagismo de interiores e de exteriores, sobretudo, considerando jardins públicos e privados (Mayo *et al.* 1997; Lorenzi & Mello-Silva 2003; Souza & Lorenzi 2008). Podem ainda ser cultivadas pelas folhagens e flores de corte tão presentes na composição de arranjos florais (Junqueira & Peetz 2002). Seu uso

alimentício, embora menos conhecido no Brasil, é igualmente importante, pois várias espécies apresentam o acúmulo de amido, vitaminas e minerais nos caules. Estas espécies constituem uma rica fonte de alimento em vários países, principalmente na África, Ásia e na América Central, onde são conhecidas como *taro* (como *Colocasia esculenta* (L.) Schott) e *taio*, *yautía* ou *cocoyam* (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott *sensu lato*), respectivamente (Plowman 1969; Giacometti & Léon 1994; Mayo *et al.* 1997; Corrêa 2000; Pinto *et al.* 2001; Seganfredo *et al.* 2001; Lima 2009).

Em Araceae, ao lado de outros marcadores, o *matK* mostrou-se eficiente na reconstrução filogenética não só da família como um todo (Cabrera *et al.* 2008), como de várias de suas tribos. Grob *et al.* (2002), em seu estudo filogenético com a tribo Thomsonieae Blume, foi capaz de reconhecer novas relações evolutivas, sobretudo, entre as espécies de *Amorphophallus* Blume ex Decne. Gonçalves *et al.* (2007), trabalhando com a tribo neotropical Spathicarpeae Schott propôs a expansão da tribo para acomodar *Dieffenbachia* Schott e *Bognera* Mayo & Nicolson, dois gêneros anteriormente pertencentes a tribo Dieffenbachieae Engler (*sensu* Mayo *et al.* 1997), além da segregação em gêneros monotípicos dos táxons *Incarum pavonii* (Schott) E.G. Gonç. e *Croatiella integrifolia* (Madison) E.G. Gonç. Batista (2008), por sua vez, obteve resultados que apontaram para a expansão da tribo Caladieae Schott para incluir também a tribo Zomicarpeae Schott (*sensu* Mayo *et al.* 1997). Em seu estudo, propõem ainda a redefinição do gênero *Xanthosoma* Schott para incluir *Chlorospatha* Engler. Wong *et al.* (2010), além de elucidar as relações em Schismatoglottideae Nakai, propõem a criação de uma nova tribo, Philonotieae S.Y. Wong & P.C. Boyce. Cusimano *et al.* (2010), ao analisar as relações evolutivas em Areae encontrou resultados que mostravam ser *Typhonium* Schott, *Sauromatum* Schott e as espécies australianas de *Typhonium*, na verdade, pertencentes a linhagens evolutivas diferentes.

Porém, o conhecimento taxonômico na família ainda é insuficiente, mesmo considerando as filogenias já publicadas e o número crescente de especialistas (Mayo *et al.* 1997; Cabrera *et al.* 2008). Uma mostra disso é a constatação de que muitas espécies preliminarmente reconhecidas como novas permanecem ainda não descritas (Croat 2004; Gonçalves 2011). Um dos principais entraves aos avanços no conhecimento taxonômico do grupo é a dificuldade no reconhecimento das espécies, principalmente pela sua grande variabilidade fenotípica (Mayo 1991; Mayo *et al.* 1997; Cusimano *et al.* 2011), preservação insuficiente de espécimes herborizados

(Gonçalves 2002) e reconhecidos casos de heterofilia (Ray 1987; Ray 1990), onde indivíduos em estágios diferentes de desenvolvimento foram descritos no passado como espécies distintas (Mayo *et al.* 1997). Além disso, em grupos geofíticos, o surgimento de folhas e flores pode ser completamente assíncrono, dificultando o reconhecimento das espécies (Zhu & Croat 2004).

Soma-se a estas dificuldades de identificação e circunscrição taxonômica o crescente interesse na comercialização de suas espécies, principalmente as de interesse ornamental (Souza & Lorenzi 2008). Estas, por vezes, são espécies ameaçadas (Coelho 2000; Coelho & Catharino 2008; Catharino & Coelho 2010), que na maioria dos casos são retiradas da natureza sem a devida autorização legal (Gonçalves, com. pess.). Possivelmente, o estabelecimento de uma ferramenta de identificação molecular tornaria mais rápida e também eficaz a identificação desses materiais. Deste modo, além da aplicação taxonômica, teríamos nos *DNA barcodes* estabelecidos para Araceae uma importante ferramenta conservacionista.

Assim, particularidades como a dificuldade de identificação e circunscrição taxonômica, o número insuficiente de especialistas, o crescente interesse no uso e na comercialização de suas espécies e a ampla utilização de um importante marcador *barcode* (o *matK*) na reconstrução de filogenias em diferentes níveis, fazem de Araceae um grupo ideal para a avaliação da aplicabilidade dos *DNA barcodes* como ferramenta de identificação molecular. Além disso, embora já exista uma primeira abordagem *DNA barcoding* em Lemnaceae (hoje subfamília Lemnoideae) com Wang *et al.* (2010), nenhum estudo consistente foi conduzido, com amostragem exclusiva de toda família, especificamente com esta finalidade.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade e o funcionamento de um fragmento do marcador *matK* como código de barras de DNA, utilizando como modelo a família Araceae.

São ainda objetivos específicos:

- Avaliar e quantificar a capacidade do fragmento-alvo de *matK* em recuperar a identificação correta, ou seja, sua eficiência em discriminar entre os diferentes gêneros e espécies pertencentes à Araceae;
- Avaliar e quantificar a eficiência do fragmento-alvo em discriminar entre espécies proximamente relacionadas, utilizando como modelo um grupo de difícil circunscrição taxonômica (*Xanthosoma* Schott);
- Avaliar sua eficiência em recuperar, de forma inequívoca, a identificação molecular de um táxon inédito em Araceae; e
- Avaliar a retenção, por parte do fragmento-alvo de *matK*, de sinal filogenético, seja num contexto global ou específico;

Referências Bibliográficas

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** **215**: 403-410.
- Amorim, D.S. 2002. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto, Ed. Holos.
- Angiosperm Phylogeny Group – APG. 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**: 399–436.
- Ardura, A.; Linde, A.R.; Moreira, J.C. & Garcia-Vazquez, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation** **143**: 1438-1443.
- Avise, J.C. & Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **94**: 7748–7755.
- Balakrishnan, R. 2005. Species concepts, species boundaries and species identification: A view from the tropics. **Systematic Biology** **54**: 689-693.
- Ball, S.L. & Hebert, P.D. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society** **21**: 508-524.
- Barret, R.D. & Hebert, P.D. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology** **83**: 481-491.
- Batista, A.R. 2008. **Filogenia do Complexo Caladieae-Zomicarpeae (Araceae) baseada em sequências do DNA plastidial**. Dissertação de Mestrado,

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia,
Universidade Católica de Brasília – UCB.

Baum, D.A. & Shaw, K.L. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. Pp. 289–303. In: Hoch, P.C. & Stephenson, A.G. (eds.). **Experimental and molecular approaches to plant biosystematics**. St. Louis, Missouri Botanical Gardens.

Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J. & Sayers, E.W. 2010. GenBank. **Nucleic Acids Research** **39** (Database issue): D32-7.

Bezerra, P. & Fernandes, A. 1984. **Fundamentos de taxonomia vegetal**. Fortaleza, Ed. Universidade Federal do Ceará.

Brothers, D.J. 1983. Nomenclature at the ordinal and higher levels. **Systematic Zoology** **32**: 34-42.

Bock, W.J. 1973. Philosophical foundations of classical evolutionary classification. **Systematic Zoology** **22**: 375-392.

Cabrera, L.I.; Salazar, G.A.; Chase, M.W.; Mayo, S.J.; Bogner, J. & Dávila, P. 2008. Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA. **American Journal of Botany** **95**: 1153-1165.

Carvalho, D.C. 2009. **Caracterização genética de invasões biológicas: o caso do tucunaré (*Cichla* spp.) em Minas Gerais, Brasil**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Animal, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

Catharino, E.L. & Coelho, M.A. 2010. Uma nova espécie de *Anthurium* Schott (Araceae), endêmica da Serra da Bocaina, município de Bananal, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia** **61**: 69-72.

- Chase, M.W.; Salamin, N.; Wilkinson, M.; Dunwell, J.M.; Kesanakurthi, R.P.; Haidar, N. & Savolainen, V. 2005. Land plant and DNA barcodes: short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **360**: 1889–1895.
- Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Hollingsworth, P.M.; van den Berg, C.; Madriñán, S.; Petersen, G.; Seberg, O.; Jørgensen, T.; Cameron, K.M. & Carine, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. **Taxon** **56**: 295–299.
- Chen, S.L.; Yao, H.; Han, J.P.; Liu, C.; Song, J.Y.; Shi, L.C.; Zhu, Y.J.; Ma, X.Y.; Gao, T.; Pang, X.H.; Luo, K.; Li, Y.; Li, X.W.; Jia, X.C.; Lin, Y.L. & Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **Public Library of Science ONE** **5**: e8613.
- Coelho, M.A. & Catharino, E.L. 2008. Duas espécies novas de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia** **59**: 829-833.
- Colman, J. 1932. A statistical test of the species concept in *Littorina*. **The Biological Bulletin** **63**: 223-243.
- Coonen, L.P. 1977. Aristotle's biology. **Bioscience** **27**: 733-738.
- Corrêa, M.G. 2000. **Ciclo celular e microsporogênese de espécies da família Araceae, coletadas no sul do Brasil**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. **Current Ornithology** **1**: 159-187.
- Croat, T.B. 2004. Revision of *Dieffenbachia* (Araceae) of Mexico, Central America, and the West Indies. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **91**: 668-772.

- Cusimano, N.; Barrett, M.D.; Hetterscheid, W.L. & Renner, S.S. 2010. A phylogeny of the Areae (Araceae) implies that *Typhonium*, *Sauromatum*, and the Australian species of *Typhonium* are distinct clades. **Taxon** **59**: 439-447.
- Cusimano, N.; Bogner, J.; Mayo, S.J.; Boyce, P.C.; Wong, S.Y.; Hesse, M.; Hetterscheid, W.L.; Keating, R.C. & French, J.C. 2011. Relationships within the Araceae: Comparison of morphological patterns with molecular phylogenies. **American Journal of Botany** **98**: 1–15.
- Cywinska, A.; Hunter, F.F. & Hebert, P.D. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. **Medical and Veterinary Entomology** **20**: 413–424.
- Dalebout, M.L.; Baker, C.S.; Mead, J.G.; Cockcroft, V.G. & Yamada, T.K. 2004. A comprehensive and validated molecular taxonomy of beaked whales, family Ziphiidae. **Journal of Heredity** **95**: 459-473.
- Davis, J.I. 1997. Evolution, evidence and role of species concepts in phylogenetics. **Systematic Botany** **22**: 373-403.
- deWaard, J.R.; Landry, J.F.; Schmidt, B.C.; Derhousoff, J.; McLean, J.A. & Humble, L.M. 2009. In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. **Biodiversity and Conservation** **18**: 3825-3839.
- Diamond, J.I. 1966. Zoological classification systems of a primitive people. **Science** **151**:1102-1104.
- Dobzhansky, T. 1937. **Genetics and the Origin of Species**. New York, Columbia Univ. Press.
- Dong, L.-N.; Wortley, A.H.; Wang, H.; Li, D.-Z. & Lu, L. 2011. Efficiency of DNA barcodes for species delimitation: a case in *Pterygiella* Oliv. (Orobanchaceae). **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 189-202.

- Du, Z.-Y.; Qimike, A.; Yang, C.-F.; Chen, J.-M. & Wang, Q.-F. Testing four barcoding markers for species identification of Potamogetonaceae. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 246-251.
- Dunning, L.T. & Savolainen, V. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. **Botanical Journal of the Linnean Society** **164**: 1-9.
- Erpenbeck, D.; Hooper, J.N. & Wörheide, G. 2005. Technical Note: *CO1* phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' – are we sequencing a suboptimal partition? **Molecular Ecology** (Notes): 1-4.
- Fazekas, A.J.; Burgess, K.S.; Kesanakurti, P.R.; Graham, S.W.; Newmaster, S.G.; Husband, B.C.; Percy, D.M.; Hajibabaei, M. & Barret, S.C. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. **Public Library of Science ONE** **3**: e2802.
- Franklin, J. 1986. Aristotle on species variation. **Philosophy** **61**: 245-252.
- Fu, Y.-M.; Jiang, W.-M. & Fu, C.-X. 2011. Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 237-245.
- Gao, T.; Yao, H.; Song, J.; Liu, C.; Zhu, Y.; Ma, X.; Pang, X.; Xu, H. & Chen, S. 2010. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology** **130**: 116-121.
- Giacometti, D.C. & León, J. 1994. Tannia, Yautia. In: Hernando-Bermejo, J.E. & León, J. (eds). Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. **Plant Production and Protection Series** **26**: 253-258.
- Gonçalves, E.G. 2002. New aroid taxa from Brazil. **Aroideana** **25**: 16-35.

- Gonçalves, E.G.; Diener, P.S.; Sousa C.; Alarcão, G. & Pina, G.O. 2004. A preliminary survey of gynoeceum morphology in *Xanthosoma* (Araceae). **Aroideana 27**: 182-186.
- Gonçalves, E.G.; Mayo, S.J.; Van Sluys, M.A. & Salatino, A. 2007. Combined genotypic-phenotypic phylogeny of the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent events of invasion to Andean regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution 43**: 1023-1039.
- Govaert, R. & Frodin, D.G. 2002. **World checklist and bibliography of Araceae (and Acoraceae)**. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Gonçalves, P.F. 2009. **O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.
- Gonçalves, E.G. 2011. The commonly cultivated species of *Xanthosoma* Schott (Araceae), including four new species. **Aroideana 34**: 3-23.
- Grayum, M.H. 1990. Evolution and phylogeny of the Araceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden 77**: 628-697.
- Greene, M. 1972. Aristotle and the Modern Biology. **Journal of the History and Ideas 33**: 395-424.
- Grob, G.B.J., B. Gravendeel, M.C.M. Eurlings & W.L.A. Hettterscheid. 2002. Phylogeny of the Tribe Thomsonieae (Araceae) based on chloroplast *matK* and *trnL* intron sequences. **Systematic Botany 27**: 453-467.
- Guo, X.; Simmons, M.P.; But, P.; Shaw, P.-C. & Wang, R.-J. 2011. Application of DNA barcodes in *Hedyotis* L. (Spermacoceae, Rubiaceae). **Journal of Systematics and Evolution 49**: 203-212.

- Hajibabaei, M.; Janzen, D.H.; Burns, J.M.; Hallwachs, W. & Hebert, P.D. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **103**: 968-971.
- Hall, B.G. 2011. **Phylogenetics trees made easy. A how to manual for molecular biologists**. Sunderland, Sinauer Associates.
- Hausner, G.; Olson, R.; Simon, D.; Johnson, I.; Sanders, E.R. Karol, K.G.; McCourt, R.M. & Zimmerly, S. 2006. Origin and Evolution of the Chloroplast *trnK* (*matK*) Intron: A Model for Evolution of Group II Intron RNA Structures. **Molecular Biology and Evolution** **23**: 380–391.
- Hebert, P.D.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **270**: 313–321.
- Hebert P.D.; Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **270**: S96–S99.
- Hebert, P.D.; Stoeckle, M.Y.; Zemplak, T.S. & Francis, C.M. 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. **Public Library of Science Biology** **2**: 1657-1663.
- Hebert, P.D.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H. & Hallwachs, W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **101**: 14812-14817.
- Hebert, P.D.N.; deWaard, J.R.; Landry, J.F. 2009. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. **Biology Letters** doi: 10.1098/rsbl.2009.0848.
- Hennig, W. 1966. **Phylogenetic systematics**. Urbana, Univ. Illinois Press.

- Hilu, K.W.; Borsch, T.; Müller, K.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Savolainen, V.; Chase, M.W.; Powell, M.P.; Alice, L.A.; Evans, R.; Sauquet, H.; Neinhuis, C.; Slotta, T.A.; Rohwer, J.G., Campbell, C.S. & Chatrou, L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. **American Journal of Botany** **90**: 1758–1776. 2003.
- Hilu, K.W.; Black, C.; Diouf, D. & Burleigh, G. 2008. Phylogenetic signal in *matK* vs. *trnK*: A case study in early diverging eudicots (angiosperms). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **48**: 1120–1130.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. **American Journal of Botany** **84**: 830–839.
- Hollingsworth, M.L.; Clark, A.A.; Forrest, L.L.; Richardson, J.; Pennington, R.T.; Long, D.G.; Cowan, R.; Chase, M.W.; Gaudeul, M. & Hollingsworth, P.M. 2009a. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. **Molecular Ecology Resources** **9**: 439–457.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Erickson, D.L.; Fazekas, A.J.; Graham, S.W.; James, K.E.; Kim, K.-J.; Kress, W.J.; Schneider, H.; van Alphenstahl, J.; Barrett, S.C.; van den Berg, C.; Bogarin, D.; Burgess, K.S.; Cameron, K.M.; Carine, M.; Chacón, J.; Clark, A.; Clarkson, J.J.; Conrad, F.; Devey, D.S.; Ford, C.S.; Hedderson, T.A.; Hollingsworth, M.L.; Husband, B.C.; Kelly, L.J.; Kesanakurti, P.R.; Kim, J.S.; Kim, Y.-D.; Lahaye, R.; Lee, H.-L.; Long, D.G.; Madriñán, S.; Maurin, O.; Meusnier, I.; Newmaster, S.G.; Park, C.-W.; Percy, D.M.; Petersen, G.; Richardson, J.E.; Salazar, G.A.; Savolainen, V.; Seberg, O.; Wilkinson, M.J.; Yi, D.-K. & Little, D.P. 2009b. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **106**: 12794-12797.
- Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **Public Library of Science ONE** **6**: e19254.

- Holmes, E. B. 1980. Reconsideration of some systematic concepts and terms. **Evolutionary Theory** 5: 35-87.
- Hunn, E. 1982. The Utilitarian factor in folk biological classification. **American Anthropologist** 84: 830-847.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F. & Donoghue, M. J. 2009. **Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético**. São Paulo, Artmed.
- Kerr, K.C.; Birks, S.M.; Kalyakin, M.V.; Red'kin, Y.A.; Koblik, E.A. & Hebert, P.D. 2009. Filling the gap – *COI* barcode resolution in eastern Palearctic birds. **Frontiers in Zoology** 6: 29. doi:10.1186/1742-9994-6-29.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular and Evolution** 16: 111-120.
- Knowles, L.L. & Carstens, B.C. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. **Systematic Biology** 56: 887-895.
- Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weigt, L.A. & Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102: 8369-8374.
- Kress, W.J. & Erickson, D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **Public Library of Science ONE** 2: e508.
- Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Jones, F.A.; Swenson, N.G.; Perez, R.; Sanjurjo, O. & Bermingham, E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106: 18621-18626.

- Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Swenson, N.G.; Thompson, J.; Uriarte, M. & Zimmerman, J.K. 2010. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot. **Public Library of Science ONE 5**: e15409.
- Lahaye, R.; Van der Bank, M.; Bogarin, D.; Warner, J.; Pupulin, F.; Gigot, G.; Maurin, O.; Duthoit, S.; Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105**: 2923–2928.
- Lambert, D.M.; Baker, A.; Huynen, L.; Haddrath, O. Hebert, P.D. & Millar, C.D. 2005. Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? **Journal of Heredity 96**: 1-6.
- Li, Y.; Gao, L.-M.; Poudel, R.C.; Li, D.-Z. & Forrest, A. 2011. High universality of matK primers for barcoding gymnosperms. **Journal of Systematics and Evolution 49**: 169-175.
- Lima, T.A. 2009. **Caracterização de compostos nutricionais e antinutricionais em taiobas (*Xanthosoma Schott*)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília – UnB. 63p.
- Liu, Y.; Yan, H.-F.; Cao, T. & Ge, X.-J. 2010. Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). **Journal of Systematics and Evolution 48**: 36-46.
- Lorenz, J.G.; Jackson, W.E.; Beck, J.C. & Hanner, R. 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** (published online): 1-9.
- Lorenzi, H. & Mello-Silva, L.E. 2003. **As Plantas Tropicais de R. Burle Marx**. Nova Odessa, Instituto Plantarum.

- Lukhtanov, V.A.; Sourakov, A.; Zakharov, E.V. & Hebert, P.D. 2009. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. **Molecular Ecology Resources** **9**: 1302-1310.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. Pp. 381-423. In: Claridge, M.F.; Dawah, H.A. & Wilson, M.R. (eds.). **Species: The units of diversity**. London, Chapman and Hall.
- Mayo, S.J. 1991. A revision of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). **Kew Bulletin** **46**: 601-681.
- Mayo, S.J.; Bogner, J. & Boyce, P.C. 1997. **The genera of Araceae**. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Meyer, C.P. & Paulay, G. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. **Public Library of Science Biology** **3**: 2229-2238.
- Mayr, E.E. 1998. **O desenvolvimento do pensamento biológico – Diversidade, evolução e herança**. Brasília, Ed. Universidade de Brasília.
- Monaghan, M.T.; Balke, M.; Gregory, T.R. & Vogler A.P. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** (published online): 1-9.
- Moniz, M.B. & Kaczmarek, I. 2010. Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. **Protist** **161**:7-34.
- Moritz, C. & Cicero, C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. **Public Library of Science Biology** **2**: e354.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York, Oxford University Press.

- Newmaster, S.G.; Fazekas, A.J. & Ragupathy, S. 2006. DNA barcoding in land plantas: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. **Canadian Journal of Botany** **84**: 355-341.
- Newmaster, S.G.; Fazekas, A.J.; Steeves, R.A. & Janovec, J. 2008. Testing candidate plant barcode regions with species of recent origin in the Myristicaceae. **Molecular Ecology Notes** **8**: 480–490.
- Ortiz, M.F. 2010. **Validação do DNA barcoding como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes; Pimelodidae) na Amazônia.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA.
- Pennisi, E. 2007. Wanted: a barcode for plants. **Science** **318**: 190–191.
- Pinto, N.A.; Fernandes, S.M.; Thé, P.M. & Carvalho, V.D. 2001. Variabilidade da composição centesimal, vitamina C, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). **Revista Brasileira de Agrociência** **7**: 205-208.
- Plowman, T. 1969. Folk uses of new world aroids. **Economic Botany** **23**: 97-122.
- Ray, T. 1987. Cyclic heterophylly in *Syngonium* (Araceae). **American Journal of Botany** **74**: 16-26.
- Ray, T. 1990. Metamorphosis in the Araceae. **American Journal of Botany** **77**: 1599-1609.
- Remigio, E.A. & Hebert, P.D. 2003. Testing the utility of partial *COI* sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **29**: 641-647.

- Saunders, E.R.; Karol, K.G. & McCourt, R.M. 2003. Occurrence of *matK* in a *trnK* group II intron in charophyte green algae and phylogeny of the Characeae. **American Journal of Botany** **90**: 628–633.
- Schneider, H. 2003. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Ribeirão Preto, Ed. Holos.
- Schander, C. & Willassen, E. 2005. What can biological barcoding do for marine biology? **Marine Biology Research (Short Communication)** **1**: 79-83.
- Seganfredo, R.; Finger, F.L.; Barros, R.S. & Mosquim, P.R. 2001. Influência de colheita sobre a deterioração pós-Colheita em folhas de taioba. **Horticultura Brasileira** **19**: 184-187.
- 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**:142-166.
- Shi, L.-C.; Zhang, J.; Han, J.-P.; Song, J.-Y.; Yao, H.; Zhu, Y.-J.; Li, J.-C.; Wang, Z.-Z.; Xiao, W.; Lin, Y.-L.; Xie, C.-X.; Qian, Z.-Z. & Chen, S.-L. 2011. Testing the potencial of proposed DNA barcodes for species identification of Zingiberaceae. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 261-266.
- Smith, M.A.; Woodley, N.E.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W. & Hebert, P.D. 2006. DNA barcodes reveae cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). **Proceedings of the National Academy of Sciences** **103**: 3657-3662.
- Soltis, P.S; Soltis, D.E. & Doyle, J.J. 1998. **Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing**. New York, Springer.

- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado na APG II.** (2ª. ed.). Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Taberlet, P.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Gielly, L.; Miquel, C.; Valentini, A.; Vermat, T.; Corthier, G.; Brochmann, C. & Willerslev, E. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. **Nucleic Acids Research** **35**: e1–e8.
- Valdez-Moreno, M.; Ivanova, N.V.; Elías-Gutiérrez, M.; Contreras-Balderas, S. & Hebert, P.D. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **Journal of Fish Biology** **74**: 377–402.
- Vences, M.; Thomas, M.; Bonett, R.M. & Vieites, D.R. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** **360**: 1859–1868.
- Xiang, X.-G.; Zhang, J.-B.; Lu, A.-M. & Li, R.-Q. 2011. Molecular identification of species in Junglandaceae: a tiered method. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 252-260.
- Xue, C.-Y. & Li, D.-Z. 2011. Use of DNA barcode sensu lato to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae). **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 267–270.
- Wang, W.; Wu, Y.; Yan, Y.; Ermakova, M.; Kerstetter, R. & Messing, J. 2010. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. **BMC Plant Biology** **10**: 205.
- Wang, Y.-Z.; Mao, R.-B.; Liu, Y.; Li, J.-M.; Dong, Y.; Li, Z.-Y. & Smith, J.F. 2011. Phylogenetic reconstruction of Chirita and allies (Gesneriaceae) with taxonomic treatments. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 50-64.

- Ward, R.; Zemlack, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R. & Hebert, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **360**: 1847–1857.
- Wiley, E.O. 1975. Karl R. Popper, systematics, and classification: A reply to Walter Bock and other Evolutionary Taxonomists. **Systematic Zoology** **24**: 233-243.
- Wong, S.Y.; Boyce, P.C.; bin Othman, A.S. & Pin, L.C. 2010. Molecular phylogeny of tribe Schismatoglottideae (Araceae) based on two plastid markers and recognition of a new tribe, Philonotieae, from the neotropics. **Taxon** **59**: 117-124.
- Yan, H.-F.; Hao, G.; Hu, C.-M. & Ge, X.-J. 2011. DNA barcoding in closely related species: a case study of *Primula* L. sect. *Proliferae* Pax (Primulaceae) in China. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 225-236.
- Yoo, K.-O. & Jang, S.-K. 2010. Infrageneric relationships of Korean *Viola* based on eight chloroplast markers. **Journal of Systematics and Evolution** **48**: 474-481.
- Yu, J.; Xue, J.H. & Zhou, S.L. 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 176–181.
- Zander, R.H. 2010. Structuralism in Phylogenetic Systematics. **Biological Theory** **5**: 383-394.
- Zhu, G.H. & Croat, T.B. 2004. A revision of genus *Dracontium* (Araceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **91**: 473-484.

HISTÓRICO DA TESE

O desejo de avaliar a aplicabilidade de uma abordagem *DNA barcodes* em Araceae teve início em 2006-2007 com a aprovação do projeto "Avaliação da tecnologia 'Código de Barras de DNA' para identificação taxonômica em Araceae por meio de marcadores plastidiais", no edital universal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Naquele momento, visava a avaliação de diferentes marcadores plastidiais, dois codificantes (o *matK* e o *rbcl*) e dois não-codificantes (os espaçadores *trnL-trnF* e *trnH-psbA*), como sequências *barcodes* em Araceae, partindo de uma ampla amostragem. Num primeiro momento, os esforços foram concentrados na amplificação e no sequenciamento de dois destes marcadores, o *matK* e o *trnL-F*, principalmente, devido à experiência prévia do Dr. Eduardo G. Gonçalves, coordenador do projeto, e as necessidades de outros projetos executados sob sua orientação que envolviam, além dos *DNA barcodes*, a reconstrução filogenética de uma subfamília (Lasioideae), de duas tribos (Caladieae e Zomicarpeae) e de um gênero (*Philodendron* Schott) de Araceae. Foram necessários quase dois anos para que os protocolos fossem adaptados e sequências viáveis fossem obtidas para a tribo Caladieae-Zomicarpeae, resultados apresentados por Batista, em 2008. O próximo grupo a ser abordado foi *Philodendron*. Porém, ao contrário de Caladieae-Zomicarpeae não foram obtidas sequências completas, nem para o *matK*, nem para o *trnL-F* (Castro 2009, dados não publicados). O mesmo aconteceu com Lasioideae (Sales, com. pess.). Nesse meio tempo, outros materiais, pertencentes a outras subfamílias (Monsteroideae e Aroideae) e tribos (Monstereae, Dieffenbachieae, Spathicarpeae e Zomicarpeae), foram incluídos, contudo, também sem sucesso. Assim, fora Caladieae-Zomicarpeae, das 43 espécies amostradas posteriormente, apenas para 18 (cerca de 40%) foram obtidas sequências parciais para algum dos marcadores. No Anexo I é apresentada uma lista das espécies amostradas e dos respectivos fragmentos de *matK* obtidos.

Em 2009, com a utilização dos protocolos e dos *primers* propostos o pelo CBOL - *Plant Working Group* (Consortium for Barcoding of Life, Hollingsworth et al. 2009b) resultados animadores começaram a serem obtidos. Contudo, nesse mesmo ano o projeto código de barras de DNA foi, praticamente, suspenso por uma série de

dificuldades técnicas, logísticas e operacionais. O projeto foi retomado apenas em 2010, porém com um desenho diferente que contemplava apenas a avaliação do *matK*. Nesse ano, persistiram as dificuldades na obtenção de sequências completas para esse marcador. Ressalta-se que essa dificuldade na obtenção de sequências viáveis era inerente ao próprio marcador e aos protocolos adotados, conforme exposto por diferentes estudos envolvendo *DNA barcodes* em plantas, como os de Kress *et al.* (2009), Dunning & Savolainen (2010), Hollingsworth *et al.* (2009), Yu *et al.* (2011) e Hollingsworth *et al.* (2011). Além disso, especificamente em Araceae, acreditamos que a elevada quantidade de impurezas, que não foram, adequadamente, removidas com o polietileno glicol, comprometeu a etapa de seqüenciamento. Como não havia mais tempo, foram utilizados para a construção da tese, ora apresentada, apenas as espécies com sequências completas já obtidas, pertencentes, principalmente, ao gênero *Xanthosoma* (tribo Caladieae-Zomicarpeae), além das já disponíveis no GenBank®. Por estes motivos, este estudo foi, parcialmente, baseado em dados obtidos por terceiros, ainda que a abordagem seja inédita.

Referências Bibliográficas

- Batista, A.R. 2008. **Filogenia do Complexo Caladieae-Zomicarpeae (Araceae) baseada em sequências do DNA plastidial**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília – UCB.
- Castro, V.H. 2008. Reconstrução filogenética de *Philodendron* Schott com ênfase no subgênero *Mecostigma* por meio de marcadores plastidiais. Monografia de conclusão de curso, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília – UCB.
- Dunning, L.T. & Savolainen, V. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. **Botanical Journal of the Linnean Society** **164**: 1-9.

Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Erickson, D.L.; Fazekas, A.J.; Graham, S.W.; James, K.E.; Kim, K.-J.; Kress, W.J.; Schneider, H.; van Alphenstahl, J.; Barrett, S.C.; van den Berg, C.; Bogarin, D.; Burgess, K.S.; Cameron, K.M.; Carine, M.; Chacón, J.; Clark, A.; Clarkson, J.J.; Conrad, F.; Devey, D.S.; Ford, C.S.; Hedderson, T.A.; Hollingsworth, M.L.; Husband, B.C.; Kelly, L.J.; Kesanakurti, P.R.; Kim, J.S.; Kim, Y.-D.; Lahaye, R.; Lee, H.-L.; Long, D.G.; Madriñán, S.; Maurin, O.; Meusnier, I.; Newmaster, S.G.; Park, C.-W.; Percy, D.M.; Petersen, G.; Richardson, J.E.; Salazar, G.A.; Savolainen, V.; Seberg, O.; Wilkinson, M.J.; Yi, D.-K. & Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America** **106**: 12794-12797.

Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **Public Library of Science ONE** **6**: e19254.

Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Jones, F.A.; Swenson, N.G.; Perez, R.; Sanjur, O. & Bermingham, E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **106**: 18621-18626.

Yu, J.; Xue, J.H. & Zhou, S.L. 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 176–181.

Anexo I. Lista das espécies de Araceae amostradas e dos respectivos fragmentos de *matK* obtidos. Para o sequenciamento completo da região *matK* foram utilizados os seguintes *primers*: -19F (Gravendeel *et al.* 2001) e 2R (Steele & Vigalys 1994), 390F e 1326R (Cuénoud *et al.* 2002) e 1034F e 533R (Batista *et al.* 2008) e os protocolos propostos por Gonçalves *et al.* (2007), Batista (2008) e Hollingsworth *et al.* (2009b). X: fragmento sequenciado com sucesso.

Espécie	-19F	390F	1034F	533R	1326R	2R
<i>Aglaonema commutatum</i> Schott						
<i>Anchomanes difformis</i> (Blume) Engl.						
<i>Anthurium affine</i> Schott	X	X		X		
<i>Anthurium amnicola</i> Dressler						
<i>Anthurium bahiense</i> N.E. Br. Ex Engl.						
<i>Anthurium bellum</i> Schott						
<i>Anthurium berriozabalense</i> Matuda						
<i>Anthurium gladiifolium</i> Schott						
<i>Anthurium gomesianum</i> Nadruz						
<i>Anthurium gracile</i> (Rudge) Lindl.						
<i>Anthurium paraguayense</i> Engl.						
<i>Anthurium rubrinervium</i> (Link) G. Don.						
<i>Anthurium scandens</i> (Aubl.) Engl.						
<i>Anthurium scherzerianum</i> Schott						
<i>Anthurium unense</i> Nadruz & Cath.						
<i>Anubias</i> sp.	X					
<i>Cyrtosperma johnstonii</i> N.E. Br.	X			X		
<i>Dracontium bogneri</i> G.H. Zhu & Croat	X	X		X		
<i>Dracontium longipes</i> Engl.	X	X		X	X	
<i>Dracontium margaretae</i> Bogner	X	X		X	X	
<i>Dracontium</i> sp.1	X					
<i>Dracontium spruceanum</i> (Schott) G.H. Zhu	X	X		X	X	
<i>Gearum brasiliense</i> N.E. Br.						
<i>Homalomena picturata</i> (Linden & André) Regel	X					
<i>Lasia spinosa</i> (L.) Thwaites						

Anexo I. (Continuação).

Espécie	-19F	390F	1034F	533R	1326R	2R
<i>Montrichardia linifera</i> (Arruda) Schott	X					
<i>Orontium aquaticum</i> L.	X					
<i>Philodendron adamantinum</i> Mart. ex Schott						
<i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott ex Endl.						
<i>Philodendron brasiliense</i> Engl.	X					
<i>Philodendron corcovadense</i> Kunth	X					
<i>Philodendron dardanianum</i> Mayo	X					
<i>Philodendron lundii</i> Warm.	X					
<i>Philodendron mello-barretoanum</i> Burle-Max ex G.M. Barroso						
<i>Philodendron pedatum</i> (Hook.) Kunth						
<i>Philodendron solimoesense</i> A.C. Sm.						
<i>Philodendron stenolobum</i> E.G. Gonç.	X					
<i>Philodendron tweedieanum</i> Schott	X					
<i>Pistia stratiotes</i> L.						
<i>Podolasia stipitata</i> N.E. Br.						
<i>Typhonodorum lindleyanum</i> Schott						
<i>Urospatha sagittifolia</i> (Rudge) Schott	X					
<i>Zamioculcas zamifolia</i> (Lodd.) Engl.						

APRESENTAÇÃO DA TESE

No intuito de atender aos objetivos propostos, o presente estudo foi estruturado em três capítulos:

Capítulo 1. O uso de um fragmento do marcador *matK* como sequência *DNA barcode* em *Araceae*.

No Capítulo 1 são apresentados os resultados de uma primeira avaliação da aplicabilidade e do funcionamento de um fragmento do marcador *matK* como código de barras de DNA em *Araceae*. 514 seqüências de *matK*, de procedência conhecida e devidamente identificadas, foram editadas e utilizadas para na construção de um Perfil de Referência que serviu como base para a identificação molecular de diferentes acessos de *Araceae*. Além disso, a topologia geral obtida foi comparada às reconstruções filogenéticas disponíveis na literatura como forma de avaliar a capacidade do fragmento-alvo em recuperar agrupamentos com significado biológico e evolutivo.

Capítulo 2. Aplicabilidade dos *DNA barcodes* na identificação molecular e na elucidação das relações evolutivas nas espécies cultivadas de *Xanthosoma Schott* (*Araceae*).

No Capítulo 2, diferentes espécies cultivadas de *Xanthosoma Schott*, de difícil circunscrição, foram utilizadas para delinear os limiares do reconhecimento específico em uma identificação molecular. Nesse capítulo, além das limitações dos *DNA barcodes* na identificação de espécies proximalmente relacionadas, são também discutidas as implicações da adoção e do uso dos *DNA barcodes* como uma ferramenta preliminar de inferência evolutiva e seus impactos na circunscrição e na elucidação das relações em *Xanthosoma*.

Capítulo 3 – *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp. nov. inéd.: um estudo de caso do uso de *DNA barcodes* na identificação molecular de um novo táxon em Araceae.

Por fim, no Capítulo 3 são discutidas a precisão e a funcionalidade dos *DNA barcodes* na identificação molecular e no posicionamento sistemático de um táxon desconhecido para a ciência (*Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç.), tendo como base o Perfil de Referência construído no Capítulo 1.

A construção e organização dos tópicos dos capítulos e das Referências Bibliográficas seguiram as normas gerais da *Acta Botanica Brasilica*, disponíveis na página <<http://www.scielo.br/revistas/abb/pinstruc.html>>.

CAPÍTULO 1. O uso de um fragmento do marcador *matK* como sequência *DNA barcode* em Araceae.

RESUMO

Os *DNA barcodes* têm se mostrado como uma importante ferramenta de identificação molecular em diversos grupos de animais e plantas. Araceae apresenta, entre outras particularidades, grande variabilidade fenotípica, preservação inadequada de espécimes herborizados e assincronia na emergência de folhas e flores. Aliado a isso, o crescente interesse comercial por suas espécies e o número insuficiente de especialistas fazem desta família botânica um grupo ideal para o uso de *DNA barcodes* como uma ferramenta de identificação. Com base no exposto e considerando ainda a existência de sequências de *matK*, de procedência conhecida e devidamente identificadas, provenientes de diferentes estudos filogenéticos, foi objetivo desse Capítulo avaliar a aplicabilidade e o funcionamento do *matK* como sequência *barcode* em Araceae. 514 seqüências, pertencentes a 363 espécies, foram editadas para a obtenção do fragmento-alvo e avaliadas quanto a sua capacidade de reconhecimento genérico e específico, através do método de distância genética e pela busca BLAST®. Pela primeira vez dentro de Araceae, o uso de um marcador como sequência *barcode* foi avaliado em grande escala. Pelo método de distância, 68% das amostras puderam ser identificadas, de forma inequívoca, ao nível específico. Já, considerando a identificação em nível genérico, o percentual de acerto, também utilizando o método de distância, foi superior a 95% (95,7%). Pela busca BLAST® os resultados foram ainda mais animadores, pois 81,5% das sequências foram corretamente identificadas. Considerando a identificação em nível genérico, o percentual foi bastante similar ao encontrado para o método de distância, 96% (96,2%). Assim, o fragmento-alvo de *matK* (de aproximadamente 725pb), se mostrou suficientemente variável para tal tarefa, sendo capaz de discriminar adequadamente entre as diferentes espécies e gêneros amostrados. Além disso, a existência de forte sinal filogenético mostrou-se uma importante característica, com possíveis implicações evolutivas. Finalmente, a utilização de uma abordagem *DNA barcoding* pode, futuramente, auxiliar na conservação e o uso sustentável das espécies de Araceae.

Chapter 1. The use of a fragment of molecular marker *matK* as a DNA barcode sequence in Araceae.

ABSTRACT

DNA barcodes have been shown to be an important tool for molecular identification in various groups of animals and plants. Araceae presents a few taxonomical challenges such as great phenotypical variability, inadequate preservation of herbalized specimens and asynchrony in the emergence of leaves and flowers. Additionally the growing commercial interest for Araceae species and the insufficient number of experts make this botanical family an ideal group for the use of DNA barcodes for identification purposes. Therefore considering the existence of *matK* sequences of known origin from different phylogenetical studies, this chapter was aimed to evaluate the applicability and operation of *matK* as a barcode sequence in Araceae. 514 sequences belonging to 363 species have been edited to obtain the target fragment and evaluate their ability to distinguish genera and species by the method of genetic distance and BLAST® search. For the first time in Araceae, the use of a marker as barcode sequence was evaluated on a large scale. By the method of distance, 68% of the samples could be identified unequivocally at the species level. Now, at the genus level the accuracy using the method of distance was greater than 95% (95.7%). BLAST® results were even more encouraging because 81.5% of the sequences were correctly identified. Considering the identification at the genus level, the result was very similar to that found with the distance method 96% (96.2%). Thus, the target fragment of *matK* (approximately 725pb) was proved sufficiently variable for this task and was also able to discriminate different species and genera among those analysed. Moreover, the existence of strong phylogenetical signal has been shown to be an important feature, with possible evolutionary implications. Finally, the use of a DNA barcoding approach may further help in the conservation and sustainable use of Araceae species.

1. Introdução

O conceito de código de barras de DNA ou *DNA barcodes*, proposto pelo zoólogo canadense Paul Hebert (Hebert *et al.* 2003a; Hebert *et al.* 2003b), se apóia na idéia de que seqüências relativamente curtas de DNA (com cerca de 400-800pb) podem permitir a identificação molecular de materiais biológicos, desde que uma matriz de seqüências de referência, devidamente identificadas e de procedência conhecida, seja estabelecida (Dalebout *et al.* 2004 Lorenz *et al.* 2005; Schander & Willassen 2005; Meyer & Paulay 2005; Lahaye *et al.* 2008).

Teoricamente, tal abordagem poderia permitir a rápida, objetiva e eficiente identificação de qualquer material biológico portador de DNA intacto. Isso facilitaria, não só a identificação de espécies já catalogadas (independente do estágio de desenvolvimento ou de suas variações fenotípicas), mas também o reconhecimento de espécies ainda inéditas (Hebert *et al.* 2004a) ou mesmo de espécies crípticas (Hebert *et al.* 2004b; Moniz & Kaczmarek 2010). Dadas as suas potencialidades, o uso desta ferramenta tem se difundido pela comunidade científica, sendo vários os grupos biológicos reconhecidos utilizando esta abordagem molecular.

Em animais, o gene que codifica para a citocromo c oxidase subunidade 1 (*COI* ou *cox1*) foi escolhido como *DNA barcode*, principalmente, pela alta taxa de variação que apresenta (Hebert *et al.* 2003a). Baseados neste gene do DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido realizados vários estudos de caracterização e identificação molecular, em diferentes grupos de animais e insetos (Barret & Hebert 2005; Cywinska *et al.* 2006; Kerr *et al.* 2009; Hajibabaei *et al.* 2006; deWaard *et al.* 2009; Ardura *et al.* 2010). A maioria destes estudos relata quase 100% de acurácia na identificação das espécies amostradas. Assim, praticamente, não existe dúvida sobre a eficiência e universalidade da *COI* como região *barcode* para os animais.

No entanto, sabe-se que tal marcador não varia o suficiente para servir como ferramenta de identificação entre as diferentes espécies de plantas terrestres (Schuster & Brennicke 1994; Soltis *et al.* 2009; Kress *et al.* 2005; Chase *et al.* 2005; Chase *et al.* 2007; Pennisi 2007; Fazekas *et al.* 2008; Lahaye *et al.* 2008; Newmaster *et al.* 2008; Hollingsworth *et al.* 2009a). Para suprir esta lacuna e encontrar seqüências alternativas igualmente poderosas para a identificação de organismos vegetais, ao longo dos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos utilizando, principalmente, o genoma do cloroplasto (cpDNA).

Inicialmente, Kress *et al.* (2005), após compararem 10 *loci* diferentes (*trnH-psbA*, *rpl36-rps8*, *trnK-rps16*, *trnV-atpE*, *trnC-ycf6*, *ycf6-psbM*, *psbM-trnD*, *atpB-rbcL*, *trnL-F* e ITS), propuseram o *trnH-psbA* como um marcador universal para as plantas terrestres. Já, Newmaster *et al.* (2006), recomendaram o *rbcL*, após avaliarem mais de 10.000 sequências desse marcador, depositadas no GenBank® (Benson *et al.* 2010). Em 2007, Kress & Erickson, com base no estudo de Newmaster *et al.* (2006), propuseram a combinação do *trnH-psbA* com o *rbcL* como DNA *barcodes* para as plantas. Paralelamente, Chase *et al.* (2007) propuseram a combinação de três marcadores: o *rpoC1*, o *rpoB* e o *matK* ou, numa segunda abordagem, o *rpoC1*, o *matK* e o *trnH-psbA*. Por sua vez, Taberlet *et al.* (2007) sugeriram o intron *trnL* como sequência *barcode* mais adequada. No ano seguinte, Newmaster *et al.* (2008) utilizaram, com sucesso, o *matK* aliado ao *trnH-psbA* na identificação de diferentes espécies de Myristicaceae. Ainda nesse mesmo ano, Lahaye *et al.* (2008), demonstraram que uma porção do gene *matK* poderia ser um forte candidato a DNA *barcode* universal para as angiospermas, após analisarem centenas de espécies de orquídeas. Já para Kress *et al.* (2009), o uso do *matK*, do *rbcL* e do *trnH-psbA* combinados seria a melhor escolha possível. Além desses marcadores, outros mais foram propostos em diferentes estudos, tais como o *accD*, o *ndhJ*, o *ycf5*, o *atpF-H*, o *psbK-psbI*, além do nuclear nrITS2 (Chase *et al.* 2005; Fazekas *et al.* 2009; Petersen & Seberg 2009; Hollingsworth *et al.* 2009a).

Sobretudo, com o intuito de uniformizar e direcionar todos estes avanços na abordagem DNA *barcoding* em plantas, em 2009, o CBOL - *Plant Working Group* (*Consortium for Barcoding of Life*, Hollingsworth *et al.* 2009), grupo formado por mais de 50 pesquisadores e centros de pesquisa de todo o mundo, reconheceram o *matK* combinado ao *rbcL*, como DNA *barcodes core* para as plantas terrestres, mesmo admitindo que melhorias ainda seriam necessárias, principalmente considerando as dificuldades existentes na amplificação e na recuperação de sequências viáveis para o *matK* (Kress *et al.* 2009). Atualmente, pesquisadores como Hollingsworth *et al.* (2011) admitem também a utilização, em paralelo e quando necessário, de outros marcadores, plastidiais (como o *trnH-psbA*) ou nucleares (como o ITS), além da combinação *matK* + *rbcL*, para que uma maior eficiência na identificação das amostras vegetais seja alcançada.

É importante ressaltar que tanto o *matK*, quanto o *rbcL* não figuram apenas como DNA *barcodes*. Muitas vezes, são também utilizados, em separado ou em

conjunto, na reconstrução filogenética de diversos grupos vegetais (Hilu *et al.* 2003; Cabrera *et al.* 2008; Kress *et al.* 2009; Kress *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011; Yoo *et al.* 2011; Hollingsworth *et al.* 2011). Porém, dos dois, o *matK* é o mais variável, característica que lhe confere uma maior capacidade discriminatória ao nível familiar e infragenérico (Hilu & Liang 1997; Hilu *et al.* 2003). Isso ocorre, principalmente, pela sua taxa de mutação que é três vezes maior que a do *rbcL* (Soltis *et al.* 1996).

O *matK* é uma ORF (*Open Reading Frame*), de cerca de 1500bp, localizada no gene que codifica o tRNA para a lisina^(UUU), o *trnK* (Soltis *et al.* 1999; Hilu *et al.* 2003; Shaw *et al.* 2005; Hilu *et al.* 2008). Por apresentar regiões mais conservadas e mais variáveis, característica desejável na sua utilização filogenética (Hilu & Liang 1997; Hilu *et al.* 2003; Hausner *et al.* 2006; Hilu *et al.* 2008), cada vez mais *primers* têm sido desenhados para que fragmentos deste marcador figurem como *DNA barcodes*. Além de representar um caminho para a obtenção de sequências viáveis (Dunning & Savolainen 2010; Yu *et al.* 2011; Li *et al.* 2011), esse desenho atenderia a importantes premissas em uma abordagem *DNA barcode*, tais como a utilização de sequências curtas e dotadas de variabilidade suficiente para o reconhecimento específico, sem que a sua universalidade fosse comprometida (Hollingsworth *et al.* 2009b; Hollingsworth *et al.* 2011). Nessa linha, Dunning & Savolainen (2010), após avaliarem diferentes pares de *primers*, propuseram a adoção de *primers* grupo-específicos para o *matK*, como a combinação 1R_KIM / 3F_KIM (Kim, dados não publicados), principalmente, para as Eudicotiledôneas, a combinação 390F / 1326R (Cuénoud *et al.* 2002) para parte das Monocotiledôneas e a combinação XXF / ALI_R (Dunning & Savolainen 2010) para ordens como Acorales, Alismatales e Arecales.

Embora esse não seja o objetivo, a utilização de marcadores moleculares, dotados de sinal filogenético, como no caso do *matK*, tem permitido também a utilização dos *DNA barcodes* na elucidação das relações evolutivas entre os táxons, em diferentes níveis. Esta característica híbrida, que combina o poder discriminante dos *DNA barcodes* à filogenia, constitui um importante desdobramento desta ferramenta de identificação molecular (Lahaye *et al.* 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Hollingsworth *et al.* 2011). Nessa linha, Kress *et al.* (2009) e Kress *et al.* (2010) foram capazes de construir, utilizando sequências *barcodes*, filogenias robustas entre os táxons presentes em florestas tropicais no Panamá e em Porto Rico, respectivamente. Em ambos os casos, ressaltam que estas filogenias

compartilham várias semelhanças com a apresentada pelo APG II (*Angiosperm Phylogeny Group* 2003), largamente aceitas entre os botânicos.

A família Araceae, pertencente à ordem Alismatales, é composta por aproximadamente 3700 espécies, agrupadas em 102 gêneros. Essas espécies estão distribuídas por todo o globo, especialmente nas regiões tropicais da Ásia e das Américas (Grayum 1990; Mayo *et al.* 1997; Govaertz & Frodin 2002; Gonçalves *et al.* 2004; Bogner & Gonçalves 2005; Cabrera *et al.* 2008; Cusimano *et al.* 2011). Apresenta ampla variação ecológica, morfológica e anatômica, sobretudo, considerando seus hábitos, folhas e inflorescências. Porém, sua principal característica é apresentar as flores agrupadas em uma espádice envolta por uma espata (Mayo *et al.* 1997). As Araceae são plantas largamente utilizadas como ornamentais, não só em projetos paisagísticos, mas também como fontes de flores e folhagens em arranjos tropicais (Junqueira & Peetz 2002; Lorenzi & Mello-Silva 2003; Souza & Lorenzi 2008). Apresentam ainda uso alimentício, especialmente considerando as folhas que são comidas como verduras e os caules que são ricos em amido (Plowman 1969; Giacometti & Léon 1994; Mayo *et al.* 1997; Corrêa 2000; Pinto *et al.* 2001; Seganfredo *et al.* 2001; Lima 2009).

Em Araceae, ao lado de outros marcadores, o *matK* mostrou-se eficiente na reconstrução filogenética não só da família como um todo (Cabrera *et al.* 2008), como de várias de suas tribos. Grob *et al.* (2002), em seu estudo filogenético com a tribo Thomsonieae Blume, foi capaz de reconhecer novas relações evolutivas, sobretudo, entre as espécies de *Amorphophallus* Blume ex Decne. Gonçalves *et al.* (2007), trabalhando com a tribo neotropical Spathicarpeae Schott propôs a expansão da tribo para acomodar *Dieffenbachia* Schott e *Bognera* Mayo & Nicolson, dois gêneros anteriormente pertencentes a tribo Dieffenbachieae Engler (*sensu* Mayo *et al.* 1997), além da segregação em gêneros monotípicos dos táxons *Incarum pavonii* (Schott) E.G. Gonç. e *Croatiella integrifolia* (Madison) E.G. Gonç. Batista (2008), por sua vez, obteve resultados que apontaram para a expansão da tribo Caladieae Schott para incluir também a tribo Zomicarpeae Schott (*sensu* Mayo *et al.* 1997). Em seu estudo, propõem ainda a redefinição do gênero *Xanthosoma* Schott para incluir *Chlorospatha* Engler. Wong *et al.* (2010), além de elucidar as relações em Schismatoglottideae Nakai, propôs a criação de uma nova tribo, Philonotieae S.Y. Wong & P.C. Boyce. E, Cusimano *et al.* (2010), ao analisar as relações evolutivas em Areae encontrou resultados que mostravam ser *Typhonium* Schott, *Sauromatum*

Schott e as espécies australianas de *Typhonium*, na verdade, pertencentes a linhagens evolutivas diferentes.

Porém, o conhecimento taxonômico da família ainda é insuficiente, mesmo considerando as filogenias já publicadas e o número crescente de especialistas (Mayo *et al.* 1997; Cabrera *et al.* 2008). Uma mostra disso é a constatação de que muitas espécies preliminarmente reconhecidas como novas permanecem ainda não descritas (Croat 2004; Gonçalves 2011). Um dos principais entraves aos avanços no conhecimento taxonômico do grupo é a dificuldade no reconhecimento das espécies, principalmente pela sua grande variabilidade fenotípica (Mayo 1991; Mayo *et al.* 1997; Cusimano *et al.* 2011), preservação insuficiente de espécimes herborizados (Gonçalves 2002) e reconhecidos casos de heterofilia (Ray 1987; Ray 1990), onde indivíduos em estágios diferentes de desenvolvimento foram descritos no passado como espécies distintas (Mayo *et al.* 1997). Além disso, em grupos geofíticos, o surgimento de folhas e flores pode ser completamente assíncrono, dificultando o reconhecimento das espécies (Zhu & Croat 2004).

Soma-se a estas dificuldades de identificação e circunscrição taxonômica o crescente interesse na comercialização de suas espécies, principalmente as de interesse ornamental (Souza & Lorenzi 2008). Estas, por vezes, são espécies ameaçadas (Coelho & Catharino 2008; Catharino & Coelho 2010), que na maioria dos casos são retiradas da natureza sem a devida autorização legal (Gonçalves, com. pess.). Possivelmente, o estabelecimento de uma ferramenta de identificação molecular tornaria mais rápida e também eficaz a identificação desses materiais. Deste modo, além da aplicação taxonômica, teríamos nos *DNA barcodes* estabelecidos para Araceae uma importante ferramenta conservacionista.

Aqui é oportuno dizer que embora já exista uma abordagem *barcode* em Araceae, este estudo é pontual e restrito à tribo Lemnoideae (Wang *et al.* 2010). Também cabe ressaltar que as Araceae também já foram utilizadas em grandes estudos que visavam o estabelecimento de uma sequência *barcode* universal para as plantas com flores, como os de Kress *et al.* (2005), Chase *et al.* (2005), Chase *et al.* (2007) e Hollingsworth *et al.* (2009b). Porém, nenhum estudo consistente foi conduzido, com amostragem exclusiva de toda família, especificamente com esta finalidade. Assim, com base no exposto e considerando a existência de sequências de *matK*, de procedência conhecida e devidamente identificadas, provenientes de diferentes estudos filogenéticos, o presente estudo tem como objetivo avaliar a

aplicabilidade e o funcionamento do *matK* como sequência *barcode*, utilizando como modelo a família Araceae.

2. Metodologia

2.1. Obtenção das sequências

Foram utilizadas 514 sequências de *matK*, provenientes de diferentes estudos filogenéticos em Araceae: Batista (2008), Grob *et al.* (2002), Gonçalves *et al.* (2007), Wong *et al.* (2010), Cusimano *et al.* (2010), Cabrera *et al.* (2008) e Wang *et al.* (2010). Sempre que possível, foi amostrada mais de uma sequência para cada espécie, sendo estas, muitas vezes, pertencentes a acessos distintos geograficamente. Exceto por Batista (2008), todas as sequências estão disponíveis no GenBank® (Anexo I). Conforme Cabrera *et al.* (2008), as espécies *Acorus calamus* L. (acesso no GenBank®: AB040154), *Alisma canaliculatum* A. Braum & C.D. Bouché (acesso AB040179), *Tofieldia pusilla* Pers. (AM920648) e *Hedyosmum mexicanum* C. Cordem. (AM905824) foram selecionadas como grupo externo para as análises.

2.2. Obtenção do fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*)

Para manter o posicionamento e, conseqüentemente, a universalidade do fragmento-alvo obtido frente a outras sequências *barcodes* ou não-*barcodes* depositadas no GenBank® (Benson *et al.* 2010) e/ou no BOLD® (*Barcoding of Life Data System*, Ratnasingham & Hebert 2007), juntamente com as 514 sequências anteriores foram alinhadas também cinco acessos de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: *A. thaliana* cultivar ser1 (acesso AF144373.1), *A. thaliana* cultivar nd1 (AF144375.1), *A. thaliana* cultivar no0 (AF144376.1), *A. thaliana* cultivar ka0 (AF144377.1) e *A. thaliana* cultivar su0 (AF144378.1). Todas essas sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW® (Thompson *et al.* 1994), sendo os alinhamentos, posteriormente, verificados e editados manualmente.

Para a obtenção do fragmento-alvo, os *primers* XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010), próprios para Alismatales, foram incluídos manualmente aos alinhamentos anteriores, sendo a região compreendida entre os *primers* então recortada (Figura 1). O fragmento-alvo obtido (sequência *barcode*) foi utilizado para as demais análises e comparações.

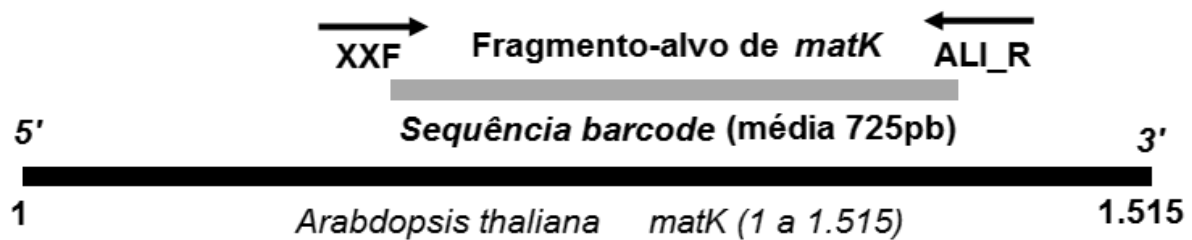


Figura 1. Posicionamento do fragmento-alvo (sequência *barcode*) em relação ao gene *matK* da sequência de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. É possível ainda observar a orientação dos *primers* XXF e ALI_R, próprios para Alismatales, propostos por Dunning & Savolainen (2010).

2.3. Análise das sequências

A distância genética entre as espécies foi estimada utilizando o modelo de substituição Kimura 2 Parâmetros – K2P (Kimura 1980). As árvores foram geradas através do programa MEGA 5® (Tamura *et al.* 2011), utilizando *Neighbour-Joining* (NJ), com o teste de *bootstrap* (Felsenstein 1985) com 1000 réplicas. A escolha tanto do modelo de substituição, quanto do método de distância, seguiram as recomendações propostas pelo *Barcoding of Life Data System* (BOLD, Ratnasingham & Hebert 2007). A variação inter e intraespecíficas foram calculadas, segundo Meyer & Paulay (2005), também usando o modelo K2P (Kimura 1980), com base nas distâncias genéticas estimadas entre as diferentes espécies e dentro de uma mesma espécie, respectivamente. A variabilidade existente foi avaliada através de parâmetros estatísticos (média e desvio-padrão) e pela análise do *Barcoding gap* (Meyer & Paulay 2005) que, em linhas gerais, consiste na análise da existência ou não de uma lacuna (*gap*) entre as distribuições de frequência das distâncias genéticas inter e intraespecíficas calculadas e agrupadas segundo intervalos de

classe (IC). O IC adotado foi de 0,001 unidades de distância. O teste *Two-way Chi-squared* (teste Chi-Quadrado para frequências não-paramétricas) foi realizado para maior confiabilidade dos resultados.

2.4. Testes de reconhecimento

O poder discriminatório do fragmento-alvo de *matK* como sequência *barcode* em Araceae foi avaliado através de dois métodos: (a) o método de distância genética, calculada conforme os parâmetros descritos anteriormente; e (b) através do programa BLAST® (Altschul *et al.* 1990).

2.4.1. Método de distância genética

2.4.1.1. Construção do Perfil de Referência

Do conjunto de 514 sequências iniciais, foram retiradas 151 sequências duplicadas (provenientes de espécies com mais de um acesso) que foram utilizadas, numa primeira etapa de identificação, como acessos “desconhecidos”. Das 363 sequências restantes foram ainda sorteadas e retiradas 50 sequências para compor, numa segunda etapa de identificação, os acessos “originalmente ausentes”. Após isto, o conjunto formado pelas 313 sequências restantes passou a ser denominado Perfil de Referência (Figura 2). É conveniente salientar que o Perfil de Referência, permaneceu composto por representantes de todas as subfamílias, tribos e gêneros de Araceae amostrados mesmo após o sorteio.

Construção do Perfil de Referência

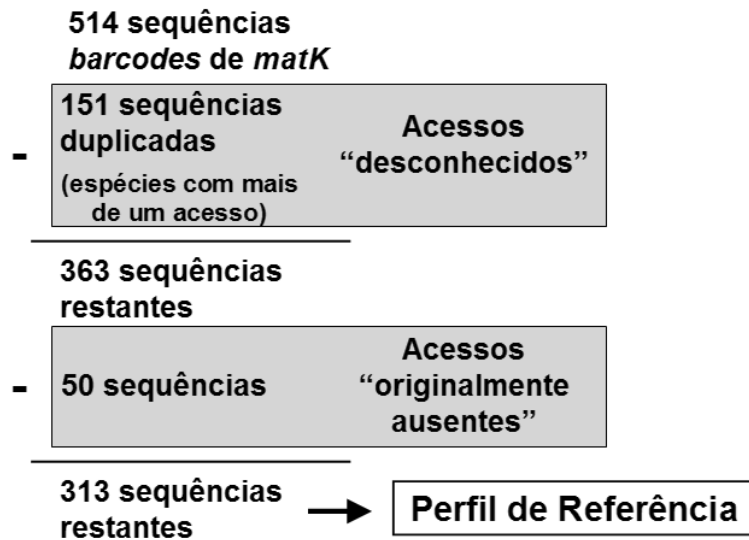


Figura 2. Obtenção do Perfil de Referência para a identificação, tanto das “amostras desconhecidas”, quanto das “inicialmente ausentes” pertencentes à família Araceae.

2.4.1.2. Capacidade de reconhecimento genérico e específico

Numa primeira etapa, como forma de avaliar a capacidade de reconhecimento genérico e de reconhecimento específico do fragmento-alvo de *matK*, foram confrontadas, contra o Perfil de Referência, 151 sequências duplicadas (provenientes de espécies com mais de um acesso do banco de 514 sequências originais), pertencentes a 66 espécies (Figura 3). As identificações originais foram apagadas no momento da comparação permanecendo todas as sequências “desconhecidas”. Desta feita, a identificação da amostra foi feita com base na menor distância genética, recebendo a sequência “desconhecida” a identificação da sequência com a qual permanecesse agrupada. Quando a espécie “desconhecida” permaneceu agrupada exatamente com a espécie “esperada”, apresentando a mesma distância genética, a identificação foi considerada correta. Quando a espécie “desconhecida” permaneceu agrupada com várias espécies, dentre as quais estava a espécie “esperada”, a identificação foi considerada ambígua. E quando a espécie “desconhecida” não permaneceu agrupada com a espécie “esperada” a identificação foi considerada incorreta. Como forma de avaliar a capacidade de reconhecimento

genérico, além da espécie, foi ainda computado o gênero com o qual a amostra “desconhecida” permaneceu agrupado.

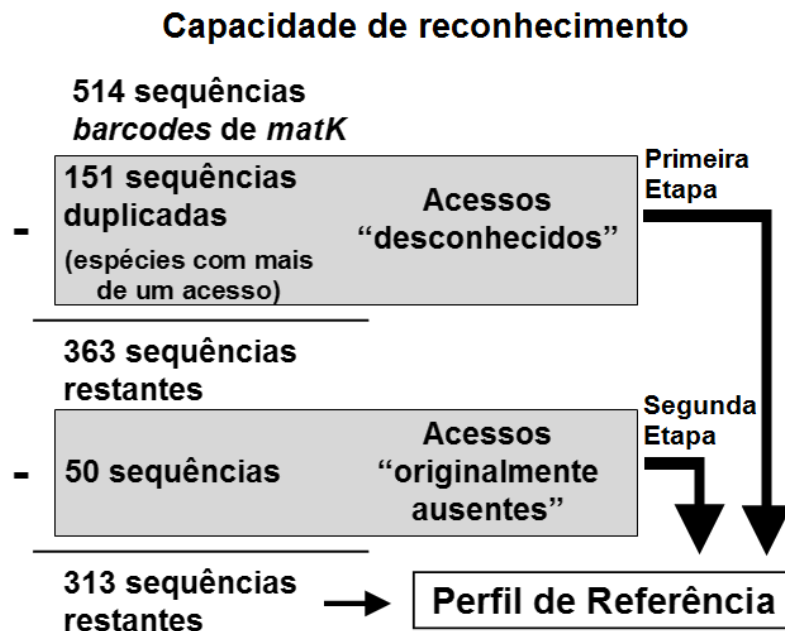


Figura 3. Etapas de avaliação da capacidade de reconhecimento genérico e de reconhecimento específico do fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*), com base no Método de distância genética.

Ainda, numa segunda etapa, como forma de avaliar a capacidade do fragmento em reconhecer amostras inicialmente ausentes, foram também confrontadas contra o Perfil de Referência, àquelas 50 sequências originalmente retiradas por sorteio no momento da construção do referido Perfil (Figura 3). Nesta etapa, apenas foi computada a distância genética destas espécies em relação à espécie com a qual permaneceu agrupada.

2.4.2. Busca BLAST®

Nessa etapa, a identificação das sequências “desconhecidas” foi feita com base nos melhores *hits* da busca BLAST® (Altschul *et al.* 1990). Agora, as 151 sequências duplicadas foram confrontadas contra a totalidade das sequências depositadas no GenBank® (Figura 4). Quanto a melhor resposta (maior escore entre

todas as sequências avaliadas) da busca correspondia a espécie “esperada” a identificação foi considerada correta. Quando a melhor resposta correspondia a várias espécies (com o mesmo score), incluindo a espécie “esperada” a identificação foi considerada ambígua. E, quando a “melhor resposta” da busca BLASTn® não era a espécie “esperada” a identificação foi considerada incorreta. Foi ainda computado o gênero ao qual pertencia a melhor resposta, como forma de avaliar a capacidade de reconhecimento genérico.

Capacidade de reconhecimento



Figura 4. Avaliação da capacidade de reconhecimento genérico e de reconhecimento específico do fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*) através da busca BLAST® (Altschul *et al.* 1990).

2.5. Avaliação dos padrões de similaridade entre os táxons de Araceae

Como forma de avaliar, num contexto global, os padrões de similaridade exibidos pelos diferentes táxons de Araceae, todas as 514 sequências *barcodes* foram utilizados para gerar diferentes árvores de distância genética através do programa MEGA 5® (Tamura *et al.* 2011), utilizando *Neighbour-Joining* (NJ) e o modelo K2P (Kimura 1980). Além disso, as topologias obtidas foram comparadas, visualmente, às reconstruções filogenéticas disponíveis, por exemplo, nos estudos de French *et al.* (1995), Grob *et al.* (2002), Tam *et al.* (2004), Gonçalves *et al.* (2007), Batista (2008), Cabrera *et al.* (2008), Cusimano *et al.* (2010), Espíndola *et al.* (2010), Linz *et al.* (2010), Wang *et al.* (2010), Wong *et al.* (2010), Cusimano *et al.*

(2011) como forma de avaliar a capacidade do fragmento-alvo de *matK* em recuperar agrupamentos com significado biológico e evolutivo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Considerações sobre o fragmento-alvo de *matK*

O comprimento das sequências *barcodes* obtidas para Araceae foi, em média, de 725pb. Portanto, apresenta-se relativamente mais comprida que outros *barcodes* encontrados na literatura e recomendados como *DNA barcodes* para as Angiospermas, como o *rbcL*, em média com 607pb, e o *trnH-psbA*, com entre 200 e 760pb (Fazekas *et al.* 2008; Kress *et al.* 2009). Porém, mesmo mais comprida, deste total de 725pb, 325 sítios são considerados informativos para parcimônia (49% do total). Este valor é proporcionalmente superior ao encontrado para o *matK* inteiro (31%) e cinco vezes maior que o do *rbcL* (10%) (Saunders *et al.* 2003). Nesse contexto, o fragmento-alvo apesar de maior, é tão informativo ou mais que as sequências inteiras de *matK* ou de outros marcadores codificantes ou não-codificantes.

Esse grande número de sítios informativos se deve ao seu posicionamento diante do *matK*. Segundo Yu *et al.* (2011), que como Dunning & Savolainen (2010) também propuseram *primers* universais para que o *matK* pudesse ser utilizado como *DNA barcode* em Angiospermas, a região compreendida entre os sítios de número 400 e 1300 (utilizando a sequência de *A. thaliana* como referência) é a que apresenta as regiões de maior variabilidade em todo o *matK*. Essa é, praticamente, a mesma região onde está localizado o fragmento-alvo de *matK* que utilizamos como sequência *barcode* nesse estudo (entre os sítios 449 e 1348). Assim, o fragmento-alvo de *matK* pode ser considerado representativo da variabilidade existente em todo o marcador e dotado de valor filogenético.

Além disso, após a inclusão dos *primers* XXF e ALI_R (Dunning & Savolainen 2010) ao conjunto de sequências alinhadas de Araceae, foi possível constatar que as regiões flangeadoras corresponderam, quase que perfeitamente, as sequências desses dois *primers* (Figura 5).

primer XXF 5'-TAATTTACGATCAATTCAATTC-3'
...ATTCAGAATTTACGATCTATTTCATACAACAT...

primer ALI_R 5'-YTATATACTTCGACTTTCGTG-3'*
...GTAAAGTATATACTTCGCCTTTCGTGTGCG....

Figura 5. Detalhe dos alinhamentos, mostrando a correspondência entre os *primers* XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010) e as regiões flanqueadoras das sequências de Araceae. As bases sublinhadas nas regiões flanqueadoras apresentam polimorfismos.*Para efeito comparativo a sequência do *primer* ALI_R (*reverse*) está em *reverse complement* (a sua sequência original é 5'-CACGAAAGTCGAAGTATAATY-3').

Assim, embora não tenham sido realizadas amplificações utilizando esses *primers*, a reduzida ocorrência de polimorfismos nas regiões flanqueadoras aponta para sua utilidade e funcionalidade como *primers* universais para o *matK* em Araceae, corroborando o estudo de Dunning & Savolainen (2010) que defendem sua utilização em Alismatales. Contudo, testes ainda são necessários para que sua adequação possa ser, realmente, avaliada.

Embora possa parecer, a busca por *primers* apropriados para grupos específicos não compromete a universalidade e nem o uso do *matK* como sequência *barcode*. Pelo contrário, segundo Hollingsworth *et al.* (2011), o desenho de *primers* específicos ou a utilização de coquetéis de *primers* tem sido defendida e pode representar uma saída para a utilização do *matK* ao lado do *rbcL* como *DNA barcodes core* para as plantas terrestres, conforme recomendado pelo CBOL *Plant Working Group* (Hollingsworth *et al.* 2009).

3.2. Variação inter e intraespecífica

A variação interespecífica foi de 0,070818599 ($\pm 0,048382686$) e a variação intraespecífica foi de 0,008917388 ($\pm 0,005306684$) (Tabela 1). Portanto, o fragmento-alvo de *matK* apresentou um menor nível de divergência genética dentro das espécies do que entre as espécies de Araceae analisadas. Segundo Meyer &

Paulay (2005), Lahaye *et al.* (2008) e Hollingsworth *et al.* (2009) este é um pré-requisito para que um marcador possa ser utilizado como sequência *barcode*.

Tabela 1. Variação interespecífica e intraespecífica para o fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*).

	Média	Desvio
Variação		
Interespecífica	0,070818599	±0,048382686
Variação		
Intraespecífica	0,008917388	±0,005306684

Porém, embora o fragmento-alvo tenha apresentado alta divergência interespecífica e baixa divergência intraespecífica, não foi observada lacuna (*gap*) entre as distribuições de frequência das distâncias genéticas inter e intraespecíficas calculadas (Figura 6).

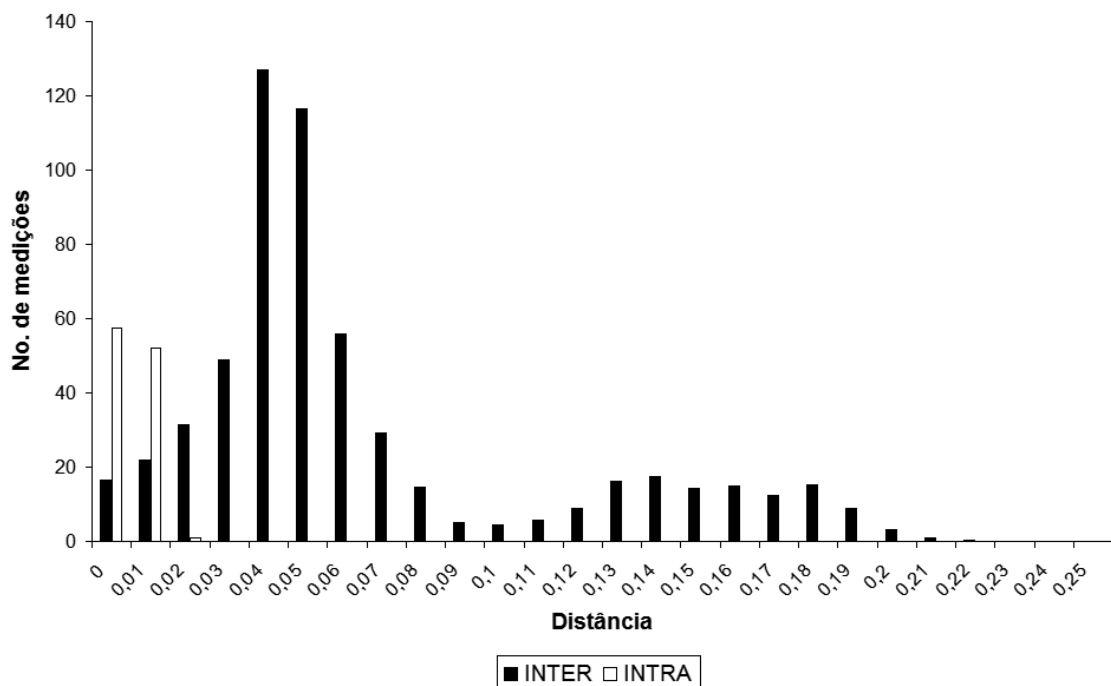


Figura 6. Distribuição relativa da variação interespecífica (barras pretas) e intraespecífica (barras brancas) para o fragmento-alvo de *matK* (Kimura – 2P, MEGA 5®).

Idealmente, os *DNA barcodes* devem apresentar um *gap* entre a distribuição das divergências inter e intraespecíficas (Hebert *et al.* 2003a; Moritz & Cícero 2004; Meyer & Paulay 2005; Gonçalves 2009; Ortiz 2010). Teoricamente, quanto mais sobreposição houver, menos eficaz o marcador será em discriminar entre as diferentes espécies analisadas (Meyer & Paulay 2005). Contudo, o teste *Two-way Chi-squared* mostrou existir diferença significativa entre as distribuições das frequências inter e intraespecífica ($P < 0,05$). Assim, mesmo considerando a existência de sobreposição, o fragmento-alvo, estatisticamente, ainda é capaz de distinguir, de forma confiável, entre as espécies de Araceae.

Tanto a ocorrência de espécies afins dentro de um mesmo gênero quanto a inclusão, quando foi possível, de vários acessos de uma mesma espécie, reforçaram a proporção de espécies e/ou acessos intimamente relacionados presentes na atual análise. Moritz & Cícero (2004), Meyer & Paulay (2005) e Meier *et al.* (2008) demonstraram que ao aumentarmos o número de espécies afins em uma análise, a sobreposição entre as variações genéticas também aumentava e, muitas vezes, o *Barcoding gap* deixava de existir para um mesmo conjunto de dados. Chen *et al.* (2010), ao reforçarem em seu estudo a proporção de espécies estreitamente relacionadas, observaram que nenhum dos *barcodes* avaliados apresentaram *gaps* significativos, isso quando estes ainda continuaram a ocorrer. Ressalta-se que, neste mesmo estudo, para o *matK*, o *rbcL*, o *ycf5* e o *rpoC1* a sobreposição já ocorria antes mesmo da inclusão das espécies afins. Gao *et al.* (2010) e Liu *et al.* (2010) encontraram resultados similares ao avaliarem a funcionalidade de *DNA barcodes* na identificação de plantas medicinais e na identificação de briófitas, respectivamente. Assim, mesmo considerando a existência do *Barcoding gap* como indicativa de sucesso da aplicação do marcador como sequência *barcode* são vários os exemplos, presentes na literatura, que demonstram que a existência ou não de sobreposição pode ser também um artefato da própria metodologia de análise, o que não, necessariamente, interferiria no poder discriminante deste marcador.

A ausência de *gap* pode ainda ser resultado de uma amostragem insuficiente. No presente estudo, cerca de 70% das sequências pertenciam a apenas um indivíduo por espécie. Para Meyer & Paulay (2005) e Moniz & Kaczmarek (2010), embora vários estudos com *barcodes* alcancem bons resultados e sejam realizados nestas condições, a amostragem, deve incluir, sempre que possível, dois ou mais indivíduos por espécie, devendo ser os acessos provenientes de ampla distribuição

geográfica e representativos para as populações amostradas, condição que reconhecem ser difícil de alcançar. Ainda, segundo Meyer & Paulay (2005), quando esta condição não é respeitada, normalmente, ocorre sobreposição entre a distribuição das divergências inter e intraespecíficas.

Por fim, é conveniente lembrar que além da inclusão de espécies e/ou acessos intimamente relacionados e de uma amostragem insuficiente, segundo Moritz & Cícero (2004) e Meyer & Paulay (2005), a existência de sobreposição também pode estar relacionada com a ocorrência de hibridação entre espécies ou mesmo ser fruto do pouco tempo de divergência entre alguns táxons. Ambas as possibilidades ocorrem em Araceae, sobretudo, se considerarmos a existência de espécies recentemente irradiadas e/ou àquelas estreitamente relacionadas que ocorrem em simpatria (Mayo *et al.* 1997; Gonçalves *et al.* 2007; Batista 2008; Cusimano *et al.* 2011). Aliás, no Capítulo seguinte (Capítulo 2) discutiremos de forma mais aprofundada a aplicabilidade de *DNA barcodes* em um grupo formado por espécies estreitamente relacionadas, possivelmente de especiação recente e que estão distribuídas de forma simpátrica. Para tanto, utilizaremos como modelo o gênero *Xanthosoma* Schott (Araceae).

3.3. Testes de reconhecimento genérico e específico

Tanto pelo método de distância genética, quanto pela busca BLAST® foi possível proceder à identificação em nível genérico e específico, sendo o fragmento-alvo proposto capaz de recuperar identificações corretas e, em maioria, inequívocas para a maioria das amostras analisadas de Araceae.

Pelo método de distância, aproximadamente, 97% das amostras “desconhecidas” puderam ser identificadas ao nível específico. Deste total, 68% foram identificadas corretamente, enquanto 28,9% das identificações foram consideradas ambíguas, ou seja, a espécie “desconhecida” permaneceu agrupada com várias espécies, dentre as quais estava a espécie “esperada”. Apenas 3,1% das sequências foram identificadas de forma incorreta. Já, considerando a identificação em nível genérico, o percentual de acerto, também utilizando o método de distância, foi superior a 95% (95,7%).

Segundo Meyer & Paulay (2005), o conceito de *DNA barcodes* deve apresentar, além da capacidade de atribuir a uma amostra desconhecida uma

espécie conhecida, a capacidade de detectar que espécies previamente não amostradas são distintas das que compõem o Perfil de Referência. Neste contexto, importantes resultados também foram alcançados: as 50 amostras “inicialmente ausentes”, que foram confrontadas contra o Perfil de Referência, permaneceram praticamente em todos os casos, agrupadas com gêneros e espécies relacionados.

Pela busca BLAST® os resultados foram ainda mais animadores, pois 81,5% das sequências “desconhecidas” foram corretamente identificadas, somente 16,5% consideradas ambíguas e 2% identificadas de forma incorreta. Considerando a identificação em nível genérico, o percentual foi bastante similar ao encontrado para o método de distância, 96% (96,2%). Chen *et al.* (2010), ao testarem sete regiões candidatas, plastidiais e nucleares, também obtiveram melhores resultados na identificação das amostras pelo método BLAST® do que pelo método de distância. Embora não discutam essa diferença na eficiência entre os métodos, acreditamos que possa ser resultado do próprio arcabouço de análise destes dois métodos. Na busca BLAST®, o algoritmo procura por trechos de similaridade entre seqüências (Altschul *et al.* 1990) ao invés de compará-las através de suas distâncias genéticas, como no método de distância¹. Essa diferença de abordagem poderia sim permitir um maior sucesso comparativo, se considerarmos um mesmo banco de dados.

Estes percentuais estão de acordo com os encontrados na literatura. Kress *et al.* (2009) recuperaram 69% das identificações ao utilizarem, isoladamente, o *matK*. Resultados similares também foram alcançados por Hollingsworth *et al.* (2009) que, utilizando o *matK* ao lado do *rbcL* como *DNA barcodes*, foram capazes de identificar corretamente 72% das amostras testadas. Porém, são mais significativos que os encontrados por Newmaster *et al.* (2008) e Mort *et al.* (2010) que, utilizando apenas o *matK* com *barcode*, identificaram menos de 50% dos indivíduos de Myricaceae e do gênero *Tolpis* Adans. (Asteraceae), respectivamente. Ren *et al.* (2010) recuperaram um percentual ainda menor, apenas 31,25%. Resultados mais

¹ De forma mais pormenorizada, ao utilizarmos *Neighbour-Joining* (NJ) as sequências são agrupadas pelas suas distâncias evolucionárias. Táxons mais estreitamente relacionados entre si são agrupados até que todos estejam conectados, sendo a árvore resultante a que apresentar o menor comprimento entre os braços. Além de não testar todas as topologias possíveis, métodos de distância, como o NJ, podem forçar agrupamentos sem qualquer sentido biológico (Schneider 2003). Já, na busca BLAST® as sequências não são transformadas em uma única variável. Toda a sequência é avaliada através da busca por regiões de similaridade local (domínios). Assim, de fato, as sequências são diretamente comparadas entre si, sendo agrupadas segundo seus escores de similaridade (Altschul *et al.* 1990).

expressivos foram alcançados por Kelly *et al.* (2010), que após analisarem quatro marcadores, afirmaram ser o *matK* sozinho suficiente para a identificação das Podostemaceae africanas, sendo este marcador capaz de identificar todas as espécies testadas (100%) e por Lahaye *et al.* (2008) que recuperaram a identificação inequívoca de 90,9% das amostras em um conjunto amostral formado por mais de 1.000 espécies de orquídeas da América Central. Aliás, com base nesse percentual, estes últimos autores defenderam o uso, em larga escala, de uma parte do *matK* como *DNA barcodes* universal para as plantas com flores. Salienta-se que o fragmento-alvo testado aqui, como sequência *barcode* para Araceae, está compreendido entre os *primers* que utilizaram em seu estudo, o 390F e 1326R (Cuénoud *et al.* 2002).

Assim, mesmo com tanta diversidade de resultados, que ora apontam o *matK* como *barcode* ideal, ora o colocam em segundo plano evidenciando e defendendo o uso de marcadores mais eficientes, em separado ou em conjunto, os resultados aqui encontrados estão dentro dos disponíveis na literatura e mostram ser esta primeira abordagem suficientemente abrangente para avaliar a eficiência da tecnologia código de barras de DNA em Araceae, sendo, o fragmento-alvo capaz de recuperar a identificação inequívoca de um considerável percentual de espécies e gêneros pertencentes a essa família botânica.

3.4. Avaliação dos padrões de similaridade entre os táxons de Araceae

As árvores construídas para avaliar a eficiência do fragmento-alvo de *matK* em recuperar as identificações mostraram-se bastante similares às aquelas apresentadas nos estudos moleculares de Grob *et al.* (2002) sobre a tribo Thomsonieae, Tam *et al.* (2004) sobre Monsteroideae Engler, Gonçalves *et al.* (2007), sobre Spathicarpeae, Wong *et al.* (2010) sobre Schismatoglottideae, Cusimano *et al.* (2010) sobre a tribo Areae e aos estudos de Cabrera *et al.* (2008) e Cusimano *et al.* (2011), com a reconstrução de toda família. É importante salientar que esta comparação está fundamentada apenas na topologia, visto que o arcabouço de análise adotado neste estudo é bastante diferente do adotado nos estudos filogenéticos citados acima. Porém, mesmo assim, várias subfamílias, tribos, gêneros e espécies mantiveram os mesmos agrupamentos, muitas vezes

formando grupos coerentes biologicamente. As congruências e incongruências entre as topologias são discutidas a seguir.

Família Araceae. Em linhas gerais, a família Araceae (Figura 7) mostrou-se coesa e fortemente suportada (*bootstrap* = 96). Foi possível ainda o reconhecimento das sete subfamílias propostas por Mayo *et al.* (1997), a saber Gymnostachydoideae Bogner & Nicolson, Orontioideae Mayo, Bogner & P.C. Boyce, Pothoideae Engler, Monsteroideae Engler, Lasioideae Engler, Calloideae Endlicher e Aroideae Engler. Essas subfamílias permaneceram agrupadas em dois grupos: um menor, basal, formado por Gymnostachydoideae e Orontioideae (*bootstrap* = 90), e outro maior formado por todas as outras cinco subfamílias, mais Lemnoideae Bab. (antiga família Lemnaceae Martinov) (*bootstrap* = 99). As subfamílias Pothoideae e Monsteroideae, mesmo formando um único agrupamento (*bootstrap* = 42²), permaneceram distintas entre si (*bootstrap* = 85 e *bootstrap* = 99, respectivamente). O agrupamento formado por Lasioideae, Calloideae e Aroideae é fracamente suportado (*bootstrap* = 22). Aroideae é a última e maior subfamília a divergir, com 23 tribos e mais de 70 gêneros (*bootstrap* = 22). A seguir, cada um dos agrupamentos apresentados serão discutidos em seus pormenores.

² Valores de *bootstrap* tão baixos normalmente são desconsiderados no momento da análise dos agrupamentos (Schneider 2003). Porém, como o objetivo deste tópico foi apenas avaliar, num contexto global, a topologia da árvore encontrada e compará-la com os demais padrões disponíveis na literatura, todos os agrupamentos foram mantidos e discutidos.



Figura 7. A família Araceae e suas principais subfamílias (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008), (6) Wong *et al.* (2010).

Grupo Orontioideae + Gymnostachyoideae. A subfamília Orontioideae (gêneros *Orontium* L. e *Lysichiton* Schott) juntamente com a subfamília Gymnostachyoideae (*Gymnostachys* R. Brown) formaram um único grupo dentro da família Araceae (Figura 7). Essa estreita relação entre *Gymnostachys*, único membro da subfamília Gymnostachyoideae, e a subfamília Orontioideae, já tinha sido proposta por French *et al.* (1995) utilizando RFLP, Mayo *et al.* (1997) utilizando dados morfológicos, Tam *et al.* (2004) ao analisarem o *trnL-F* e por Cabrera *et al.* (2008) ao construírem a primeira grande filogenia molecular de Araceae, utilizando vários marcadores (*rbcL*, *matK-trnK* e o *trnL-F*). Assim, os resultados aqui apresentados concordam com os encontrados na literatura. É ainda conveniente lembrar que, exceto pela inclusão de Lemnaceae (agora tribo Lemnoideae) em Araceae, a topologia aqui apresentada corrobora a segregação das “Proto-Araceae”, que incluem Gymnostachyoideae e Orontioideae, das Araceae “verdadeiras”, conforme proposto por Mayo *et al.* (1997) e Cusimano *et al.* (2010). Tanto em French *et al.* (1995), quanto em Cabrera *et al.* (2008) o clado formado por Gymnostachyoideae e Orontioideae permaneceu também como grupo-irmão das demais Araceae. Mayo *et al.* (1997) ressalta que *Gymnostachys* difere de *Orontium* e *Lysichiton* por apresentar folhas lineares, sem divisão entre lâmina e pecíolo e sinflorescências ramificadas, enquanto estes dois gêneros apresentam folhas não-lineares, com pecíolo e limbo expandido e inflorescências individualizadas, monopodiais. Já, entre *Orontium* e *Lysichiton* parecem não existir características morfológicas diagnósticas, sendo sua circunscrição sustentada apenas por análises moleculares (Cabrera *et al.* 2008; Cusimano *et al.* 2011).

Subfamília Lemnoideae. A subfamília Lemnoideae (Figura 7) forma um grupo coeso (*bootstrap* = 99) dentro de Araceae. O gênero *Spirodela* Schleid é o primeiro a divergir, seguido por *Lemna* Hegelm. e *Landoltia* Les & D.J. Crawford que permanecem agrupados (Grupo 2; *bootstrap* = 99) e são distintos de *Wolffiella* Hegelm. e *Wolffia* Horkel ex Schleid que juntos, formam outro agrupamento (Grupo 1; *bootstrap* = 99). Nesse último agrupamento, *Wolffia* forma um grupo *core* distinto de *Wolffiella*, que se apresenta disjunto pela inclusão de *Wolffia brasiliensis* Wedd. O acesso *W. globosa* (Roxb.) Hartog & Plas (*strain* 9196) permaneceu separado não só de *Wolffia core*, mas de todo o grupo *Wolffiella* + *W. brasiliensis*. Estudos moleculares, como o de French *et al.* (1995) e o de Cabrera *et al.* (2008), têm

mostrado ser verdadeira a inclusão de família Lemnaceae dentro de Araceae. Mayo *et al.* (1997) e Cabrera *et al.* (2008) ressaltam também que as aparentemente distintas Lemnaceae são na verdade um caso extremo de adaptação ao hábito aquático flutuante dentro de Araceae. Assim, as ervilhas ou lentilhas d'água, como são popularmente conhecidas, além da ínfima dimensão (comumente entre 3 e 5mm de comprimento) tiveram seus espádices reduzidos a flores solitárias aclamídeas que em nada lembram as espádices e espatas tão comuns nas demais Araceae. Quanto à topologia, a árvore obtida concorda, em grande parte, com a apresentada em Cabrera *et al.* (2008), pois *Spirodela* também apareceu como grupo-irmão das demais Lemnoideae e *Wolffia* e *Wolffiella* mantiveram estreita relação entre si. Porém, diverge por apresentar um agrupamento entre os gêneros *Lemna* e *Landoltia* e a segregação de *Lemna* em dois grupos, relação ausente no estudo filogenético de Cabrera *et al.* (2008). Wang *et al.* (2010), que desenvolveram um sistema de identificação molecular para Lemnaceae baseado na adoção, como *DNA barcode*, do espaçador intergênico *atpF-atpH*, por sua vez, encontraram resultados similares aos aqui apresentados, sobretudo considerando o agrupamento de *W. brasiliensis* no agrupamento formado por *Wolffiella*. Embora Wang *et al.* (2010) não comentem o ocorrido em seu estudo, provavelmente, *W. brasiliensis* deva ser, na verdade, uma espécie de *Wolffiella*. Com a transferência dessa espécie para *Wolffiella*, este gênero se tornaria monofilético.

Grupo Pothoideae + Monsteroideae. O próximo grupo a divergir é formado pelas subfamílias Pothoideae e Monsteroideae (Figura 7), ambas monofiléticas e bem suportadas (*bootstrap* = 85 e *bootstrap* = 99, respectivamente). Nesse agrupamento, a subfamília Pothoideae é formada pela tribo Potheae Engler (gêneros *Pothos* L., *Pothoidium* Schott e *Pedicellarum* M. Hotta) e pela tribo monogenérica Anthurieae Engler (*Anthurium* Schott), claramente distinta de Potheae (*bootstrap* = 85). Mayo *et al.* (1997) diferenciaram *Anthurium* dos gêneros que formam Potheae, principalmente, pelo seu crescimento simpodial, enquanto *Pothos*, *Pothoidium* e *Pedicellarum* têm crescimento monopodial e inflorescências axilares. Além disso, *Anthurium* é um gênero Neotropical, enquanto *Pothos*, *Pothoidium* e *Pedicellarum* são distribuídos pela Ásia e Austrália. Temponi (2006) com base em características morfológicas, anatômicas, caracteres polínicos e moleculares também encontrou resultados que fazem de *Anthurium* um grupo claramente distinto de Potheae. Na

subfamília Monsteroideae, a espécie *Raphidophora crassifolia* Aldwer. apareceu como grupo-irmão de todas as outras Monsteroideae. A tribo Monstereae (*sensu* Mayo *et al.* 1997) apresentou-se disjunta, pois os gêneros *Epipremnum* Schott, *Amydrium* Schott, *Scindapsus* Schott e *Monstera* Adanson formaram um agrupamento distinto do composto pelos gêneros *Alloschemone* Schott, *Rhodospata* Poeppig, *Stenospermation* Schott e *Heteropsis* Kunth. (gênero pertencente à tribo Heteropsidae Engler). As tribos Spathiphyllae Engler (representada pelo gênero *Holochlamys* Engler) e Anadendreae Bogner & French (gênero *Anadendrum* Schott) guardaram estreita relação com esse último grupo formado pelas tribos Monstereae + Heteropsidae. Neste trecho da árvore, a topologia encontrada é muito similar a de Cabrera *et al.* (2008), exceto pela presença de *R. crassifolia* como grupo-irmão das demais Monsteroideae, relação, por sua vez, presente em Cusimano *et al.* (2011). Por fim, estreita relação encontrada entre alguns gêneros de Monstereae e Heteropsidae pode ser explicada pelo compartilhamento do número cromossômico ($n=14$) e pela distribuição neotropical, como destacado por Mayo *et al.* (1997), Cabrera *et al.* (2008) e Cusimano *et al.* (2011). Esses autores propõem ainda que Heteropsidae seja expandida para incluir *Stenospermation*, *Alloschemone* e *Rhodospata* o que faria de Monstereae um grupo monofilético formado apenas pelos gêneros *Epipremnum*, *Amydrium*, *Scindapsus* e *Monstera*. O arranjo encontrado no presente estudo corrobora esta proposta.

Subfamília Lasioideae. A subfamília Lasioideae (gêneros *Urospatha* Schott, *Dracontioides* Engler, *Anaphyllopsis* A. Hay, *Dracontium* L., *Pycnospatha* Gagnepain, *Lasimorpha* Schott, *Lasia* Loureiro, *Podolasia* N.E. Brown e *Cyrtosperma* Griffith), forma um agrupamento fortemente suportado (*bootstrap* = 91) e distinto das subfamílias Calloideae, Stylochaetoneae e Aroideae (Figura 7). Em, Lasioideae, *Urospatha* e *Dracontioides* formam um grupo-irmão dos demais gêneros. *Anaphyllopsis* e *Dracontium* permanecem segregados do agrupamento formado por *Pycnospatha*, *Lasia*, *Lasimorpha*, *Podolasia* e *Cyrtosperma*. Segundo Mayo *et al.* (1997), são características que permitem o reconhecimento de Lasioideae: as folhas pinadas de nervuras bem desenvolvidas, a deiscência oblíqua das anteras e o número cromossômico $n=13$. Porém, Cusimano *et al.* (2011) destacam apenas o florescimento basípeto das espádices. Os agrupamentos aqui encontrados diferem dos de Cabrera *et al.* (2008), nos quais *Urospatha* aparece

como grupo-irmão dos demais gêneros de Lasioideae e *Dracontium*, *Dracontioides* e *Anaphyllopsis* formam um grupo distinto dos demais gêneros. Porém, como Cabrera *et al.* (2008), apontaram também para a estreita relação entre os gêneros *Pycnospatha*, *Lasia*, *Lasimorpha*, *Podolasia* e *Cyrtosperma*. Esses gêneros estão distribuídos no sudeste asiático, Indonésia e seus arquipélagos relacionados, além da África, enquanto *Dracontioides*, *Urospatha*, *Dracontium* e *Anaphyllopsis* são gêneros neotropicais (Mayo *et al.* 1997; Cusimano *et al.* 2011).

Subfamília Calloideae. A subfamília monogenérica Calloideae (gênero *Calla* L.), embora também fracamente suportada (*bootstrap* = 22), apresenta-se, ao lado da tribo Stylochaetoneae, fora de Aroideae (Figura 7), conforme Cabrera *et al.* (2008). Este arranjo difere do proposto por Mayo *et al.* (1997), porém concorda com o de Cusimano *et al.* (2011), exceto pelo posicionamento de *Calla* que, nesse último estudo, estaria incluída em Aroideae. Segundo Mayo *et al.* (1997) e Cusimano *et al.* (2011), a ausência de perigônio, ao lado de outras características permitiriam a distinção de *Calla* e sua manutenção como um grupo a parte.

Subfamília Aroideae. Para facilitar a exposição e apresentação dos resultados, a maior subfamília de Araceae, que neste estudo incluiu 23 tribos e 78 gêneros, foi subdividida em dois grandes grupos: (a) um primeiro (Grupo II), mais basal, formado pelas tribos Schismatoglottideae Nakai, Zamiculcadeae Engler, Montrichardieae Engler, Callopsideae Engler, Anubiadeae Engler, Homalomeneae M. Hotta, Philodendreae Schott, Zantedeschieae Engler, Aglaonemateae Engler, Nephthytideae Engler, Culcasieae Engler, Spathicarpeae Schott, Caladieae Schott, Zomicarpeae Schott e Thomsonieae Blume; e (b) um segundo (Grupo I), formado por Arisareae Dumortier, Ambrosineae Schott, Peltandreae Engler, Arophyteae Bogner, Pistieae Blume, Colocasieae Engler, Arisaemateae Nakai e Areae (Figura 8).

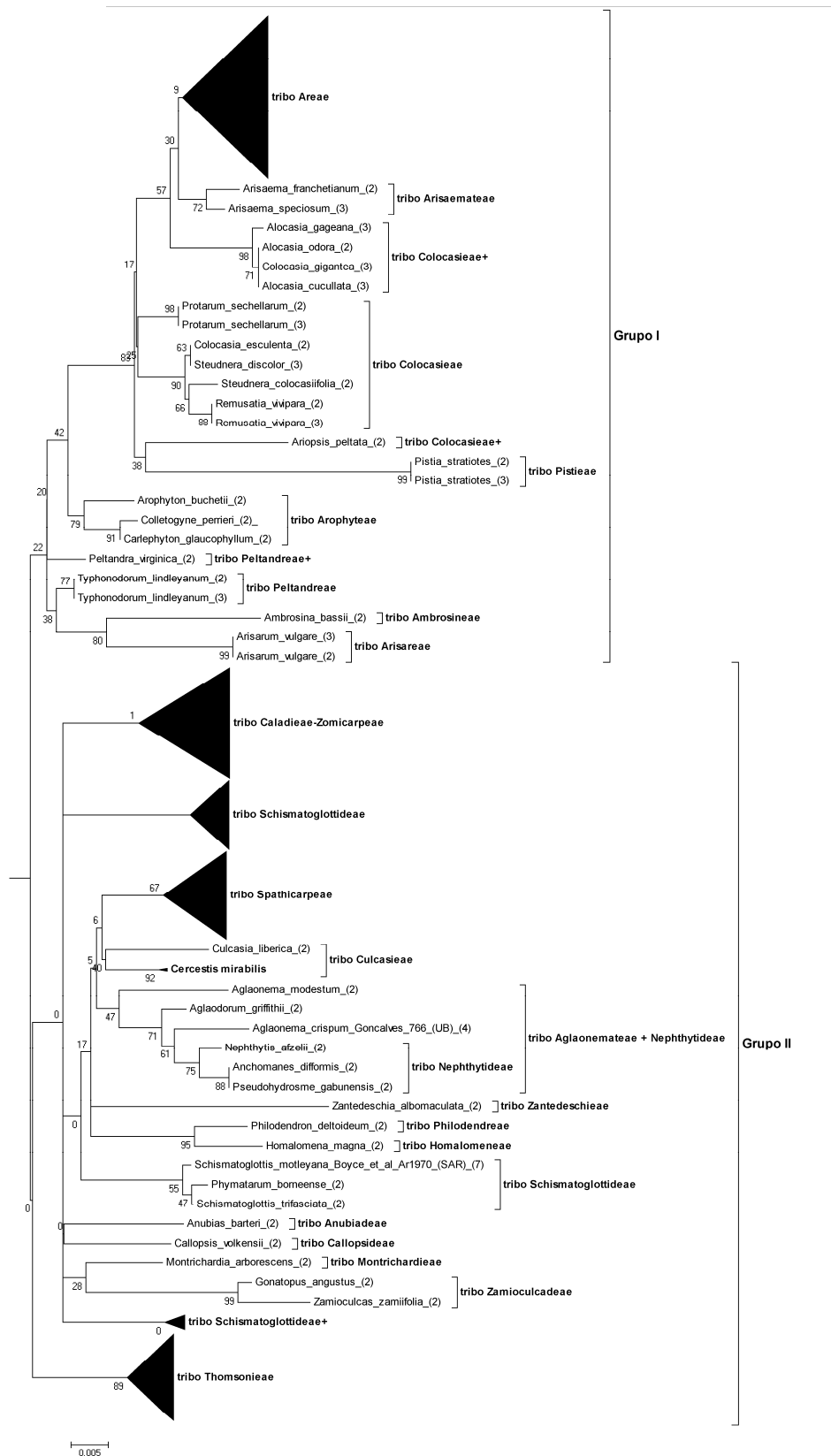


Figura 8. Subfamília Aroideae (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008), (3) Cusimano *et al.* (2010), (7) Wong *et al.* (2010).

Aroideae. Grupo II. A tribo Thomsonieae (*bootstrap* = 89) é a primeira a divergir apresentando-se como grupo-irmão das demais tribos. Em Thomsonieae (Figura 9), as espécies de *Amorphophallus* Decaisne permaneçam agrupadas em quatro grupos (1, 2, 3 e 4) que correspondem, quase que exatamente, aos clados encontrados por Grob *et al.* (2002). No Grupo 1 (correspondente ao Clado I do estudo de Grob *et al.* 2002) permaneceram reunidas todas as espécies africanas. No Grupo 2, parte das espécies asiáticas (= Clado 2). Em 3, todas as cinco espécies que, segundo Grob *et al.* (2002), compartilham a inserção de 12pb na posição 1507-1518 (= Clado 4). E, no Grupo 4 as espécies asiáticas restantes (= Clado 3). A espécie *A. longituberosus* (Engl.) Engl. & Gehrm., que em Grob *et al.* (2002) aparece no Clado 5, junto com *Pseudodracontium* N.E. Br., aqui permaneceu no Grupo 1. A Figura 9 traz ainda *Pseudodracontium lacourii* (Lindl. & André) N.E. Br. agrupada com espécies pertencentes a *Amorphophallus*, fato que corrobora a recomendação de Grob *et al.* (2002) para a inclusão e sinonimização de *Pseudodracontium* em *Amorphophallus*. Segundo Grob *et al.* (2002) e Cusimano *et al.* (2011), esses agrupamentos são sustentados por características morfológicas presentes na espata, nas folhas, raízes e nos frutos, embora este último autor ressalte que apenas as características foliares constituiriam sinapomorfias em Thomsonieae.

A tribo Schismatoglottideae aparece disjunta, sendo formada por dois agrupamentos menores e um grupo *core* (Figura 10), próximo da Caladieae-Zomicarpeae (*sensu* Batista 2008). Schismatoglottideae+ permanece relacionado às tribos Zamioculcadeae (fortemente suportada; *bootstrap* = 99), Montrichardieae, Calloposideae e Anubiadeae que juntas ocupam uma posição basal no Grupo II. A seguir, as espécies *Schismatoglottis motleyana* (Schott) Engl., *S. trifasciata* Engl. e *Phymatarum borneense* M. Hotta aparecem como grupo-irmão do agrupamento formado pelas tribos Homalomeneae, Philodendreae, Zantedeschieae, Aglaonemateae, Nephthytideae, Culcasieae, Spathicarpeae (Figura 8). Nesse agrupamento, as tribos Homalomeneae, Philodendreae e Zantedeschieae ocupam uma posição basal. A tribo Nephthytideae, embora coesa (*bootstrap* = 75), aparece estreitamente relacionada com a tribo Aglaonemateae. Um arranjo similar para Homalomeneae, Philodendreae, Zantedeschieae, Aglaonemateae, Nephthytideae e Culcasieae também foi encontrado por Cabrera *et al.* (2008) e por Cusimano *et al.* (2011).

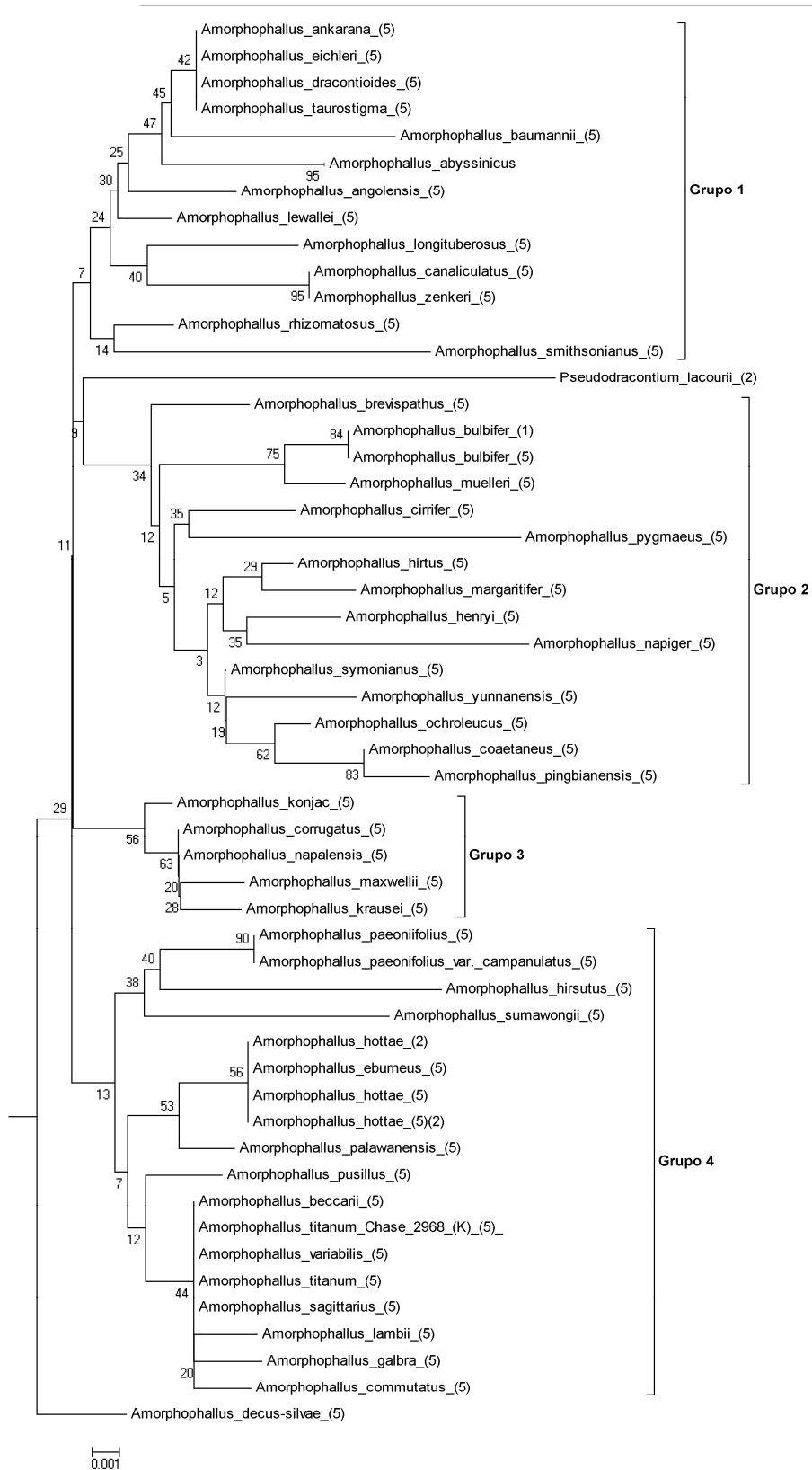


Figura 9. Tribo Thomsonieae Blume (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®).
 (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008), (5) Grob *et al.* (2002).

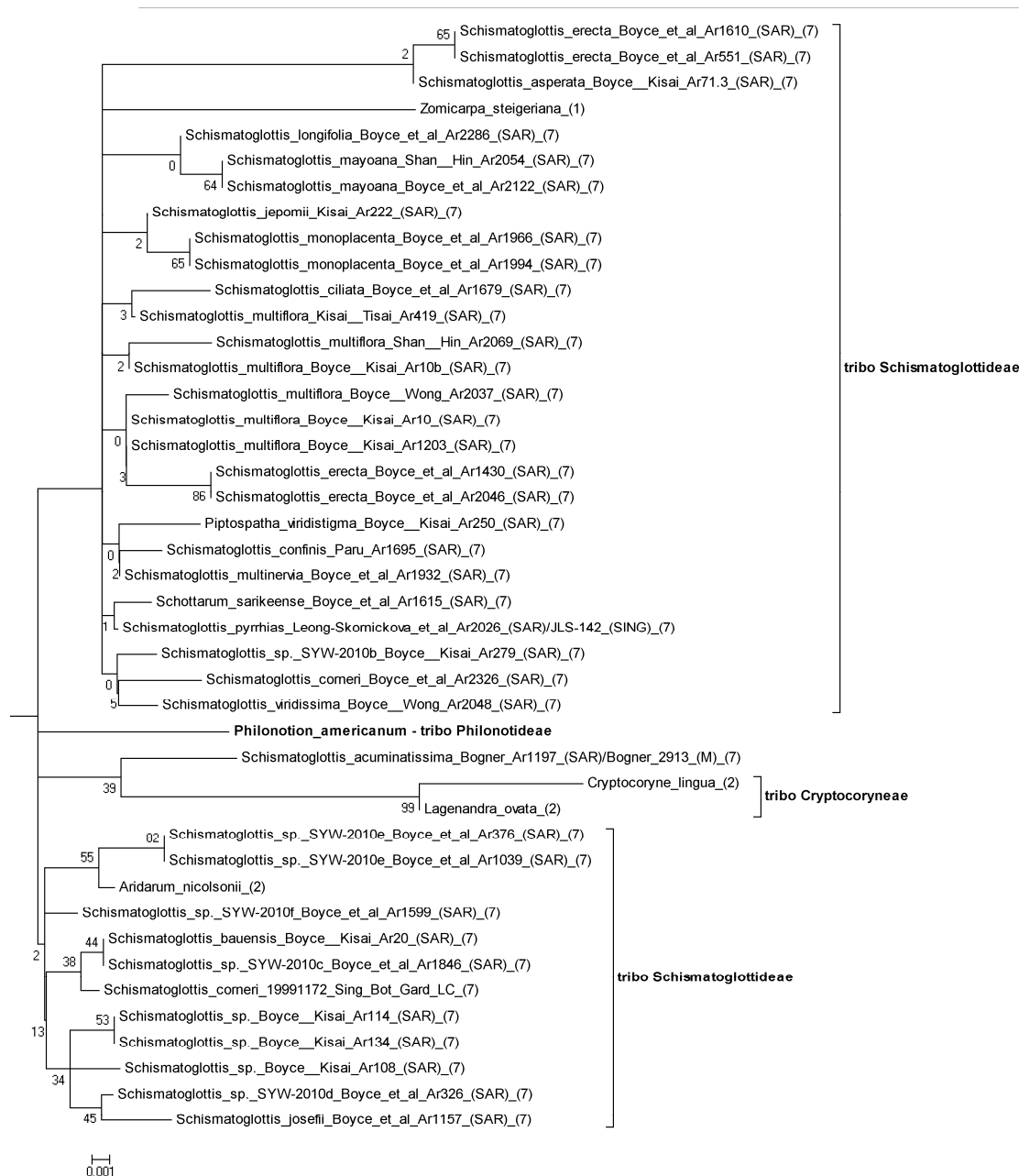


Figura 10. Grupo *core* de Schimatoglottideae Nakai (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008); (7) Wong *et al.* (2010).

O grupo *core* de Schimatoglottideae (Figura 10), inclui as tribos Cryptocoryneae Blume e Philonotieae S.Y. Wong & P.C. Boyce, arranjo bastante diferente do encontrado por Wong *et al.* (2010), que em sua reconstrução filogenética da tribo Schimatoglottideae, reconheceram ser Schimatoglottideae monofilética e distinta tanto de Cryptocoryneae, quanto de Philonotieae, embora

guardassem entre si estreita relação. French *et al.* (1995), Mayo *et al.* (1997) e Cabrera *et al.* (2008) também reconheceram ser Schismatoglottideae e Cryptocoryneae estreitamente relacionadas, porém, como Wong *et al.* (2010), distintas entre si. Tanto Schismatoglottideae, quanto Cryptocoryneae apresentam adaptações ao reofitismo, ou seja, apresentam mecanismos de desarticulação vinculados a dispersão das infrutescens meio líquido (Mayo *et al.* 1997, Wong *et al.* 2010; Cusimano *et al.* 2011).

A tribo Spathicarpeae apresenta-se, claramente, distinta das demais, arranjo similar ao encontrado por Gonçalves *et al.* (2007), Cabrera *et al.* (2008) e por Cusimano *et al.* (2011). Aliás, dentro de Spathicarpeae (Figura 11), podemos notar que os gêneros *Gearum* N.E. Brown e *Dieffenbachia* Schott ocupam uma posição basal dentro da tribo. *Incarum* E.G. Gonç., *Spathanthemum* Schott e *Gorgonidium* Schott compõem o próximo grupo a divergir, distinto do agrupamento formado pelos gêneros *Bognera* Mayo & Nicolson, *Mangonia* Schott, *Spathicarpa* Hook., *Croatiella* E.G. Gonç., *Synandrospadix* Engler, *Taccarum* Schott e *Asterostigma* F.E.L. Fischer & C.A. Meyer. Nesse agrupamento, *Bognera* e *Mangonia* permanecem agrupados entre si, enquanto *Synandrospadix*, *Taccarum* e *Asterostigma* aparecem como grupo-irmão de *Spathicarpa* e *Croatiella*. Embora a tribo Spathicarpeae seja realmente distinta das demais e forme um grupo coeso, pela adição de *Dieffenbachia* e *Bognera*, como proposto por French *et al.* (1995) e Gonçalves *et al.* (2007), o arranjo de seus gêneros difere, em parte, do encontrado por Gonçalves *et al.* (2007) em seu estudo filogenético. Segundo este último autor, *Bognera* e não *Gearum* estaria ao lado de *Dieffenbachia* como gênero basal em Spathicarpeae. Além disso, *Gearum* figuraria como grupo-irmão de um grande grupo parafilético formado por *Mangonia* e mais dois grupos monofiléticos, um primeiro composto por *Spathanthemum*, *Incarum* e *Gorgonidium*, e um segundo, constituído por *Croatiella*, *Synandrospadix*, *Asterostigma*, *Taccarum* e *Spathicarpa*. Aqui é importante ressaltar que, a presente análise, corrobora a manutenção de *Incarum* e *Croatiella* como gêneros monoespecíficos, distintos de *Asterostigma*, conforme proposto por Gonçalves *et al.* (2007). No restante, o arranjo entre os gêneros encontrado aqui é congruente ao obtido, tanto por Gonçalves *et al.* (2007), quanto por Cabrera *et al.* (2008). Segundo Mayo *et al.* (1997) e Cusimano *et al.* (2011), embora não-diagnósticas, seriam características compartilhadas pelas espécies de

Spathicarpeae, a presença de estaminódios e estames conados. Gonçalves *et al.* (2007) destacam apenas o número cromossômico (n=17).

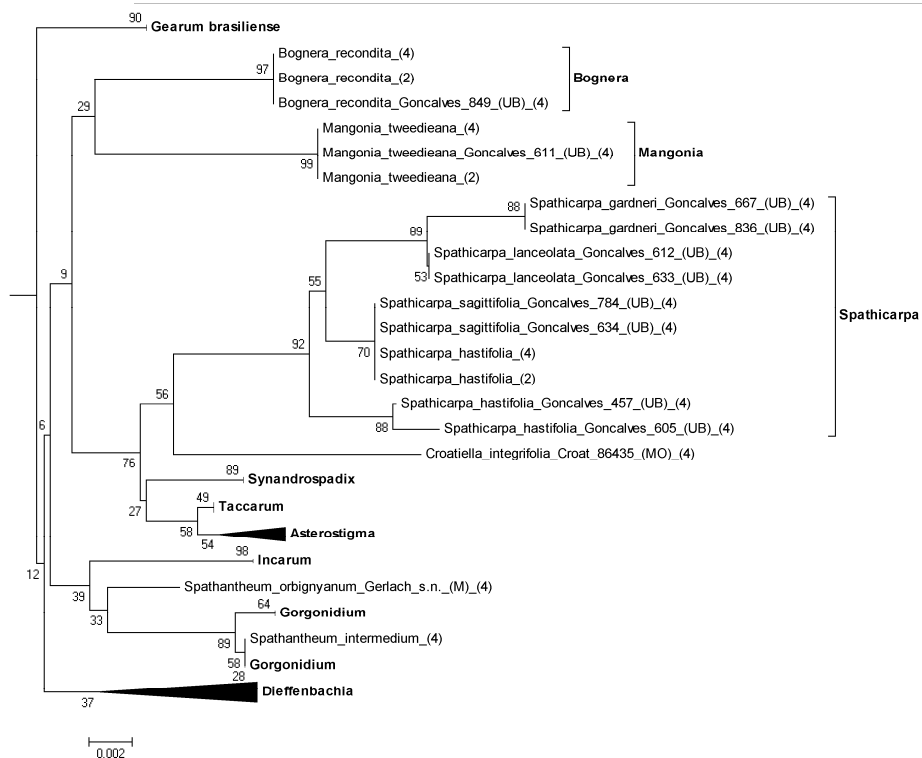


Figura 11. Tribo Spathicarpeae (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008), (4) Gonçalves *et al.* (2007).

As tribos Caladieae e Zomicarpeae formam um único grupo (Figura 12), conforme proposto por Batista (2008). Resultados similares foram encontrados também por Cabrera *et al.* (2008) que, com base em suas análises, propuseram a expansão de Caladieae para acomodar Zomicarpeae, conforme já havia defendido Keating, em 2002. Estes resultados contrastam com os de Mayo *et al.* (1997) que reconhecia essas tribos como distintas, mesmo defendendo a existência de estreita relação entre elas. Cusimano *et al.* (2011) já circunscreve Caladieae, incluindo Zomicarpeae. Em Caladieae-Zomicarpeae, podem ser reconhecidos quatro agrupamentos distintos (Grupos 1, 2, 3 e 4). No Grupo 1, *Zomicarpella* N.E. Brown apresenta-se como grupo-irmão dos gêneros *Caladium* Ventenat e *Scaphispatha* Schott, que permanecem agrupados entre si, concordando com os resultados de Batista (2008). O Grupo 2 é formado por *Hapaline benthamiana* (Schott) Schott, *Caladium lindenii* (André) Madison, *Jasarum steyermarkii* G.S. Bunting e pelas

espécies de *Syngonium* Schott. Tanto em Batista (2008), quanto em Cabrera *et al.* (2008), *C. lindenii* permanece agrupado com *Syngonium*. No Grupo 3, temos *Filarum* Nicolson e *Ulearum* Engler formando um grupo fortemente suportado (*bootstrap* = 98), conforme Batista (2008) e Cabrera *et al.* (2008). O Grupo 4 apresenta três grupos distintos, sendo o primeiro formado por algumas espécies de *Chlorospatha* Engler e *Xanthosoma* Schott, enquanto os dois restantes permanecem compostos apenas por espécies de *Xanthosoma*.

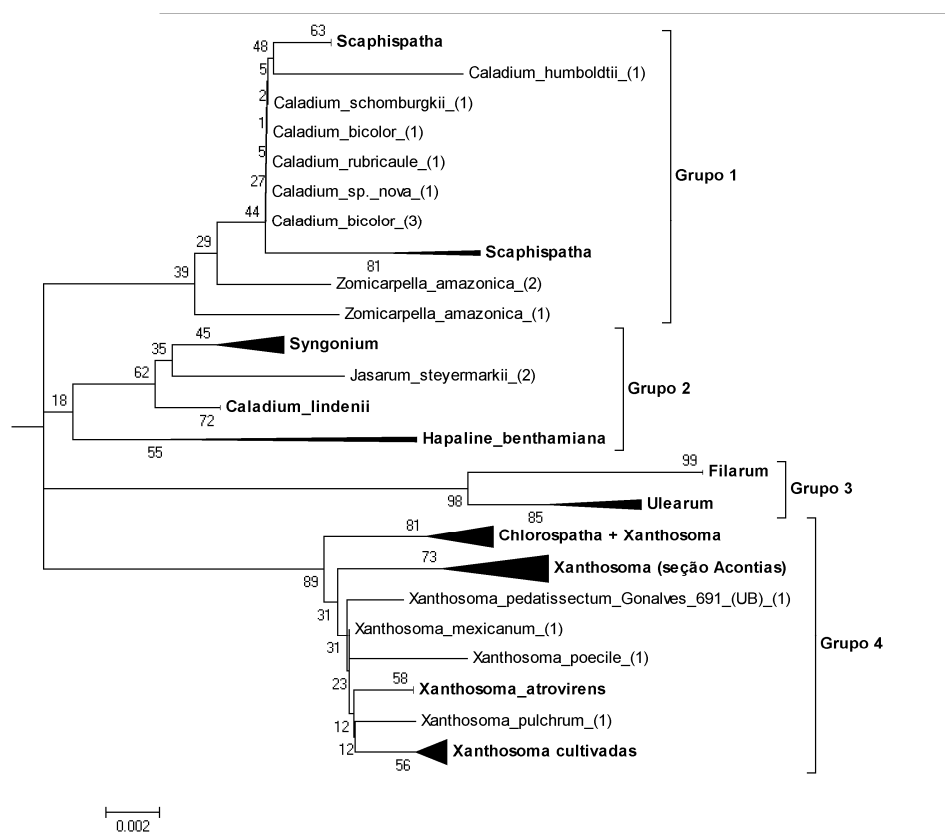


Figura 12. Tribos Caladieae-Zomicarpeae (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (1) Acesso pertencente ao estudo de Batista (2008); (2) Cabrera *et al.* (2008); e (3) Cusimano *et al.* (2010).

Essa estreita relação entre *Chlorospatha* e *Xanthosoma* também está presente em Cabrera *et al.* (2008) e Batista (2008). Aliás, essa última autora, através de estudos moleculares, reconheceu a existência de cinco linhagens evolutivas dentro de *Xanthosoma*: uma primeira linhagem formada pelas espécies caulescentes de *Xanthosoma* e *Chlorospatha*; uma segunda linhagem que agrupava a maior parte das espécies cultivadas de *Xanthosoma*; uma terceira linhagem que

correspondia a Secção *Acontias*, descrita por Engler (Engler & Krause 1920); uma quarta, fortemente suportada, composta por *X. pulchrum* e a *X. poecile* (Schott) E.G. Gonç. (comb. inéd.); e, finalmente, uma quinta linhagem, formada apenas por *X. mexicanum* Liebm. Embora, os agrupamentos encontrados não apontem *X. pulchrum*, *X. poecile* e *X. mexicanum* como grupos distintos, foi possível o reconhecimento, além do grupo formado pelas espécies caulescentes de *Chlorospatha* e *Xanthosoma*, de grupos de circunscrição similar a segunda e a terceira linhagem propostas por Batista (2008). Tanto Mayo *et al.* (1997), Batista (2008), Cabrera *et al.* (2008) e Cusimano *et al.* (2011) apontam a existência de latífiferos anostomosados como característica distintiva de Caladieae-Zomicarpeae.

Aroideae. Grupo I. As tribos Arisareae (fortemente suportada; *bootstrap* = 99), Ambrosineae e Peltandreae são as primeiras a divergir (*bootstrap* = 80 e 77, respectivamente), formando um grupo basal e distinto do agrupamento composto pelas tribos Arophyteae, Pistieae, Colocasieae, Arisaemateae e Areae (Figura 8). Estes resultados são bastante similares aos encontrados por Cabrera *et al.* (2008) e Cusimano *et al.* (2011), exceto pela disjunção de Arophyteae. Porém, mesmo disjunta, Arophyteae aparece como grupo-irmão do agrupamento formado por Pistieae, Colocasieae, Arisaemateae e Areae. Nesse agrupamento, Pistieae (*bootstrap* = 99) e o gênero *Ariopsis* Nimmo são basais e Colocasieae aparece disjunta em dois grupos: um formado pelos gêneros *Colocasia* Schott, *Stuednera* K. Koch e *Remusatia* Schott (*bootstrap* = 90), que também inclui *Protarum* Engler, e outro composto pelos gêneros *Arisaema* Mart. (tribo Arisaemateae) e *Alocasia* G. Don, mais *Colocasia gigantea* (Blume) Hook.f. que permanece disjunta das demais espécies de *Colocasia* (*bootstrap* = 98). Exceto pelo posicionamento de *Protarum* e pela inclusão de *Pinellia* Tenore (tribo Arisaemateae) dentro de Areae, todo o arranjo está de acordo com as filogenias propostas por Cabrera *et al.* (2008) e Cusimano *et al.* (2011).

Na tribo Areae (Figura 13), o gênero *Typhonium* Schott aparece disjunto em dois grupos distintos (Grupos 1 e 2). O Grupo 2, mais basal dentro da tribo, corresponde ao clado formado pelas espécies australianas, conforme apontaram os resultados encontrado por Cusimano *et al.* (2010), ao reconstruírem a filogenia de Areae. Ressalta-se que esses mesmos autores propõem que as espécies que compõem este clado australiano passem a integrar o gênero *Lazarum* Hay, proposto

anos antes (Hay 1992). Assim, o Grupo 1 seria composto por *Typhonium stricto sensu*, ainda de acordo com Cusimano *et al.* (2010). Esta divisão de *Typhonium* não está presente na filogenia recuperada por Cabrera *et al.* (2008). Ainda, considerando *Areae*, embora seja possível o reconhecimento de *Sauromatum* Schott como gênero distinto, ao contrário de Cusimano *et al.* (2010), este gênero aparece agrupado com *Eminium* (Blume) Schott, *Biarum* Schott, *Dracunculus* P. Miller, *Helicodiceros* K. Koch e *Arum* L. Contudo, em Cusimano *et al.* (2011) esses cinco gêneros aparecem, junto com *Sauromatum*, formando um grupo monofilético. Considerando o gênero *Arum*, a topologia obtida difere da apresentada por Espíndola *et al.* (2010) e por Linz *et al.* (2010), principalmente pela disjunção de *Arum rupicola* Boiss., *A. balansanum* R.R. Mill. e *A. concinnatum* Schott que aqui ocupam uma posição basal dentro do gênero, ao lado de *A. pictum* L.f. Segundo Mayo *et al.* (1997), Linz *et al.* (2010) e Cusimano *et al.* (2011), características morfológicas, tais como a forma e o arranjo dos estamonódios e a arquitetura foliar, além de aspectos ecológicos e geográficos seriam suficientes para a identificação de *Areae*.

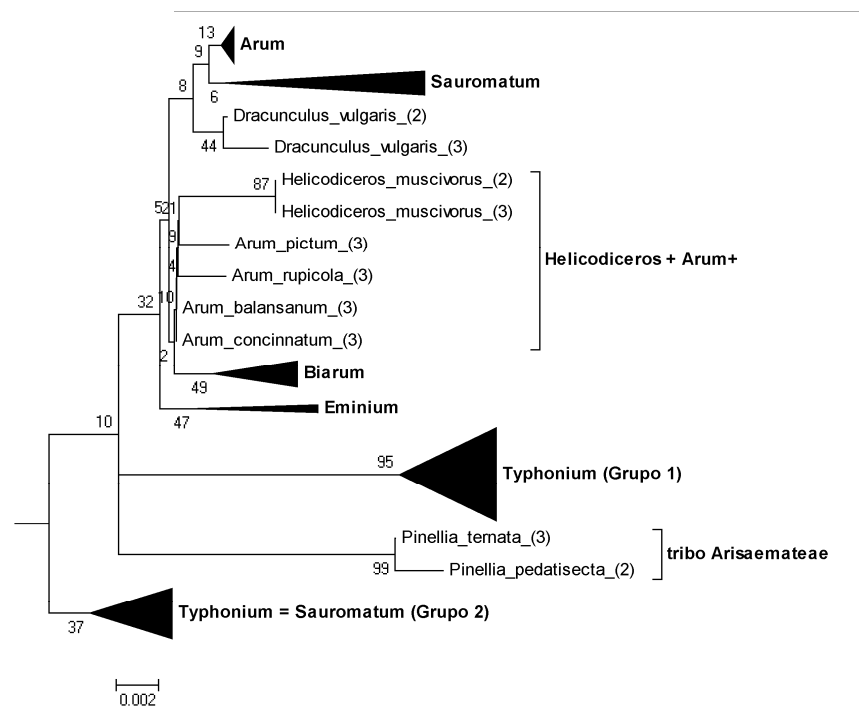


Figura 13. Tribo *Areae* (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura-2P, MEGA 5®). (1) Acesso pertencente ao estudo de Batista (2008); (2) Cabrera *et al.* (2008); e (3) Cusimano *et al.* (2010).

O elevado número de congruências apontam, de fato, para a existência de forte sinal filogenético na sequência *barcode* de *matK*. Como visto, no fragmento-alvo analisado existe informação suficiente para refletir, partindo de uma árvore de distância, as inferências filogenéticas alcançadas com o uso do *matK* inteiro (aproximadamente, 1500pb) e até de análises *multiloci*, construídas a partir de arcabouços mais elaborados, utilizando testes de alta estringência. Essa característica não tem apenas implicações diretas na capacidade de identificação molecular, mas também sérias implicações evolutivas. Nesse contexto, os resultados alcançados colocam a sequência *barcode* de *matK* também como uma possível ferramenta exploratória de inferência evolutiva capaz de refletir as relações entre os grupos de Araceae, sem a necessidade de lançar mão, em um primeiro momento, de um estudo filogenético propriamente dito. Essa particularidade é melhor avaliada e discutida no Capítulo 3.

4. Conclusão

Pela primeira vez dentro de Araceae, o uso de um marcador como sequência *barcode* foi avaliado em grande escala. O fragmento-alvo de *matK*, de aproximadamente 725pb de comprimento, mostrou-se suficientemente variável para tal tarefa, sendo capaz de recuperar identificações corretas e, em maioria, inequívocas para a maioria dos gêneros e das espécies analisadas, tanto pelo método de distância genética, quanto pela busca BLAST®. A existência de forte sinal filogenético mostrou-se uma importante característica, com reais implicações evolutivas. Assim, no futuro, o uso destas sequências *barcodes* pode representar uma alternativa simples e de baixo custo para a identificação molecular das espécies de Araceae, fornecendo subsídio e embasamento não só para considerações filogenéticas, mas também para a conservação e o uso sustentável das espécies consideradas.

5. Recomendações

Mesmo considerando que resultados importantes tenham sido alcançados e um grande número de espécies tenha sido avaliado, recomenda-se aumentar a densidade amostral, não só para uma maior compreensão da variação existente dentro de Araceae, mas também para o estabelecimento de um banco de sequências robusto, coeso e densamente representativo que, futuramente, poderá ser utilizado na identificação e circunscrição de táxons desconhecidos. Além disso, a reduzida ocorrência de polimorfismos nas regiões flangeadoras aponta para a utilidade e funcionalidade dos *primers* propostos por Dunning & Savolainen (2010) para o *matK*. Contudo, testes ainda são necessários para que sua adequação possa ser avaliada.

6. Referências Bibliográficas

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** **215**: 403-410.
- Ardura, A.; Linde, A.R.; Moreira, J.C. & Garcia-Vazquez, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation** **143**: 1438-1443.
- Ball, S.L. & Hebert, P.D. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of North American Benthological Society** **21**: 508-524.
- Barret, R.D. & Hebert, P.D. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology** **83**: 481-491.
- Batista, A.R. 2008. **Filogenia do Complexo Caladieae-Zomicarpeae (Araceae) baseada em sequências do DNA plastidial**. Dissertação de Mestrado,

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia,
Universidade Católica de Brasília – UCB.

- Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J. & Sayers, E.W. 2010. GenBank. **Nucleic Acids Research** (Database issue): D32-7.
- Bogner, J. & Gonçalves, E.G. 2005. Two new species of *Xanthosoma* (Araceae) from South America and notes on the tribe Caladieae. **Willdenowia** **35**: 333-344.
- Cabrera, L.I.; Salazar, G.A.; Chase, M.W.; Mayo, S.J.; Bogner, J. & Dávila, P. 2008. Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA. **American Journal of Botany** **95**: 1153-1165.
- Chase, M.W.; Salamin, N.; Wilkinson, M.; Dunwell, J.M.; Kesanakurthi, R.P.; Haidar, N. & Savolainen, V. 2005. Land plant and DNA barcodes: short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **360**: 1889–1895.
- Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Hollingsworth, P.M.; van den Berg, C.; Madriñán, S.; Petersen, G.; Seberg, O.; Jørgensen, T.; Cameron, K.M. & Carine, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. **Taxon** **56**: 295–299.
- Catharino, E.L. & Coelho, M.A. 2010. Uma nova espécie de *Anthurium* Schott (Araceae), endêmica da Serra da Bocaina, município de Bananal, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia** **61**: 69-72.
- Chen, S.L.; Yao, H.; Han, J.P.; Liu, C.; Song, J.Y.; Shi, L.C.; Zhu, Y.J.; Ma, X.Y.; Gao, T.; Pang, X.H.; Luo, K.; Li, Y.; Li, X.W.; Jia, X.C.; Lin, Y.L. & Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **Public Library of Science ONE** **5**: e8613.

- Coelho, M.A. & Catharino, E.L. 2008. Duas espécies novas de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia** **59**: 829-833.
- Croat, T.B. 2004. Revision of *Dieffenbachia* (Araceae) of Mexico, Central America, and the West Indies. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **91**: 668-772.
- Cywinska, A.; Hunter, F.F. & Hebert, P.D. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. **Medical and Veterinary Entomology** **20**: 413–424.
- Cuénoud, P.; Savolainen, V.; Chatrou, L.W.; Powell, M.; Grayer, R.J. & Chase, M.W. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. **American Journal of Botany** **89**: 132-144.
- Cusimano, N.; Barrett, M.D.; Hetterscheid, W.L. & Renner, S.S. 2010. A phylogeny of the Areae (Araceae) implies that *Typhonium*, *Sauromatum*, and the Australian species of *Typhonium* are distinct clades. **Taxon** **59**: 439-447.
- Cusimano, N.; Bogner, J.; Mayo, S.J.; Boyce, P.C.; Wong, S.Y.; Hesse, M.; Hetterscheid, W.L.; Keating, R.C. & French, J.C. 2011. Relationships within the Araceae: Comparison of morphological patterns with molecular phylogenies. **American Journal of Botany** **98**: 1–15.
- Dalebout, M.L.; Baker, C.S.; Mead, J.G.; Cockcroft, V.G. & Yamada, T.K. 2004. A comprehensive and validated molecular taxonomy of beaked whales, family Ziphiidae. **Journal of Heredity** **95**: 459-473.
- deWaard, J.R.; Landry, J.F.; Schmidt, B.C.; Derhousoff, J.; McLean, J.A. & Humble, L.M. 2009. In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. **Biodiversity and Conservation** **18**: 3825-3839.

- Dunning, L.T. & Savolainen, V. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. **Botanical Journal of the Linnean Society** **164**: 1-9.
- Engler, A. & Krause, K. 1920. Araceae - Colocasioideae. In: Engler, A. (ed.), **Das Pflanzenreich IV**. 23E (Heft 71): 3-139.
- Erpenbeck, D.; Hooper, J.N. & Wörheide, G. 2005. Technical Note: *CO1* phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' – are we sequencing a suboptimal partition? **Molecular Ecology (Notes)**: 1-4.
- Espíndola, A.; Buerki, S.; Bedalov, M. Küpfer, P. & Alvarez, N. 2010. New insights into the phylogenetics and biogeography of *Arum* (Araceae): unraveling its evolutionary history. **Botanical Journal of the Linnean Society** **163**: 14-32.
- Fazekas, A.J.; Burgess, K.S.; Kesanakurti, P.R.; Graham, S.W.; Newmaster, S.G.; Husband, B.C.; Percy, D.M.; Hajibabaei, M. & Barret, S.C. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. **Public Library of Science ONE** **3**: e2802.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** **39**: 783-791.
- French, J.C.; Chung, M.G. & Hur, Y.K. 1995. Chloroplast DNA phylogeny of the Ariflorae. In: Rudall, P.J.; Cribb, P.; Cutler, D.F. & Humphries, C.J. (Eds.). **Monocotyledons. Journal of Systematics and Evolution** **1**: 255-275.
- Gao, T.; Yao, H.; Song, J.; Liu, C.; Zhu, Y.; Ma, X.; Pang, X.; Xu, H. & Chen, S. 2010. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology** **130**: 116-121.
- Gonçalves, E.G. 2002. New aroid taxa from Brazil. **Aroideana** **25**: 16-35.

- Gonçalves, E.G.; Diener, P.S.; Sousa C.; Alarcão, G. & Pina, G.O. 2004. A preliminary survey of gynoecium morphology in *Xanthosoma* (Araceae). **Aroideana 27**: 182-186.
- Gonçalves, E.G.; Mayo, S.J.; Van Sluys, M.A. & Salatino, A. 2007. Combined genotypic-phenotypic phylogeny of the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent events of invasion to Andean regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution 43**: 1023-1039.
- Gonçalves, P.F. 2009. **O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.
- Govaert, R. & Frodin, D.G. 2002. **World checklist and bibliography of Araceae (and Acoraceae)**. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Grayum, M.H. 1990. Evolution and phylogeny of the Araceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden 77**: 628-697.
- Grob, G.B.J., B. Gravendeel, M.C.M. Eurlings & W.L.A. Hetterscheid. 2002. Phylogeny of the Tribe Thomsonieae (Araceae) based on chloroplast *matK* and *trnL* intron sequences. **Systematic Botany 27**: 453-467.
- Hajibabaei, M.; Janzen, D.H.; Burns, J.M.; Hallwachs, W. & Hebert, P.D. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences 103**: 968-971.
- Hay, A. 1992. A new Australian genus of Araceae, with notes on generic limits and biogeography of the Areae. **Botanical Journal of the Linnean Society 109**: 427-434.

- Hebert, P.D.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **270**: 313–321.
- Hebert P.D.; Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B** **270**: S96–S99.
- Hebert, P.D.; Stoeckle, M.Y.; Zemplak, T.S. & Francis, C.M. 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. **Public Library of Science Biology** **2**: 1657-1663.
- Hebert, P.D.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H. & Hallwachs, W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **101**: 14812-14817.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. **American Journal of Botany** **84**: 830–839.
- Hilu, K.W.; Borsch, T.; Müller, K.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Savolainen, V.; Chase, M.W.; Powell, M.P.; Alice, L.A.; Evans, R.; Sauquet, H.; Neinhuis, C.; Slotta, T.A.; Rohwer, J.G., Campbell, C.S. & Chatrou, L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. **American Journal of Botany** **90**: 1758–1776. 2003.
- Hilu, K.W.; Black, C.; Diouf, D. & Burleigh, G. 2008. Phylogenetic signal in *matK* vs. *trnK*: A case study in early diverging eudicots (angiosperms). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **48**: 1120–1130.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Erickson, D.L.; Fazekas, A.J.; Graham, S.W.; James, K.E.; Kim, K.-J.; Kress, W.J.; Schneider, H.; van Alphenstahl, J.; Barrett, S.C.; van den Berg, C.; Bogarin, D.; Burgess, K.S.;

Cameron, K.M.; Carine, M.; Chacón, J.; Clark, A.; Clarkson, J.J.; Conrad, F.; Devey, D.S.; Ford, C.S.; Hedderson, T.A.; Hollingsworth, M.L.; Husband, B.C.; Kelly, L.J.; Kesanakurti, P.R.; Kim, J.S.; Kim, Y.-D.; Lahaye, R.; Lee, H.-L.; Long, D.G.; Madriñán, S.; Maurin, O.; Meusnier, I.; Newmaster, S.G.; Park, C.-W.; Percy, D.M.; Petersen, G.; Richardson, J.E.; Salazar, G.A.; Savolainen, V.; Seberg, O.; Wilkinson, M.J.; Yi, D.-K. & Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **106**: 12794-12797.

Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **Public Library of Science ONE** **6**: e19254.

Keating, R.C. 2002 . Acoraceae and Araceae. In: Gregory, M. & Cutler, D.F. (eds.). **Anatomy of the monocotyledons** **9**. Oxford, Oxford University Press.

Kelly, L.J.; Ameka, G.K. & Chase, M.W. 2010. DNA barcoding of african Podostemaceae (river-weeds): a test of proposed barcode regions. **Taxon** **59**: 251-260.

Kerr, K.C.; Birks, S.M.; Kalyakin, M.V.; Red'kin, Y.A.; Koblik, E.A. & Hebert, P.D. 2009. Filling the gap – COI barcode resolution in eastern Palearctic birds. **Frontiers in Zoology** **6**: 29. doi:10.1186/1742-9994-6-29.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** **16**: 111-120.

Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weigt, L.A. & Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **102**: 8369-8374.

- Kress, W.J. & Erickson, D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **Public Library of Science ONE 2**: e508.
- Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Jones, F.A.; Swenson, N.G.; Perez, R.; Sanjur, O. & Bermingham, E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences 106**: 18621-18626.
- Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Swenson, N.G.; Thompson, J.; Uriarte, M. & Zimmerman, J.K. 2010. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot. **Public Library of Sciences ONE 5**: e15409.
- Lahaye, R.; Van der Bank, M.; Bogarin, D.; Warner, J.; Pupulin, F.; Gigot, G.; Maurin, O.; Duthoit, S.; Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105**: 2923–2928.
- Lambert, D.M.; Baker, A.; Huynen, L.; Haddrath, O. Hebert, P.D. & Millar, C.D. 2005. Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? **Journal of Heredity 96**: 1-6.
- Linz, J.; Stökl, J.; Urru, I. Krügel, T. Stensmyr, M.C. & Hansson, B.S. 2010. Molecular phylogeny of the genus *Arum* (Araceae) inferred from multi-locus sequence data and AFLPs. **Taxon 59**: 405-415.
- Liu, Y.; Yan, H.-F.; Cao, T. & Ge, X.-J. 2010. Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). **Journal of Systematics and Evolution 48**: 36-46.
- Lorenz, J.G.; Jackson, W.E.; Beck, J.C. & Hanner, R. 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** (published online): 1-9.

- Mayo, S.J. 1991. A revision of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). **Kew Bulletin** **46**: 601-681.
- Mayo, S.J.; Bogner, J. & Boyce, P.C. 1997. **The genera of Araceae**. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Meier, R.; Zhang, G.Y. & Ali, F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. **Systematic Biology** **57**: 809–813.
- Meyer, C.P. & Paulay, G. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. **Public Library of Science Biology** **3**: 2229-2238.
- Monaghan, M.T.; Balke, M.; Gregory, T.R. & Vogler A.P. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** (published online): 1-9.
- Moniz, M.B. & Kaczmarek, I. 2010. Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. **Protist** **161**:7-34.
- Moritz, C. & Cicero, C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. **Public Library of Science Biology** **2**: e354.
- Mort, M.E.; Crawford, D.J.; Archibald, J.K. O’Leary, T.R. & Santos-Guerra, A. 2010. Plant DNA barcoding: a test using Macaronesian taxa of *Tolpis* (Asteraceae). **Taxon** **59**: 581-587.
- Newmaster, S.G.; Fazekas, A.J. & Ragupathy, S. 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. **Canadian Journal of Botany** **84**: 355-341.
- Newmaster, S.G.; Fazekas, A.J.; Steeves, R.A. & Janovec, J. 2008. Testing candidate plant barcode regions with species of recent origin in the Myristicaceae. **Molecular Ecology Notes** **8**: 480–490.

- Ortiz, M.F. 2010. **Validação do DNA barcoding como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes; Pimelodidae) na Amazônia.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA.
- Pennisi, E. 2007. Wanted: a barcode for plants. **Science 318**: 190–191.
- Plowman, T. 1969. Folk uses of new world aroids. **Economic Botany 23**: 97-122.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data system. **Molecular Ecology Notes 7**: 355–364.
- Ray, T. 1987. Cyclic heterophylly in *Syngonium* (Araceae). **American Journal of Botany 74**: 16-26.
- Ray, T. 1990. Metamorphosis in the Araceae. **American Journal of Botany 77**: 1599-1609.
- Remigio, E.A. & Hebert, P.D. 2003. Testing the utility of partial *COI* sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution 29**: 641-647.
- Ren, B.-Q.; Xiang, X.-G. & Chen, Z.-D. 2010. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. **Molecular Ecology Resources 10**: 594-605.
- Sanders, E.R.; Karol, K.G. & McCourt, R.M. 2003. Occurrence of *matK* in a *trnK* group II intron in charophyte green algae and phylogeny of the Characeae. **American Journal of Botany 90**: 628–633.
- Schneider, H. 2003. **Métodos de análise filogenética: um guia prático.** Ribeirão Preto, Ed. Holos.

- Smith, M.A.; Woodley, N.E.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W. & Hebert, P.D. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). **Proceedings of the National Academy of Sciences** **103**: 3657-3662.
- Soltis, P.S.; Soltis, D.E. & Doyle, J.J. 1998. **Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing**. New York, Springer.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado na APG II**. (2ª. ed.). Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Taberlet, P.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Gielly, L.; Miquel, C.; Valentini, A.; Vermat, T.; Corthier, G.; Brochmann, C. & Willerslev, E. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. **Nucleic Acids Research** **35**: e1–e8.
- Tam, S.; Boyce, P.; Upton, T.; Barabé, D.; Bruneau, A.; Forest, F. & Parker, J. 2004. Intergeneric and infrafamilial phylogeny of subfamily Monsteroideae (Araceae) revealed by chloroplast *trnL-F* sequences. **American Journal of Botany** **91**: 490-498.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted).
- Temponi, L.G. 2006. **Sistemática de *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae)**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de São Paulo - USP.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research** **22**: 4673-4680.
- Vences, M.; Thomas, M.; Bonett, R.M. & Vieites, D.R. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** **360**: 1859–1868.
- Wang, W.; Wu, Y.; Yan, Y.; Ermakova, M.; Kerstetter, R. & Messing, J. 2010. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. **BMC Plant Biology** **10**: 205.
- Ward, R.; Zemlack, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R. & Hebert, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **360**: 1847–1857.
- Wong, S.Y.; Boyce, P.C.; bin Othman, A.S. & Pin, L.C. 2010. Molecular phylogeny of tribe Schismatoglottideae (Araceae) based on two plastid markers and recognition of a new tribe, Philonotieae, from the neotropics. **Taxon** **59**: 117-124.
- Yu, J.; Xue, J.H. & Zhou, S.L. 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 176–181.
- Zhu, G.H. & Croat, T.B. 2004. A revision of genus *Dracontium* (Araceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **91**: 473-484.

Anexo I. Sequências de *matK* utilizadas no presente estudo. Os acessos estão em ordem alfabética e foram separados de acordo com os estudos onde foram publicados. Além dos números de acesso do GenBank®, quando presentes, foram também incluídas informações sobre o *voucher*.

Grob et al. (2002). *Amorphophallus abyssinicus* (A. Rich.) N.E. Br. (AF387379.1); *A. angolensis* (Welw. ex Schott) N.E. Br. (AF387404.1); *A. ankarana* Hett., Ittenb. & Bogner (AF387380.1); *A. baumannii* (Engl.) N.E. Br. (AF387382.1); *A. beccarii* Engl. (AF387383.1); *A. brevispathus* Gagnep. (AF387384.1); *A. canaliculatus* Ittenb., Hett. & Lobin (AF387385.1); *A. cirrifer* Stapf (AF387386.1); *A. coaetaneus* S.Y. Liu & S.J. Wei (AF387381.1); *A. commutatus* (Schott) Engl. (AF387392.1); *A. corrugatus* N.E. Br. (AF387387.1); *A. decus-silvae* Backer & Alderw. (AF387388.1); *A. dracontioides* (Engl.) N.E. Br. (AF387389.1); *A. eburneus* Bogner (AF387390.1); *A. eichleri* (Engl.) Hook. f. (AF387391.1); *A. galbra* F.M. Bailey (AF387393.1); *A. henryi* N.E. Br. (AF387394.1); *A. hirsutus* Teijsm. & Binn. (AF387395.1); *A. hirtus* N.E. Br. (AF387396.1); *A. hottae* Bogner & Hett. (AF387397.1); *A. konjac* K. Koch (AF387398.1); *A. krausei* Engl. (AF387399.1); *A. lambii* S.J. Mayo & Widjaja (AF387400.1); *A. lewallei* Malaisse & Bamps (AF387401.1); *A. longituberosus* (Engl.) Engl. & Gehrm. (AF387402.1); *A. margaritifera* (Roxb.) Kunth (AF387403.1); *A. maxwellii* Hett. (AF387405.1); *A. muelleri* Blume (AF387406.1); *A. napalensis* (Wall.) Bogner & S.J. Mayo (AF387408.1); *A. napiger* Gagnep. (AF387407.1); *A. ochroleucus* Hett. & V.D. Nguyen (AF387409.1); *A. paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson (AF387410.1); *A. palawanensis* Bogner & Hett. (AF387411.1); *A. pingbianensis* H. Li & C.L. Long (AF387412.1); *A. pusillus* Hett. & Serebryanyi (AF387413.1); *A. pygmaeus* Hett. (AF387414.1); *A. rhizomatosus* Hett. (AF387415.1); *A. sagittarius* Steenis (AF387416.1); *A. smithsonianus* Sivad. (AF387417.1); *A. sumawongii* (Bogner) Bogner & S.J. Mayo (AF387418.1); *A. symonianus* Hett. & M. Sizemore (AF387419.1); *A. taurostigma* Ittenb., Hett. & Bogner (AF387420.1); *A. titanum* Becc. (AF387421.1); *A. variabilis* Blume (AF387422.1); *A. yunnanensis* Engl. (AF387423.1); *A. zenkeri* (Engl.) N.E. Br. (AF387424.1); *Anchomanes difformis* (Blume) Engl. (AF387427.1); *Arisaema tortuosum* (Wall.) Schott (AF387428.1); *Filarum manserichense* Nicolson (AF387429.1); *Gonatopus angustus* N.E. Br. (AF387430.1); *Hapaline* sp. HAR 056 (AF387431.1); *Pseudodracontium harmandii*

Anexo I. (Continuação).

var. *schmidtii* Engl. (AF387425.1); *P. lanceolatum* Serebryanyi (AF387426.1); *Typhonium venosum* (Aiton) Hett. & P.C. Boyce (AF387432.1).

Gonçalves et al. (2007). *Aglaonema crispum* voucher Goncalves 766 (UB) (EF173528.1); *Amorphophallus bulbifer* (Roxb.) Blume (EU542582.1); *Asterostigma cryptostylum* voucher Goncalves 640 (UB) (EF173530.1); *A. cubense* voucher Goncalves 446 (UB) (EF173531.1); *A. lividum* voucher Goncalves 695 (UB) (EF173532.1); *A. lombardii* voucher Lombardi 658 (BHCB) (EF173533.1); *A. reticulatum* voucher Goncalves 459 (UB) (EF173534.1); *A. riedelianum* voucher Goncalves 418 (UB) (EF173535.1); *A. tweedianum* voucher Goncalves 316 (UB) (EF173536.1); *Bognera recondita* voucher Goncalves 849 (UB) (EF173537.1); *Caladium bicolor* (EU542583.1); *Cercestis mirabilis* voucher Goncalves 616 (UB) (EF173529.1); *Chlorospatha atropurpurea* (Madison) Madison (EU542584.1); *Croatiella integrifolia* voucher Croat 86435 (MO) (EF173538.1); *Dieffenbachia aglaonematifolia* voucher Goncalves 25 (UB) (EF173539.1); *D. humilis* voucher Goncalves 930 (UB) (EF173540.1); *D. oerstedii* voucher Goncalves 1017 (UB) (EF173541.1); *D. parlatorei* voucher Goncalves 1026 (UB) (EF173542.1); *Dieffenbachia* sp. Goncalves 164 (EF173543.1); *Filarum manserichense* Nicolson (EU542585.1); *Gearum brasiliense* voucher Goncalves 651 (UB) (EF173544.1); *Gorgonidium intermedium* voucher Hetterscheid HAR 130 (L) (EF173545.1); *G. striatum* voucher Hetterscheid HAR 245 (L) (EF173546.1); *G. vermicidum* voucher Forzza 1965 (SPF) (EF173547.1); *Hapaline benthamiana* (Schott) Schott (EU542586.1); *Incarum pavonii* voucher Hetterscheid HAR 136 (L) (EF173548.1); *Mangonia tweedieana* voucher Goncalves 611 (UB) (EF173549.1); *Scaphispatha gracilis* Brongn. ex Schott (EU542587.1); *Spathanthemum orbignyanum* voucher Gerlach s.n. (M) (EF173550.1); *Spathicarpa gardneri* voucher Goncalves 667 (UB) (EF173551.1); *S. gardneri* voucher Goncalves 836 (UB) (EF173552.1); *S. hastifolia* voucher Goncalves 457 (UB) (EF173553.1); *S. hastifolia* voucher Goncalves 605 (UB) (EF173554.1); *S. lanceolata* voucher Goncalves 612 (UB) (EF173555.1); *S. lanceolata* voucher Goncalves 633 (UB) (EF173556.1); *S. sagittifolia* voucher Goncalves 634 (UB) (EF173558.1); *S. sagittifolia* voucher Goncalves 784 (UB) (EF173557.1); *Synandropadix vermitoxicus* voucher Forzza 1951 (SPF)

Anexo I. (Continuação).

(EF173559.1); *Syngonium angustatum* Schott (EU542588.1); *Taccarum crassispathum* voucher Goncalves 104 (UB) (EF173560.1); *T. warmingii* voucher Kautsky 1017 (RB) (EF173561.1); *T. weddellianum* voucher Goncalves 198 (UB) (EF173562.1); *Typhonium roxburghii* Schott (EU542589.1); *Ulearum sagittatum* Engl. (EU542590.1); *Xanthosoma brasiliense* (Desf.) Engl. (EU542591.1); *Zomicarpa steigeriana* Maxim. ex Schott (EU542592.1); *Zomicarpella amazonica* Bogner EU542593.1.

Cabrera et al. (2008). *Aglaodorum griffithii* (Schott) Schott (AM920580.1); *Aglaonema modestum* Schott ex Engl. (AM920579.1); *Alloschemone occidentalis* (Poepp.) Engl. & K.Krause (AM920566.1); *Alocasia odora* (Roxb.) K.Koch (AM920624.1); *Ambrosina bassii* L. (AM920620.1); *Amorphophallus hottae* Bogner & Hett. (AM920607.1); *Amydrium humile* Schott (AM920567.1); *Anadendrum* sp. Chase 9985 (K) (AM920547.1); *Anaphyllopsis americana* (Engl.) A.Hay (AM920575.1); *Anchomanes difformis* (Blume) Engl. (AM920583.1); *Anthurium acaule* (Jacq.) Schott (AM920557.1); *Anubias barteri* Schott (AM920578.1); *Aridarum nicolsonii* Bogner (AM920606.1); *Ariopsis peltata* J.Grah. (AM920626.1); *Arisaema franchetianum* Engl. (AM920628.1); *Arisarum vulgare* O.Targ-Tozz (AM920619.1); *Arophyton buchettii* Bogner (AM920642.1); *Arum hygrophilum* Boiss. (AM920631.1); *Asterostigma pavonii* Schott (AM920590.1); *Biarum tenuifolium* (L.) Schott (AM920632.1); *Bognera recondita* (Madison) Mayo & Nicolson (AM920587.1); *Bucephalandra motleyana* Schott (AM920644.1); *Caladium lindenii* (André) Madison (AM920610.1); *Calla palustris* L. (AM920641.1); *Calloopsis volkensis* Engl. (AM920595.1); *Carlephyton glaucophyllum* Bogner (AM920643.1); *Cercestis mirabilis* (N.E.Br) Bogner (AM920639.1); *Chlorospatha* sp. Chase 11912 (AM920613.1); *Colletogyne perrieri* Buchet (AM920645.1); *Colocasia esculenta* (L.) Schott (AM920622.1); *Cryptocoryne lingua* Becc. Ex Engl. (AM920601.1); *Culcasia liberica* N.E.Br. (AM920638.1); *Cyrtosperma macrotum* Engl. (AM920572.1); *Dieffenbachia aglaonematifolia* Engl. (AM920586.1); *Dracontiodes desciscens* Engl. (AM920576.1); *Dracontium polyphyllum* L. (AM920569.1); *Dracunculus vulgaris* Schott (AM920634.1); *Eminium spiculatum* (Blume) Kuntze (AM920635.1); *Epipremnum pinnatum* (L.) Engl. (AM920568.1); *Filarum manserichense* Nicolson

Anexo I. (Continuação).

(AM920617.1); *Gearum brasiliense* N.E.Br (AM920585.1); *Gonatopus angustus* N.E.Br. (AM920599.1); *Gorgonidium* sp. CL-2007 (AM920589.1); *Gymnostachys anceps* R.Brown (AM920548.1); *Hapaline benthamiana* Schott (AM920609.1); *Hedyosmum mexicanum* (AM920646.1); *Helicodiceros muscivorus* (L. f.) Engl. (AM920633.1); *Heteropsis oblongifolia* Kunth (AM920560.1); *Holochlamys beccarii* (Engl.) Engl. (AM920558.1); *Homalomena magna* A. Hay (AM920596.1); *Jasarum steyermarkii* G.S.Buting (AM920614.1); *Lagenandra ovata* Thwaites (AM920602.1); *Lasia spinosa* (L.) Thwaites (AM920571.1); *Lasimorpha senegalensis* Shott (AM920577.1); *Lemna minor* L. (AM920552.1); *Lysichiton americanus* Hultén & H.St.John (AM920549.1); *Mangonia tweedieana* Schott (AM920588.1); *Monstera adansonii* Schott (AM920565.1); *Montrichardia arborescens* (L.) (AM920640.1); *Nephtytis afzelii* Schott (AM920581.1); *Orontium aquaticum* L. (AM920550.1); *Pedicellarum paiei* M.Hotta (AM920555.1); *Peltandra virginica* (L.) Raf. (AM920637.1); *Philodendron deltoideum* Poepp. & Endl. (AM920597.1); *Phymatarum borneense* M. Hotta (AM920605.1); *Pinellia pedatisecta* Schott (AM920629.1); *Piptospatha ridleyi* N.E.Br. (AM920603.1); *Pistia stratiotes* L. (AM920621.1); *Podolasia stipitata* N.E.Br. (AM920574.1); *Pothoidium lobbianum* Schott (AM920556.1); *Pothos scandens* D.Don (AM920554.1); *Protarum sechellarum* Engl. (AM920627.1); *Pseudodracontium lacourii* (Linden & Andre) N.E.Br. (AM920608.1); *Pseudohydrosme gabunensis* Engl. (AM920582.1); *Pycnospatha arietina* (AM920573.1); *Remusatia vivipara* (Roxb.) Schott (AM920625.1); *Rhaphidophora crassifolia* Aldewer (AM920563.1); *Rhodospatha oblongata* Poepp. & Endl. (AM920562.1); *Scaphispatha gracilis* Brongn. ex Schott (AM920615.1); *Schismatoglottis trifasciata* Engl. (AM920604.1); *Scindapsus hederaceus* Schott (AM920564.1); *Spathanthemum intermedium* Bogner (AM920591.1); *Spathicarpa hastifolia* Hook (AM920594.1); *Spathiphyllum wallisii* Hort (AM920559.1); *Spirodela polirhiza* (L.) Schleid. (AM920553.1); *Stenospermation ulei* K.Krause (AM920561.1); *Stuednera colocasiifolia* K.Koch (AM920623.1); *Stylochaeton bogneri* Mayo (AM920598.1); *Symplocarpus foetidus* (L.) Nuttall (AM920551.1); *Synandropadix vermitoxicus* (Griseh.) Engl. (AM920593.1); *Syngonium auritum* (L.) Schott (AM920611.1); *Taccarum weddellianum* Brongn. ex Schott (AM920592.1); *Typhonium blumei* Nicolson & Sivad. (AM920630.1); *Thyphonodorum lindleyanum*

Anexo I. (Continuação).

Schott (AM920636.1); *Ulearum sagittatum* Engl. (AM920616.1); *Urospatha saggitifolia* (Rudge) Schott (AM920570.1); *Xanthosoma helleborifolium* (Jacq.) Schott (AM920612.1); *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl. (AM920600.1); *Zanthesdeschia albomaculata* (Hook. f.) Bail (AM920584.1); *Zomicarpella amazonica* Bogner (AM920618.1).

Cusimano et al. (2010). *Alocasia cucullata* (Lour.) Schott (EU886579.1); *Alocasia gageana* Engl. & K. Krause (EU886580.1); *Ariopsis peltata* J. Graham (EU886587.1); *Arisaema speciosum* (Wall.) Mart. (EU886502.1); *Arisaema tortuosum* (Wall.) Schott (EU886577.1); *Arisarum vulgare* O. Targ. Tozz. (EU886582.1); *Arum balansanum* R.R. Mill (EU886512.1); *Arum concinatum* Schott (EU886516.1); *Arum creticum* Boiss. & Heldr. (EU886504.1); *Arum cyrenaicum* Hruby (EU886515.1); *Arum dioscoridis* Sm. (EU886505.1); *Arum hygrophilum* Boiss. (EU886509.1); *Arum italicum* Mill. (EU886517.1); *Arum korolkowii* Regel (EU886589.1); *Arum maculatum* L. (EU886506.1); *Arum megobrebi* Lobin (EU886513.1); *Arum nigrum* Schott (EU886507.1); *Arum orientale* M. Bieb. (EU886510.1); *Arum pictum* L. f. (EU886518.1); *Arum purpleospathum* P.C. Boyce (EU886508.1); *Arum rupicola* Boiss. (EU886519.1); *Arum* sp. nov. (I 21/05) Neumann (EU886511.1); *Arum* sp. nov. (I 21/05) Neumann (EU886514.1); *Biarum bovei* Blume (EU886529.1); *Biarum carduchorum* (Schott) Engl. (EU886521.1); *Biarum davisii* Turrill (EU886525.1); *Biarum dispar* (Schott) Talavera (EU886522.1); *Biarum ditschianum* Bogner & P.C. Boyce (EU886526.1); *Biarum kotschyi* (Schott) B. Mathew ex Riedl (EU886527.1); *Biarum pyrami* (Schott) Engl. (EU886523.1); *Biarum straussii* Engl. (EU886524.1); *Biarum tenuifolium* (L.) Schott (EU886528.1); *Caladium bicolor* Vent. (EU886501.1); *Colocasia gigantea* (Blume) Hook. f. (EU886581.1); *Dracunculus canariensis* Kunth (EU886531.1); *Dracunculus vulgaris* Schott (EU886532.1); *Eminium jaegeri* Bogner & P.C. Boyce (EU886520.1); *Eminium spiculatum* (Blume) Schott (EU886530.1); *Helicodiceros muscivorus* (L.f.) Engl. (EU886533.1); *Peltandra virginica* (L.) Schott (EU886583.1); *Pinellia ternata* (Thunb.) Ten. ex Breitenb. (EU886503.1); *Pistia stratiotes* L. (EU886585.1); *Protarum sechellarum* Engl. (EU886588.1); *Remusatia vivipara* (Roxb.) Schott (EU886584.1); *Stuednera discolor* W. Bull (EU886586.1); *Theriophonum dalzellii* Schott (EU886534.1); *Theriophonum infaustum* N.E. Br.

Anexo I. (Continuação).

(EU886535.1); *Typhonium adnatum* Hett. & Sookchaloem (EU886547.1); *Typhonium aff. brownii* Schott Ford-4782 voucher A. Ford 4782 (CNS) (GU255972.1); *Typhonium aff. brownii* Schott Gray-9276 voucher B. Gray 9276 (CNS) (GU255971.1); *Typhonium albidinervum* C.Z. Tang & H. Li (EU886548.1); *Typhonium alismifolium* F. Muell. voucher B. Gray 9146 (CNS); *Typhonium angustilobum* F. Muell. (EU886576.1); *Typhonium angustilobum* F. Muell. voucher B. Gray 9277 (CNS) (GU255974.1); *Typhonium bachmaense* V.D. Nguyen & Hett. (EU886549.1); *Typhonium baoshanense* Z.L.Dao & H. Li (EU886591.1); *Typhonium blumei* Nicolson & Sivad. (EU886553.1); *Typhonium brevipes* Hook. f. (EU886539.1); *Typhonium brownii* Schott (EU886538.1); *Typhonium circinnatum* Hett. & J. Mood (EU886551.1); *Typhonium cordifolium* S.Y. Hu (EU886560.1); *Typhonium digitatum* Hett. & Sookchaloem (EU886552.1); *Typhonium diversifolium* Wall. ex Schott (EU886540.1); *Typhonium echinulatum* Hett. & Sookchaloem (EU886554.1); *Typhonium eliosurum* (F. Muell. ex Benth.) O.D. Evans (EU886537.1); *Typhonium filiforme* Ridl. (EU886555.1); *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume (EU886556.1); *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume voucher Michel, CR 2016 (DNA) (GU255983.1); *Typhonium gallowayi* Hett. & Sookchaloem (EU886558.1); *Typhonium gaoligongense* (Z.L. Wang & H. Li) Hett. & P.C. Boyce (EU886590.1); *Typhonium giganteum* Engl. (EU886536.1); *Typhonium glaucum* Hett. & Sookchaloem (EU886559.1); *Typhonium gracile* Schott (EU886563.1); *Typhonium griseum* Hett. & Sookchaloem (EU886561.1); *Typhonium hirsutum* (S.Y. Hu) J. Murata & S.J. Mayo (EU886542.1); *Typhonium horsfieldii* (Miq.) Steenis (EU886541.1); *Typhonium huense* V.D.Nguyen & Croat (EU886557.1); *Typhonium jinpingense* Z.T. Wang, H. Li & F.H. Bian (EU886564.1); *Typhonium lineare* Hett. & V.D. Nguyen (EU886565.1); *Typhonium nudibaccatum* A. Hay voucher R.L. Barrett 3957 (PERTH) (GU255981.1); *Typhonium orbifolium* Hett. & Sookchaloem (EU886566.1); *Typhonium pedunculatum* Hett. & Sookchaloem (EU886567.1); *Typhonium peltandroides* A. Hay, M.D. Barrett & R.L. Barrett voucher M.D. Barrett 599 (PERTH) (GU255973.1); *Typhonium praetermissum* A. Hay voucher Hay s.n. 16.10.1996 (NSW) (GU255982.1); *Typhonium reflexum* Hett. & Sookchaloem (EU886568.1); *Typhonium roxburghii* Schott (EU886569.1); *Typhonium russell-smithii* A. Hay voucher I. Cowie 104311 (DNA) (GU255985.1); *Typhonium*

Anexo I. (Continuação).

saraburiense Schott (EU886570.1); *Typhonium* sp. Schott Hetterscheid H.AR.532 (EU886572.1); *Typhonium* sp. Schott Hetterscheid H.AR.543 (EU886573.1); *Typhonium* sp. Schott Hetterscheid H.AR.555 (EU886550.1); *Typhonium* sp. Schott Kununurra voucher R.L. Barrett 3069 (PERTH) (GU255979.1); *Typhonium* sp. Schott Morgan River voucher M.D. Barrett & R.L. Barrett MDB 2265 (PERTH) (GU255980.1); *Typhonium* sp. Schott NC-2010 voucher Bogner 2962 (M) (GU255984.1); *Typhonium* sp. Schott Prince Regent voucher M.D. Barrett 1033 (PERTH) (GU255978.1); *Typhonium* sp. Schott Prince Regent voucher R.L. Barrett & M.D. Barrett RLB 1716 (PERTH) (GU255977.1); *Typhonium subglobosum* Hett. & Sookchaloem (EU886546.1); *Typhonium tentaculatum* Hett. (EU886543.1); *Typhonium trilobatum* (L.) Schott (EU886571.1); *Typhonium tubispathum* Hett. & A. Galloway (EU886574.1); *Typhonium varians* Hett. & Sookchaloem (EU886575.1); *Typhonium venosum* (Aiton) Hett. & P.C. Boyce (EU886544.1); *Typhonium violifolium* Gagnep. (EU886562.1); *Typhonium wilbertii* A. Hay (EU886545.1); *Typhonium wilbertii* A. Hay voucher A. Ford 2544 (CNS) (GU255976.1); *Typhonodorum lindleyanum* Schott (EU886578.1); *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott (EU886500.1).

Wang et al. (2010). *Landoltia punctata* (G. Mey.) Les & D.J. Crawford strain 7248 (GU454140.1); *L. punctata* strain 7260 (GU454141.1); *L. punctata* strain 7449 (GU454142.1); *L. punctata* strain 7487 (GU454143.1); *L. punctata* strain 8721 (GU454144.1); *L. punctata* strain 9278 (GU454145.1); *Lemna aequinoctialis* Welw. strain 6612 (GU454146.1); *L. aequinoctialis* strain 6746 (GU454147.1); *L. aequinoctialis* strain 7126 (GU454148.1); *Lemna disperma* Hegelm. strain 7269 (GU454149.1); *Lemna gibba* L. strain 7589 (GU454150.1); *L. gibba* strain 7741 (GU454151.1); *L. gibba* strain 7784 (GU454152.1); *L. gibba* strain 8703 (GU454153.1); *L. gibba* strain JS 6F7-11 (GU454154.1); *L. gibba* strain JS PARENT LINE (GU454155.1); *Lemna japonica* Landolt strain 7182 (GU454156.1); *Lemna minor* L. strain 7018 (GU454157.1); *L. minor* strain 7136 (GU454158.1); *L. minor* strain 7210 (GU454159.1); *L. minor* strain 9016 (GU454160.1); *L. minor* strain 9253 (GU454161.1); *L. minor* strain 9417 (GU454162.1); *Lemna minuta* Kunth strain 7284 (GU454163.1); *L. minuta* strain 7726 (GU454164.1); *L. minuta* strain 8065

Anexo I. (Continuação).

(GU454165.1); *L. minuta* strain 8634 (GU454173.1); *Lemna obscura* (Austin) Daubs strain 7856 (GU454166.1); *Lemna trisulca* L. strain 7579 (GU454167.1); *L. trisulca* strain 8137 (GU454168.1); *L. trisulca* strain UTCC 399 (GU454169.1); *Lemna turionifera* Landolt strain 8339 (GU454170.1); *L. turionifera* strain 8760 (GU454171.1); *Lemna valdiviana* Hegelm. strain 7288 (GU454172.1); *L. valdiviana* strain 9229 (GU454174.1); *L. valdiviana* strain 9232 (GU454175.1); *Spirodela intermedia* W. Koch strain 7125 (GU454125.1); *S. intermedia* strain 7178 (GU454126.1); *S. intermedia* strain 7291 (GU454127.1); *S. intermedia* strain 7355 (GU454128.1); *S. intermedia* strain 7450 (GU454129.1); *S. intermedia* strain 7747 (GU454130.1); *S. intermedia* strain 8410 (GU454131.1); *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. strain 7205 (GU454132.1); *S. polyrhiza* strain 7212 (GU454133.1); *S. polyrhiza* strain 7222 (GU454134.1); *S. polyrhiza* strain 7498 (GU454135.1); *S. polyrhiza* strain 7657 (GU454136.1); *S. polyrhiza* strain 8790 (GU454137.1); *S. polyrhiza* strain 9203 (GU454138.1); *S. polyrhiza* strain SJ (GU454139.1); *Wolffia australiana* (Benth.) Hartog & Plas strain 7733 (GU454191.1); *W. australiana* strain 8730 (GU454192.1); *Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas strain 9196 (GU454193.1); *Wolffiella denticulata* (Hegelm.) Hegelm. strain 8221 (GU454176.1); *Wolffiella gladiata* (Hegelm.) Hegelm. strain 7595 (GU454177.1); *W. gladiata* strain 7852 (GU454178.1); *W. gladiata* strain 8066 (GU454179.1); *Wolffiella hyalina* Monod strain 8640 (GU454180.1); *Wolffiella lingulata* (Hegelm.) Hegelm. strain 7464 (GU454181.1); *W. lingulata* strain 7655 (GU454182.1); *W. lingulata* strain 7725 (GU454183.1); *Wolffiella neotropica* Landolt strain 7290 (GU454184.1); *W. neotropica* strain 7609 (GU454185.1); *W. neotropica* strain 8848 (GU454186.1); *Wolffiella oblonga* (Phil.) Hegelm. strain 7164 (GU454187.1); *W. oblonga* strain 9136 (GU454188.1); *Wolffiella rotunda* Landolt strain 9072 (GU454189.1); *W. rotunda* strain 9121 (GU454190.1).

Wong et al. (2010). *Anchomanes difformis* (Blume) Engl. voucher P.C. Boyce et al. Ar30 (SAR) (GQ220885.1); *Aridarum borneense* (M. Hotta) Bogner & A. Hay voucher P.C. Boyce et al. Ar2123 (SAR) (GQ220886.1); *Aridarum caulescens* Bogner & Nicolson var. *angustifolium* voucher P.C. Boyce et al. Ar1915 (SAR) (GQ220888.1); *A. caulescens* voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar637 (SAR) (GQ220887.1);

Anexo I. (Continuação).

Aridarum crassum S.Y. Wong & P.C. Boyce voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar263 (SAR) (GQ220889.1); *Aridarum nicolsonii* Bogner voucher P.C. Boyce & S.Y. Wong Ar2098 (SAR) (GQ220890.1); *Aridarum purseglovei* (Furtado) M. Hotta voucher P.C. Boyce et al. Ar1036 (SAR) (GQ220891.1); *A. purseglovei* voucher P.C. Boyce et al. Ar1887 (SAR) (GQ220892.1); *A. purseglovei* voucher P.C. Boyce et al. Ar1914 (SAR) (GQ220893.1); *Bakoa lucens* (Bogner) P.C. Boyce & S.Y. Wong voucher P.C. Boyce & S.Y. Wong Ar2097 (SAR) (GQ220894.1); *Bucephalandra motleyana* Schott voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar252 (SAR) (GQ220895.1); *B. motleyana* voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar456 (SAR) (GQ220896.1); *Cryptocoryne yujii* Bastmeijer. voucher P.C. Boyce et al. Ar2321 (SAR); *Dieffenbachia spruceana* Schott voucher Josef Bogner 2954 (M) (GQ220898.1); (GQ220897.1); *Phymatarum borneense* M. Hotta voucher P.C. Boyce et al. Ar1442 (SAR) (GQ220899.1); *P. borneense* voucher P.C. Boyce et al. Ar1931 (SAR) (GQ220900.1); *Piptospatha burbridgei* (N.E. Br.) M. Hotta voucher P.C. Boyce et al. Ar1973 (SAR) (GQ220901.1); *Piptospatha elongata* (Engl.) N.E. Br. voucher P.C. Boyce & S.Y. Wong Ar2052 (SAR) (GQ220902.1); *Piptospatha grabowskii* (Engl.) Engl. voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar294 (SAR) (GQ220903.1); *P. grabowskii* voucher P.C. Boyce et al. Ar390 (SAR) (GQ220904.1); *Piptospatha impolita* (Engl.) N.E.Br. voucher P.C. Boyce et al. Ar2141 (SAR) (GQ220905.1); *Piptospatha viridistigma* P.C. Boyce & S. Y. Wong voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar250 (SAR) (GQ220906.1); *Schismatoglottis acuminatissima* Schott voucher Josef Bogner Ar1197 (SAR)/Bogner 2913 (M) (GQ220907.1); *Schismatoglottis americana* A.M.E. Jonker & Jonker voucher Josef Bogner 2911 (M) (GQ220908.1); *Schismatoglottis asperata* Engl. voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar71.3 (SAR) (GQ220909.1); *Schismatoglottis bauensis* A. Hay & C.C. Lee voucher P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar20 (SAR) (GQ220910.1); *Schismatoglottis brevicuspis* Hook. f. voucher Wong1 (SAR) (GQ220911.1); *Schismatoglottis ciliata* A. Hay voucher P.C. Boyce et al. Ar1679 (SAR) (GQ220913.1); *Schismatoglottis confinis* S.Y.Wong & P.C.Boyce voucher Simon Kutuh ak Paru Ar1695 (SAR) (GQ220914.1); *Schismatoglottis corneri* A. Hay voucher (No.19991172), Singapore Botanical Garden Living Collection (GQ220915.1); *Schismatoglottis corneri* A. Hay voucher P.C. Boyce et al. Ar2326 (SAR) (GQ220916.1); *Schismatoglottis erecta* M. Hotta

Anexo I. (Continuação).

voucher P.C. Boyce et al. Ar1430 (SAR) (GQ220919.1); *S. erecta voucher* P.C. Boyce et al. Ar1610 (SAR) (GQ220920.1); *S. erecta voucher* P.C. Boyce et al. r2046 (SAR) (GQ220921.1); *S. erecta voucher* P.C. Boyce et al. Ar551 (SAR) (GQ220922.1); *Schismatoglottis jepomii* P.C. Boyce & S.Y. Wong *voucher* Jeland ak Kisai Ar222 (SAR) (GQ220925.1); *Schismatoglottis josefii* A. Hay *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1157 (SAR) (GQ220947.1); *Schismatoglottis longifolia* Ridl. *voucher* P.C. Boyce et al. Ar2286 (SAR) (GQ220928.1); *Schismatoglottis mayoana* Bogner & Hotta *voucher* Lee Ai Shan & Ooi Im Hin Ar2054 (SAR) (GQ220929.1); *S. mayoana voucher* P.C. Boyce et al. Ar2122 (SAR) (GQ220930.1); *Schismatoglottis monoplacenta* M. Hotta *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1966 (SAR) (GQ220931.1); *S. monoplacenta voucher* P.C. Boyce et al. Ar1994 (SAR) (GQ220932.1); *Schismatoglottis motleyana* (Schott) Engl. *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1970 (SAR) (GQ220933.1); *Schismatoglottis multiflora* Ridl. *voucher* Jeland ak Kisai & Jipom ak Tisai Ar419 (SAR) (GQ220936.1); *S. multiflora voucher* Lee Ai Shan & Ooi Im Hin Ar2069 (SAR) (GQ220935.1); *S. multiflora voucher* P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar1203 (SAR) (GQ220939.1); *S. multiflora voucher* P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar10b (SAR) (GQ220938.1); *S. multiflora voucher* P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar10 (SAR) (GQ220937.1); *S. multiflora voucher* P.C. Boyce & S.Y. Wong Ar2037 (SAR) (GQ220934.1); *Schismatoglottis multinervia* M. Hotta *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1932 (SAR) (GQ220940.1); *Schismatoglottis nicolsonii* A. Hay *voucher* P.C. Boyce et al. Ar2106 (SAR) (GQ220941.1); *Schismatoglottis patentinervia* Engl. *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1308 (SAR) (GQ220942.1); *Schismatoglottis pyrrias* A. Hay *voucher* Jana Leong-Skornickova et al. Ar2026 (SAR)/JLS-142 (SING) (GQ220944.1); *Schismatoglottis* sp. Ar108 *voucher* P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar108 (SAR) (GQ220945.1); *Schismatoglottis* sp. Ar114 *voucher* P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar114 (SAR) (GQ220946.1); *Schismatoglottis* sp. Ar134 *voucher* P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar134 (SAR) (GQ220948.1); *Schismatoglottis* sp. Ar1582 *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1582 (SAR) (GQ220949.1); *Schismatoglottis* sp. SYW-2010a *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1761 (SAR) (GQ220917.1); *Schismatoglottis* sp. SYW-2010b *voucher* P.C. Boyce & Jeland ak Kisai Ar279 (SAR) (GQ220918.1); *Schismatoglottis* sp. SYW-2010c *voucher* P.C. Boyce et al. Ar1846 (SAR) (GQ220923.1); *Schismatoglottis* sp. SYW-2010d *voucher* P.C. Boyce et al.

Anexo I. (Continuação).

Ar326 (SAR) (GQ220924.1); *Schismatoglottis* sp. SYW-2010e voucher P.C. Boyce et al. Ar1039 (SAR) (GQ220927.1); *Schismatoglottis* sp. SYW-2010e voucher P.C. Boyce et al. Ar376 (SAR) (GQ220926.1); *Schismatoglottis* sp. SYW-2010f voucher P.C. Boyce et al. Ar1599 (SAR) (GQ220943.1); *Schismatoglottis tecturata* (Schott) Engl. voucher Jeland ak Kisai & Jipom ak Tisai Ar466 (SAR) (GQ220951.1); *S. tecturata* voucher P.C. Boyce et al. Ar2114 (SAR) (GQ220950.1); *Schismatoglottis viridissima* A. Hay voucher P.C. Boyce & S.Y. Wong Ar2048 (SAR) (GQ220952.1); *Schottarum sarikeense* (Bogner & M. Hotta) P.C. Boyce & S.Y. Wong voucher P.C. Boyce et al. Ar1615 (SAR) (GQ220912.1).

CAPÍTULO 2. Aplicabilidade dos *DNA barcodes* na identificação molecular e na elucidação das relações evolutivas nas espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae).

RESUMO

Embora várias espécies de *Xanthosoma* Schott (Araceae) se destaquem na ornamentação e no paisagismo, sua grande importância econômica é alimentar. As taiobas, *yuatía*, *cocoyam* e os *mangaritos*, como são popularmente conhecidas, estão entre as mais importantes culturas de rizomas, raízes e tubérculos de todo o mundo, servindo como fonte alimentar para milhões de pessoas, especialmente na Ásia, na África e na América Central. Porém, apesar dos diversos estudos já conduzidos, as relações taxonômicas e a circunscrição, sobretudo, das espécies cultivadas, ainda permanecem nebulosas. Neste sentido, a implementação e o uso de ferramentas de identificação moleculares, como os *DNA barcodes* e pode representar uma importante contribuição. Assim, foi objetivo desse Capítulo avaliar a aplicabilidade dos *DNA barcodes* na identificação molecular das espécies cultivadas de *Xanthosoma* e na elucidação de suas relações evolutivas. Sequências *barcodes* de *matK*, pertencentes às principais espécies de taioba cultivadas no mundo, foram obtidas e comparadas entre si e com outras pertencentes a espécies relacionadas ou não. A variação interespecífica foi calculada, com base nas distâncias genéticas estimadas entre as diferentes espécies. As espécies *X. robustum* Schott, *X. maffafa* Schott, *X. brasiliense* (Desf.) Engl., *X. blandum* Schott, *X. atrovirens* K. Koch & C.D. Bouché, *X. appendiculatum* Schott e *X. violaceum* Schott apresentaram a mesma identidade molecular, comportando-se como uma única unidade genética. Por sua vez, *X. riedelianum* Schott e *X. taioba* E.G. Gonç. comportaram-se como unidades independentes e distintas destas sete espécies anteriores. Embora uma identificação específica não tenha sido alcançada, estes resultados, mesmo que de forma preliminar, apontam para uma nova circunscrição taxonômica em *Xanthosoma*, na qual as principais espécies cultivadas de taioba seriam, na verdade, uma única espécie, com marcada amplitude de variação fenotípica, alcançada tanto por processos naturais quanto pela intervenção do homem. Corroborariam tal afirmação aspectos morfológicos, citogenéticos, geográficos e evolutivos.

Chapter 2. Applicability of DNA barcodes in molecular identification of cultivated species of *Xanthosoma* Schott (Araceae) and elucidation of their evolutionary relationships.

ABSTRACT

Although several species of *Xanthosoma* Schott (Araceae) have been used for decoration and landscaping, they are also economically important as food source. The *taiobas*, *yuatía*, *cocoyam* and *mangaritos*, as they are commonly known, are among the most important crops of rhizomes, roots and tubers around the world, serving as a food source for millions of people, especially in Asia, Africa and Central America. Despite many studies already conducted, the taxonomic relationships and circumscription, especially of the cultivated species, still remain unclear. The implementation and use of molecular identification tools, such as DNA barcodes, may represent an important contribution to the taxonomy of this plant group. This chapter was aimed to evaluate the applicability of DNA barcodes in molecular identification of cultivated species of *Xanthosoma* as well as to elucidate their evolutionary relationships. Barcode sequences of *matK*, belonging to most important species of cultivated *taioaba* of the world were obtained and compared among themselves as well as with other plants belonging to related species or not. The interspecific variation was calculated based on the genetic distances estimated between the different species, using Neighbor-joining - NJ and Kimura - 2P. The species *X. robustum* Schott, *X. maffafa* Schott, *X. brasiliense* (Desf.) Engl., *X. blandum* Schott, *X. atrovirens* K. Koch & C.D. Bouché, *X. appendiculatum* Schott and *X. violaceum* Schott were shown to have the same molecular identity, behaving as a single genetic unit. Conversely, *X. riedelianum* Schott and *X. taioaba* E.G. Gonç. behaved as independent units, distinct from the others. Although a specific identification has not been established, our results, albeit preliminary, suggest a new taxonomical circumscription of *Xanthosoma*, in which the main cultivated species of *taioaba* were, in fact, a single species, with large phenotypic variation, achieved by natural processes and human intervention. Corroborate this statement, morphological, cytogenetic, geographic and evolutionary aspects.

1. Introdução

Xanthosoma Schott é um gênero de Araceae exclusivamente neotropical. Suas espécies ocorrem da Flórida até o norte da Argentina (Mayo *et al.* 1997 e Gonçalves 2000), em diferentes habitats, tais como florestas tropicais úmidas, subtropicais, regiões pantanosas, florestas decíduas e semi-decíduas ou mesmo em áreas montanhosas (Gonçalves 2000).

Morfologicamente, apresentam caules geralmente intumescidos e folhas pecioladas, dispostas em rosetas, muitas vezes com bainhas evidentes. O tamanho das plantas pode variar de apenas 30 cm a mais de quatro metros de altura, quando são, comumente, chamadas de “orelhas-de-elefante”, principalmente, considerando o tamanho e a forma de suas folhas (Castro 2006). Suas pequenas flores, polinizadas por besouros (Garcia-Robledo *et al.* 2004), em decorrência do forte odor que emitem, estão reunidas em uma espádice envolta por uma única bráctea, a espata – padrão típico das inflorescências da grande maioria das espécies da família Araceae (Mayo *et al.* 1997). O fruto é do tipo baga, com sementes cilíndricas e ricas em endosperma. Seus cormos³ são intumescidos e, relativamente, grandes (Mayo *et al.* 1997; Gonçalves *et al.* 2004a; Gonçalves *et al.* 2004b; Batista 2008). Cristais de oxalato de cálcio são freqüentes, sobretudo, nas folhas e nos cormos que ainda podem apresentar quantidades variáveis de amido, entre outros carboidratos e substâncias protéicas (Mayo *et al.* 1997; Corrêa 2000).

Embora várias espécies de *Xanthosoma* se destaquem na ornamentação e no paisagismo, e sejam largamente utilizadas na composição, sobretudo, de jardins de apelo tropical (Lorenzi & Mello-Silva 2003; Souza & Lorenzi 2008), sua grande importância econômica, sem dúvida, é a alimentar (Batista 2008). Segundo Pinto *et al.* (1999), as taiobas, *yuatía*, *cocoyam* e os *mangaritos*, como são popularmente conhecidas (Mayo *et al.* 1997), estão entre as mais importantes culturas de rizomas,

³ Definição de Cormo: Caule usualmente subterrâneo, com eixo principal intumescido (comumente, amilífero) e entrenós bem definidos. Eventualmente, em *Xanthosoma* Schott (Araceae), os cormos podem apresentar ramificações laterais, denominadas cormelos. O Cormo difere do bulbo pelo fato de armazenar as reservas no próprio eixo e não nas escamas e da túbera por apresentar entrenós evidentes (Gonçalves & Lorenzi 2011). Prefere-se, nesse estudo, a utilização de cormo a de rizoma, tão comum na literatura, por entendermos que essa última é muito genérica e, nesse caso, pode ser substituída por outra de maior propriedade.

raízes e tubérculos de todo o mundo, servindo como fonte alimentar para, pelo menos, 400 milhões de pessoas, especialmente na Ásia, na África e na América Central (Towle 1961; Seganfredo *et al.* 2001).

Seus caules, cormos e folhas constituem uma fonte importante, não só de carboidratos, mas de proteínas e dos mais diversos minerais e vitaminas, tão essenciais na composição de uma dieta alimentar rica e balanceada (Abramo 1990; Carvalho & Cordeiro 1990; Pinto *et al.* 1999; Seganfredo *et al.* 2001; Pinto *et al.* 2001b; Morais *et al.* 2006; Lima 2009). Além disso, apresentam níveis relativamente baixos de fatores antinutricionais, como nitratos, taninos e compostos fenólicos (Pinto *et al.* 2001a; Lima 2009) e valores nutricionais próximos ou superiores aos de culturas convencionais como a batata-inglesa, o cará, o inhame e a batata-doce (Leite *et al.* 2011), ou mesmo, de outra Araceae cultivada, o taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) (Giacometti & Léon 1994).

Aliado as suas qualidades nutricionais, seu baixo custo produtivo (Seganfredo *et al.* 2001) faz das *Xanthosoma* uma alternativa economicamente viável, principalmente para as populações carentes ou socialmente fragilizadas que, normalmente, as utilizam em sua subsistência (Pinto *et al.* 2001a; Souza 2008). Estes pequenos produtores, podem ainda comercializar o excedente produtivo, como forma de complementar sua renda (Santos 2005; Castro 2006). Assim, para muitos pesquisadores, as taiobas representam uma importante alternativa no combate à desnutrição, a fome e a pobreza (Pinto *et al.* 1999; BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2010).

As *Xanthosoma* também representam uma cultura relevante do ponto de vista estratégico. Várias espécies cultivadas podem se desenvolver e serem comercializadas no período da entressafra de outras culturas comerciais (Longhurst & Lipton 1989). Além disso, podem ainda crescer e produzir em ambientes sombreados, o que as torna uma cultura passível de ser desenvolvida em áreas de reflorestamento (Seganfredo *et al.* 2001), integrando esta cultura a modelos de produção sustentáveis como os agroflorestais, tão defendidos na atualidade. Ressalta-se que esta prática já é adotada em alguns países da África, nos quais as taiobas são consorciadas com palmeiras oleíferas, como o dendê (Salako *et al.* 1995).

No Brasil, mesmo com a existência de políticas públicas de incentivo à produção e ao consumo de culturas não-convencionais (BRASIL, Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2010), a utilização alimentar das taiobas ainda é pequena, estando restrita a algumas regiões do país. As folhas apresentam maior aceitação que os cormos e são consumidas nos estados de Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina, Pará, Amazonas e Mato Grosso (Pinto *et al.* 2001b; Batista 2008; Santos *et al.* 2011). Além de questões culturais, outro fator limitante para o consumo das folhas e dos cormos é, como já mencionado anteriormente, a ocorrência de cristais de oxalato de cálcio nos tecidos, que provocam amargor e adstringência na boca e garganta (Seganfredo *et al.* 2001). Aliada a essas questões culturais e alimentícias, existem ainda problemas técnicos de manejo e implementação dos cultivos em escala produtiva (Santos *et al.* 2011).

A principal espécie de taioba cultivada no mundo é *Xanthosoma mafaffa* Schott (Gonçalves, 2011), no entanto existem outras espécies que também são utilizadas como fonte de alimento, como por exemplo: *X. violaceum* Schott, *X. atrovirens* K. Koch & C.D. Bouché, *X. robustum* Schott, *X. sagittifolium* (L.) Schott *X. brasiliense* Engl. e *X. taioba* E.G. Gonç. Porém, é importante salientar que a grande maioria destas estas espécies cultivadas são, usualmente, denominadas de “*Xanthosoma sagittifolium*”, apesar das diferenças morfológicas que apresentam (Giacometti & Léon 1994; Gonçalves, 2011).

Esta dificuldade na classificação se reflete no grupo como um todo, sendo a taxonomia das espécies cultivadas considerada inconclusiva pela maioria dos autores (Gonçalves 2011). Dentro da sua própria tribo (Caladieae-Zomicarpeae), a circunscrição do gênero *Xanthosoma* é complexa: são conhecidas entre 60 e 70 espécies, porém alguns especialistas acreditam que este número possa exceder 120 espécies (Gonçalves, com. pess.). Além disso, a circunscrição e o posicionamento de *Xanthosoma* frente aos outros gêneros sempre foi objeto de controvérsia (Gonçalves *et al.* 2004b; Batista 2008; Gonçalves 2011).

Schott, em 1832, descreveu o gênero *Xanthosoma* junto com o gênero *Acontias*, que, segundo este autor, deveria reunir as espécies tuberosas desse grupo. Mais tarde, Engler (1920) fundiu *Acontias* em *Xanthosoma*, mas preservou a segregação das espécies em duas seções: Seção *Xanthosoma* (= “*Euxanthosoma*”) e Seção *Acontias* Schott, ainda respeitando a circunscrição original dada por Schott (Gonçalves *et al.* 2004b). Recentemente, Gonçalves *et al.* (2004b) dividiu as *Xanthosoma* em quatro grupos: o Grupo *Xanthosoma*, no qual agrupou as espécies de “orelha de elefante” típicas, tais como *X. hyleae* Engl. & K. Krause, *X. mafaffa*, *X.*

poepigii Schott, *X. sagittifolium*, *X. lucens* E.G. Gonç. e *X. violaceum*; o Grupo *Acontias* representado por espécies que foram, originalmente, incluídas no gênero *Acontias* por Schott (1832), das quais merecem destaque *X. pentaphyllum* Engl, *X. plowmanii* Bogner e *X. syngoniifolium* Rusby; o Grupo *Cyrtospadix*, formado por espécies que apresentam a lâmina das folhas cordatas ou sagitadas, como em *X. striatipes* (Kunth) Madison, *X. aristeguietae* (G.S. Bunting) Madison e *X. pulchrum* E.G. Gonç.; e por fim, o Grupo *Chlorospatha* no qual incluiu *X. striolatum* Mart. ex Schott e *X. acutum* E.G. Gonç., ocorrentes na Amazônia.

Em 2008, Batista através de estudos moleculares usando marcadores plastidiais (*matK* e *trnL-F*), reconheceu a existência de cinco linhagens evolutivas dentro de *Xanthosoma*: a primeira linhagem era formada pelas espécies caulescentes de *Xanthosoma* e *Chlorospatha*; a segunda linhagem agrupava a maior parte das espécies cultivadas; por sua vez, a terceira linhagem correspondia a Secção *Acontias*, descrita por Engler, em 1920; a quarta linhagem, fortemente suportada, permaneceu composta por *X. pulchrum* e a *X. poecile* (Schott) E.G. Gonç. (comb. inéd.). E, finalmente, a quinta linhagem, composta pela espécie *X. mexicanum* Liebm, que segundo a autora não guardava qualquer relação aos outros grupos anteriores.

Porém, mesmo considerando estes estudos, que em muito contribuíram para o conhecimento do grupo, as relações taxonômicas e a circunscrição das espécies ainda permanece nebulosa, principalmente, considerando as espécies de taioba cultivadas (Gonçalves 2011). Só para se ter uma idéia destas dificuldades, recentemente, materiais cultivados na África foram re-determinados como *Xanthosoma mafaffa*, depois de anos sendo referidos como *X. sagittifolium*. O mesmo aconteceu com materiais amplamente cultivados na Flórida como *X. sagittifolium*, agora identificados como *Xanthosoma robustum* (Gonçalves, com. pess. e Gonçalves 2011). Já, no Brasil, os materiais cultivados no sul, sudeste, nordeste e centro-oeste são, de fato, *X. taioba* E.G. Gonç. (sp. nov. inéd.), mas as identidades dos materiais cultivados no norte do Brasil permanecem incógnitas (Gonçalves 2011).

Para contornar essa dificuldade, uma abordagem possível seria a adoção e o uso de ferramentas moleculares para a identificação das espécies, metodologia de resultados expressivos em outros grupos vegetais (Lahaye *et al.* 2008; Hollingsworth *et al.* 2009; Hollingsworth *et al.* 2011). Nessa linha, uma ferramenta, recente e

promissora, são os *DNA barcodes* ou código de barras de DNA. Seus entusiastas defendem que através de pequenos fragmentos de DNA, que têm em média 600pb, é possível identificar, de forma inequívoca, qualquer material biológico (Hebert *et al.* 2003a; Hebert *et al.* 2003b; Dalebout *et al.* 2004). Porém, alguns pesquisadores, menos otimistas, mesmo reconhecendo a funcionalidade do método, dizem que seus limites ainda devem ser melhor compreendidos e que os resultados devem ser tratados com mais cautela (Moritz & Cícero 2004; Meyer & Paulay 2005; Moniz & Kaczmarska 2010). De qualquer forma, são vários os exemplos de sucesso, da aplicação dos *DNA barcodes* na identificação, tanto de espécies animais, como de plantas (Hebert *et al.* 2004a; Hebert *et al.* 2004b; Kress *et al.* 2005; Chase *et al.* 2005; Hajibabaei *et al.* 2006; Chase *et al.* 2007; Newmaster *et al.* 2008; deWaard *et al.* 2009; Ardura *et al.* 2010; Hollingsworth *et al.* 2011).

Nas plantas, a *COI* (citocromo c oxidase subunidade 1) não se mostrou tão eficiente quanto é na identificação de animais e insetos (Chase *et al.* 2007; Kress *et al.* 2005; Hollingsworth *et al.* 2011). Após anos de procura, apenas em 2009, finalmente a comunidade científica pôde comemorar o estabelecimento de um *barcode* para as plantas. Neste ano, o *CBOL Plant Working Group* (*Consortium for Barcoding of Life*, Hollingsworth *et al.* 2009) propôs uma abordagem *multiloci* que combinava o *matK* com outro marcador codificante, o *rbcL*. Reconheceu ainda que marcadores complementares (codificantes, não-codificantes ou nucleares) poderiam ser utilizados para aumentar a eficiência nas identificações, de acordo com a necessidade, principalmente considerando as dificuldades encontradas na recuperação de sequências viáveis para o *matK* (Kress *et al.* 2009). Dificuldades essas, hoje já resolvidas ou em processo de resolução (Dunning & Savolainen 2010; Hollingsworth *et al.* 2011; Yu *et al.* 2011).

Os *DNA barcodes* foram, originalmente, pensados apenas para a identificação em nível específico (Hebert *et al.* 2003a). Porém, a eficiência desta ferramenta de identificação trouxe alguns desdobramentos, sendo hoje possível sua aplicação para a identificação de outros níveis hierárquicos, como gêneros, tribos, subfamílias e famílias, quando então são chamados de *DNA barcodes latu sensu*. E, nesse sentido, os estudos voltados estritamente para sua aplicação primordial utilizam então os *DNA barcodes* em uma abordagem *stricto sensu* (Xue & Li 2011). Em qualquer das abordagens, um enfoque recente de sua aplicação, além da identificação, tem sido sua utilização para elucidar as relações evolutivas em

comunidades, famílias, gêneros e entre espécies relacionadas (Lahaye *et al.* 2008; Kress *et al.* 2009; Kress *et al.* 2010; Hollingsworth *et al.* 2011).

Nesse contexto, embora as análises baseadas em sequências *barcodes* não tenham a perspectiva de ser uma ferramenta filogenética, principalmente, se considerarmos seu arcabouço de análise, que utiliza, por exemplo, métodos de distância genética e não de parcimônia (Meyer & Paulay 2005), essas análises de fato fornecem algum tipo de sinal filogenético (Ward *et al.*, 2005; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Kress *et al.* 2010; Hollingsworth *et al.* 2011).

Assim, começa a se delinear uma abordagem híbrida que combina o poder discriminante dos *DNA barcodes* à filogenia. Aqui, cabe salientar que o *matK*, gene plastidial (pertencente ao genoma do cloroplasto, cpDNA) que codifica a tRNA^{Lys} (UUU) (Neuhaus & Link 1987) figura como um sério candidato nessa abordagem, pois este é, sem dúvida, pela sua taxa de variação, um dos genes mais utilizados em reconstruções filogenéticas, principalmente em angiospermas (Soltis *et al.* 1998; Hilu *et al.* 2003; Hilu *et al.* 2008).

Como visto, apesar dos diversos estudos já conduzidos, ainda existem muitas lacunas que devem ser preenchidas, especialmente, considerando a correta identificação das espécies cultivadas de *Xanthosoma*. Neste sentido, a implementação e o uso de ferramentas de identificação moleculares dotadas de sinal filogenético, como os códigos de barra de DNA, pode representar uma importante contribuição. Portanto, com base no exposto, o presente estudo visa avaliar a aplicabilidade dos *DNA barcodes* na identificação molecular e na elucidação das relações evolutivas em um grupo de difícil circunscrição, como é o caso das espécies cultivadas de taioba (*Xanthosoma* Schott, Araceae).

2. Metodologia

2.1. Obtenção das amostras

Foi coletado material foliar fresco de 10 (dez) espécies, pertencentes ao gênero *Xanthosoma* Schott (Araceae), mantidas em cultivo no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília – UCB (*Campus* I, Q.S. 07, lote 01 EPCT, Águas Claras Taguatinga, Distrito Federal). Cinco representam as principais espécies de

taioaba cultivadas no mundo: *Xanthosoma atrovirens*, *X. mafaffa*, *X. robustum*, *X. taioba* e *X. violaceum*. As cinco espécies restantes foram selecionadas com base na filogenia proposta por Batista (2008): *X. appendiculatum* Schott, *X. blandum* Schott, *X. brasiliense* (Desf.) Engl. e *X. riedelianum* Schott são espécies estreitamente relacionadas a estas cultivadas e *X. pottii* E.G. Gonç pertence a uma linhagem distinta das espécies anteriores (Tabela 1). Todas as espécies foram devidamente identificadas pelo especialista em Araceae, Dr. Eduardo G. Gonçalves (Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG). Essas amostras foram desidratadas em sílica gel e mantidas até o momento da extração.

Tabela 1. Lista em ordem alfabética dos acessos amostrados pertencentes ao gênero *Xanthosoma* Schott (Araceae), mantidos em cultivo no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília – UCB, Distrito Federal – Brasil. UB: sigla do Herbário da Universidade de Brasília – UnB. ⁽¹⁾ Principais espécies de taioba cultivadas no mundo; ⁽²⁾ Espécies estreitamente relacionadas a essas espécies cultivadas; e ⁽³⁾ Espécie pertencente a uma linhagem diferente das demais.

Espécies	Voucher	Origem
<i>Xanthosoma appendiculatum</i> Schott ⁽²⁾	Gonçalves s.n.	Belém, PA
<i>Xanthosoma atrovirens</i> K. Koch & C.D. Bouché ⁽¹⁾	Gonçalves s.n.	Cultivado, RJ
<i>Xanthosoma blandum</i> Schott ⁽²⁾	Gonçalves 891 (UB)	Manaus, AM
<i>Xanthosoma brasiliense</i> (Desf.) Engl. ⁽¹⁾	Boos s.n.	Trinidad
<i>Xanthosoma mafaffa</i> Schott ⁽¹⁾	Gonçalves 1019 (UB)	Cultivado, SP
<i>Xanthosoma pottii</i> E.G. Gonç. ⁽³⁾	Gonçalves 199 (UB)	Nhecolândia, MS
<i>Xanthosoma riedelianum</i> Schott ⁽²⁾	Gonçalves 763 (UB)	Cultivado, MG
<i>Xanthosoma robustum</i> Schott ⁽¹⁾	Gonçalves s. n.	Cultivado, Flórida
<i>Xanthosoma taioba</i> E.G. Gonç. ⁽¹⁾	Gonçalves 911 (UB)	Areias, PB
<i>Xanthosoma violaceum</i> Schott ⁽¹⁾	Gonçalves 184 (UB)	Cultivado, DF

Com base na filogenia proposta por Cabrera *et al.* (2008) foram selecionados como grupo externo as seguintes espécies: *Acorus calamus* L. (acesso no GenBank®: AB040154), *Alisma canaliculatum* A. Braum & C.D. Bouché (acesso AB040179), *Tofieldia pusilla* Pers. (AM920648) e *Hedyosmum mexicanum* C. Cordem. (AM905824). Além dessas espécies foram ainda incluídas na análise *Colocasia esculenta* (L.) Schott (AM920622), espécie de Araceae cultivada (taro), também de interesse alimentar (tribo Colocasieae) e outras cinco espécies, que assim como Xanthosoma, pertencem à tribo Caladieae-Zomicarpeae: *Filarum manserichense* Nicolson (AM920617), *Ulearum sagittatum* Engl. (AM920616), *Scaphispatha gracilis* Brongn. ex Schott (AM920615), *Caladium lindenii* (André) Madison (AM920610) e *Zomicarpella amazonica* Bogner (AM920618).

2.2. Extração, Amplificação e Seqüenciamento de DNA

As etapas de Extração, Amplificação e o Seqüenciamento de DNA foram realizadas nos Laboratórios da Universidade Católica de Brasília - UCB, localizados no *Campus* II, SGAN 916 Avenida W5, Brasília, Distrito Federal.

O DNA de, aproximadamente, 100ng de folha foi extraído pelo método CTAB (Doyle & Doyle 1987), modificado para o uso em sistema FastPrep® (Krackeler Scientific, Inc.). O DNA total foi testado quanto a sua integridade por visualização em gel de agarose a 0,7-1%. A solução de DNA foi então aliquotada e mantida a -30°C para as análises posteriores.

O DNA foi amplificado por meio de PCR (Polimerase Chain Reaction). A reação continha 20µL, constituídos, para cada região, de 0,15µM de cada oligonucleotideo, 0,20µM de cada dNTP, 1X *Reaction buffer* (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂), 0,20mg/ml de BSA, 1,5U de *Taq DNA polymerase* (Phoneutria, BR), e 0,15ng de DNA *template*. A temperatura de anelamento variou entre 56 e 58°C, por 1min. A amplificação foi realizada no amplificador, marca Gene Amp PCR System, modelo 9700 (Applied Biosystems, CA), com a seguinte programação: 96°C por 2min (1 ciclo), 94°C por 1min, 56°C por 1min, 72°C por 2min (sendo, a cada ciclo, acrescentados 5seg) (35 ciclos) e 72°C por 10min (1 ciclo).

Para a amplificação e o sequenciamento do *matK*, foram utilizados os *primers* -19F (Gravendeel *et al.* 2001) e 2R (Steele & Vilgalys 1994) na amplificação de toda a *ORF*, incluindo o *íntron* 3' do *trnK* (~1900bp). Foram ainda utilizados os *primers*

internos 390F e 1326R (Cuénoud *et al.* 2002) e 1034F e 533R (Batista, 2007), com a finalidade de aumentar a sobreposição na região. Os produtos de PCR obtidos foram purificados com ExoSAP-IT® (USB Corporation).

Para o seqüenciamento foi utilizado o seqüenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, CA) e o Kit de seqüenciamento DYEnamic™ ET terminator® (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), de acordo com as instruções do fabricante. O seqüenciamento foi realizado acrescentando 3ml de mix e 1µL de DNA amplificado. Para a análise das seqüências e a obtenção da fita consenso foi utilizado o programa computacional SeqScape 2.5® (Applied Biosystems, CA).

2.3. Obtenção do fragmento-alvo (sequência *barcode*)

Para manter o posicionamento e, conseqüentemente, a universalidade do fragmento-alvo obtido frente a outras sequências *barcodes* ou não-*barcodes* depositadas no GenBank® (Benson *et al.* 2010) e/ou no BOLD® (*Barcoding of Life Data System*, Ratnasingham & Hebert 2007), juntamente com as 20 sequências anteriores foram alinhadas também cinco acessos de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*A. thaliana* cultivar ser1, acesso AF144373.1; *A. thaliana* cultivar nd1, acesso AF144375.1; *A. thaliana* cultivar no0, acesso AF144376.1; *A. thaliana* cultivar ka0, acesso AF144377.1; e *A. thaliana* cultivar su0, acesso AF144378.1). Todas essas sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW® (Thompson *et al.* 1994), sendo os alinhamentos, posteriormente, verificados e editados manualmente.

Para a obtenção do fragmento-alvo, os *primers* XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010), próprios para Alismatales, foram incluídos, manualmente, aos alinhamentos anteriores, sendo a região compreendida entre os *primers* então recortada (Figura 1). O fragmento-alvo obtido (sequência *barcode*) foi utilizado para as demais análises e comparações.

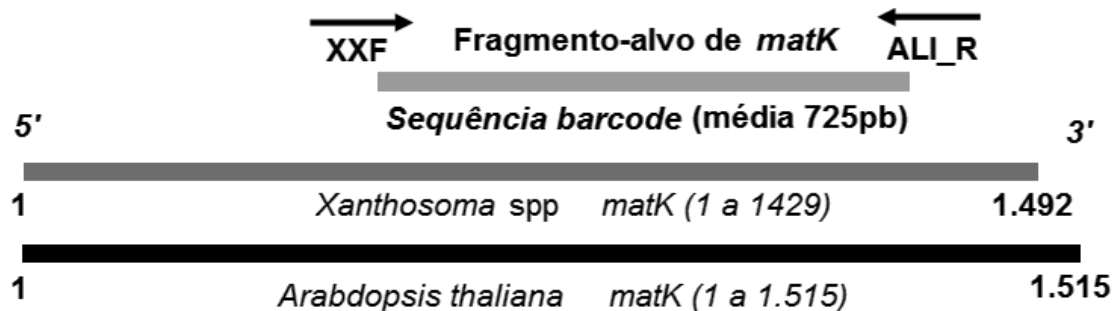


Figura 1. Posicionamento do fragmento-alvo (sequência *barcode*) em relação ao gene *matK* das sequências obtidas para as diferentes espécies de *Xanthosoma* Schott e a sequência de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. É possível ainda observar a orientação dos *primers* XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010).

2.4. Análise das sequências

Após esta etapa, foi estimada a distância genética entre as espécies, utilizando o modelo de substituição Kimura 2 Parâmetros – K2P (Kimura 1980). As árvores foram geradas através do programa MEGA 5® (Tamura *et al.* 2011), utilizando *Neighbour-Joining* (NJ), com teste de *bootstrap* (Felsenstein 1985) com 1000 réplicas. A escolha tanto do modelo de substituição, quanto do método de distância seguiram as recomendações propostas pelo *Barcoding of Life Data System* (BOLD, Ratnasingham & Hebert 2007). A variação interespecífica foi calculada, segundo Meyer & Paulay (2005), também usando o modelo K2P (Kimura 1980), com base nas distâncias genéticas estimadas entre as diferentes espécies. A variabilidade existente foi avaliada através de parâmetros estatísticos (média e desvio-padrão).

2.5. Análise de sítios diagnósticos

Para avaliar melhor os limites da ferramenta de identificação, as sequências das 10 espécies de *Xanthosoma* (Tabela 1) foram comparadas entre si. Conforme Wong *et al.* (2009), essas sequências foram, inicialmente, visualizadas no programa MEGA 5® (Tamura *et al.* 2011), sendo identificados, manualmente, todos os sítios

variáveis, ou também chamados, sítios diagnósticos (Rach *et al.* 2008). Esses sítios diagnósticos foram então utilizados na construção de uma nova matriz de sequências alinhadas. Em seguida, dentre os sítios diagnósticos, foram selecionados somente os sítios diagnósticos puros, ou seja, aqueles que apresentavam variação em apenas um dos táxons (sítios autoapomórficos). As espécies foram, então, comparadas aos pares entre si. Sítios diagnósticos com *missing data* foram desconsiderados.

3. Resultados e Discussão

O comprimento do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* obtido foi de 695pb. A variação interespecífica média foi de 0,00396977 ($\pm 0,00169862$) (Tabela 2). A matriz com todas as distâncias genéticas encontra-se no Anexo I.

Tabela 2. Variação interespecífica entre as espécies de *Xanthosoma* Schott.

	Max.	Mín.	Média	DPadrão
Varição interespecífica	0,0105	0,0	0,00396977	$\pm 0,00169862$

A árvore de distância genética é apresentada na Figura 2. Com base em sua topologia foi possível verificar que Araceae forma um agrupamento fortemente suportado (*bootstrap* = 100). Dentro de Araceae, a primeira espécie a divergir é *Colocasia esculenta*, pertencente à tribo Colocasieae (Mayo *et al.* 1997) (*bootstrap* = 100). Todas as espécies pertencentes à tribo Caladieae-Zomicarpeae (*sensu* Batista 2008) divergem a seguir, formando um só grupo, também fortemente suportado (*bootstrap* = 96). Caladieae-Zomicarpeae apresenta uma politomia composta por *Caladium lindenii* que permanece isolado de outros três grupos: o primeiro, formado por *Filarum manserichense* e por *Ulearum sagittatum* Engl. (*bootstrap* = 99), o segundo por *Zomicarpella amazonica* e *Scaphispatha gracilis* e o terceiro, e último, que agrupa todas as espécies de *Xanthosoma* (*bootstrap* = 98). No grupo formado

pelas espécies de *Xanthosoma*, as espécies *Xanthosoma pottii* e *X. riedelianum* permanecem agrupadas entre si (Grupo II) e formam um grupo distinto das demais espécies de *Xanthosoma*. *X. taioba* aparece como espécie-irmã (*bootstrap* = 100) das espécies restantes (*X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum* e *X. violaceum*) que juntas formam um grupo a parte (Grupo I), bem suportado (*bootstrap* = 88).

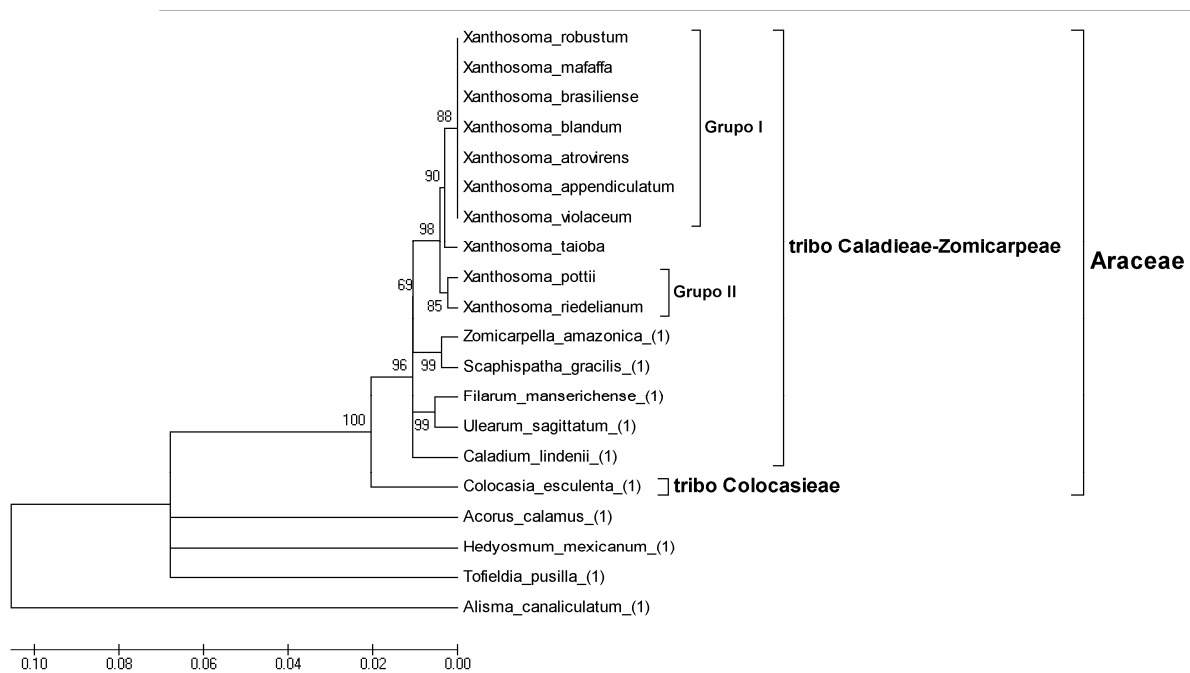


Figura 2. Árvore com as espécies de *Xanthosoma* Schott, baseada nas sequências do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura – 2P, MEGA 5®).

Considerando-se apenas as espécies cultivadas de *Xanthosoma*, ainda com base na Figura 2, é possível notar que as espécies *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum* e *X. violaceum* (Grupo I) apresentaram 0% de variação interespecífica entre si, ou seja, apresentam a mesma identidade molecular. Por sua vez, podemos notar também que *X. pottii*, *X. riedelianum* e *X. taioba* comportaram-se como unidades independentes e distintas destas sete espécies anteriores.

Em situações como esta, na qual os métodos de distância não foram suficientes para discriminar entre sequências *barcodes* extremamente similares, a

análise dos sítios diagnósticos pode representar uma possibilidade adicional para a identificação das espécies (Rach *et al.* 2008; Tavares & Baker 2008; Wong *et al.* 2009; Gonçalves 2009).

Segundo Rach *et al.* (2008), na análise de sítios diagnósticos cada sítio das sequências de nucleotídeos pode ser tratado como se fosse um caráter, sendo as bases (A, T, C e G) variações nesse estado de caráter. Assim, segundo esses autores, diferenças na composição dos sítios que apresentam alguma variação entre as espécies poderiam ser utilizadas no reconhecimento de unidades taxonômicas. Porém, segundo Wong *et al.* (2009), não basta apenas que os sítios apresentem alguma variação na composição de seus caracteres. Como o objetivo é a identificação de unidades taxonômicas distintas é preciso que uma espécie apresente um estado em determinado sítio e a outra um estado distinto da primeira para esse mesmo sítio. Nesse caso, apenas os sítios diagnósticos puros poderiam ser utilizados na separação, inequívoca, entre duas espécies.

Entre as 10 espécies de *Xanthosoma* analisadas existem apenas 10 sítios diagnósticos. Desses, apenas seis são diagnósticos puros (Tabela 3). As espécies *X. pottii* e *X. taioba* apresentaram substituições diagnósticas suficientes para distingui-las entre si e também com relação as demais espécies. Contudo, as espécies *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum*, *X. violaceum* e *X. riedelianum* não apresentaram qualquer diferença entre si formando, deste modo, uma única unidade biológica. As sequências *barcodes* completas destas dez espécies de *Xanthosoma* são apresentadas no Anexo II.

Tabela 3. Posição relativa e composição dos sítios diagnósticos para cada uma das 10 espécies de *Xanthosoma* Schott (Araceae) analisadas. ⁽¹⁾ Fragmento-alvo de *matK* de 695pb recortado a partir das sequências originais de *Xanthosoma* Schott utilizando os primers XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010). ⁽²⁾ Sequência de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Total = 1536pb (originalmente, 1515pb + 21 *gaps* nas posições 599-608, 616-623 e 774-774).

Espécie	Nucleotídeos diagnósticos					
	Posição na sequência <i>barcode</i> ⁽¹⁾	57	143	172	259	398
Posição na sequência de <i>A. thaliana</i> ⁽²⁾	605	691	720	807	946	973
<i>Xanthosoma appendiculatum</i> Schott	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma atrovirens</i> K. Koch & C.D. Bouché	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma blandum</i> Schott	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma brasiliense</i> (Desf.) Engl.	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma robustum</i> Schott	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma maffafa</i> Schott	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma violaceum</i> Schott	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma riedelianum</i> Schott	A	C	A	G	C	C
<i>Xanthosoma taioba</i> E.G. Gonç.	A	A	C	G	C	C
<i>Xanthosoma pottii</i> E.G. Gonç.	C	C	A	T	A	T

Portanto, nem mesmo através da análise dos sítios diagnósticos presentes na sequência *barcode* de *matK* foi possível recuperar a identificação molecular inequívoca de *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum* e *X. violaceum*.

Porém, embora uma identificação específica não tenha sido alcançada, estes resultados indicam que estas sete espécies de *Xanthosoma* têm uma história evolutiva muito próxima, o que explicaria porque divergências em seu DNA ainda não estariam fixadas. Aqui encontra-se uma das maiores limitações em uma abordagem *DNA barcoding*: a dificuldade no reconhecimento de espécies recentemente irradiadas, principalmente se estas espécies ainda estiverem compartilhando haplótipos (Hebert *et al.* 2003a; Hebert *et al.* 2009; Lukhtanov *et al.* 2009; Valdez-Moreno *et al.* 2009), como pode ser o caso de *Xanthosoma*.

Numa abordagem *DNA barcodes sensu stricto*, que tem como objetivo a identificação específica (Hebert *et al.* 2003a), poderíamos simplesmente aceitar que não foi possível reconhecer molecularmente, com base no fragmento-alvo de *matK*, as espécies cultivadas de *Xanthosoma*. Contudo, os mesmos resultados, vistos à luz de uma abordagem *DNA barcodes latu sensu* (Xue & Li 2011), poderiam ser considerados importantíssimos e bastante elucidativos com relação à sistemática das espécies cultivadas de *Xanthosoma*, com sérias implicações, não só na circunscrição propriamente dita dessas espécies, mas também no reconhecimento e análise de seus padrões de diversidade e evolução.

Para tanto, inicialmente, devemos considerar que seja qual for a abordagem *DNA barcoding* considerada, o conceito de espécie adotado é, basicamente filogenético, ou seja, as espécies são unidades taxonômicas que compartilham um único ancestral comum, formando assim grupos monofiléticos (Hebert *et al.* 2003a). Assim, o Grupo I, composto por *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum* e *X. violaceum*, formaria uma só unidade taxonômica, inclusive, como visto, com divergência nucleotídica igual a zero (Figura 2), pelo menos para o marcador utilizado.

Contudo, Gonçalves (2011) reconhece uma série de características morfológicas, suficientes para sua identificação e circunscrição taxonômica. Segundo este autor, *X. robustum*, embora bastante variável, tem como principais características a presença, nos indivíduos adultos, de caule epígeo e folhas com 7-12 nervuras laterais (Figura 3, A-B). Além disso, seus estaminódios nunca são róseos. Já *X. maffafa* apresenta folhas grandes e patentes, com pecíolos cerosos e usualmente róseos em sua porção distal (Fig. 3, C). Suas inflorescências apresentam estaminódios de cor rosa (Fig. 3, D). *X. brasiliense* é a única espécie cultivada com folhas hastadas a subpedadas, com cormos grandes e nunca arredondados (Figura 4, A). Por sua vez, *X. blandum* é caracterizada pelos cormos cilíndricos e ramificados e pelas folhas com lóbulos posteriores agudos e algo extrorsos (Fig. 4, B). Suas inflorescências também apresentam estaminódios de coloração rósea. *X. atrovirens* pode ser reconhecida pela coloração verde escura da superfície adaxial das folhas que, quase sempre, apresentam o ápice dos lóbulos arredondados (Fig. 4, C). Ainda, embora *X. atrovirens* apresente os pecíolos recobertos por uma camada cerosa, que lhes confere um aspecto azulado, ao contrário de *X. violaceum*, quando a cera é retirada, seus pecíolos não são

arroxeados. Já em *X. violaceum*, invariavelmente, os pecíolos, as nervuras e os pedúnculos são arroxeados, mesmo após a retirada da camada cerosa que os recobre. Esta última espécie também tem estaminódios de cor rosa (Fig. 4, D). Por fim, *X. appendiculatum* apresenta folhas verde-escuras com um apêndice foliáceo em sua superfície abaxial, característica que a distingue de todas as outras espécies cultivadas (Figura 5, A).



Figura 3. Espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae). A. Folhas de *X. robustum* Schott. B. Detalhe do caule epígeo de *X. robustum* Schott. C. Detalhe da folha de *X. maffafa* Schott. D. Detalhe da espádice de *X. maffafa* Schott. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves.

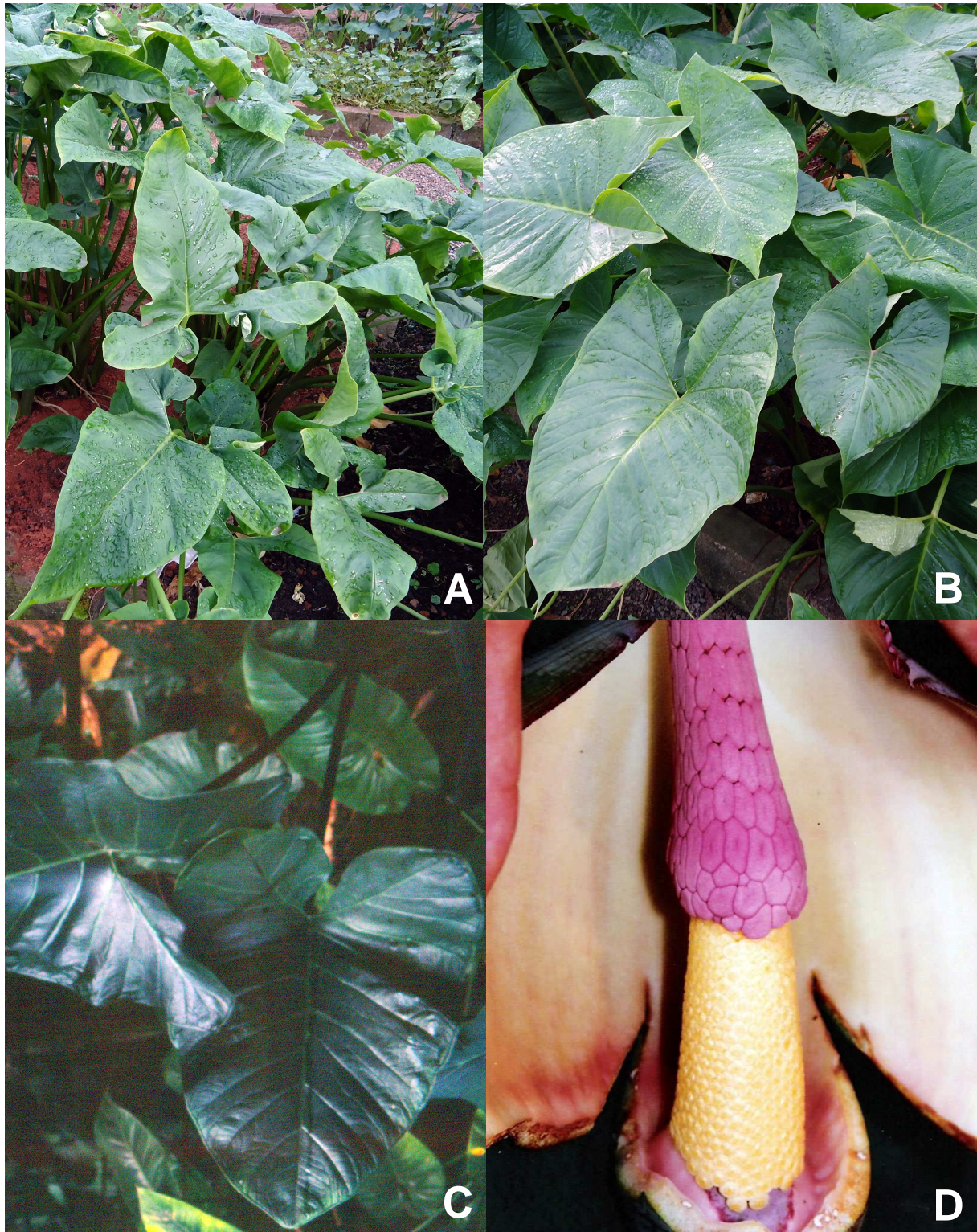


Figura 4. Espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae). A. Hábito de *X. brasiliense* (Desf.) Engl. B. Hábito de *X. blandum* Schott. C. Detalhe da folha de *X. atrovirens* K. Koch & C.D. Bouché. D. Detalhe da espádice de *X. violaceum* Schott. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves.

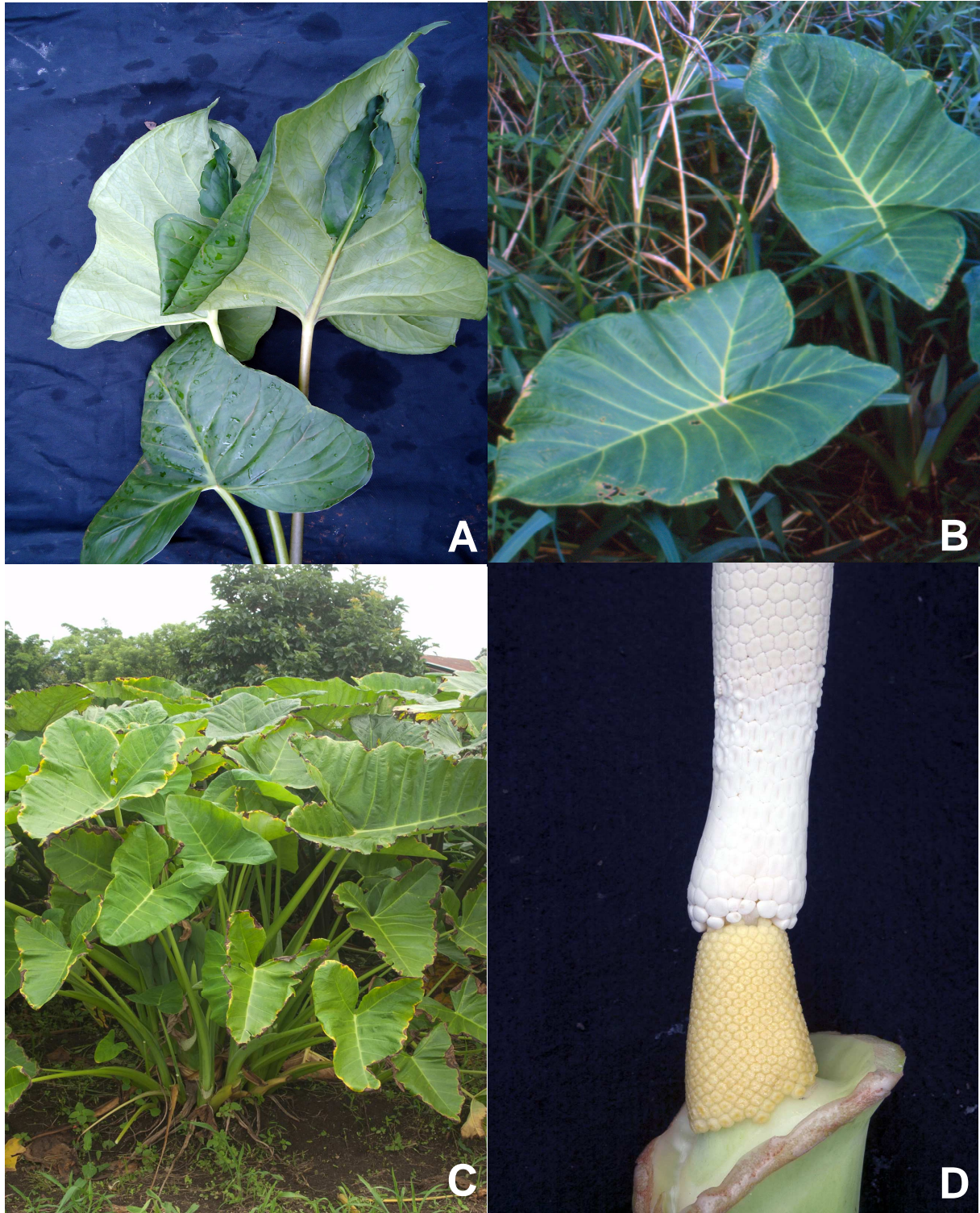


Figura 5. Espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae). A. Detalhe das folhas de *X. appendiculatum* Schott. B. Hábito de *X. taioba* E.G. Gonç. C. Hábito de *X. sagittifolium* (L.) Schott. D. Detalhe da espádice de *X. sagittifolium* (L.) Schott. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves.

Esse impasse pode ser resolvido se considerarmos *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum* e *X. violaceum* como táxons infra-específicos de uma única espécie. Assim, continuaríamos a manter uma só unidade taxonômica e as formas continuariam a ser distintas morfologicamente, como ocorre com *Brassica oleracea* (Ananga *et al.* 2008) e com *Colocasia esculenta* (Rao *et al.* 2010).

Num primeiro momento, poderíamos pensar em *X. sagittifolium* como sendo essa espécie. Nesse contexto, *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum* e *X. violaceum* seriam variedades ou cultivares de *X. sagittifolium*. Circunscrições similares já haviam sido propostas anteriormente por Bunting (1979) e Giacometti & Léon (1994), porém lhes faltava maior embasamento. Embora plausível, ao adotarmos essa circunscrição, necessariamente precisaríamos ter sequenciado *X. sagittifolium*, o que, infelizmente, não foi possível. Isto porque somente em 2011 a espécie brasileira considerada *X. sagittifolium* foi reconhecida como distinta (*X. taioba*) por Gonçalves (2011), principalmente por apresentar as nervuras secundárias mais claras que o limbo e nunca desnudadas na base, além de estaminódios róseos (Figura 5, B). Por sua vez, *X. sagittifolium* tem nervuras secundárias concolores e estaminódios amarelados (Fig. 5, C-D). *Xanthosoma taioba* aparece em nossas análises como espécie-irmã do Grupo I, claramente distinta e independente destas sete espécies, tanto pela análise de sítios diagnósticos (Tabela 3) quanto pela árvore de distâncias genéticas (Figura 2), corroborando a circunscrição dada por Gonçalves (2011). Aliás, os altos índices de suporte encontrados indicariam que essa árvore de distâncias evidenciaria, de alguma forma, as relações evolutivas entre as espécies, para o marcador considerado, não sendo os agrupamentos apenas um artefato da análise (Schneider 2003, Meyer & Paulay 2005; Gonçalves 2009; Moniz & Kaczmarek 2010).

Se considerarmos a distribuição geográfica original das 10 espécies de *Xanthosoma* estudadas e uma ainda não estudada (*X. sagittifolium*), podemos notar que as espécies cultivadas estariam distribuídas em três padrões característicos: um grupo mais ao leste da América do Sul, outro na América Central continental e no norte da América do Sul e um terceiro na porção insular da América Central (Figura 6).



Figura 6. Distribuição geográfica original das 10 espécies de *Xanthosoma* Schott (Araceae) estudadas e de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.

O grupo mais ao leste da América do Sul seria formado por *X. riedelianum* e *X. taioba*. Segundo Gonçalves (2011), embora a distribuição de *X. riedelianum* não seja clara, esta espécie é há muito tempo cultivada na região sudeste do Brasil. O mesmo acontece com *X. taioba*, que ocorria originalmente ao longo da costa brasileira.

O grupo distribuído na América Central continental e no norte da América do Sul seria formado por seis espécies: *X. mafaffa*, *X. robustum* e *X. violaceum* que ocorreriam da Costa Rica ao México (América Central continental) e por *X. atrovirens*, *X. blandum* e *X. appendiculatum* distribuídas em países como a Venezuela, a Guiana Francesa e o norte do Brasil.

X. sagittifolium, espécie normalmente confundida com *X. mafaffa* e *X. robustum*, seria a única espécie a integrar o terceiro grupo e permaneceria isolada geograficamente das demais, sendo, originalmente, distribuída nas Antilhas, Antilhas Espanholas e na Jamaica. A distribuição original de *X. brasiliense* ainda permanece desconhecida, pois essa espécie nunca foi coletada na natureza (Gonçalves 2011), mas seu cultivo ainda restringe-se ao norte da América do Sul, especialmente Venezuela e Trinidad-Tobago (J. Boos, com. pess.).

O arranjo descrito parece corresponder aos padrões de distribuição e migração dos principais grupos indígenas, tanto formadores do ramo Tupi, que segundo Noelli (1996), Heckenberger *et al.* (1998) e Pereira (2000), teriam se originado na região amazônica e migrado para o litoral até as regiões sudeste e sul do Brasil, quanto de outras etnias ameríndias em constante fluxo migratório e contato com povos característicos da América Central, como os olmecas e os maias (Stoltman *et al.* 2005; Bruhns *et al.* 2007). Além desses, os grupos caribes também têm origem provavelmente nas Guianas e teriam colonizado o arquipélago caribenho (Souza 1993; Meira & Franchetto 2005; Meira 2006). Merecem destaque ainda os Macuxis, etnia também originada nas Guianas que teria se deslocado para o interior do território brasileiro (Santilli 2004). Nesse contexto, poderíamos inferir que, inicialmente, as *Xanthosoma* foram domesticadas na porção norte da América do Sul, na região amazônica, e depois teriam migrado para a América Central continental e para o litoral brasileiro acompanhando a movimentação destes grupos humanos (Figura 7). Isso vai de encontro ao ponto de vista de Clement (1989), que cita a origem de *Xanthosoma* como sendo as áreas baixas da região Amazônica. Processos antrópicos como a domesticação, a seleção de cultivares e a transferência de germoplasma parecem ter sido determinantes para que a unidade taxonômica, formada pelas espécies que compõem o Grupo I, apresentasse suficiente variação fenotípica, porém ainda se mantivesse coesa no que diz respeito às sequências de *matK*.

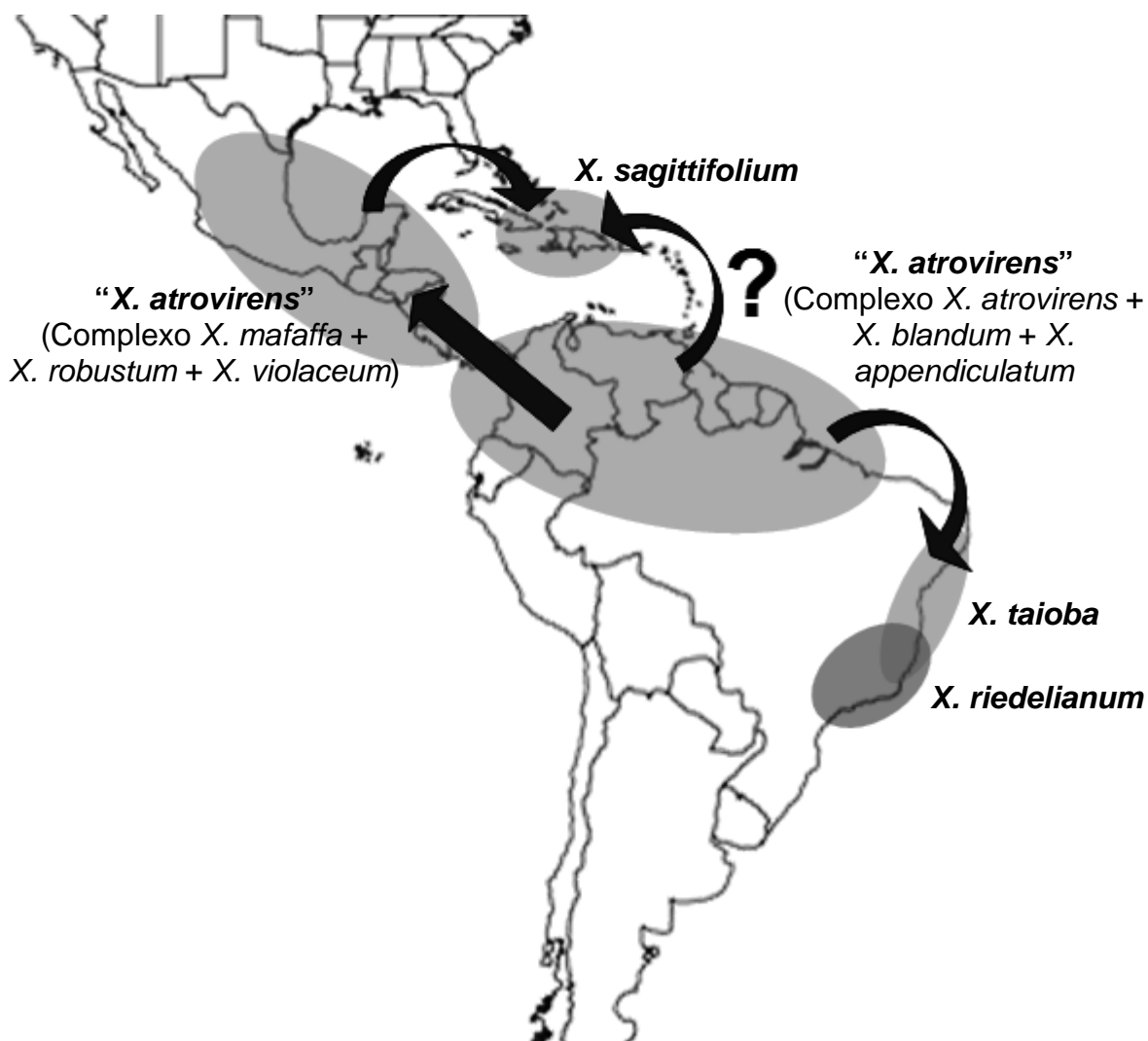


Figura 7. Possíveis processos de expansão e colonização das espécies cultivadas de taioba (*Xanthosoma* Schott, Araceae).

Assim, o complexo “*X. atrovirens* + *X. blandum* + *X. appendiculatum*” formaria, num primeiro momento, a base fundadora da unidade taxonômica “*X. atrovirens*”⁴. Aliás, muitas variedades têm sido atribuídas a *X. atrovirens* (Gonçalves 2011), dentre elas, *X. appendiculatum* (*sensu* Engler & Krause 1920) que apenas recentemente recuperou o *status* de espécie com base nos estudos filogenéticos de Batista (2008). Este mesmo estudo, além de mostrar *X. appendiculatum* como, filogeneticamente, distinta de *X. atrovirens*, posiciona *X. mafaffa*, *X. blandum*, *X. violaceum*, *X. brasiliense* e *X. robustum* como táxons relacionados a *X. atrovirens*.

⁴ *X. atrovirens* foi escolhida para designar a unidade taxonômica, pois é o táxon mais antigo.

Aliás, *X. appendiculatum* é, popularmente conhecida como tambatajá, espécie associada a um mito próprio da etnia Macuxi (Gonçalves 2011).

Com a expansão para o norte (natural ou associada a grupos humanos) e colonização de novos ambientes, possivelmente, tem-se um segundo momento, no qual "*X. atrovirens*" veio a apresentar as variações típicas do complexo "*X. mafaffa* + *X. robustum* + *X. violaceum*". Gonçalves (2011) afirma que *X. robustum* é uma espécie extremamente variável, e que é normalmente confundida com *X. mafaffa*, da qual difere pela ausência de estaminódeos róseos e por não apresentar estigmas amarelo brilhantes. Aqui é conveniente ressaltar que neste mesmo estudo este autor considera *X. roseum* Schott como sinônimo de *X. mafaffa*, enquanto outros autores como Standley & Steyermark (1958), por sua vez, consideram *X. roseum* uma sinonímia de *X. robustum*. *X. blandum*, espécie que ocorre no norte da América do Sul, também já foi considerada uma variedade de *X. mafaffa* por Engler & Krause (1920). *X. violaceum*, assim como *X. blandum* e *X. mafaffa* apresenta estaminódios de cor rosa, porém é distinta destas espécies por apresentar, invariavelmente, os pecíolos e os pedúnculos arroxeados (Gonçalves 2011). Assim, pelo exposto, fica clara a estreita relação que as espécies de ambos os complexos guardam entre si e com relação às demais. Também é evidente a sua dificuldade de correta circunscrição taxonômica.

Com base na sua afinidade morfológica com o complexo "*X. mafaffa* + *X. robustum* + *X. violaceum*" podemos inferir que *X. sagittifolium*, possivelmente, representaria um evento de dispersão desses germoplasmas do continente centro-americano para a porção insular do América Central, mas não possuímos aqui dados que corroborem estes fatos, pela ausência de sequência de *X. sagittifolium*. Finalmente, *X. riedelianum* e *X. taioba*, ocorrentes no leste da América do Sul, teriam sua distribuição associada ao fluxo migratório característico do ramo Tupi. Aqui é importante salientar que outros grupos vegetais cultivados apresentam distribuição similar, também estreitamente relacionada com o fluxo migratório das comunidades indígenas americanas, como é o caso de *Theobroma* L. (Motamayor *et al.* 2002).

Alguns aspectos citogenéticos também corroboram esse arranjo em algumas das principais espécies cultivadas como táxons infra-específicos de "*X. atrovirens*". Sales (2010, dados não publicados), em um estudo citogenético preliminar afirmou existir variação no número de cromossomos entre as espécies de taioba. Das 19

espécies por ela analisadas, 12 (64%) apresentam $2n=26$. Estariam nesse grupo *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens* e *X. violaceum* que, com exceção de *X. appendiculatum*, formam, exatamente, o Grupo I (Figura 2). *X. appendiculatum*, *X. taioba* e *X. riedelianum* seriam espécies triplóides ($2n=39$). De qualquer maneira, algumas destas espécies podem ser resultado de hibridização com grupos não tão próximos, mas que mantiveram a linhagem plastidial materna, gerando a baixa diferenciação na sequência do *matK*. Além disso, com o cultivo e a propagação destas espécies, possivelmente podem ter ocorrido variações no número cromossômico, como triploidia (Guerra, 1988). Estas variações podem ter sido acompanhadas de alterações morfológicas, como no caso de *X. appendiculatum* ($2n=39$), distinta das demais pela presença de um apêndice foliáceo na superfície adaxial de suas folhas (Gonçalves 2011). Já em *X. taioba* e *X. riedelianum* ($2n=39$), esta triploidia aliada a disjunção geográfica, teriam permitido que essas espécies seguissem um caminho evolutivo particular.

Portanto, os *DNA barcodes*, tomados em uma abordagem *sensu lato*, apontam para uma nova circunscrição taxonômica em *Xanthosoma*. Nessa circunscrição, "*X. atrovirens*" formaria uma única unidade taxonômica, composta por seis variedades ou cultivares. Assim as principais espécies cultivadas de taioba seriam, na verdade, uma única espécie, com marcada amplitude de variação fenotípica, alcançada tanto por processos naturais quanto pela intervenção do homem. Um caso muito similar ocorreu em *C. esculenta*, outra espécie de Araceae de interesse alimentar, cujas diversas cultivares são distintas morfológicamente, mas formam uma única categoria infra-específica (Rao *et al.* 2010). Corroborariam tal afirmação aspectos morfológicos, citogenéticos, geográficos e evolutivos.

4. Conclusão

Os resultados obtidos apontam para duas possíveis conclusões. A primeira é que a abordagem código de barras de DNA foi capaz de detectar uma espécie fortemente polimórfica ("*X. atrovirens*") a partir de um complexo de entidades historicamente consideradas como espécies distintas (*X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens* e *X. violaceum*). A segunda possível conclusão - antagônica em relação à primeira - é que, realmente, os *DNA barcodes*

apresentam uma séria limitação, não sendo capazes de recuperar, de forma inequívoca, a identificação de espécies irradiadas recentemente, como parece ser o caso das principais espécies cultivadas de taioba (*Xanthosoma*, Araceae). De qualquer forma, como visto, a abordagem *DNA barcodes* pode ir muito além do reconhecimento inequívoco de espécies. Ao aliarmos a essa ferramenta conhecimentos adicionais sobre a morfologia, a ecologia, a taxonomia e os padrões evolutivos do grupo, os *DNA barcodes* passam a figurar também como uma ferramenta preliminar, porém consistente, de interpretação evolutiva, sobretudo, se considerarmos a existência de forte sinal filogenético na sequência *barcode* de *matK* estudada.

5. Recomendações

Mesmo considerando o fragmento-alvo de *matK* como uma ferramenta capaz de recuperar agrupamentos com significado biológico, a variação molecular entre *X. robustum*, *X. maffafa*, *X. brasiliense*, *X. blandum*, *X. atrovirens*, *X. appendiculatum* e *X. violaceum* não foi detectada através do uso desta ferramenta. Assim, além do aumento do desenho amostral que deve contemplar, obrigatoriamente, mais de uma sequência para cada espécie, pertencentes a acessos distintos geograficamente, recomendamos ainda a utilização de outras ferramentas moleculares, tais como RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e microssatélites, já aplicadas com grande sucesso em *C. esculenta* (Rao *et al.* 2010), para a adequada análise da variabilidade genética em *Xanthosoma*. Além disso, após o sequenciamento de *X. sagittifolium* recomenda-se também a utilização de análises filogenéticas, que envolvam mais marcadores, de diferentes origens, para o adequado entendimento das relações evolutivas e dos processos de colonização em *Xanthosoma*. Entendemos que, só então, uma adequada re-circunscrição de “*X. atrovirens*” poderá ser adequadamente avaliada e proposta.

6. Referências Bibliográficas

Abramo, M. **Taiobas, carás e inhames**. São Paulo, Ícone.

Ananga, A.O.; Cebert, E.; Soliman, K.; Kantety, R.; Konan, K. & Ochieng, J.W. 2008. Phylogenetic relationships within and among *Brassica* species from RAPD loci associated with blackleg resistance. **African Journal of Biotechnology** 7: 1287-1293.

Ardura, A.; Linde, A.R.; Moreira, J.C. & Garcia-Vazquez, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation** 143: 1438-1443.

Batista, A.R. 2008. **Filogenia do Complexo Caladieae-Zomicarpeae (Araceae) baseada em sequências do DNA plastidial**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília – UCB.

Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J. & Sayers, E.W. 2010. GenBank. **Nucleic Acids Research** 39 (Database issue): D32-7.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2010. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília, Mapa/ACS.

Bunting, G.S. 1979. Synopsis de las Araceae de Venezuela. **Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)** 10: 139-290.

Bruhns, K.O.; Kelker, N.L.; Rodríguez Martínez, M.C.; Ceballos, P.O.; Coe, M.D.; Diehl, R.A.; Houston, S.D.; Taube, K.A. & Calderón, A.D. 2007. Did the Olmec Know How to Write? **Science** 315: 1365–1366.

- Cabrera, L.I.; Salazar, G.A.; Chase, M.W.; Mayo, S.J.; Bogner, J. & Dávila, P. 2008. Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA. **American Journal of Botany** **95**: 1153-1165.
- Carvalho, E.F. & Cordeiro, J.A. 1990. Um método alternativo e eficiente de propagação vegetativa de inhame (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) e de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). **Acta Amazonica** **20**: 11-18.
- Castro, G. R. 2006. **Studies on cocoyam (*Xanthosoma* spp.) in Nicaragua, with emphasis on Dasheen mosaic virus**. Doctoral diss. Dept. of Plant Biology and Forest Genetics, SLU. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.
- Chase, M.W.; Salamin, N.; Wilkinson, M.; Dunwell, J.M.; Kesanakurthi, R.P.; Haidar, N. & Savolainen, V. 2005. Land plant and DNA barcodes: short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **360**: 1889–1895.
- Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Hollingsworth, P.M.; van den Berg, C.; Madriñán, S.; Petersen, G.; Seberg, O.; Jørgensen, T.; Cameron, K.M. & Carine, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. **Taxon** **56**: 295–299.
- Clement, C.R. 1989. A center of crop genetic diversity in western Amazonia. **BioScience** **39**: 624-631.
- Corrêa, M.G. 2000. **Ciclo celular e microsporogênese de espécies da família Araceae, coletadas no sul do Brasil**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.
- Cuénoud, P.; Savolainen, V.; Chatrou, L.W.; Powell, M.; Grayer, R.J. & Chase, M.W. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA

- and plastid *rbcL*, *atpB* and *matK* DNA sequences. **American Journal of Botany** **89**: 132-144.
- Dalebout, M.L.; Baker, C.S.; Mead, J.G.; Cockcroft, V.G. & Yamada, T.K. 2004. A comprehensive and validated molecular taxonomy of beaked whales, family Ziphiidae. **Journal of Heredity** **95**: 459-473.
- deWaard, J.R.; Landry, J.F.; Schmidt, B.C.; Derhousoff, J.; McLean, J.A. & Humble, L.M. 2009. In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. **Biodiversity and Conservation** **18**: 3825-3839.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochemical Bulletin** **19**: 11-15.
- Dunning, L.T. & Savolainen, V. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. **Botanical Journal of the Linnean Society** **164**: 1-9.
- Engler, A. & Krause, K. 1920. Araceae - Colocasioideae. In: Engler, A. (ed.). **Das Pflanzenreich IV**. 23E (Heft 71): 3-139.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** **39**: 783-791.
- Garcia-Robledo, C.; Kattan, G.; Murcia, C. & Quinttero-marín. 2004. Beetle pollination and fruit predation of *Xanthosoma daguense* (Araceae) in an Andean cloud forest in Colombia. **Journal of Tropical Ecology** **20**: 459–469.
- Giacometti, D.C. & León, J. 1994. Tannia, Yautia. In: Hernando-Bermejo, J.E. & León, J. (eds). Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. **Plant Production and Protection Series** **26**: 253-258.

- Gonçalves, E.G. 2000. *Xanthosoma riparium* (Araceae), a new species from Goiás, Brasil. **Novon** **10**: 26-28.
- Gonçalves, E.G.; Paiva, E.A. & Nadruz-Coelho, M.A. 2004a. A preliminary survey of petiolar collenchyma in the Araceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **91**: 473-484.
- Gonçalves, E.G.; Diener, P.S.; Sousa, C.; Grazielle, A. & Pima, G.O. 2004b. A preliminary survey of gynoeceum morphology in *Xanthosoma*. **Aroideana** **27**: 182-189.
- Gonçalves, P.F. 2009. **O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.
- Gonçalves, E.G. 2011. The commonly cultivated species of *Xanthosoma* Schott (Araceae), including four new species. **Aroideana** **34**: 3-23.
- Gonçalves, E.G. & Lorenzi, H. 2011. **Morfologia Vegetal: Organografia e Dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. (2ª. ed.). Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Gravendell, G.B.; Chase, M.W.; Vogel, E.F.; Roos, M.C.; Mes, T.H. & Bachmann, R. 2001. Molecular Phylogeny of *Coelogyne* (Epidendroideae: Orchidaceae) based on plastid RFLP, *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences: evidence for polyphyly. **American Journal of Botany** **88**: 1915-1927.
- Guerra, M. S. 1988. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan.
- Hajibabaei, M.; Janzen, D.H.; Burns, J.M.; Hallwachs, W. & Hebert, P.D. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **103**: 968-971.

- Hebert, P.D.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **270**: 313–321.
- Hebert P.D.; Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **270**: S96–S99.
- Hebert, P.D.; Stoeckle, M.Y.; Zemplak, T.S. & Francis, C.M. 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. **Public Library of Science Biology** **2**: 1657-1663.
- Hebert, P.D.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H. & Hallwachs, W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **101**: 14812-14817.
- Hebert, P.D.N.; deWaard, J.R.; Landry, J.F. 2009. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. **Biology Letters**. doi: 10.1098/rsbl.2009.0848.
- Heckenberger, M.J.; Neves, E.G. & Petersen, J.B. 1998. De onde surgem os modelos? As origens e expansões Tupi na Amazônia Central. **Revista de Antropologia** **41**: 69-96.
- Hilu, K.W.; Black, C.; Diouf, D. & Burleigh, G. 2008. Phylogenetic signal in *matK* vs. *trnK*: A case study in early diverging eudicots (angiosperms). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **48**: 1120–1130.
- Hilu, K.W.; Borsch, T.; Müller, K.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Savolainen, V.; Chase, M.W.; Powell, M.P.; Alice, L.A.; Evans, R.; Sauquet, H.; Neinhuis, C.; Slotta, T.A.; Rohwer, J.G., Campbell, C.S. & Chatrou, L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. **American Journal of Botany** **90**: 1758–1776.

Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Erickson, D.L.; Fazekas, A.J.; Graham, S.W.; James, K.E.; Kim, K.-J.; Kress, W.J.; Schneider, H.; van Alphenstahl, J.; Barrett, S.C.; van den Berg, C.; Bogarin, D.; Burgess, K.S.; Cameron, K.M.; Carine, M.; Chacón, J.; Clark, A.; Clarkson, J.J.; Conrad, F.; Devey, D.S.; Ford, C.S.; Hedderson, T.A.; Hollingsworth, M.L.; Husband, B.C.; Kelly, L.J.; Kesanakurti, P.R.; Kim, J.S.; Kim, Y.-D.; Lahaye, R.; Lee, H.-L.; Long, D.G.; Madriñán, S.; Maurin, O.; Meusnier, I.; Newmaster, S.G.; Park, C.-W.; Percy, D.M.; Petersen, G.; Richardson, J.E.; Salazar, G.A.; Savolainen, V.; Seberg, O.; Wilkinson, M.J.; Yi, D.-K. & Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **106**: 12794-12797.

Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **Public Library of Science ONE** **6**: e19254.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** **16**: 111-120.

Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weigt, L.A. & Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **102**: 8369-8374.

Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Jones, F.A.; Swenson, N.G.; Perez, R.; Sanjur, O. & Bermingham, E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **106**: 18621-18626.

Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Swenson, N.G.; Thompson, J.; Uriarte, M. & Zimmerman, J.K. 2010. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot. **Public Library of Science ONE** **5**: e15409.

- Lahaye, R.; Van der Bank, M.; Bogarin, D.; Warner, J.; Pupulin, F.; Gigot, G.; Maurin, O.; Duthoit, S.; Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **105**: 2923–2928.
- Leite, G.L.; Nascimento, A.F.; Alves, S.M.; Cerqueira, V.M. & Costa, C.A. 2011. Insetos associados em mangarito em diferentes sistemas de cultivo. **Enciclopédia Biosfera** **7**: 1-7.
- Lima, T.A. 2009. **Caracterização de compostos nutricionais e antinutricionais em taiobas (*Xanthosoma Schott*)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília – UnB.
- Longhurst, R. & Lipton, M. 1989. The role of agricultural research and secondary food crops in reducing seasonal food insecurity. In: Sahn, D.E. (ed.). **Seasonal Variability in Third World Agriculture: The consequences for food security**. London, IFPRI/Johns Hopkins University Press.
- Lorenzi, H. & Mello-Silva, L.E. 2003. **As Plantas Tropicais de R. Burle Marx**. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Lukhtanov, V.A.; Sourakov, A.; Zakharov, E.V. & Hebert, P.D. 2009. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. **Molecular Ecology Research** **9**: 1302-1310.
- Mayo, S.J.; Bogner, J. & Boyce, P.C. 1997. **The genera of Araceae**. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Meira, S. & Franchetto, B. 2005. The southern Cariban languages and the Cariban family. **International Journal of American Linguistics** **71**: 127-192.

- Meira, S. 2006. A família lingüística Caribe (Karíb). **Revista de Estudos e Pesquisas FUNAI 3**: 157-174.
- Meyer, C.P. & Paulay, G. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. **Public Library of Science Biology 3**: 2229-2238.
- Moniz, M.B. & Kaczmarska, I. 2010. Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. **Protist 161**: 7-34.
- Morais, V.S.; Martins, J.A.; Weber, M.B. & Sena, D.R. 2006. Efeito do tipo de cultivo no conteúdo de vitamina C em folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia 1**: 64-68.
- Moritz, C. & Cicero, C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. **Public Library of Science Biology 2**: e354.
- Motamayor, J.C.; Risterucci, A.M.; Lopez, P.A.; Ortiz, C.F.; Moreno, A.; Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity 89**: 380–386.
- Neuhaus, H. & Link, G. 1987. The chloroplast tRNA Lys (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. **Current Genetics 11**: 251–257.
- Noelli, F.S. 1996. As hipóteses sobre o centro de origem e rotas de expansão dos Tupi. **Revista de Antropologia 39**: 7-53.
- Pereira, M.S. 2000. **Índios Tupi-Guarani na pré-história**. Alagoas, Ed. Universidade Federal de Alagoas – UFAL.
- Pinto, N.A.; Boas, B.M. & Carvalho, V.D. 1999. Caracterização mineral das folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). **Ciência e Agrotecnologia 23**: 57-61.

- Pinto, N.A.; Carvalho, V.D.; Corrêa, A.D. & Rios, A.O. 2001a. Avaliação de fatores antinutricionais das folhas da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). **Ciência e Agrotecnologia** **25**: 601-604.
- Pinto, N. A.; Fernandes, S.M.; Thé, P.M.; Carvalho, V.D. 2001b. Variabilidade da composição centesimal, vitamina C, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). **Revista Brasileira de Agrociência** **7**: 205-208.
- Rach, J.; DeSalle, R.; Sarkar, I.N.; Schierwater, B. & Hadrys, H. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. **Proceedings of the Royal Society B** **275**: 237-247.
- Rao, R.V.; Matthews, P.J.; Eyzaguirre, P.B.; Hunter, D. (eds.). 2010. **The Global Diversity of Taro: Ethnobotany and Conservation**. Rome, Bioversity International.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data system. **Molecular Ecology Notes** **7**: 355–364.
- Salako, F.K.; Lal, R. & Swift, M.J. 1995. Intercropping oil palm (*Elaeis guineensis*) with cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) on windrows and non-windrows in southern Nigeria. **Journal of Sustainable Agriculture** **6**: 47-60.
- Sales, V.A. 2009. **Estudos citogenéticos em *Xanthosoma* Schott (Araceae)**. Monografia de conclusão de curso, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília – UCB.
- Santilli, P. 2004. Makuxi. In: Instituto Socioambiental – ISA. 2011. **Povos Indígenas no Brasil**, <<http://pib.socioambiental.org/pt/povo/makuxi/740>>, Acessado em: 29/12/2011.

- Santos, A.H. 2005. **O vale do rio Taia-Hy – Levantamento de aráceas e dioscoriáceas comestíveis no litoral norte catarinense**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- Santos, W.M.; Silva, M.B.; Seabra, J.R.; Nolasco, F.; Campos, R.A. & Rodrigues, L.F. 2011. Produção de mudas de taioba em função de diferentes tipos e tamanhos de rizomas. In: 51^o. Congresso Brasileiro de Olericultura. Hortaliças: da origem aos desafios da saúde e sustentabilidade (Suplemento - CD ROM). **Horticultura Brasileira 29**: S1989-S1996.
- Schneider, H. 2003. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Ribeirão Preto, Ed. Holos.
- Schott, H.W. 1832. **Araceae**. Meletemata Botanica, C. Gerold, Vienna. 16-22.
- Seganfredo, R.; Finger, F.L.; Barros, R.S. & Mosquim, P.R. 2001. Influência de colheita sobre a deterioração pós-Colheita em folhas de taioba. **Horticultura Brasileira 19**: 184-187.
- Soltis, P.S; Soltis, D.E. & Doyle, J.J. 1998. **Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing**. New York, Springer.
- Souza, S.D. 1993. **Alguns aspectos morfológicos da língua arara (Karíb)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Linguística, Universidade de Brasília – UnB.
- Souza, C.S. 2008. **Propagação *in vitro* de germoplasma de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa – UFV.

- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado na APG II.** (2ª. ed.). Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Standley, P. C. & J. A. Steyermark. 1958. Araceae, in Flora of Guatemala. **Fieldiana Botany** 304–363.
- Steele, K.P. & Vilgalys, R. 1994. Phylogenetic analysis of Polemoniaceae using nucleotide sequences of plastid gene *matK*. **Systematic Biology** 19: 126–142.
- Stoltman, J.B.; Marcus, J.; Flannery, K.V.; Burton, J.H. & Moyle, R.G. 2005. Petrographic evidence shows that pottery exchange between the Olmec and their neighbors was two-way. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102: 11213-11218.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted).
- Tavares, E.S. & Baker, A.J. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister species in diverse clades of birds. **BMC Evolutionary Biology** 8: 1-27.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.
- Towle, M.A. 1961. **The ethnobotany of precolumbian Peru.** Chicago, Aldine Publ. Co.

- Valdez-Moreno, M.; Ivanova, N.V.; Elías-Gutiérrez, M.; Contreras-Balderas, S. e Hebert, P.D. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **Journal of Fish Biology** **74**: 377–402.
- Ward, R.; Zemplack, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R. & Hebert, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **360**: 1847–1857.
- Wong, E.H.; Shivji, M.S. & Hanner, R.H. 2009. Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. **Molecular Ecology Resources** **9**: 243-256.
- Xue, C.-Y. & Li, D.-Z. 2011. Use of DNA barcode sensu lato to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae). **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 267–270.
- Yu, J.; Xue, J.H. & Zhou, S.L. 2011. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution** **49**: 176–181.

Anexo I. Matriz de distâncias genéticas para as diferentes espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae), baseada nas sequências do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* (Kimura – 2P, MEGA 5®).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acorus calamus	-									
Alisma canaliculatum	0,2361	-								
Tofieldia pusilla	0,1703	0,1850	-							
Hedyosmum mexicanum	0,1557	0,2286	0,1441	-						
Colocasia esculenta	0,1739	0,2112	0,1364	0,1649	-					
Zomicarpella amazonica	0,1815	0,2052	0,1327	0,1719	0,0415	-				
Filarum manserichense	0,1894	0,2096	0,1437	0,1820	0,0447	0,0289	-			
Ulearum sagittatum	0,1876	0,2077	0,1401	0,1801	0,0447	0,0274	0,0105	-		
Scaphispatha gracilis	0,1857	0,2134	0,1309	0,1760	0,0431	0,0075	0,0305	0,0289	-	
Caladium lindenii	0,1740	0,2092	0,1291	0,1684	0,0336	0,0197	0,0274	0,0258	0,0212	-
Xanthosoma appendiculatum	0,1821	0,2098	0,1314	0,1744	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197
Xanthosoma atrovirens	0,1821	0,2098	0,1314	0,1744	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197
Xanthosoma blandum	0,1821	0,2098	0,1314	0,1744	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197
Xanthosoma brasiliense	0,1821	0,2098	0,1314	0,1744	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197
Xanthosoma robustum	0,1821	0,2098	0,1314	0,1744	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197
Xanthosoma mafaffa	0,1821	0,2098	0,1314	0,1744	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197
Xanthosoma pottii	0,1860	0,2100	0,1350	0,1783	0,0448	0,0243	0,0336	0,0258	0,0258	0,0243
Xanthosoma riedelianum	0,1823	0,2100	0,1315	0,1746	0,0400	0,0197	0,0289	0,0243	0,0212	0,0197
Xanthosoma taioba	0,1820	0,2096	0,1295	0,1743	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197
Xanthosoma violaceum	0,1821	0,2098	0,1314	0,1744	0,0400	0,0197	0,0289	0,0274	0,0212	0,0197

Anexo I. (Continuação).

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Acorus calamus										
Alisma canaliculatum										
Tofieldia pusilla										
Hedyosmum mexicanum										
Colocasia esculenta										
Zomicarpella amazonica										
Filarum manserichense										
Ulearum sagittatum										
Scaphispatha gracilis										
Caladium lindenii										
Xanthosoma appendiculatum	-									
Xanthosoma atrovirens	0,0000	-								
Xanthosoma blandum	0,0000	0,0000	-							
Xanthosoma brasiliense	0,0000	0,0000	0,0000	-						
Xanthosoma robustum	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-					
Xanthosoma mafaffa	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-				
Xanthosoma pottii	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	-			
Xanthosoma riedelianum	0,0060	0,0060	0,0060	0,0060	0,0060	0,0060	0,0045	-		
Xanthosoma taioba	0,0060	0,0060	0,0060	0,0060	0,0060	0,0060	0,0105	0,0060	-	
Xanthosoma violaceum	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0105	0,0060	0,0060	-

Anexo II. Sequências completas do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* das diferentes espécies cultivadas de *Xanthosoma* Schott (Araceae) (MEGA 5®). Os sítios diagnósticos puros estão em **negrito**.

	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	CTTTTTTTCACGAATATCATAAATTGGAATAATCTTATTACTCCAAAGAAAT	50
X. appendiculatumT.....	
X. atrovirens	
X. blandum	
X. brasiliense	
X. robustum	
X. mafaffa	
X. pottii	
X. riedelianum	
X. violaceum	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	CTAACTATTATGGTTTTTCAAAGAGAATCCAAGACTCTTTTGTTCCTA	100
X. appendiculatum	
X. atrovirens	
X. blandum	
X. brasiliense	
X. robustum	
X. mafaffa	
X. pottiiC.....	
X. riedelianum	
X. violaceum	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	TATAATTCTTATGTGGTTGAATGCGAATCCATATTTGTTTTATCCGTAA	150
X. appendiculatumC.....	
X. atrovirensC.....	
X. blandumC.....	
X. brasilienseC.....	
X. robustumC.....	
X. mafaffaC.....	
X. pottiiC.....	
X. riedelianumC.....	
X. violaceumC.....	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	ACAATCCTCTTATTTACGATCCACATCTTCTGGAACCTTTCTTGAGCGAA	200
X. appendiculatumA.....	
X. atrovirensA.....	
X. blandumA.....	
X. brasilienseA.....	
X. robustumA.....	
X. mafaffaA.....	
X. pottiiA.....C.....	
X. riedelianumA.....C.....	
X. violaceumA.....	

Anexo II. (Continuação).

12345678901234567890123456789012345678901234567890
X. taioba CACATTTCCATGAAAAAATAGAACACATCTCGTAGTACTTTGTTGTAAT 250
X. appendiculatum
X. atrovirens
X. blandum
X. brasiliense
X. robustum
X. mafaffa
X. pottii
X. riedelianum
X. violaceum

12345678901234567890123456789012345678901234567890
X. taioba GATTTTCAGAAAACCCCTATGGTTGCTCAAGGATCCTTTCATGCATTATGT 300
X. appendiculatum
X. atrovirens
X. blandum
X. brasiliense
X. robustum
X. mafaffa
X. pottiiT.....T.....
X. riedelianumT.....
X. violaceum

12345678901234567890123456789012345678901234567890
X. taioba TAGATATCAAGGAAAATCAATTCTGGCTTCAAAAAGGGACTCGTCTTCTGA 350
X. appendiculatumT.....
X. atrovirensT.....
X. blandumT.....
X. brasilienseT.....
X. robustumT.....SY.....
X. mafaffaT.....
X. pottii
X. riedelianum
X. violaceumT.....

12345678901234567890123456789012345678901234567890
X. taioba TGAAGAAATGGAAATCTTACTTTGTCAATTTTGGCAATGTCATTTTCAC 400
X. appendiculatum
X. atrovirens
X. blandum
X. brasiliense
X. robustum
X. mafaffa
X. pottiiA.....
X. riedelianum
X. violaceum

12345678901234567890123456789012345678901234567890
X. taioba TTTTGGTCTCAACCCTGTAGGATCCACATAAACCAATTCTCAAATTTTTC 450
X. appendiculatum
X. atrovirens
X. blandum
X. brasiliense
X. robustum
X. mafaffa
X. pottiiT.....
X. riedelianum
X. violaceum

Anexo II. (Continuação).

	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	TTTCCATTTTCTGGGTTATCTTTCAAGTGTACCAATAAATCCTTCAGCGG	500
X. appendiculatum	
X. atrovirens	
X. blandum	
X. brasiliense	
X. robustum	
X. mafaffa	
X. pottii	
X. riedelianum	
X. violaceum	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	TAAAGAGTCAAATGCTAGAGAATTCTTTTTTAATAGATACTGTTACTAAA	550
X. appendiculatum	
X. atrovirens	
X. blandum	
X. brasiliense	
X. robustum	
X. mafaffa	
X. pottii	
X. riedelianum	
X. violaceum	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	AAATTCGAAACTATAGTTCCAATTATTTCTATGGTTGGATCATTGTCAAAA	600
X. appendiculatum	
X. atrovirens	
X. blandum	
X. brasiliense	
X. robustum	
X. mafaffa	
X. pottii	
X. riedelianum	
X. violaceum	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
X. taioba	AGCGAAATTTTGTAACGTATCGGGGAATCCTATTAGTAAACCAGTTTGGG	650
X. appendiculatum	
X. atrovirens	
X. blandum	
X. brasiliense	
X. robustum	
X. mafaffa	
X. pottii	
X. riedelianum	
X. violaceum	
	123456789012345678901234567890123456789012345	
X. taioba	CCGATTTGTCAGATTCTGATATTATTGATCGGTTTGGTCCGGATAT	695
X. appendiculatumA.....	
X. atrovirensA.....	
X. blandumA.....	
X. brasilienseA.....	
X. robustumA.....	
X. mafaffaA.....	
X. pottii	
X. riedelianum	
X. violaceumA.....	

CAPÍTULO 3 – *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp. nov. inéd.: um estudo de caso do uso de *DNA barcodes* na identificação molecular de um novo táxon em *Araceae*.⁵

RESUMO

A capacidade de identificar com precisão as espécies, ou qualquer outro nível taxonômico, é fundamental para a pesquisa e o estudo da diversidade biológica. Porém, o número de especialistas disponíveis é hoje muito menor que a demanda. Nesse contexto, ferramentas moleculares de identificação, como os *DNA barcodes*, podem representar uma alternativa para a identificação de materiais biológicos portadores de DNA intacto. Assim, foi objetivo do presente capítulo avaliar a funcionalidade e a precisão da abordagem *barcode* em recuperar, de forma inequívoca, a identificação molecular de um táxon desconhecido para a ciência (*AraceaeX*). O fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*) obtido para *AraceaeX* foi comparado aos demais acessos de *Araceae* que formavam o Perfil de Referência, construído no Capítulo 1. Foi possível verificar que a sequência desconhecida (*AraceaeX*) guardava estreita relação com o gênero monoespecífico *Bognera* Mayo & Nicolson, pertencente a tribo *Spathicarpeae*, porém diferia deste molecular e morfológicamente. Os resultados aqui apresentados serviram como base para a descrição de um novo gênero em *Araceae*: *Lorenzia* E.G. Gonç. gen. nov. inéd., instituído pela criação da espécie *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp. nov. inéd., anteriormente denominada *AraceaeX*. Porém, é preciso ressaltar que esta ferramenta molecular, embora poderosa, não substitui o trabalho do sistemata, sendo seu resultado extremamente dependente, em última análise, dos estudos deste profissional.

⁵ É conveniente salientar que com esse estudo o autor não tem a intenção de publicar nenhum dos nomes inéditos aqui apresentados. Esses serão publicados posteriormente em literatura especializada.

Chapter 3 – *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp.nov. inéd.: a case-study using DNA barcodes for the molecular identification of a new taxon in Araceae⁶.

ABSTRACT

The ability to accurately identify organisms at the species level or at any other taxonomical level is critical to research and study the biological diversity. However, the number of specialists available today is smaller than the demand which makes difficult to achieve proper organism identification. In this context, molecular identification tools such as DNA barcodes, may represent an alternative to identify biological materials with intact DNA. The objective of this chapter was to evaluate the functionality and accuracy of barcode approach in recovering, unequivocally, the molecular identification of an unknown *taxon* (*AraceaeX*). The *matK* fragment (barcode sequence) obtained for *AraceaeX* was compared to other accessions of Araceae that formed the Reference Profile, built in Chapter 1. The unknown sequence (*AraceaeX*) was closely related to the monospecific genus *Bognera* Mayo Bogner & Nicolson (tribe Spathicarpeae), but differed from that at molecular and morphological levels. The results presented here were helpful for the description of a new genus of Araceae: *Lorenzia* E.G. Gonç. gen. nov. inéd., created with the recognition of the species *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp. nov. inéd., previously named *AraceaeX*. However, we must emphasize that this molecular tool, although powerful, does not replace the work of taxonomists, but is highly dependent on these studies.

⁶ It is important to note that it is not the author's intention to publish any inedited taxa here presented. They should be published elsewhere.

1. Introdução

A capacidade de identificar com precisão as espécies, ou qualquer outro nível taxonômico, é fundamental para a pesquisa e o estudo da diversidade biológica (Stace 1989). Ao atribuirmos a um organismo um nível hierárquico estamos, na verdade, abrindo um horizonte de possibilidades que vincularão esse organismo à sua população, aos outros de sua espécie, às outras espécies de seu gênero, a outros gêneros, famílias e assim por diante (Raven *et al.* 2010). Além disso, ao identificar um material biológico podemos acessar o conhecimento científico disponível, com implicações diretas em sua ecologia, genética, fisiologia, anatomia, evolução, entre outras áreas do pensamento biológico (Lorenzi & Souza 2008; Judd *et al.* 2009).

Basicamente, a identificação de um material biológico pode ser realizada de quatro formas: através da comparação com outro material biológico previamente identificado; através de literatura especializada, principalmente considerando o uso de mecanismos de identificação como as chaves e as descrições científicas; pode ser ainda realizada pelo reconhecimento imediato, mas isso dependerá do conhecimento prévio acumulado sobre o táxon em questão e sobre seus grupos relacionados por parte do identificador; ou pode ser realizada diretamente por um especialista. Dentre essas quatro formas, a última é a mais confiável (Bezerra & Fernandes 1989, Vidal & Vidal 2004; Judd *et al.* 2009). Porém, ter acesso ou conseguir enviar o material a ser determinado para um especialista não é tarefa fácil, principalmente, considerando que, na maioria dos casos, os materiais são coletados em uma localidade e o especialista reside em outro estado da federação ou, até mesmo, em outro país.

Contudo, esse não é o maior entrave. A questão é que o número desses profissionais tem crescido, mas em ritmo menor que a demanda (Wilson 2004; Peixoto *et al.* 2006). Assim, embora este seja o caminho mais confiável para a identificação de um material desconhecido, a identificação pode demorar meses, ou até mesmo, anos. Além do incentivo à formação e ao treinamento de novos profissionais, outras saídas têm sido propostas para preencher, mais rapidamente, essa lacuna entre a *expertise* na identificação taxonômica e a necessidade, não só da comunidade científica, mas também de estudiosos, aficionados e do público em

geral (Tautz *et al.* 2003). Nessa linha, o uso de tecnologias de identificação moleculares vem ganhando cada vez mais espaço.

Nos últimos dez anos, tem crescido, em volume de informação e em credibilidade, a adoção e o uso de pequenos fragmentos de DNA como ferramenta de identificação biológica. Esses pequenos fragmentos vêm sendo denominados *DNA barcodes* ou códigos de barra de DNA (Hebert *et al.* 2003a; Hebert *et al.* 2003b). Em linhas gerais, os códigos de barras de DNA são marcadores moleculares, codificantes ou não, capazes de recuperar, de forma rápida e, na maioria dos casos, inequívoca a identificação de um material biológico desconhecido, em qualquer nível (Dalebout *et al.* 2004), através da sua comparação com um banco de sequências confiável (Meyer & Paulay 2005; Lahaye *et al.* 2008).

Através da adoção da *COI* (citocromo c oxidase subunidade I) como sequência *barcode*, essa tecnologia de identificação molecular tem se mostrado eficiente na identificação de diferentes grupos de insetos e animais (Hebert *et al.* 2004b, Vences *et al.* 2005, Hajibabaei *et al.* 2006, deWaard *et al.* 2009; Ardura *et al.* 2010). Já nas plantas terrestres, essa região do DNA mitocondrial (mtDNA) não apresentou variação suficientemente para que fosse utilizada da mesma forma (Chase *et al.* 2005; Chase *et al.* 2007; Fazekas *et al.* 2008; Lahaye *et al.* 2008, Newmaster *et al.* 2008; Hollingsworth *et al.* 2009). Assim, outros fragmentos tiveram que ser testados. Dentre esses, merecem destaque alguns marcadores plastidiais (cpDNA), tais como o *accD*, o *matK*, o *ndhJ*, o *rpoB*, o *rpoC1*, o *ycf5*, o *atpF-H*, o *psbK-psbI*, o *rbcL*, o *trnH-psbA* e o *trnL-F*, além de nucleares, como o nrITS e o nrITS2 (Kress *et al.* 2005, Chase *et al.* 2007; Fazekas *et al.* 2008; Hollingsworth *et al.* 2009a; Hollingsworth *et al.* 2011).

Essa busca pelo *DNA barcode* ideal para as plantas envolveu, sobretudo, nos últimos anos, considerável esforço e dedicação por parte da comunidade científica na avaliação e no estudo destas 13 sequências candidatas (Fazekas *et al.* 2008; Hollingsworth *et al.* 2009b). Contudo, somente a pouco menos de dois anos é que resultados expressivos começaram a ser obtidos. Em 2009, o CBOL *Plant Working Group* (*Consortium for the Barcode of Life*, Hollingsworth *et al.* 2009b), que reunia à época 52 pesquisadores, pertencentes a 25 instituições de todo o mundo, após deliberar sobre o conhecimento disponível até então, num total de sete sequências candidatas (quatro codificantes: *matK*, *rbcL*, *rpoB* e *rpoC1*; e três não-codificantes: *atpF-H*, *trnH-psbA* e *psbK-psbI*), recomendou a adoção de uma abordagem *multiloci*

que combinava um marcador mais lento e conservado, o *rbcL*, com outro mais variável, o *matK*. Embora essa decisão tenha sofrido críticas, principalmente, considerando a falta de *primers* universais e a dificuldade em obter sequências viáveis para o *matK* (Kress *et al.* 2009), finalmente, surgia uma abordagem *barcode* para as plantas terrestres (Hollingsworth *et al.* 2009b; Hollingsworth *et al.* 2011).

Apesar das dificuldades relatadas, o *matK*, que é uma *ORF* (*Open Reading Frame*), de cerca de 1500bp, localizada dentro do íntron do *trnK*, o gene que codifica o tRNA para a lisina^(UUU) (Soltis *et al.* 1999; Hilu *et al.* 2003; Shaw *et al.* 2005; Hilu *et al.* 2008), tem se mostrado eficiente em recuperar a identificação de diferentes famílias botânicas, sendo, por vezes recomendado como *barcode* universal, em detrimento do *rbcL* (Lahaye *et al.* 2008; Yu *et al.* 2011). Aliás, é crescente o esforço em desenhar novos *primers* e no estabelecimento de protocolos de amplificação que vem permitindo sua utilização como ferramenta de identificação molecular, com resultados surpreendentes (Hollingsworth *et al.* 2011). Em seu estudo, Dunning & Savolainen (2010), depois de analisarem múltiplos *primers* para o *matK*, recomendaram a aplicação e o uso de pares específicos para determinadas ordens e famílias botânicas, recuperando, em média, 97% das identificações. Resultados promissores também foram alcançados, recentemente, por outros autores, como Yu *et al.* (2011) que conseguiram recuperar, em uma amostra de 58 espécies, pertencentes a 47 famílias de angiospermas, sequências viáveis em cerca de 93% dos casos, valor muito superior aos, aproximadamente, 60% obtidos pelo CBOL *Plant Working Group* (Hollingsworth *et al.* 2009b).

Esse marcador não oferece apenas a possibilidade de identificação molecular. O *matK* é um dos marcadores mais utilizados na construção de filogenias, principalmente, pela sua rápida evolução, desempenhando papel de destaque na sistemática vegetal e no tratamento e circunscrição de diversas famílias botânicas (Hilu & Liang 1997; Soltis *et al.* 1999; Hilu & Alice 1999; Hausner *et al.* 2006; Hilu *et al.* 2003; Hilu *et al.* 2008).

Em Araceae, a família dos copos de leite (caracterizados pelas inflorescências em espádice, envoltas pela espata), esta região mostrou-se eficiente na reconstrução filogenética não só da família como um todo (Cabrera *et al.* 2008), como de várias tribos em separado: Thomsonieae (Grob *et al.* 2002), Spathicarpeae (Gonçalves *et al.* 2007), Caladieae-Zomicarpeae (Batista 2008), Schismatoglottideae (Wong *et al.* 2010) e Areae (Cusimano *et al.* 2010).

Aliás, o número de gêneros aceitos dentro da família tem mudado significativamente nos últimos cinco anos, sobretudo, considerando os estudos filogenéticos citados anteriormente. Novas circunscrições genéricas foram propostas, como em Wong *et al.* (2010), com a readoção de *Philonotion* Schott (tribo Philonotieae S.Y. Wong & P.C. Boyce, também proposta nesse estudo) e em Cusimano *et al.* (2010) com o reerguimento de *Sauromatum* Schott (tribo Areae). A descoberta de novos gêneros, baseados em novas coletas e em materiais depositados em coleções é um pouco menos comum, como *Croatiella* E.G. Gonç., *Incarum* E.G. Gonç. (Gonçalves 2005) e *Pichinia* Wong & Boyce (Wong & Boyce 2010).

Contudo, reconhecer um novo gênero ou espécie pode ser uma tarefa difícil e demorada. Em 2003, o especialista em Araceae, Eduardo Gomes Gonçalves, em uma viagem de campo para o estado do Amapá – Brasil, coletou uma planta que, inicialmente, mostrou-se similar ao gênero monotípico *Bognera* Mayo & Nicolson (Bogner 2008), pertencente à tribo Spathicarpeae Schott (*sensu* Gonçalves *et al.* 2007). Porém, como o material estava estéril sua determinação não foi possível àquela época, permanecendo a planta em cultivo para futura identificação. Em análise posterior, com base na observação de um pedúnculo delicado, Gonçalves chegou a cogitar sua relação com a tribo Zomicarpeae Schott, também de distribuição amazônica, assim como *Bognera*. Contudo, a análise de cortes transversais do pecíolo revelou um padrão colocasióide, caracterizado pela presença de um anel de colênquima parcialmente interrompido, típico da tribo Spathicarpeae (Gonçalves *et al.* 2004). Em 2007, o material foi sequenciado e confrontado contra a filogenia recém publicada de Spathicarpeae (Gonçalves *et al.* 2007) o que, realmente, confirmou sua relação com essa tribo, em detrimento de Zomicarpeae, que teve sua filogenia completada no ano seguinte (Batista 2008). Apenas em 2010, após sete anos em cultivo, suas flores puderam ser observadas, confirmando a suspeita de que o material, realmente, era próximo à *Bognera* (Gonçalves, com. pess.).

Porém, o posicionamento e a circunscrição deste novo táxon dentro de Spathicarpeae permaneciam ainda obscuros. Nesse contexto, fica clara a importância do Perfil de Referência construído no Capítulo 1 desta tese, que reúne 514 sequências *barcode* de *matK*, pertencentes a 105 gêneros e mais de 350 espécies de Araceae. Considerando-se que se trata de uma amostra

adequadamente identificada, grande e amplamente diversa desta família, este perfil poderia permitir, não só a confirmação do novo táxon proposto por Gonçalves, como também posicioná-lo frente a outras espécies, gêneros e grupos de Araceae nele catalogados. Portanto, com base no que foi exposto, é objetivo do presente capítulo avaliar a funcionalidade e a precisão da abordagem *barcode* em recuperar, de forma inequívoca a identificação molecular de um táxon desconhecido para a ciência, tendo como base de comparação o Perfil de Referência construído para a família Araceae no Capítulo 1.

2. Metodologia

2.1. Obtenção da sequência desconhecida

Foi coletado material foliar fresco do material desconhecido (denominada de *AraceaeX*), mantido em cultivo no Jardim Botânico Plantarum (Av. Brasil, 2000, Nova Odessa – SP) e no Jardim Botânico Inhotim (Rua B, 20, Brumadinho - MG, Brasil). Essa amostra foi desidratada em sílica gel e mantida até o momento da extração. O DNA foi extraído pelo método CTAB (Doyle & Doyle 1987), modificado para o uso em sistema FastPrep® (Krackeler Scientific, Inc.) e amplificado segundo a metodologia proposta por Gonçalves *et al.* (2007). Os produtos de PCR obtidos foram purificados com ExoSAP-IT® (USB Corporation). Para o seqüenciamento foi utilizado o seqüenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, CA) e o Kit de seqüenciamento DYEnamic™ ET terminator® (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), de acordo com as instruções do fabricante. Tanto na amplificação, quanto no seqüenciamento do *matK*, foram utilizados os *primers* –19F (Gravendeel *et al.* 2004) e 2R (Steele & Vilgalys 1994) na amplificação de toda a *ORF*, incluindo o *ínton* 3' do *trnK* (~1900bp), e os *primers* internos 390F e 1326R (Cuénoud *et al.* 2002) e 1034F e 533R (Batista, 2008), disponíveis na literatura, com a finalidade de aumentar a sobreposição na região. A sequência obtida foi depositada no GenBank® (acesso JF803495).

2.2. Construção do Perfil de Referência

Para compor o Perfil de Referência, ao contrário do desenho dado no Capítulo 1, foram combinadas todas as sequências de *matK* provenientes de diferentes estudos filogenéticos em Araceae: Batista (2008), Grob *et al.* (2002), Gonçalves *et al.* (2007), Wong *et al.* (2010), Cusimano *et al.* (2010), Cabrera *et al.* (2008) e Wang *et al.* (2010). Assim, nesse Capítulo, compuseram o Perfil de Referência 514 sequências, pertencentes a 9 Subfamílias, 31 Tribos, 105 gêneros e 363 espécies. Exceto por Batista (2008), todas as sequências estão disponíveis para acesso no GenBank® (Capítulo 1, Anexo I).

2.3. Obtenção do fragmento-alvo de *matK* (sequência *barcode*)

A sequência desconhecida (*AraceaeX*) foi alinhada juntamente com todas as 514 sequências do Perfil de Referência. Além dessas sequências, como descrito nos capítulos anteriores, para manter o posicionamento e, conseqüentemente, a universalidade do fragmento-alvo obtido frente a outras sequências *barcodes* ou não-*barcodes* depositadas no GenBank® (Benson *et al.* 2010), foram também alinhadas outras cinco sequências de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*A. thaliana* cultivar ser1, acesso AF144373.1; *A. thaliana* cultivar nd1, acesso AF144375.1; *A. thaliana* cultivar no0, acesso AF144376.1; *A. thaliana* cultivar ka0, acesso AF144377.1; e *A. thaliana* cultivar su0, acesso AF144378.1). Todas as sequências acima foram alinhadas utilizando o programa ClustalW® (Thompson *et al.* 1994), sendo os alinhamentos, posteriormente, verificados e editados manualmente. Para a obtenção do fragmento-alvo, os *primers* XXF e ALI_R, propostos por Dunning & Savolainen (2010), próprios para Alismatales, foram incluídos, manualmente, aos alinhamentos anteriores, sendo a região compreendida entre os *primers* então recortada (Capítulo 1, Figura 1). As sequências obtidas foram utilizadas para as demais análises e comparações.

2.4. Análise das sequências

Para estimar a distância genética entre a amostra desconhecida e as demais pertencentes ao Perfil de Referência foi utilizado o modelo de substituição Kimura 2

Parâmetros – K2P (Kimura 1980). As árvores foram geradas através do programa MEGA 5® (Tamura *et al.* 2011), utilizando *Neighbour-Joining* (NJ), com o teste de *bootstrap* (Felsenstein 1985) com 1000 réplicas. Novamente, a escolha tanto o modelo substituição, quanto do método de distância seguiram as recomendações propostas pelo *Barcoding of Life Data System* (BOLD, Ratnasingham & Hebert 2007).

3. Resultados e Discussão

Com base na topologia da árvore obtida (Figura 1) é possível verificar que a sequência desconhecida (*AraceaeX*) permaneceu agrupada com a espécie *Bognera recondita* (Madison) Mayo & Nicolson (*bootstrap* = 76), com a qual guarda estreita relação (*Bootstrap* = 86), pertencente a tribo Spathicarpeae. Embora, a espécie *Mangonia tweediana* Schott seja grupo-irmão de *AraceaeX* e *B. recondita*, esta forma um agrupamento distinto e fortemente suportado (*bootstrap* = 100). É possível ainda reconhecer dentro da tribo Spathicarpeae dois outros grupos agrupamentos: um formado pelos gêneros *Asterostigma* F.E.L. Fischer & C.A. Meyer, *Taccarum* Schott, *Spathicarpa* Hook., *Croatiella* E.G. Gonç. e *Synandrospadix* Engler e outro por *Incarum* E.G. Gonç., *Sphathanthium* Schott e *Gorgonidium* Schott. Os gêneros *Dieffenbachia* Schott e *Gearum* N.E. Brown. permanecem separados dos demais, mais incluídos em Spathicarpeae. São tribos relacionadas à Spathicarpeae: Culcasieae Engler, Aglaonemateae Engler, Homalomeneae M. Hotta, Philodendreae Schott, Nephthytideae Engler e Zantedeschieae Engler.

A topologia aqui apresentada difere da obtida por Cabrera *et al.* (2008), em sua reconstrução filogenética da família Araceae, pois não apresenta Dieffenbachieae como um grupo monofilético e distinto de Spathicarpeae. Porém, concorda com a reconstrução de Gonçalves *et al.* (2007) que expandiu Spathicarpeae para incluir além de Dieffenbachieae, o gênero *Bognera*, anteriormente posicionado em Dieffenbachieae (*sensu* Mayo *et al.* 1997). Além disso, recupera tanto o clado de gêneros e espécies andinas (Clado SIG) quanto o clado “SACTS” que reúne gêneros e espécies que se desenvolvem em áreas marcadas pela sazonalidade, conforme proposto por Gonçalves *et al.* (2007). Assim, mesmo considerando a adoção de um arcabouço de análise diferente dos estudos citados

anteriormente, é possível notar que a sequência *barcode* continua a guardar forte sinal filogenético, característica rara em uma abordagem que considera apenas um marcador molecular e o avalia por um método de distância.

Ainda, considerando as topologias obtidas por Gonçalves *et al.* (2007) e por Cabrera *et al.* (2008), é possível notar que nesses estudos *Bognera* figura como um gênero basal em Spathicarpeae, relação distinta da obtida aqui que coloca *Gearum* e *Dieffenbachia* nessa posição. Nesse contexto, podemos inferir que *AraceaeX* também permaneça, evolutivamente, ao lado de *Bognera* e *Dieffenbachia*, gêneros com os quais compartilha similaridades morfológicas, tais como a presença de tricomas curtos nas folhas. Contudo, as semelhanças entre *AraceaeX*, *Bognera* e *Dieffenbachia* acabam aí. *AraceaeX* difere, substancialmente, destes dois últimos gêneros por apresentar um número indefinido de pequenos catafilos nos nós, tecas com deiscência semicircular, flores com tricomas capitados e conectivos sólidos, características ausentes nestes dois gêneros (Gonçalves, com. pess.).

Ao combinarmos estas características morfológicas distintivas com o posicionamento de *AraceaeX* no Perfil de Referência podemos notar que o fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK*, não só foi capaz de identificar uma sequência desconhecida, mas também permitiu seu posicionamento sistemático com relação aos demais gêneros e espécies dentro da tribo. Portanto, por ser claramente distinta, morfológica e molecularmente, de *Bognera* e dos outros gêneros em Spathicarpeae é bastante provável que *AraceaeX* represente, possivelmente, um novo táxon em Araceae.



Figura 1. Árvore com as subfamílias e tribos de Araceae, baseada nas sequências do fragmento-alvo (sequência *barcode*) de *matK* (*Neighbor-joining* – NJ, Kimura – 2P, MEGA 5®). (2) Acesso pertencente ao estudo de Cabrera *et al.* (2008) e (7) acesso pertencente ao estudo de Wong *et al.* (2010).

4. Considerações adicionais

Os resultados apresentados nesse capítulo foram decisivos para a circunscrição e o reconhecimento do novo gênero monotípico *Lorenzia* E.G. Gonç. gen. nov. inédito, instituído com a descrição da espécie *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp. nov. inéd. (Gonçalves, *no prelo*), anteriormente denominada *Araceae*X. Porém, para que maior resolução filogenética fosse alcançada outros métodos como a parcimônia e a inferência bayesiana foram utilizados por Gonçalves, além da morfologia e dos métodos de distância, no momento da descrição. No Anexo I, são apresentadas algumas fotos de *L. umbrosa*.

Como visto, foram necessários quase oito anos para que o gênero *Lorenzia* e sua espécie *L. umbrosa* pudessem ser reconhecidos, ficando claro o papel determinante da comparação molecular em sua circunscrição. Certamente, se sua sequência de DNA tivesse, à época, sido comparada diretamente contra um banco de sequências confiável seu posicionamento e relação com os demais grupos teria sido melhor compreendido, questionamentos seriam mais facilmente resolvidos e muito tempo teria sido poupado. Realmente, é evidente a importância do Perfil de Referência construído no Capítulo 1 e do uso do fragmento-alvo de *matK* como ferramenta molecular de identificação em *Araceae*.

Porém, a importância do Perfil de Referência não reside apenas na sua capacidade de validar diagnósticos moleculares. Meyer & Paulay (2005) ressaltam que, independentemente do método empregado, a utilização ferramentas de identificação moleculares, como os *DNA barcodes*, é extremamente sensível à riqueza do banco de seqüências utilizado como referência. Portanto, para que as identificações recuperadas pela aplicação de ferramentas moleculares sejam válidas é imperativo que as seqüências de código de barras de referência sejam provenientes de espécimes de procedência conhecida, principalmente os depositados em coleções biológicas, adequadamente identificados de acordo com o rigor científico (Dalebout *et al.* 2004; Lorenz *et al.* 2005; Schander & Willassen 2005).

Aqui surge uma das maiores polêmicas do uso de sequências na identificação molecular de táxons. Apesar da importância do conhecimento taxonômico para a comunidade científica (Ball & Hebert 2005; Monaghan *et al.* 2005; Rubinoff *et al.* 2006), o número de especialistas disponíveis é hoje muito menor que a demanda

(Peixoto *et al.* 2006), o que representa um fator limitante, principalmente, em estudos ecológicos e inventários sobre a biodiversidade (Paquin & Hedin, 2004; Barbosa & Peixoto 2003). Deste modo, com a criação, adequada manutenção e construção de bancos de referência confiáveis, o uso de *DNA barcodes* pode sim representar uma alternativa na qual a identificação taxonômica de um espécime poderá, praticamente, ser feita por qualquer pessoa que tiver acesso a um laboratório de sequenciamento de DNA (Hogg & Hebert 2004a; Lorenz *et al.* 2005).

Embora possa parecer, esta tecnologia não visa substituir de forma alguma o trabalho do sistemata tradicional em catalogar a biodiversidade (Dunn 2003; Lipscomb *et al.* 2003; Tautz *et al.* 2003; Barret & Hebert 2005). É importante salientar que os *DNA barcodes* podem apenas identificar amostras desconhecidas por comparação com bancos de dados validados. Portanto, na verdade, os sistematas tornam-se imprescindíveis, pois, em outras palavras, a validade das identificações baseadas em DNA depende do estabelecimento de seqüências de referência provenientes de espécimes taxonomicamente confirmados por eles (Barret & Hebert 2005).

Portanto, o princípio de qualquer diagnóstico molecular é ajudar o pesquisador, e não servir como um fim em si mesmo (Besansky *et al.* 2003). Como os grupos taxonômicos são reconhecidos, caracterizados e classificados tendo como base uma ampla gama de características (morfológicas, genéticas, ecológicas, geográficas, entre outras) a identificação “clássica” e a “molecular” não devem ser consideradas como atividades excludentes. Neste contexto, a adoção de *DNA barcodes* representaria, apesar de poderosa, apenas mais uma ferramenta (Schander & Willassen 2005; Gregory 2005; Marshall 2005) para uma compreensão mais aprofundada sobre as relações entre os organismos (Besansky *et al.* 2003 e Schander & Willassen 2005; Miller 2007).

5. Conclusão

Foi possível recuperar, de forma inequívoca, a identificação molecular de um táxon desconhecido, tendo como base de comparação o Perfil de Referência construído para a família Araceae no Capítulo 1. Além disso, o fragmento-alvo (seqüência *barcode*) de *matK* possibilitou inferências consistentes que permitiram o

posicionamento sistemático da amostra desconhecida (*Araceae*X) com relação aos demais gêneros e espécies dentro de *Spathicarpeae*, servindo como base para a descrição de um novo gênero em *Araceae*: *Lorenzia* E.G. Gonç., intituído pela criação da espécie *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. Porém, é preciso ressaltar que esta ferramenta molecular, embora possa facilitar o trabalho do sistemata, não o substitui, sendo seu resultado extremamente dependente, em última análise dos estudos deste profissional.

6. Referências Bibliográficas

Ardura, A.; Linde, A.R.; Moreira, J.C. & Garcia-Vazquez, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation** **143**: 1438-1443.

Ball, S.L. & Hebert, P.D. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of North American Benthological Society** **21**: 508-524.

Barbosa, M.R. & Peixoto, A.L. 2003. **Coleções botânicas brasileiras: situação atual e perspectivas**. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Barret, R.D. & Hebert, P.D. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology** **83**: 481-491.

Batista, A.R. 2008. **Filogenia do Complexo Caladieae-Zomicarpeae (Araceae) baseada em sequências do DNA plastidial**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília – UCB.

Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J. & Sayers, E.W. 2010. GenBank. **Nucleic Acids Research** **39** (Database issue): D32-7.

- Besansky, N.J.; Severson, D.W. & Ferdig, M.T. 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. **TRENDS in Parasitology** **19**: 545-546.
- Bezerra, P. & Fernandes, A. 1984. **Fundamentos de taxonomia vegetal**. Fortaleza, Ed. Universidade Federal do Ceará.
- Bogner, J. 2008. The genus *Bognera* Mayo & Nicholson (Araceae). **Aroideana** **31**: 3-14.
- Cabrera, L.I.; Salazar, G.A.; Chase, M.W.; Mayo, S.J.; Bogner, J. & Dávila, P. 2008. Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA. **American Journal of Botany** **95**: 1153-1165.
- Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Hollingsworth, P.M.; van den Berg, C.; Madriñán, S.; Petersen, G.; Seberg, O.; Jørgensen, T.; Cameron, K.M. & Carine, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. **Taxon** **56**: 295–299.
- Chase, M.W.; Salamin, N.; Wilkinson, M.; Dunwell, J.M.; Kesanakurthi, R.P.; Haidar, N. & Savolainen, V. 2005. Land plant and DNA barcodes: short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **360**: 1889–1895.
- Cuénoud, P.; Savolainen, V.; Chatrou, L.W.; Powell, M.; Grayer, R.J. & Chase, M.W. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB* and *matK* DNA sequences. **American Journal of Botany** **89**: 132-144.
- Cusimano, N.; Barrett, M.D.; Hettterscheid, W.L. & Renner, S.S. 2010. A phylogeny of the Areae (Araceae) implies that *Typhonium*, *Sauromatum*, and the Australian species of *Typhonium* are distinct clades. **Taxon** **59**: 439-447.

- Dalebout, M.L.; Baker, C.S.; Mead, J.G.; Cockcroft, V.G. & Yamada, T.K. 2004. A comprehensive and validated molecular taxonomy of beaked whales, family Ziphiidae. **Journal of Heredity** **95**: 459-473.
- deWaard, J.R.; Landry, J.F.; Schmidt, B.C.; Derhousoff, J.; McLean, J.A. & Humble, L.M. 2009. In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. **Biodiversity and Conservation** **18**: 3825-3839.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochemical Bulletin** **19**: 11-15.
- Dunn, C.P. 2003. Keeping taxonomy based on morphology. **TRENDS in Ecology and Evolution** **18**: 270-271.
- Dunning, L.T. & Savolainen, V. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. **Botanical Journal of the Linnean Society** **164**: 1-9.
- Fazekas, A.J.; Burgess, K.S.; Kesanakurti, P.R.; Graham, S.W.; Newmaster, S.G.; Husband, B.C.; Percy, D.M.; Hajibabaei, M. & Barret, S.C. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. **Public Library of Science ONE** **3**: e2802.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** **39**: 783-791.
- Gonçalves, E. G. 2005. Two new Andean genera for the tribe Spathicarpeae (Araceae). **Willdenowia** **35**: 319-326.
- Gonçalves, E. G., E. A. S. Paiva, and M. A. Nadruz-Coelho. 2004. A preliminary survey of petiolar collenchyma in the Araceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **91**: 473-484.

- Gonçalves, E.G. 2011 (*no prelo*). *Lorenzia* (Araceae – Spathicarpeae): A new genus from Northern Brazil supported by *matK* sequence data. **Systematic Botany**.
- Gonçalves, E.G.; Mayo, S.J.; Van Sluys, M.A. & Salatino, A. 2007. Combined genotypic-phenotypic phylogeny of the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent events of invasion to Andean regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **43**: 1023-1039.
- Gravendeel, G.B. & Eurlings, M.C. 2004. Potential phylogenetic utility of the nuclear Floricaula/Leafy second intron: comparison with three chloroplast DNA regions in *Amorphophallus* (Araceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **30**: 13–23.
- Gregory, T.R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. **Nature** **434**: 1067–1067.
- Grob, G.B.J., B. Gravendeel, M.C.M. Eurlings & W.L.A. Hettterscheid. 2002. Phylogeny of the Tribe Thomsonieae (Araceae) based on chloroplast *matK* and *trnL* intron sequences. **Systematic Botany** **27**: 453-467.
- Hajibabaei, M.; Janzen, D.H.; Burns, J.M.; Hallwachs, W. & Hebert, P.D. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Science** **103**: 968-971.
- Hausner, G.; Olson, R.; Simon, D.; Johnson, I.; Sanders, E.R. Karol, K.G.; McCourt, R.M. & Zimmerly, S. 2006. Origin and Evolution of the Chloroplast *trnK* (*matK*) Intron: A Model for Evolution of Group II Intron RNA Structures. **Molecular Biology and Evolution** **23**: 380–391.
- Hebert P.D.; Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B** **270**: S96–S99.

- Hebert, P.D.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **270**: 313–321.
- Hebert, P.D.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H. & Hallwachs, W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Science** **101**: 14812-14817.
- Hilu, K.W. & Alice, L.A. 1999. Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae. **American Journal of Botany** **86**: 1735–1741.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. **American Journal of Botany** **84**: 830–839.
- Hilu, K.W.; Black, C.; Diouf, D. & Burleigh, G. 2008. Phylogenetic signal in *matK* vs. *trnK*: A case study in early diverging eudicots (angiosperms). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **48**: 1120–1130.
- Hilu, K.W.; Borsch, T.; Müller, K.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Savolainen, V.; Chase, M.W.; Powell, M.P.; Alice, L.A.; Evans, R.; Sauquet, H.; Neinhuis, C.; Slotta, T.A.; Rohwer, J.G., Campbell, C.S. & Chatrou, L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. **American Journal of Botany** **90**: 1758–1776. 2003.
- Hogg, I.D. & Hebert, P.D. 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology** **82**: 749-754.
- Hollingsworth, P.M.; Clark, A.A.; Forrest, L.L.; Richardson, J.; Pennington, R.T.; Long, D.G.; Cowan, R.; Chase, M.W.; Gaudeul, M. & Hollingsworth, P.M. 2009a. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci

with species-level sampling in three divergent groups of land plants. **Molecular Ecology Resources** **9**: 439–457.

Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Erickson, D.L.; Fazekas, A.J.; Graham, S.W.; James, K.E.; Kim, K.-J.; Kress, W.J.; Schneider, H.; van Alphenstahl, J.; Barrett, S.C.; van den Berg, C.; Bogarin, D.; Burgess, K.S.; Cameron, K.M.; Carine, M.; Chacón, J.; Clark, A.; Clarkson, J.J.; Conrad, F.; Devey, D.S.; Ford, C.S.; Hedderson, T.A.; Hollingsworth, M.L.; Husband, B.C.; Kelly, L.J.; Kesanakurti, P.R.; Kim, J.S.; Kim, Y.-D.; Lahaye, R.; Lee, H.-L.; Long, D.G.; Madriñán, S.; Maurin, O.; Meusnier, I.; Newmaster, S.G.; Park, C.-W.; Percy, D.M.; Petersen, G.; Richardson, J.E.; Salazar, G.A.; Savolainen, V.; Seberg, O.; Wilkinson, M.J.; Yi, D.-K. & Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** **106**: 12794-12797.

Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **Public Library of Science ONE** **6**: e19254.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F. & Donoghue, M. J. 2009. **Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético**. (3.ed). São Paulo, Artmed.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** **16**: 111-120.

Kress, W.J.; Erickson, D.L.; Jones, F.A.; Swenson, N.G.; Perez, R.; Sanjurjo, O. & Bermingham, E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. **Proceedings of the National Academy of Science** **106**: 18621-18626.

- Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weigt, L.A. & Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Science** **102**: 8369-8374.
- Lahaye, R.; Van der Bank, M.; Bogarin, D.; Warner, J.; Pupulin, F.; Gigot, G.; Maurin, O.; Duthoit, S.; Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** **105**: 2923–2928.
- Lipscomb, D.; Platnick, N. & Wheeler, Q. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **TRENDS in Ecology and Evolution** **18**: 65-66.
- Lorenz, J.G.; Jackson, W.E.; Beck, J.C. & Hanner, R. 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** (published online): 1-9.
- Marshall, E. 2005. Will DNA barcodes breathe life into classification? **Science** **307**: 1037.
- Mayo, S.J.; Bogner, J. & Boyce, P.C. 1997. **The genera of Araceae**. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Meyer, C.P. & Paulay, G. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. **Public Library of Science Biology** **3**: 2229-2238.
- Miller, S.E. 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** **104**: 4775–4776.
- Monaghan, M.T.; Balke, M.; Gregory, T.R. & Vogler A.P. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** (published online): 1-9.

- Newmaster, S.G.; Fazekas, A.J.; Steeves, R.A. & Janovec, J. 2008. Testing candidate plant barcode regions with species of recent origin in the Myristicaceae. **Molecular Ecology Notes** 8: 480–490.
- Paquin, P. & Hedin, M. 2004. The power and perils of “molecular taxonomy”: a case study of eyeless and endangered Cicurina (Aranae: Dictynidae) from Texas caves. **Molecular Ecology** 13: 3239-3255.
- Peixoto, A.L.; Barbosa, M.R.; Menezes, M.; Maia, L.C. & Kury, A.B. 2006. Parte 2 – Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções botânicas brasileiras com base na formação de taxonomistas e na consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. In: Kury, A.B (org.). **Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade**. Brasília, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ministério da Ciência e Tecnologia.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data system. **Molecular Ecology Notes** 7: 355–364.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 2008. **Biologia Vegetal**. (7^a ed.), São Paulo, Guanabara Koogan.
- Rubinoff, D.; Cameron, S. & Will, K. 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? **TRENDS in Ecology and Evolution** 21: 1–2.
- Schander, C. & Willassen, E. 2005. What can biological barcoding do for marine biology? **Marine Biology Research (Short Communication)** 1: 79-83.
- 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** 92:142-166.

- Soltis, P.S.; Soltis, D.E. & Doyle, J.J. 1998. **Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing**. New York, Springer.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado na APG II**. (2ª. ed.) Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Stace, C.A. 1989. **Plant Taxonomy and Biosystematics**. (2nd ed.) Edward Arnold.
- Steele, K.P. & Vilgalys, R. 1994 Phylogenetic analysis of Polemoniaceae using nucleotide sequences of plastid gene *matK*. **Systematic Biology** **19**: 126–142.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted).
- Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R.H. & Vogler, A.P. 2003. A plea for DNA taxonomy. **TRENDS in Ecology and Evolution** **18**: 70-74.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research** **22**: 4673-4680.
- Vences, M.; Thomas, M.; Bonett, R.M. & Vieites, D.R. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** **360**: 1859–1868.
- Vidal, W.N. & Vidal, M.R. 2004. **Taxonomia vegetal**. Viçosa, Ed. Universidade Federal de Viçosa – UFV.

- Wang, W.; Wu, Y.; Yan, Y.; Ermakova, M.; Kerstetter, R. & Messing, J. 2010. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. **BMC Plant Biology** **10**: 205.
- Wilson, E. 2004. Taxonomy as a fundamental Discipline. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** **359**: 739.
- Wong, S. Y. and P. C. Boyce. 2010b. Studies on Schismatoglottideae (Araceae) from Borneo XI: Ooia, a new genus and a new generic delimitation of *Piptospatha*. **Botanical Studies (Taipei)** **51**: 543-552.
- Wong, S.Y.; Boyce, P.C.; binOthman, A.S. & Pin, L.C. 2010. Molecular phylogeny of tribe Schismatoglottideae (Araceae) based on two plastid markers and recognition of a new tribe, Philonotieae, from the neotropics. **Taxon** **59**: 117-124.
- Yu, J.; Xue, J.H. & Zhou, S.L. 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal Systematics and Evolution** **49**: 176–181.

Anexo I. *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. sp. nov. inéd. (Gonçalves, no prelo). A. Hábito. B. Hábito em cultivo. C. Planta em estágio reprodutivo. D. Detalhe da espádice e da espata. Fotos cedidas por E.G. Gonçalves.



CONCLUSÃO GERAL

Pela primeira vez dentro de Araceae, o uso de um marcador como sequência *DNA barcode* foi avaliado em grande escala. O fragmento-alvo de *matK*, de aproximadamente 725pb, mostrou-se suficientemente variável para tal tarefa, sendo capaz de recuperar, na maioria dos casos, identificações inequívocas para os diferentes gêneros e espécies amostrados. Embora, ao nível genérico, praticamente não exista diferença no percentual de acertos entre as metodologias adotadas (superior a 95%), a busca BLAST® mostrou-se mais eficiente que o método de distância em recuperar identificações ao nível específico (68% e 81,5%, respectivamente). O fragmento-alvo apresentou ainda forte sinal filogenético, refletindo grande parte das relações entre os diferentes táxons de Araceae. Assim, mesmo considerando que este não seja seu principal objetivo, o fragmento-alvo de *matK* pode também ser utilizado como uma possível ferramenta exploratória de inferência evolutiva.

Como em outros estudos disponíveis na literatura, os resultados aqui obtidos também apontam para a existência de uma limitação na aplicação dos *DNA barcodes* na identificação molecular de espécies proximamente relacionadas, como foi o caso das espécies cultivadas de *Xanthosoma*. Contudo, os mesmos resultados, vistos a luz de uma abordagem mais ampla, apontaram também, mesmo que de forma preliminar, para a necessidade de uma nova circunscrição taxonômica em *Xanthosoma*. Nesse novo arranjo, as principais espécies cultivadas de taioba seriam, na verdade, uma única espécie fortemente polimórfica ("*X. atrovirens*"), com marcada amplitude de variação fenotípica, alcançada tanto por processos naturais quanto pela intervenção do homem. Corroborariam tal afirmação aspectos morfológicos, citogenéticos, geográficos e evolutivos.

O fragmento-alvo de *matK* foi ainda capaz de recuperar, de forma inequívoca, a identificação molecular de um táxon desconhecido para a ciência. Este resultado forneceu subsídios para a descrição de um novo gênero em Araceae: *Lorenzia* E.G. Gonç., intituído pela criação da espécie *Lorenzia umbrosa* E.G. Gonç. Neste aspecto, a adoção e o uso de sequências *DNA barcodes* pode representar uma importante ferramenta de auxílio na identificação e no posicionamento de novos táxons em Araceae. Porém, é preciso ressaltar que esta ferramenta molecular,

embora possa facilitar o trabalho do sistemata, não o substitui, sendo seu resultado extremamente dependente da correta identificação dos espécimes feita por estes profissionais.

Finalmente, os resultados encontrados apontam para a necessidade de um aumento na densidade amostral, não só para uma maior compreensão da variação existente dentro de Araceae, mas também para o estabelecimento de um banco de sequências de referência robusto, coeso e densamente representativo que, futuramente, poderá ser utilizado não só na identificação de espécimes desconhecidos, mas também para a conservação e o uso sustentável das espécies de Araceae.