

DUANE FERNANDES DE SOUZA LIMA

**ESTUDOS BIOSISTEMÁTICOS E TAXONÔMICOS SOBRE O
COMPLEXO *Myrcia laruotteana* Cambess. (MYRTACEAE)**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DUANE FERNANDES DE SOUZA LIMA

ESTUDOS BIOSISTEMÁTICOS E TAXONÔMICOS SOBRE O
COMPLEXO *Myrcia laruotteana* Cambess. (MYRTACEAE)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Duane Fernandes de Souza Lima
Renato Goldenberg
aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Goldenberg
Coorientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L628e Lima, Duane Fernandes de Souza, 1988-
Estudos biossistemáticos e taxonômicos sobre o
complexo *Myrcia laruotteana* Cambess. (Myrtaceae) /
Duane Fernandes de Souza Lima. – Campinas, SP:
[s.n.], 2013.

Orientador: Renato Goldenberg.
Coorientador: Eric de Camargo Smidt.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Genética de populações. 2. Marcadores ISSR.
3. Myrtaceae. I. Goldenberg, Renato. II. Smidt, Eric
de Camargo. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês Biosystematic and taxonomic studies on the *Myrcia laruotteana*
Cambess. complex (Myrtaceae)

Palavras-chave em Inglês:

Population genetics

ISSR markers

Myrtaceae

Área de concentração: Taxonomia Vegetal

Titulação: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Renato Goldenberg [Orientador]

Fiorella Fernanda Mazine Capelo

André Olmos Simões

Data da defesa: 25-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 25 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Goldenberg (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões


Assinatura

Profa. Dra. Fiorella Fernanda Mazine Capelo


Assinatura

Profa. Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral

Assinatura

Profa. Dra. Viviane da Silva Pereira

Assinatura

Escrever é fácil.

*Você começa com uma letra maiúscula
e termina com um ponto final.
No meio você coloca as ideias.*

(Pablo Neruda)

Agradecimentos

OBRIGADA A TODOS QUE, DE ALGUMA FORMA, FIZERAM PARTE DESTA ETAPA DA MINHA VIDA!

Primeiro aqueles que não fizeram parte direta do meu mestrado, mas que não posso deixar de agradecer:

Marcia e Lima, meus pais amados que sempre me apoiaram durante esta trajetória. Obrigada por todo amor e incentivo!

Carol, pela companhia, apoio, motivação, paciência, ajudas e diversão. Não tenho palavras pra te agradecer!

Amigos da biologia que sempre se orgulharam por eu fazer mestrado na Unicamp (hahaha)... Laura, Ju, Leandro, Débora e Dudu. Com vocês eu aprendi que vida de mestrando é a mesma coisa louca, não importa a universidade, o programa de pós-graduação ou o tema da sua dissertação.

Aos companheiros de república em Campinas, em especial ao Skol, ao Léo e à Malu. Obrigada pela amizade e por terem tornado minha primeira moradia longe da mãe mais agradável e menos assustadora!

Agora aqueles que tiveram um dedinho na minha dissertação:

Renato, por ter aceitado me orientar com mais um problema de Myrtaceae. Eric, por ter aceitado me coorientar sem nem me conhecer direito. Sobral, por ter dado a ideia inicial desta dissertação e por ter tido paciência com meus numerosos e-mails pedindo ajuda. Também não posso esquecer a Viviane, que me deu uma ajuda imensa na reta final do trabalho. Agradeço a vocês, meus professores, por todos os ensinamentos botânicos e não botânicos, pessoalmente ou virtualmente.

Meninas do Laboratório de Filogenia (UFPR) pela companhia, risadas, conversas, motivações e lamentações. Um obrigado mais que especial para a Mônica que, além de ter me apresentado o incrível mecanismo de extração de DNA, foi (e é) uma excelente amiga! Obrigada também a Pati, que me ajudou muito com os ISSR, e a Anna Victória, que foi praticamente um anjo que me apareceu quando o grosso do trabalho laboratorial começou.

E não posso deixar a Ana Paula de fora! Foi ela a alma caridosa que mais me suportou no laboratório (Anaaaaa, acho que vou tacar fogo em tudo isso aqui!!!)

Pessoal do Laboratório de Sistemática de Angiospermas (UFPR) e do Laboratório de Taxonomia (Unicamp) pela ótima convivência! Tássia, Cássio, André, Peter, Fred, Suelen, Carla, Ana, Mathias, Pati, Bianca, Bicho, Lilien, Gu Shimizu, Marcelinho, Deise, Rafael... Com certeza eu me esqueci de alguém, desculpa! E Dani, que também me proporcionou uma grande amizade!

Todos aqueles que me ajudaram em campo: Jair Faria, André Soller, Cássio Michelin, Fábio Vieira, Martin Molz, Mariana Bünger, Sobral, Rafael Pinto, Cláudio Nicoletti Fraga, Julia Meirelles, Leléu Boelter e Carol (minha motorista oficial).

Minhas amigas Julia e Mayara... Vou dedicar um parágrafo especial para vocês! Obrigada por todo o apoio e ensinamentos que me deram nesses dois anos e pela amizade dentro e fora da universidade. Minha vida de mestranda não seria a mesma sem vocês! May, obrigada também por toda a ajuda que me deu no fim do trabalho, com você eu aprendi que a vida pode continuar sendo boa mesmo um mês antes de entregar a versão final da dissertação!

Por fim, agradeço ao CNPq pela bolsa e pelo auxílio financeiro dado ao projeto (“Estudos taxonômicos e biossistemáticos sobre o complexo *Myrcia laruotteana* Cambess. (Myrtaceae)”, processo n° 475099/2011-7).

Índice

Resumo Geral/Abstract.....	1
Introdução Geral	4
Capítulo 1 – Uso de marcadores moleculares ISSR na delimitação do complexo <i>Myrcia laruotteana</i> Cambess. (Myrtaceae).....	17
Capítulo 2 – Estudos taxonômicos e nova combinação para o complexo <i>Myrcia laruotteana</i> Cambess. (Myrtaceae).....	45
Considerações Finais	64

Índice de figuras

Introdução Geral

Figura 1 – Árvore de consenso da análise Bayesiana com dados combinados dos marcadores ITS, ETS, *psbA-trnH*, *matK* e *trnL*. Bootstrap (da análise de parcimônia) maior que 50 são mostrados acima dos ramos; cladogramas que receberam probabilidades da análise Bayesiana maior que 0,95 são indicados pelos ramos em negrito (Lucas *et al.* 2011). O clado 8, em destaque, agrupa as espécies do complexo *M. laruotteana***9**

Capítulo 1

Figura 1 - Padrões de morfologia foliar das populações de complexo de *Myrcia laruotteana*. A – Padrão 1 (ANA, BRA-1, PRA, RBS). B – Padrão 2 (CXC, BRA-2). C – Padrão 3 (LON, CAM, CMOU, SFS, JOIN). D – Padrão 4 (PIRA, NIT). E – Padrão 5 (NOP, SFP). F – Padrão 6 (QUI-1, QUI-2).....**25**

Figura 2 – A – Distribuição da probabilidade posterior de um número K de agrupamentos genéticos do complexo de *Myrcia laruotteana*. B – Mapa das populações do complexo de *Myrcia laruotteana* em cada domínio genético inferido por análise Bayesiana**31**

Figura 3 – Dendrograma formado a partir dos valores de Φ_{ST} par a par mostrando as relações entre os grupos formados na análise Bayesiana, utilizando o algoritmo *neighbor-joining*. Os números ao lado dos ramos representam os resultados de *bootstrap*. \diamond *Myrcia laruotteana*; * *Myrcia tomentosa*; \circ *Myrcia selloi*; \square *Myrcia lajeana*.....**32**

Capítulo 2

Figura 1 – *Myrcia laruotteana*. A – Aspecto geral do ramo (*Bidá et al.* 546). B – Face abaxial da folha (*Bidá et al.* 546). C – Inflorescência (*Bidá et al.* 546). C – Frutos com remanescentes do hipanto e do cálice presentes (*Siani s.n.*, RB 361717).....**52**

Figura 2 – Distribuição de *Myrcia laruotteana*.....**53**

Figura 3 – Variação morfológica foliar em <i>Myrcia laruotteana</i> . A – Cordeiro & Poliquesi 942. B – Dreveck & Godoy 49. C – Dreveck e Godoy 61. D – Santos 4. E – Bidá et al. 546. F – Sobral et al. 10221	54
Figura 4 – Distribuição de <i>Myrcia selloi</i>	56
Figura 5 – <i>Myrcia tomentosa</i> . A – Aspecto geral do ramo (<i>Hatschbach</i> et al. 69429). B – Face abaxial da folha (<i>Hatschbach</i> et al. 69429). C – Inflorescências (<i>Hatschbach</i> et al. 69429). D – Frutos com remanescentes do hipanto e do cálice presentes (<i>Tameirão Neto</i> 3128).....	57
Figura 6 - Figura 6. <i>Myrcia tomentosa</i> . A – Aspecto geral do ramo (<i>Hatschbach</i> et al. 69429). B – Face abaxial da folha (<i>Hatschbach</i> et al. 69429). C – Inflorescências (<i>Hatschbach</i> et al. 69429). D – Frutos com remanescentes do hipanto e do cálice presentes (<i>Tameirão Neto</i> 3128)	59
Figura 7 – Distribuição de <i>Myrcia tomentosa</i>	61

Índice de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 – Populações do complexo *Myrcia laruotteana* utilizadas nas análises genéticas com o marcador ISSR. Vouchers depositados nos herbários UEC e UPCB23

Tabela 2 – Tabela 2. Seis padrões de morfologia foliar das populações do complexo *Myrcia laruotteana*26

Tabela 3 – Sequência, número de fragmentos e tamanho dos fragmentos (em pares de base – pb) dos *primers* ISSR usados na análise de variabilidade genética em populações do complexo *Myrcia laruotteana*27

Tabela 4 – Variabilidade genética encontrada em 17 populações do complexo *Myrcia laruotteana* baseada em 59 locos de ISSR. *N*: total de fragmentos encontrados em cada população; *P*: percentual de locos polimórficos; *I*: Índice de Shannon; *H_E*: heterozigosidade média esperada dentro da população. Os desvios padrão estão entre parênteses. Veja a Tabela 1 para nome das populações28

Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA) para quatro diferentes agrupamentos testados para 17 populações do complexo de *Myrcia laruotteana*, e para os grupos formados a partir da análise Bayesiana: 1) seis grupos morfológicos; 2) quatro grupos nomenclaturais; 3) quatro grupos fitogeográficos; 4) dez grupos geográficos; 5) onze grupos formados na análise Bayesiana30

Tabela 6 – Grupos genéticos com suas respectivas populações do complexo *Myrcia laruotteana* inferidos a partir de análise Bayesiana. Veja Tabela 1 para nomes das populações31

Resumo Geral

Myrtaceae é conhecida como uma das mais complexas famílias de angiospermas. *Myrcia* teve sua última revisão taxonômica realizada há 153 anos e desde então inúmeras espécies novas foram descritas, deixando *Myrcia* como o segundo maior gênero da tribo Myrteae. O elevado número de espécies no gênero e a falta de uma revisão taxonômica completa e atualizada fez com que vários complexos de espécies mal delimitadas fossem formados em *Myrcia*. Um destes complexos é abordado no presente trabalho e inclui quatro espécies (*M. laruotteana*, *M. lajeana*, *M. selloi* e *M. tomentosa*) de ampla distribuição e grande variação morfológica, tornando difícil a separação entre os táxons. Neste estudo foram usados marcadores ISSR para investigar a correlação entre a variabilidade genética de populações destas espécies com aspectos morfológicos, geográficos, fitogeográficos e taxonômicos, a fim de esclarecer a delimitação das espécies. Levando em conta os resultados obtidos nestas análises, uma nova proposta de classificação específica é apresentada, com descrições dos táxons aceitos, dados de distribuição geográfica, floração e frutificação, e chave de identificação. No estudo de genética de populações com ISSR, o valor de diversidade genética encontrado ($H_e = 0,215$) foi mais baixo que o valor para espécies perenes, de distribuição ampla e fecundação cruzada. Isto pode ser explicado em partes pela auto-compatibilidade que as espécies do complexo *M. laruotteana* podem apresentar, como já relatado na literatura. Nenhum dos grupos que refletem aspectos morfológicos, geográficos e fitogeográficos testados apresentou boa estruturação genética, ou seja, nenhum deles mostrou alguma descontinuidade genética que pudesse representar os táxons envolvidos no complexo. Os grupos testados que representam a circunscrição taxonômica atual do complexo também não apresentaram boa estruturação genética. Os grupos formados a partir da análise Bayesiana mostraram melhor estruturação genética a partir da AMOVA (12% de variação entre as populações dentro dos grupos e 27% de variação entre os grupos). A análise Bayesiana juntamente com o dendrograma formado demonstra uma separação em dois grandes grupos, o primeiro formado por todas as populações de *M. tomentosa*, e o segundo contendo as populações das outras espécies misturadas. A partir destes resultados e levando em consideração toda a variação existente entre os extremos morfológicos das espécies, é proposta uma nova classificação para o

complexo, com sinonimização de *M. lajeana* sob *M. laruotteana*. *Myrcia tomentosa* e *M. laruotteana* podem ser reconhecidas principalmente pelo indumento, geralmente denso na primeira e quase ausente na segunda. *Myrcia selloi* pode ser reconhecida pela queda dos remanescentes do hipanto e do cálice, deixando os frutos com uma cicatriz circular apical.

Abstract

Myrtaceae is known as one of the most complex families of angiosperms. The last taxonomic revision of *Myrcia* was made 153 years ago and since then many new species were described, leaving *Myrcia* as the second largest genus of the tribe Myrteae. The high number of species in the genus and the lack of a complete and updated taxonomic revision resulted in many species complexes in *Myrcia*. One of these complexes is investigated in this work and includes four species (*M. laruotteana*, *M. lajeana*, *M. selloi* and *M. tomentosa*) with wide distribution and a lot of morphological variation, making it difficult to distinguish these taxa. This study used ISSR markers to investigate the correlation between the genetic variability of populations of these species with morphological, geographical, phytogeographic and taxonomic aspects, in order to clarify the delimitation of species. Taking into account the results obtained in these analyzes, a new proposal of specific classification is presented with descriptions of accepted taxa, geographical, flowering and fruiting data, and identification key. In the study of population genetics with ISSR, the value of genetic diversity ($H_e = 0.215$) was lower than the value for perennial, widely distributed and cross-fertilization species. This can be explained in part by self-compatibility that species within *M. laruotteana* complex apparently present, as previously reported in the literature. None of the groups that reflect morphological, geographical and phytogeographic aspects showed good genetic structure, i.e., none of them showed any genetic discontinuity that could represent the taxa involved in the complex. The groups represented by the current taxonomic circumscription of the complex also did not show good genetic structure. The groups formed from the Bayesian analysis showed better genetic structure from the AMOVA (12% variation among populations within groups and 27% variation between groups). The Bayesian analysis with the dendrogram formed showed two major groups, the first with all populations of *M. tomentosa*, and the second

containing mixed populations from other species. From these results and taking into account the large amount of variation between the morphological extremes of the species, we propose a new classification for the complex, with the synonymization of *M. lajeana* under *M. laruotteana*. *Myrcia tomentosa* and *M. laruotteana* differ from each other mainly by the indumenta, which is dense in the former and almost absent in the latter. *Myrcia selloi* differs from the others by the caduceus remnants of the hypanthium and calyx, leaving circular apical scar on the fruit.

Introdução Geral

Myrtaceae é uma família monofilética, que apresenta o maior número de espécies da ordem Myrtales (Judd *et al.* 2009), com aproximadamente 132 gêneros e mais de 5600 espécies (Govaerts *et al.* 2012). A família teve provável origem na Gondwana, durante o Cretáceo (Wilson *et al.* 2001; Systma *et al.* 2004), e atualmente ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo a Austrália, Sudeste da Ásia e América do Sul como centros de diversidade (Wilson *et al.* 2001). No Brasil, Myrtaceae é a família mais rica no Cerrado (Oliveira-Filho & Fontes 2000) e no estrato arbóreo da Floresta Atlântica (Mori *et al.* 1983).

Tradicionalmente, a família era dividida em duas subfamílias, de acordo principalmente com a morfologia do fruto: Leptospermoideae com frutos secos e folhas alternas ou opostas, e Myrtoideae com frutos carnosos e folhas sempre opostas (Legrand & Klein 1978). A primeira tinha como centro de dispersão a Oceania enquanto a segunda era distribuída principalmente na América do Sul (Legrand & Klein 1978; Sobral 2003). Após estudos moleculares (Wilson *et al.* 2001, 2005), a família foi reorganizada, já que os dados mostraram que as subfamílias reconhecidas até então não são monofiléticas. Desta forma, Myrtaceae tem sido dividida nas seguintes subfamílias: Psiloxylloideae, que é caracterizada principalmente pelas flores unissexuadas e número cromossômico básico $x=12$, representada por dois gêneros ocorrentes na África (*Psiloxylon* Thouars ex Tul. e *Heteropyxis* Harv.); e Myrtoideae, que tem flores bissexuadas e número cromossômico básico $x=11$, representada pelas demais mirtáceas conhecidas (Wilson *et al.* 2005).

A subfamília Myrtoideae é composta por 15 tribos, sendo que a mais rica é Myrteae (Wilson *et al.* 2005; Lucas *et al.* 2007), distribuída em regiões tropicais, subtropicais. Myrteae compreende todas as mirtáceas americanas, com exceção do gênero andino *Tepualia* Griseb. (Landrum & Kawasaki 1997).

Antes dos trabalhos de Lucas *et al.* (2005, 2007), o grupo que hoje representa Myrteae era dividido em três subtribos caracterizadas principalmente pela morfologia do embrião: Myrtinae com hipocótilo desenvolvido e cotilédones pequenos ou vestigiais; Eugeniinae com hipocótilo vestigial ou ausente e cotilédones carnosos; e Myrciinae com hipocótilo desenvolvido e cotilédones foliáceos (McVaugh 1968). Atualmente, dados

moleculares mostram que estes grupos não são monofiléticos (Lucas *et al.* 2007), e os autores propõem uma classificação baseada em grupos informais de espécies em torno dos gêneros *Plinia* L., *Myrcia* DC., *Myrceugenia* O.Berg, *Myrteola* O.Berg, *Pimenta* Lindl. e *Eugenia* L.

O grupo de *Myrcia*, representa a antiga subtribo Myrciinae, que era composta pelos gêneros *Myrcia* DC., *Gomidesia* Berg., *Marlierea* Cambess., *Calyptranthes* Sw. e *Myrceugenia* Berg. Segundo Lucas *et al.* (2005, 2007), *Myrceugenia* não permanece neste grupo, formando seu próprio grupo informal. Desta forma, apenas *Myrcia*, *Gomidesia*, *Marlierea* e *Calyptranthes* formam o grupo de *Myrcia*, também chamado de *Myrcia* s.l., caracterizado pelos ovários bi ou tri-loculares contendo dois óvulos cada, e inflorescências geralmente paniculadas, além das características de embrião já citadas (Lucas *et al.* 2011).

O gênero *Myrcia* foi descrito por De Candolle (1827). Em 1828, o mesmo autor realizou novo trabalho totalizando 108 espécies divididas em duas seções: *Sphaerocarpha* e *Oocarpe*, com base na forma dos frutos. Após a sua descrição, o gênero sofreu várias modificações quanto às circunscrições de seções e subgêneros. Ao final do tratamento de Cambessèdes (1829), o total de espécies do gênero aumentou para 152. O trabalho de Berg (1857-1859), que pode ser considerado como o mais importante para o gênero, tratou também outros gêneros que hoje são sinônimos de *Myrcia*: *Aulomyrcia* O.Berg, *Calyptromyrcia* O.Berg, *Calycampe* O.Berg e *Gomidesia* O.Berg. Grisebach (1861) e Niedenzu (1893) propuseram *Aulomyrcia* como seção e subgênero de *Myrcia*, respectivamente. McVaugh (1968) dividiu *Myrcia* em três seções: *Myrcia* e *Aulomyrcia*, separados pela morfologia do fruto e do hipanto, e *Armeriela*, com plantas de características intermediárias entre os gêneros *Myrcia* e *Marlierea*. Os estudos de Lucas *et al.* (2005, 2011), mostram as seções *Armeriela* e *Aulomyrcia* como grupos não monofiléticos.

Bentham (1868) e Kiaerskou (1893) foram os primeiros autores a propor *Gomidesia* como sinônimo de *Myrcia*, já que os gêneros são separados principalmente pela morfologia da antera. Entretanto, Legrand (1958) revalidou o gênero, e foi seguido por McVaugh (1968). Landrum & Kawasaki (1997) e Sobral (2003) aceitam *Gomidesia* como sinônimo de *Myrcia*. Mais recentemente, Lucas *et al.* (2007) mostraram que *Gomidesia* está inserido

em *Myrcia* s.l., compondo um grupo monofilético bem suportado. Atualmente, todas as espécies de *Gomidesia* estão sinonimizadas em *Myrcia* (Govaerts *et al.* 2012).

O último estudo molecular publicado com *Myrcia* s.l. (Lucas *et al.* 2011), mostra o gênero *Myrcia* (*Myrcia* s.s.) como um grupo parafilético, uma vez que *Calyptranthes* e *Marlierea* aparecem inseridos no mesmo grupo. Individualmente, *Calyptranthes* é monofilético, enquanto *Marlierea* não. Desta forma, os autores sugerem que deve ser feita uma nova classificação subgenérica para *Myrcia*, com possível sinonimização dos gêneros citados acima.

O gênero *Myrcia* (s.s.) apresenta cerca de 396 espécies (Govaerts *et al.* 2012) e ocorre desde o México e Caribe até o norte da Argentina e Uruguai (Landrum & Kawasaki 1997). São árvores ou arbustos, com tricomas simples ou dibráquiados. Geralmente apresentam inflorescências paniculadas, flores 5-meras, e cálice aberto no botão floral. O hipanto pode ser prolongado ou não acima do ovário. O ovário é 2-4-locular, cada lóculo com 2 óvulos e placentação axilar. O fruto é globoso, coroado pelos lobos do cálice, encerrando 1-2 sementes com testa membranácea ou crustácea. O embrião é do tipo mircióide (Landrum & Kawasaki 1997; Legrand & Klein 1969).

Após o trabalho de Berg (1857-1859), não foi realizada nenhuma revisão do gênero. Trabalhos taxonômicos mais recentes (De-Carvalho 2007; Legrand & Klein 1969; Nic Lughadha 1995; Mazine & Souza 2008; Morais & Lombardi 2006; Soares-Silva 2000; Sobral 2003; Souza *et al.* 2007) incluem tratamentos apenas em escalas geográficas restritas. Devido à falta de uma revisão completa atualizada e ao grande número de espécies, é comum encontrarmos complexos de espécies mal delimitadas em *Myrcia*. Segundo Biffin *et al.* (2010), o elevado número de espécies dentro de alguns gêneros de Myrtaceae tem como consequência a dificuldade na distinção dos táxons envolvidos. Um destes complexos de espécies é constituído por *Myrcia laruotteana* Cambess. – *M. selloi* (Spreng.) N.Silveira – *M. lajeana* D.Legrand – *M. tomentosa* (Aubl.) DC., aqui denominado de complexo *M. laruotteana*.

Segundo Sobral *et al.* (2012), *M. laruotteana* ocorre de Santa Catarina ao Maranhão, *M. tomentosa* tem distribuição desde o Paraná até o Amazonas e Paraíba, e *M. lajeana* e *M. selloi* ocorrem do Rio Grande do Sul ao Paraná, porém existem registros de herbário de *M. selloi* até a Bahia. Fora do Brasil, *M. laruotteana* ainda ocorre na Argentina e Paraguai

(Legrand & Klein 1969), *M. selloi* na Argentina (Rotman 1969) e *M. tomentosa* desde o Panamá até o Brasil (Kawasaki 1989).

As espécies incluídas neste complexo, exceto *M. lajeana*, foram abordadas em estudo filogenético com ênfase em *Myrcia* (Lucas *et al.* 2011). A árvore resultante deste trabalho mostrou um clado com alto suporte estatístico (Figura 1) que agrupa *M. laruotteana*, *M. tomentosa*, *M. selloi* e *M. aff. selloi* (planta coletada em Niterói, RJ, que representa uma das formas de *M. selloi*). Essas espécies se diferem de outras espécies do mesmo gênero pelas seguintes características (Lucas *et al.* 2011): botões com uma constrição abaixo do ovário; panículas em forma de um triângulo abruptamente estreito e com ramos assimétricos; lobos do cálice livres, reflexos e pontiagudos, com seus remanescentes no fruto em forma de estrela; e bractéolas pontiagudas embaixo de cada flor, usualmente persistentes depois que os frutos caem.

Segundo Legrand & Klein (1969), *M. laruotteana*, *M. lajeana* e *M. selloi* (como *M. ramulosa* DC.) são distintas principalmente pela morfologia e tamanho das folhas, pubescência geral da planta e persistência ou não do tubo do hipanto e cálice no fruto. Neste mesmo trabalho, os autores destacaram diversas vezes a dificuldade em separar estas três espécies, chegando a citar a presença de prováveis híbridos com características intermediárias. *Myrcia tomentosa* é incluída neste complexo porque, apesar de geralmente apresentar pubescência mais densa que as outras espécies, ela se aproxima muito morfologicamente de algumas formas de *M. laruotteana*, tornando difícil a separação das duas espécies (Lucas *et al.* 2011). Os caracteres usados na distinção destes táxons apresentam grande variabilidade, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre eles.

Recentemente houve um incremento no número de estudos usando marcadores moleculares de loco único (*single-locus markers*) para analisar relações entre táxons com divergência recente (Crawford & Mort 2004). Entre estes marcadores estão os microssatélites (ou SSR, “sequências simples repetidas”), que são pequenas sequências de nucleotídeos repetidas em *tandem*, bastante comuns no DNA de plantas e animais (Powell *et al.* 1996). Para serem usados como marcadores moleculares, os microssatélites requerem o conhecimento das sequências que flanqueiam o SSR, para construção dos *primers* usados na reação de PCR (Liu & Wendel 2001). Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*, Zietkiewicz *et al.* 1994) são baseados em SSR, porém não precisam do

conhecimento prévio das sequências que flanqueiam o microssatélite e estão sendo amplamente usados em trabalhos de genética de populações. São marcadores rápidos e fáceis de usar, além de empregar técnicas mais baratas e menos laboriosas, apesar de terem a desvantagem de ser um marcador dominante. Eles são muito úteis na detecção de polimorfismos genéticos, pois geram um grande número de fragmentos polimórficos que aparecem na forma de bandas no gel de eletroforese (Zietkiewicz *et al.* 1994).

O marcador ISSR já foi usado em estudos sobre diversidade genética de populações e complexos híbridos naturais e de cultivares (Fang & Roose 1997; Nagaoka & Ogihara 1997; Wolfe *et al.* 1998; Patzak 2001; Gaiero *et al.* 2011; Rana *et al.* 2012; entre outros). Apesar da técnica fácil, poucos trabalhos com ISSR foram desenvolvidos no Brasil (Manica-Cattani *et al.* 2009; Souza & Lovato 2010; Barbosa 2011; Santos 2011; entre outros). Em Myrtaceae, foram realizados estudos com ISSR abordando relações entre espécies de *Eucalyptus* sp. (Balasaravanan *et al.* 2005), relações entre populações de *Metrosideros polymorpha* (Wright 2007), diversidade genética em *E. grandis* (Okun *et al.* 2008) e *Rhomomyrtus tomentosa* (Xiaoling 2010), e estrutura genética em microescala local de *Myrcia splendens* (Brandão *et al.* 2011).

Os objetivos do presente trabalho consistem em investigar os táxons incluídos no complexo para verificar a delimitação entre as espécies. Para tanto, propõem-se estudos moleculares com um marcador dominante altamente variável, ISSR, e estudos taxonômicos clássicos.

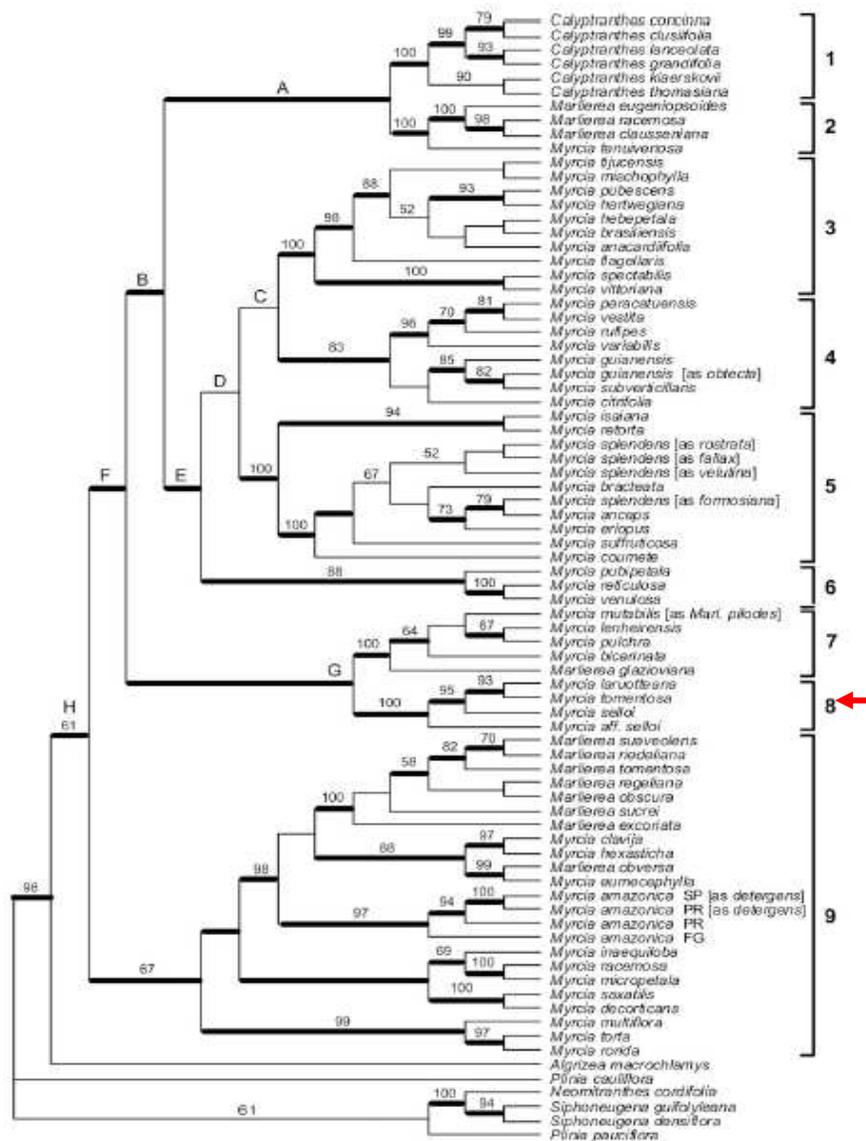


Figura 1. Árvore de consenso da análise Bayesiana com dados combinados dos marcadores ITS, ETS, *psbA-trnH*, *matK* e *trnL*. Bootstrap (da análise de parcimônia) maior que 50 são mostrados acima dos ramos; clados que receberam probabilidades da análise Bayesiana maior que 0,95 são indicados pelos ramos em negrito (Lucas *et al.* 2011). O clado 8, em destaque, agrupa as espécies do complexo *M. laruotteana*.

Referências Bibliográficas

Amorim, B.S.; Alves, M. 2011. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Myrtaceae. **Rodriguésia** 62(3):499-514.

Arantes, A.A.; Monteiro, R. 2002. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** 3(2):111-127.

Balasarayanan, T.; Chezian, P.; Kamalakannan, R.; Ghosh, M.; Yashoda, R.; Varghese, M.; Gurumurth, K. 2005. Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **Tree Physiology** 25:1295-1305.

Barbosa, A.R. 2011. **Biosistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogenética e genética de populações**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Minas Gerais.

Bentham, G. 1868. Notes on Myrtaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 10:101-166.

Berg, O. Myrtaceae. 1857-1859. In: Martius, C. F. P. **Flora Brasiliensis** 14(1):1-656.

Biffin, E.; Lucas, E.J.; Craven, L.A.; Costa, I.R.; Harrington, M.G.; Crisp, M.D. 2010. Evolution of exceptional species richness among lineages of flesh-fruited Myrtaceae. **Annals of Botany** 106:79-93.

Brandão, M. M.; Vieira, F.A.; Carvalho, D. 2011. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore** 35(5):957-964.

Bünger, M.O. 2011. **Myrtaceae na Cadeia do Espinhaço: a flora do Parque Estadual do Itacolomi (Ouro Preto/Mariana) e uma análise das relações florísticas e da influência**

das variáveis geoclimáticas na distribuição das espécies. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Cambèssedes, J. 1829. Myrtaceae. In: Saint-Hilaire, A.; Jussieu, A.; Cambèssedes, J. 1829. **Flora Brasiliae Meridionalis** 2:277-371.

Crawford, D.J.; Mort, M.E. 2004. Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. **Taxon** 53(3):631-635.

De Candolle, A. P. 1827. Myrtaceae. In: **Dictionaire classique d’histoire naturelle**. 11: 399-408.

De Candolle, A.P. 1828. Myrtaceae. In: **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis** 3:207-296.

De-Carvalho, P.L. 2007. **Myrcia DC. ex Guill. (seção Myrcia, Myrtaceae) no Distrito Federal, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília.

Fang, D.Q.; Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics** 95:408-417.

Gaiero, P.; Mazzella, C.; Agostini, G.; Bertolazzi, S.; Rossato, M. 2011. Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Buttia* Becc. species based on ISSR. **Plant Systematics and Evolution** 292:105-116.

Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B.K.; Landrum, L.L.; Matsumoto, K.; Mazine, F.F.; Nic Lughadha, E.; Proença, C.; Soares-Silva, L.H.; Wilson, P.G.; Lucas, E. 2012. **World Checklist of Myrtaceae.** Royal Botanical Gardens, Kew. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/>. Acesso em: 10/11/2012.

Grisebach, A.H.R. 1861. Myrtaceae. **Flora of the British West Indians Islands.** 234p.

Judd, W. S., Campbell, C.S.; Kellogg, E.; Stevens, P.F.; Donoghue, M.J. 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 612 p.

Kawasaki, M. L. 1989. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 11:121-170.

Kiaerskou, H. F. C. 1893. Enumeratio Myrtacearum Brasiliensium. In: Warming, E. **Symbolarum ad Floram Brasiliae Centralis Cognoscedam**, 200 p.

Landrum, L. R.; Kawasaki, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** 49(4):508-536.

Legrand, C.D. 1958. Las especies tropicales del género *Gomidesia*. **Comunicaciones Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo** 3(40):1-39.

Legrand, C. D.; Klein, R. M. 1969. Mirtáceas – *Myrcia*. In: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 218-330.

Legrand, C.D; Klein, R.M. 1978. Mirtáceas – *Myrciaria*, *Pseudocaryophyllus*, *Blepharocalyx*, espécies suplementares, espécies cultivadas, generalidades. In: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**, p. 733-876.

Liu, B.; Wendel, J.F. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes** 1:205-208.

Lucas, E.J.; Belsham, S.R.; Nic Lughadha, E.M.; Orlovich, D.A.; Sakuragui, C.M.; Chase, M.W.; Wilson, P.G. 2005. Phylogenetic patterns in the flesy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution** 251:35-51.

Lucas, E.J. Harris, S.A.; Mazine, F.F.; Belsham, S.R.; Nic Lughadha, E.M.; Telford, A.; Gasson, P.E.; Chase, M.W. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon** 56(4):1105-1128.

Lucas, E.J.; Matsumoto, K.; Harris, S.A.; Nic Lughadha, E.M.; Benardini, B.; Chase, M.W. 2011. Phylogenetics, morphology, and evolution of the large genus *Myrcia* s.l. (Myrtaceae). **International Journal of Plant Sciences** 172(7):915-934.

Manica-Cattani, M. F., Zacaria, J., Pauletti, G., Atti-Serafini, L.; Echeverrigaray, S. 2009. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology** 69: 375-380.

Mazine, F. F.; Souza, V. C. 2008. Myrtaceae dos campos de altitude do Parque Nacional do Caparaó – Espírito Santo/Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 59(1):57-74.

McVaugh, R. 1968. The genera of american Myrtaceae: an interim report. **Taxon** 17(4):354-418.

Morais, P. O.; Lombardi, J. A. 2006. A família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** 7(2):3-32.

Mori, S.A.; Boom, B.M.; Carvalino, A.M.; Santos, T.S. 1983. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica** 15(1): 68-70.

Nagaoka, T.; Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 94:597-602.

Nic Lughadha, E. 1995. Myrtaceae. In: Stannard, B. L. **Flora of the Pico das Almas**, p. 492-517.

Niedenzu, F. 1893. Myrtaceae. In: Engler, H. G. A.; Prantl, K. A. E. **Die natürlichen Pflanzenfamilien** 3(7):57-105.

Okun, D.O.; Kenya, E.U.; Oballa, P.O.; Odee, D.W.; Muluvi, G.M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology** 7(13):2119-2123.

Oliveira-Filho, A.T.; Fontes, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of the climate. **Biotropica** 32(4b):793-810.

Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica** 121:9-18.

Powell, W.; Machray, G. C.; Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science** 1(7):215-222.

Rana, T.S.; Narzary, D.; Ohri, D. 2012. Molecular differentiation of *Chenopodium album* complex and some related species using ISSR profiles and ITS sequences. **Gene** 495:29-35.

Rotman, A. D. 1969. Myrtaceae. In: Burkart, A. **Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina), Buenos Aires.**

Santos, J. 2011. **Estrutura populacional de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no Brasil: subsídios para a conservação.** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Soares-Silva, L.H. 2000. **A família Myrtaceae – subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do Rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil.** Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Sobral, M. 2003. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul.** 1ed. Unisinos, São Leopoldo. 215p.

Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. 2012. Myrtaceae *in* **Lista de espécies da flora do Brasil.** Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>. Acesso em: 10/11/2012.

Souza, M.C.; Morim, M.P.; Conde, M.M.S.; Menezes, L.F.T. 2007. Subtribo Myrciinae O.Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 21(1):49-63.

Souza, H.A.V.; Lovato, M.B. 2010. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology** 38:49-56.

Systema, K.J.; Litt, A.; Zjhra, M.L.; Pires, C.; Nepokroeff, M.; Conti, E.; Walker, J.; Wilson, P.G. 2004. Clades, clocks, and continents: historical and biogeographical analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and relatives in the southern hemisphere. **International Journal of Plant Sciences** 165(4):85-105.

Vieira, F.C.S. 2010. **Myrtaceae Juss. No Alto Quiriri, Garuva, Santa Catarina, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Wilson, P. G.; O'brien, M. M.; Gadek, P. A.; Quinn, C. J. 2001. Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany** 88: 2013-2025.

Wilson, P.G.; O'brien, M.M.; Heslewood, M.M.; Quinn, C.J. 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution** 251: 3-19.

Wolfe, A.D.; Xiang, Q.; Kephart, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology** 7:1107-1125.

Wright, M.E. 2007. **A genetic comparison of bog vs. forest populations of *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae) in Hawaii.** Tese (Mestrado em Artes) – University of Colorado.

Xiaoling, Y. 2010. **Mating system and genetic diversity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae) detected by ISSR markers.** Tese (Mestrado em Filosofia) – The University of Hong Kong.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176-183.

CAPÍTULO 1

Uso de marcadores moleculares ISSR na
delimitação do complexo *Myrcia laruotteana*
Cambess. (Myrtaceae)

Resumo – Myrtaceae é conhecida como uma família de alta complexidade taxonômica. Devido ao grande incremento no número de espécies novas e a falta de uma revisão taxonômica completa e recente, é comum encontrarmos complexos de espécies mal delimitadas em diversos gêneros da família, inclusive em *Myrcia*. Um destes complexos é constituído por *M. laruotteana*, *M. selloi*, *M. lajeana* e *M. tomentosa*. Populações destas quatro espécies foram analisadas utilizando marcadores ISSR para determinar a variabilidade e a estruturação genética, a fim de verificar se existem relações entre padrões genéticos, morfológicos e geográficos que ajudem na delimitação das espécies. O valor de diversidade genética encontrada foi baixo ($H_e = 0,215$) se comparado a espécies com características semelhantes. Nenhum agrupamento previamente testado (morfológico, geográfico, fitogeográfico e aqueles usados na taxonomia tradicional) apresentou boa estruturação genética. Os grupos formados a partir da análise Bayesiana foram os que mostraram melhor estruturação genética a partir da AMOVA (12% de variação entre as populações dentro dos grupos e 27% de variação entre os grupos). A análise Bayesiana junto com o dendrograma formado mostram dois grandes grupos, o primeiro formado por todas as populações de *M. tomentosa*, e o segundo contendo populações das outras espécies misturadas. Entre estas populações do segundo grupo, *M. selloi* pode ser distinguida pelo cálice e hipanto caducos, uma característica muito peculiar que dificulta sua possível sinonimização sob *M. laruotteana*. Estes dados servirão como base para uma nova classificação taxonômica do complexo estudado.

Palavras-chave: complexo de espécies, genética de populações, *Myrcia lajeana*, *Myrcia selloi*, *Myrcia tomentosa*, Myrteae.

Abstract – Myrtaceae is known as a family with high taxonomic complexity. Due to the large increase in the number of new species and the lack of a complete and recent taxonomic revision, it is common to find species complexes poorly delimited in several genera of the family, including *Myrcia*. One of these complexes is composed by *M. laruotteana*, *M. selloi*, *M. lajeana* and *M. tomentosa*. Populations of these four species were analyzed using ISSR markers to determine the genetic variability and structure in order to

check if there are relationships between genetic, morphological and geographical patterns, in order for us to better understand the species boundaries. The amount of genetic diversity found was low ($H_e = 0.215$) compared to species with similar characteristics. No grouping previously tested (morphological, geographical, phytogeographic and the ones used in the traditional taxonomy) showed good genetic structure. The groups formed from the Bayesian analysis showed better genetic structure from the AMOVA (12% variation among populations within groups and 27% variation between groups). The Bayesian analysis with the dendrogram formed showed two major groups, the first with all populations of *M. tomentosa*, and the second containing mixed populations from other species. Among these populations within this second group, *M. selloi* can be distinguished by the cadocous calyx and hypanthium, a character that is very peculiar and hinders its possible synonymization under *M. laruotteana*. These data will be the base of a new specific classification for the complex studied.

Key-words: species complex, population genetics, *Myrcia lajeana*, *Myrcia selloi*, *Myrcia tomentosa*, Myrteae.

Introdução

Diversos estudos moleculares (Wilson *et al.* 2001, 2005; Lucas *et al.* 2005, 2007, 2011) têm mostrado boa definição tanto em filogenia como na delimitação de táxons de categorias superiores (subfamílias, tribos, subtribos) dentro da família Myrtaceae. Atualmente, Myrtaceae vem sofrendo um grande incremento no número de espécies novas (Landrum & Oliveira 2010; Mazine & Souza 2010; Sobral & Mazine 2010; Sobral *et al.* 2010; Proença *et al.* 2011; Faria & Proença 2012; entre outros) e, conseqüentemente, as dificuldades de identificação específica também aumentam (Biffin *et al.* 2010).

O gênero *Myrcia* é um dos mais ricos da tribo Myrteae, com cerca de 396 espécies (Govaerts *et al.* 2012). Devido à falta de uma revisão completa atualizada e ao grande número de espécies, é comum encontrarmos complexos de espécies mal delimitadas em *Myrcia*. Um destes complexos é constituído por *Myrcia laruotteana* Cambess. – *M. selloi* (Spreng.) N.Silveira – *M. lajeana* D.Legrand – *M. tomentosa* (Aubl.) DC., aqui denominado de complexo *M. laruotteana*.

Segundo Sobral *et al.* (2012), *M. laruotteana* ocorre de Santa Catarina ao Maranhão, *M. tomentosa* tem distribuição desde o Paraná até o Amazonas e Paraíba, e *M. lajeana* e *M. selloi* ocorrem do Rio Grande do Sul ao Paraná, porém existem registros em herbário de *M. selloi* até a Bahia. Fora do Brasil, *M. laruotteana* ainda ocorre na Argentina e Paraguai (Legrand & Klein 1969), *M. selloi* na Argentina (Rotman 1969) e *M. tomentosa* desde o Panamá até o Brasil (Kawasaki 1989).

As espécies incluídas neste complexo, exceto *M. lajeana*, foram abordadas em estudo filogenético com ênfase em *Myrcia* (Lucas *et al.* 2011). A árvore resultante deste trabalho mostrou um clado com alto suporte estatístico que agrupa *M. laruotteana*, *M. tomentosa* e *M. selloi*. Essas espécies se diferem de outras espécies do mesmo gênero pelas seguintes características (Lucas *et al.* 2011): botões com uma constrição abaixo do ovário; panículas em forma de um triângulo abruptamente estreito e com ramos assimétricos; lobos do cálice livres, reflexos e pontiagudos, com seus remanescentes no fruto em forma de estrela; e bractéolas pontiagudas embaixo de cada flor, usualmente persistentes depois que os frutos caem.

Segundo Legrand & Klein (1969), *M. laruotteana*, *M. lajeana* e *M. selloi* (como *M. ramulosa* DC.) são distintas principalmente pela morfologia e tamanho das folhas, pubescência geral da planta e persistência ou não do tubo do hipanto e cálice no fruto. Neste mesmo trabalho, os autores destacaram diversas vezes a dificuldade em separar estas três espécies, chegando a citar a presença de prováveis híbridos com características intermediárias. *Myrcia tomentosa* é incluída neste complexo porque, apesar de geralmente apresentar pubescência mais densa que as outras espécies, ela se aproxima muito morfológicamente de algumas formas de *M. laruotteana*, tornando difícil a separação das duas espécies (Lucas *et al.* 2011). Os caracteres usados na distinção destes táxons apresentam grande variabilidade, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre eles.

Recentemente houve um incremento no número de estudos usando marcadores moleculares de loco único (“single-locus markers”) para analisar relações entre táxons com divergência recente (Crawford & Mort 2004). Entre estes marcadores estão os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*, Zietkiewicz *et al.* 1994), que são muito úteis na detecção de polimorfismos genéticos a nível específico, pois geram um grande número de fragmentos polimórficos que aparecem na forma de bandas no gel de eletroforese (Zietkiewicz *et al.* 1994).

O marcador ISSR já foi usado em estudos sobre diversidade genética de populações e complexos híbridos naturais e de cultivares (Fang & Roose 1997; Nagaoka & Ogihara 1997; Wolfe *et al.* 1998; Patzak 2001; Gaiero *et al.* 2011; Rana *et al.* 2012; entre outros). Apesar da técnica fácil, poucos trabalhos com ISSR foram desenvolvidos no Brasil (Manica-Cattani *et al.* 2009; Souza & Lovato 2010; Barbosa 2011; Santos 2011; entre outros). Em Myrtaceae, foram realizados estudos com ISSR abordando relações entre espécies de *Eucalyptus* sp. (Balasaravanan *et al.* 2005), relações entre populações de *Metrosideros polymorpha* (Wright 2007), diversidade genética em *E. grandis* (Okun *et al.* 2008) e *Rhomomyrtus tomentosa* (Xiaoling 2010), e estrutura genética em microescala local de *Myrcia splendens* (Brandão *et al.* 2011).

Apesar dos problemas taxonômicos existentes na tribo Myrteae, não existem trabalhos que tratam de complexos de espécies. Dessa forma, os objetivos deste estudo são: (1) verificar a variação e a estrutura genética de populações de *M. laruotteana*, *M. selloi*, *M.*

lajeana e *M. tomentosa* usando marcadores ISSR, e (2) inferir a diferenciação genética e as relações entre as populações e os táxons envolvidos no complexo.

Metodologia

Amostragem populacional

O material utilizado para o estudo provém de 17 populações, sendo cinco de *M. laruotteana*, quatro de *M. tomentosa*, quatro de *M. lajeana* e quatro de *M. selloi*, totalizando 200 indivíduos (Tabela 1). As populações contêm entre quatro e 15 indivíduos. Foram coletadas folhas de todos os indivíduos encontrados, além de um voucher por população, depositado no herbário UEC (acrônimos segundo Thiers 2012) com duplicatas enviadas para o herbário UPCB e outros herbários.

Extração de DNA e amplificação

As extrações de DNA foram procedidas a partir de folhas armazenadas em sílica-gel. A metodologia seguida foi adaptada da proposta por Doyle & Doyle (1987). Os produtos de extração foram visualizados em gel de agarose 1% e tampão TAE 1x, corados em solução de brometo de etídeo e fotografados em aparelho de fotodocumentação.

Foram realizadas reações de amplificação para 25 *primers* de ISSR, com volume final de 8,2 μ L. As reações foram feitas a partir do kit *TopTaq Master Mix* (Qiagen Biotechnology), contendo H₂O, corante e *Top Taq* polimerase, com adição de *primer* a 20mM e DNA genômico (1:50). As amplificações foram realizadas em programa com pre-melting a 94°C por 2 minutos, 37 ciclos com etapa de denaturação a 94°C por 15 segundos, etapa de anelamento a 42°C por 30 segundos e etapa de extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 0,5x, correndo em voltagem de 100 V por aproximadamente 3 horas e 30 minutos. Então, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo e fotodocumentados. Foi utilizado Ladder de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) para estimar o tamanho molecular dos fragmentos produzidos.

Tabela 1. Populações do complexo *Myrcia laruotteana* utilizadas nas análises genéticas com o marcador ISSR. Vouchers depositados nos herbários UEC e UPCB.

População	Nome	Espécie	Nº ind	Coordenadas	Voucher
Anápolis – GO	ANA	<i>M. tomentosa</i>	15	16°22'58"S; 48°56'37"O	Lima, D.F. & Faria, J.E.Q. 290
Brasília – DF	BRA-1	<i>M. tomentosa</i>	13	15°52'27"S; 47°50'50"O	Lima, D.F. & Faria, J.E.Q. 294
Londrina – PR	LON	<i>M. laruotteana</i>	12	23°27'24"S; 51°14'19"O	Lima, D.F. & Soller, A. 295
Cambé – PR	CAM	<i>M. laruotteana</i>	15	23°17'59"S; 51°16'43"O	Lima, D.F. & Soller, A. 296
Campo Mourão – PR	CMOU	<i>M. laruotteana</i>	15	24°01'07"S; 52°21'37"O	Lima, D.F. <i>et al.</i> 297
Coronel Xavier Chaves – MG	CXC	<i>M. laruotteana</i>	12	21°03'30"S; 44°09'14"O	Lima, D.F. <i>et al.</i> 299
Prados – MG	PRA	<i>M. tomentosa</i>	13	21°02'21"S; 44°07'06"O	Lima, D.F. <i>et al.</i> 300
Garuva – SC	QUI-1	<i>M. lajeana</i>	6	26°01'50"S; 48°57'30"O	Lima, D.F. & Vieira, F.C.S. 335
Garuva – SC	QUI-2	<i>M. lajeana</i>	6	26°02'59"S; 48°57'12"O	Lima, D.F. & Vieira, F.C.S. 336
Joinville – SC	JOIN	<i>M. selloi</i>	11	26°12'25"S; 48°46'55"O	Lima, D.F. & Vieira, F.C.S. 337
Rio Branco do Sul – PR	RBS	<i>M. tomentosa</i>	15	25°05'57"S; 49°22'39"O	Lima, D.F. <i>et al.</i> 338
Brasília – DF	BRA-2	<i>M. laruotteana</i>	7	15°43'43"S; 47°54'39"O	Faria, J.E.Q. <i>et al.</i> 1983
São Francisco do Sul – SC	SFS	<i>M. selloi</i>	14	26°13'44"S; 48°40'46"O	Lima, D.F. <i>et al.</i> 344
Nova Petrópolis – RS	NOP	<i>M. lajeana</i>	4	29°21'15"S; 51°04'19"O	Lima, D.F. & Molz, M. 347
São Francisco de Paula – RS	SFP	<i>M. lajeana</i>	12	29°15'54"S; 50°18'53"O	Lima, D.F. & Molz, M. 348
Piracicaba – SP	PIRA	<i>M. selloi</i>	15	22°42'54"S; 47°37'46"O	Lima, D.F. & Pinto, R.B. 350
Niterói – RJ	NIT	<i>M. selloi</i>	15	22°58'20"S; 43°01'15"O	Lima, D.F. <i>et al.</i> 352

Análise de variabilidade genética das populações

Uma matriz binária foi construída a partir da leitura dos perfis eletroforéticos, onde cada indivíduo foi genotipado quanto à presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos. Os locos considerados de baixa resolução foram excluídos da análise. Foram consideradas homólogas todas as bandas de tamanho molecular igual em um mesmo *primer* (Thormann

et al. 1994). O programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012) foi utilizado para avaliar a variabilidade genética por meio do número de locos polimórficos (N) e exclusivos (N_{ex}), porcentagem de locos polimórficos (P), índice de diversidade de Shannon (I) e heterozigosidade média esperada para as populações (H_e).

Uma matriz de distâncias euclidianas quadradas foi construída a partir da matriz de fenótipos ISSR para a análise de variância molecular (AMOVA), também utilizando o programa GenAlEx 6.5. A partir da AMOVA foi quantificada a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferenciação interpopulacional. A análise da estrutura genética das populações foi feita a partir do cálculo do Φ_{ST} (análogo à estatística F , Wright 1921). Foram testados os seguintes agrupamentos para as populações amostradas: 1- quatro grupos “taxonômicos”, que representam a circunscrição atual do complexo estudado (*M. laruotteana* x *M. tomentosa* x *M. lajeana* x *M. selloi*); 2- seis grupos de acordo com morfologia de folha (Figura 1; Tabela 2); 3- quatro grupos fitogeográficos (Floresta Ombrófila Densa (FOD) x FOD alto-montana x Floresta Ombrófila Mista (FOM)/Floresta Estacional Semidecidual (FES) x Savana; Veloso 1991); 4- dez grupos geográficos (populações com 200 km ou mais de distância e/ou 500 m ou mais de altitude).

Também foi realizada uma análise Bayesiana utilizando o pacote GENELAND 4.0.3 (Guillot & Santos 2010) disponível no programa R (<http://www.cran.r-project.org/>) para inferir o número de grupos genéticos nas populações amostradas. Os valores de K (grupos genéticos) foram estimados entre 1 e 18, com 10 corridas independentes e 200.000 interações MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). Nesta abordagem foi possível acessar as probabilidades de clusters de populações estruturadas e probabilidade de cada indivíduo pertencer à população amostrada ou apresentar origem externa, inferindo possíveis eventos de migração e zonas híbridas entre populações.

Uma nova AMOVA foi realizada com os grupos formados a partir da análise Bayesiana com o programa GenAlEx 6.5. O programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans 2002) foi usado para construir uma matriz com os valores de Φ_{ST} entre todos os pares de grupos formados na análise Bayesiana. Esta matriz foi utilizada para a construção do dendrograma utilizando o algoritmo *neighbor-joining* com auxílio do pacote Neighbor, disponível no programa PHYLIP (Felsenstein 1993). Os suportes estatísticos foram calculados com o

pacote Consense, do mesmo programa. A árvore resultante foi visualizada com o TREEVIEW (Page 1996).

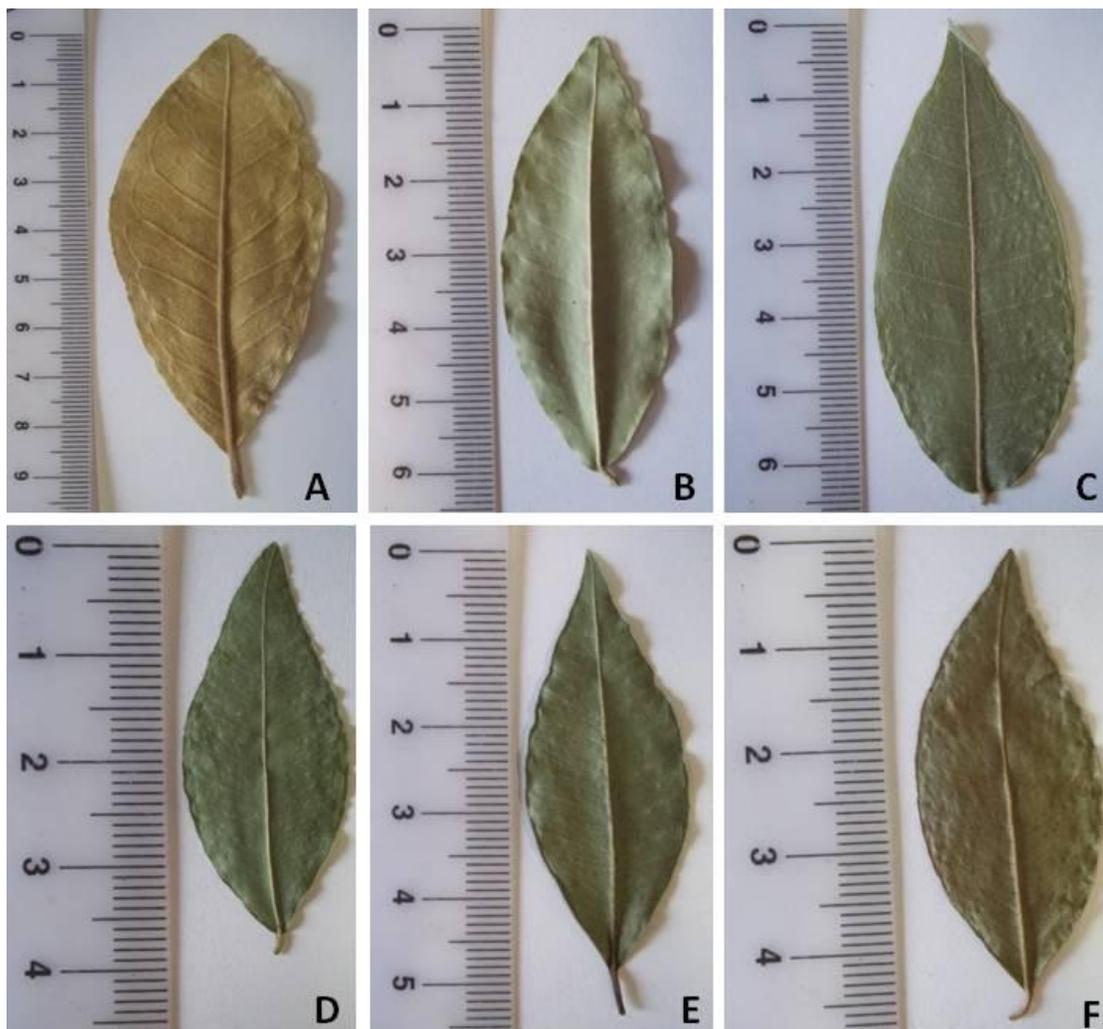


Figura 1. Padrões de morfologia foliar das populações de complexo de *Myrcia laruotteana*. A – Padrão 1 (ANA, BRA-1, PRA, RBS). B – Padrão 2 (CXC, BRA-2). C – Padrão 3 (LON, CAM, CMOU, SFS, JOIN). D – Padrão 4 (PIRA, NIT). E – Padrão 5 (NOP, SFP). F – Padrão 6 (QUI-1, QUI-2). Veja a Tabela 1 para nome das populações. Veja Tabela 2 para descrições dos padrões.

Tabela 2. Seis padrões de morfologia foliar das populações do complexo *Myrcia laruotteana*. Veja a Tabela 1 para nome das populações.

	Padrão 1 (ANA, BRA-1, PRA, RBS)	Padrão 2 (CXC, BRA-2)	Padrão 3 (LON, CAM, CMOU, JOIN, SFS)	Padrão 4 (PIRA, NIT)	Padrão 5 (NOP, SFP)	Padrão 6 (QUI-1, QUI-2)
Forma da folha	Normalmente obovada	Elíptico-lanceolada	Normalmente ovada	Ovada, elíptica	Elíptico-lanceolada	Elíptica, ovada
Ângulo de divergência das nervuras secundárias	>90°	>90°	=90°	>90°	>90°	>90°
Nervuras secundárias	Calibre diminuindo até a margem, onde se encontram formando arcos	Calibre diminuindo até a margem, onde se encontram formando arcos	Mesmo calibre até a margem, encontrando com a nervura marginal em ca. 90°	Mesmo calibre até a margem, encontrando com a nervura marginal em ca. 90°	Mesmo calibre até a margem, encontrando com a nervura marginal em ca. 90°	Calibre diminuindo até a margem, onde se encontram formando arcos
Nervuras terciárias	Reticulado esparso	Reticulado esparso	Reticulado denso	Reticulado denso	Reticulado denso	Reticulado denso
Comprimento pecíolo	6-13 cm	1,5-4 cm	0,8-2,5 cm	1-2,5 cm	2,5-6 cm	1-3 cm

Resultados

Diversidade genética intrapopulacional

Dos 25 *primers* testados, seis amplificaram satisfatoriamente apresentando locos de boa qualidade, com um total de 59 locos polimórficos. Os fragmentos que geraram dúvidas na identificação foram excluídos da análise. O número de fragmentos analisados por *primer* variou de 7 a 11, com tamanhos moleculares variando entre 300 e 1300 p.b. (Tabela 3). Nenhuma das populações apresentou algum fragmento exclusivo. A proporção de locos polimórficos variou entre 81,36% (CXC) e 30,51% (RBS). Para a heterozigosidade média esperada, a população CXC apresentou o maior valor (0,306), enquanto a população NIT apresentou o menor valor (0,109). As populações CXC e NIT também apresentaram o maior e o menor valor para o índice de diversidade de Shannon, com 0,452 e 0,165, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3. Sequência, número de fragmentos e tamanho dos fragmentos (em pares de base – pb) dos *primers* ISSR usados na análise de variabilidade genética em populações do complexo *Myrcia laruotteana*.

<i>Primer</i>	Sequência	Nº de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
MAO	5'-(CTC) ₄ RC-3'	11	300-1300
UBC 813	5'-(CT) ₈ T-3'	11	400-1200
UBC 814	5'-(CT) ₈ TG-3'	9	400-1000
UBC 827	5'-(AC) ₈ G-3'	10	400-1200
UBC 844	5'-(CT) ₈ RC-3'	7	500-1000
UBC 848	5'-(CA) ₈ RG-3'	11	300-1300

Tabela 4. Variabilidade genética encontrada em 17 populações do complexo *Myrcia laruotteana* baseada em 59 locos de ISSR. *N*: total de fragmentos encontrados em cada população; *P*: percentual de locos polimórficos; *I*: Índice de Shannon; *H_E*: heterozigosidade média esperada dentro da população. Os desvios padrão estão entre parênteses. Veja a Tabela 1 para nome das populações.

População	<i>N</i>	<i>P</i> (%)	<i>I</i>	<i>H_E</i>
ANA	51	72,88	0,364 (0,035)	0,240 (0,025)
BRA-1	53	71,19	0,337 (0,035)	0,221 (0,025)
LON	55	76,27	0,382 (0,033)	0,252 (0,024)
CAM	54	77,97	0,374 (0,034)	0,245 (0,024)
CMOU	54	76,27	0,392 (0,033)	0,259 (0,023)
CXC	52	81,36	0,452 (0,033)	0,306 (0,024)
PRA	50	71,19	0,371 (0,037)	0,250 (0,027)
QUI-1	44	47,46	0,252 (0,038)	0,169 (0,026)
QUI-2	46	52,54	0,294 (0,039)	0,200 (0,028)
JOIN	52	62,71	0,325 (0,037)	0,217 (0,026)
RBS	42	30,51	0,180 (0,037)	0,124 (0,026)
BRA-2	46	47,46	0,269 (0,039)	0,184 (0,028)
SFS	48	55,93	0,279 (0,037)	0,185 (0,026)
NOP	38	52,54	0,289 (0,038)	0,194 (0,026)
SFP	51	71,19	0,345 (0,034)	0,225 (0,024)
PIRA	51	72,88	0,403 (0,037)	0,274 (0,026)
NIT	45	32,20	0,165 (0,033)	0,109 (0,023)
média	48	61,91	0,322 (0,009)	0,215 (0,006)

Relações populacionais e estrutura genética

Quanto à similaridade genética, o maior valor encontrado foi entre as populações LON e CAM (0,954), enquanto que o menor valor se deu entre as populações RBS e SFP (0,612). O valor de Φ_{ST} calculado a partir da análise de variância molecular (AMOVA) mostrou moderada divergência entre as 17 populações (0,377). Para os quatro agrupamentos testados, foi encontrada baixa variação entre os grupos de populações (3-17%), moderada variação entre as populações dentro dos grupos (21-35%), e alta variação

dentro das populações (61-62%). A estruturação genética destes grupos, calculada a partir do Φ_{ST} , variou entre 0,383 e 0,392 (Tabela 5).

Na análise Bayesiana realizada, as populações foram agregadas em 11 grupos genéticos (Figura 2; Tabela 6). Não houve indícios de migração e hibridização entre as populações estudadas. Nenhum indivíduo apresentou probabilidade posterior de pertencer a outro grupo que não seja o seu de origem. Os grupos formados não misturaram populações consideradas de espécies diferentes. O grupo #1 é representado pelas populações NOP e SFP, semelhantes na morfologia e próximas geograficamente (cerca de 70 km). As populações QUI-1 e QUI-2, semelhantes entre si pela morfologia geral da planta e pelo habitat, formam o grupo #2. O grupo #3 é formado pelas populações SFS e JOIN, também da mesma região geográfica e semelhantes morfologicamente, entretanto essas populações apresentam probabilidade posterior de pertencerem ao grupo # 2. Estes dois grupos estão na mesma região geográfica, porém SFS e JOIN estão ao nível no mar, enquanto QUI-1 e QUI-2 estão a mais de 1000 metros de altitude. O grupo #4 é composto por três populações da mesma região LON, CAM e CMOU. O grupo #5 é formado por ANA e BRA-1, porém estas populações apresentaram probabilidade posterior de pertencerem ao grupo #6, formado unicamente por BRA-2. As populações PRA e CXC formam os grupos #7 e #8 respectivamente, entretanto CXC tem probabilidade posterior de se juntar à PRA no grupo #8. Os três últimos grupos são formados por populações isoladas, NIT (grupo #9), PIRA (grupo #10) e RBS (grupo #11). A análise de variância molecular feita a partir dos grupos citados acima demonstrou que a variação genética é mais alta entre os 11 grupos formados (27%) do que entre as populações dentro de cada grupo (12%) (Tabela 5).

A árvore de consenso formada a partir dos valores de Φ_{ST} apresentou somente dois ramos com suporte estatístico acima de 50%, um deles com suporte acima de 80% (Figura 3). Formaram-se dois grupos principais, o primeiro reunindo todas as populações reconhecidas como *M. tomentosa* e o segundo com populações misturadas de *M. laruotteana*, *M. selloi* e *M. lajeana*, com a população NIT aparecendo na base deste grupo.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) para quatro diferentes agrupamentos testados para 17 populações do complexo de *Myrcia laruotteana*, e para os grupos formados a partir da análise Bayesiana: 1) seis grupos morfológicos; 2) quatro grupos nomenclaturais; 3) quatro grupos fitogeográficos; 4) dez grupos geográficos; 5) onze grupos formados na análise Bayesiana.

Fonte de variação	Porcentagem de variação (%)				
	Grupos morfológicos	Grupos taxonômicos	Grupos fitogeográficos	Grupos geográficos	Grupos da análise Bayesiana
Entre grupos	13	10	3	17	27
Entre populações dentro dos grupos	26	29	35	21	12
Dentro das populações	61	61	62	62	61
Φ_{st} (pop/total)	0,392	0,392	0,383	0,385	0,387

Tabela 6. Grupos genéticos com suas respectivas populações do complexo *Myrcia laruotteana* inferidos a partir de análise Bayesiana. Veja Tabela 1 para nomes das populações.

Grupo	Populações	Grupo	Populações
1	NOP, SFP	7	PRA
2	QUI-1, QUI-2	8	CXC
3	SFS, JOIN	9	NIT
4	LON, CAM, CMOU	10	PIRA
5	ANA, BRA-1	11	RBS
6	BRA-2		

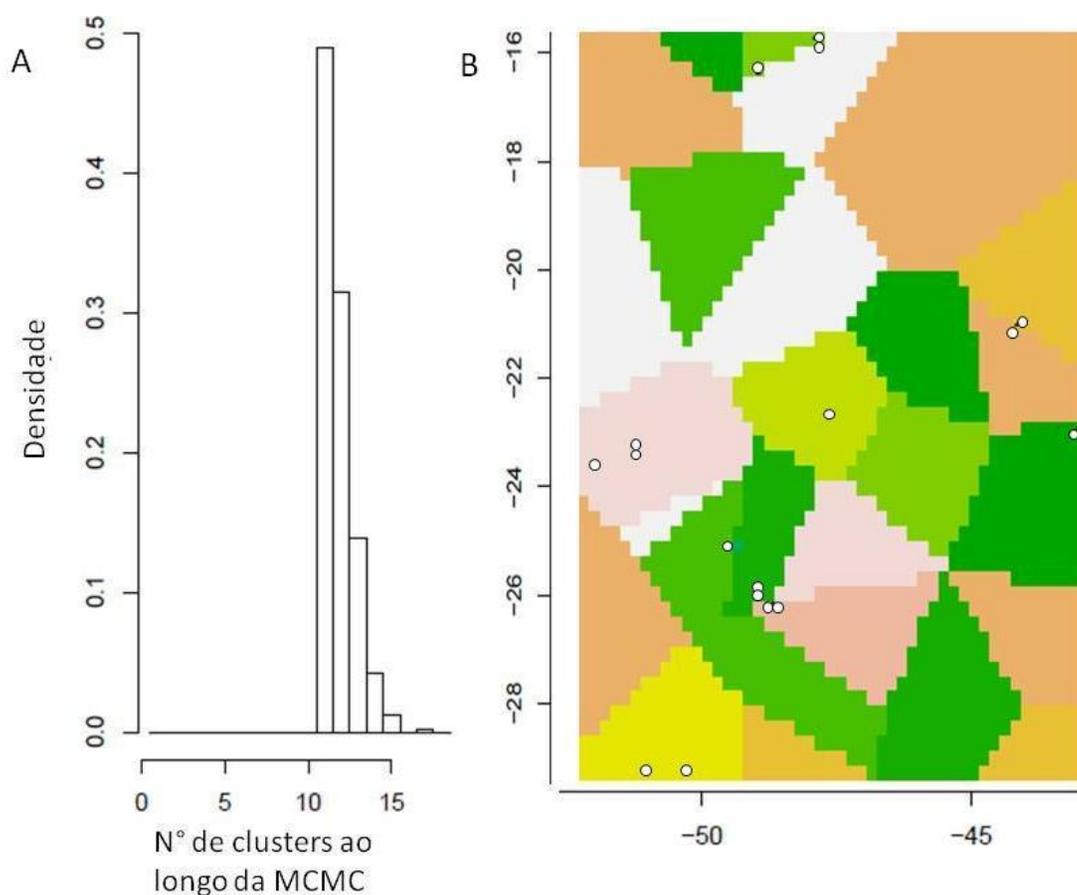


Figura 2. A – Distribuição da probabilidade posterior de um número K de agrupamentos genéticos do complexo *Myrcia laruotteana*. B – Mapa das populações do complexo de *Myrcia laruotteana* em cada domínio genético inferido por análise Bayesiana.

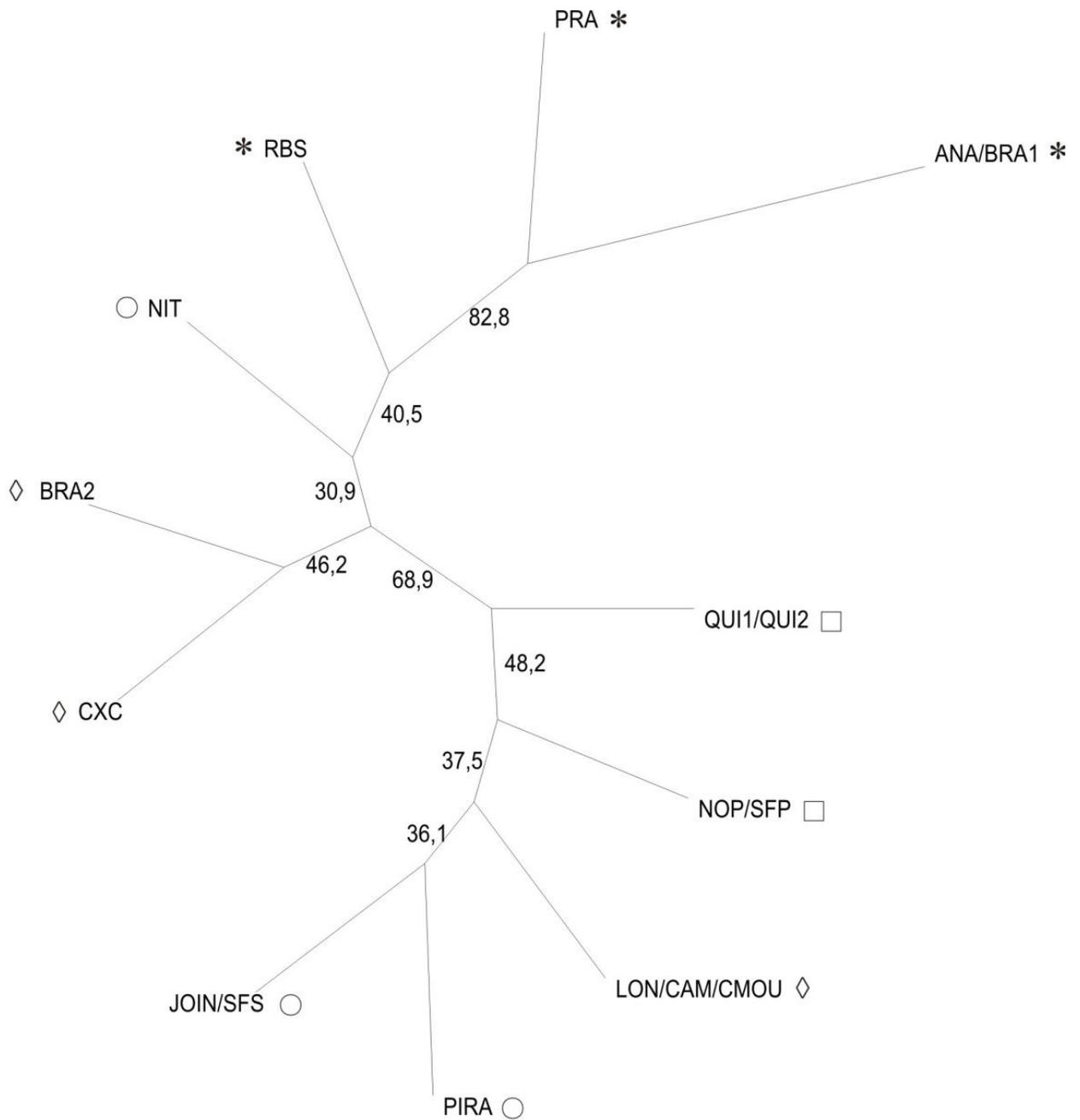


Figura 3. Dendrograma formado a partir dos valores de Φ_{ST} par a par mostrando as relações entre os grupos formados na análise Bayesiana, utilizando o algoritmo *neighbor-joining*. Os números ao lado dos ramos representam os resultados de *bootstrap*. ◇ *Myrcia laruotteana*; * *Myrcia tomentosa*; ○ *Myrcia selloi*; □ *Myrcia lajeana*.

Discussão

Diversidade genética intrapopulacional

Todos os *primers* usados neste trabalho apresentaram poucos locos amplificados, variando de 7 a 11. Este valor baixo se repete em trabalhos similares com espécies da tribo Myrteae, usando marcadores ISSR (3 a 11 locos por *primer* em *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; Brandão *et al.* 2011), RAPD (5 a 9 locos por *primer* em *Eugenia dysenterica* DC.; Trindade & Chaves 2005) e microssatélites (3 a 22 locos por *primer* em *E. dysenterica*; Zucchi *et al.* 2003). Entretanto, estudos realizados com ISSR em espécies de outras tribos de Myrtaceae, encontraram alta quantidade de locos por *primer*, como em *Eucalyptus* sp. (44 a 102 locos; Balasaravanan *et al.* 2005) e *Metrosideros polymorpha* (31 a 41 locos; Wright 2007). Isso demonstra que o baixo número de fragmentos amplificados usando ISSR talvez seja uma característica das espécies da tribo Myrteae. Todos esses trabalhos apresentaram boas resoluções em seus resultados, independente da baixa quantidade de locos.

Os valores de diversidade genética encontrados para o complexo *M. laruotteana* (0,215) se mostraram menores que valores dados a plantas com características semelhantes, perenes (0,25), de distribuição ampla (0,22) e fecundação cruzada (0,27), usando marcadores RAPD (Nybom 2004). Esse valor também é menor que aquele encontrado para populações de *Metrosideros polymorpha* (0,2436), espécie tropical de Myrtaceae com ampla variação morfológica, usando ISSR (Wright 2007).

Em revisão sobre diversidade genética com isoenzimas, Hamrick & Godt (1989) citam que espécies parcialmente auto-compatíveis que são polinizadas por animais apresentam baixos valores de diversidade genética. Para a tribo Myrteae, são poucos os estudos que relatam sobre biologia reprodutiva. Proença & Gibbs (1994) estudaram sistemas reprodutivos de oito espécies de Myrteae, sendo uma delas *Myrcia rhodosepala* Kiaersk. (atualmente sinônimo de *M. tomentosa*), e mostraram que esta espécie é auto-compatível, o que pode resultar em baixa diversidade genética em populações. Neste mesmo trabalho, todas as espécies ocorrentes em savanas apresentaram algum grau de auto-compatibilidade, enquanto que as espécies estudadas ocorrentes em florestas mostraram-se completamente auto-incompatíveis. As espécies do complexo *M. laruotteana* ocorrem tanto

em florestas quanto em savanas. Pode ser que haja algum grau de auto-compatibilidade no complexo, o que explicaria em parte a baixa diversidade genética encontrada, porém são necessários estudos de sistemas reprodutivos que contemplem estas espécies para comprovação.

Relações populacionais e estrutura genética

O valor de Φ_{ST} encontrado (0,377) mostrou-se maior que os valores para espécies com características semelhantes, perenes (0,25), amplamente distribuídas (0,34) e fecundação cruzada (0,27), usando marcadores RAPD (Nybom 2004). A proporção da variabilidade genética dentro das populações (62%) maior que entre as populações (38%) está de acordo com outros trabalhos realizados com espécies arbóreas tropicais (Lovelles & Hamrick 1984; Nybom & Bartish 2000; Nybom 2004). A pouca variação genética encontrada entre as diferentes populações amostradas sugere que pode haver fluxo gênico entre elas. O fluxo gênico entre as populações, mantido através de pólen e das sementes, está diretamente relacionado com a divergência entre elas (Hamrick & Godt 1990). A polinização em *Myrcia* é essencialmente entomofílica e a dispersão é zoocórica (Gressler *et al.* 2006), fazendo com que o fluxo gênico alcance distâncias consideráveis. Consequentemente, a estrutura genética entre as populações é reduzida, promovendo a homogeneidade (Loveless & Hamrick 1984). Isso pode explicar porque as populações mais próximas umas às outras são morfológicamente mais parecidas, pois trocam alelos com maior facilidade. Dentro das populações, a dispersão por animais também pode reduzir a estrutura genética (Loveless & Hamrick 1984).

Entre todos os agrupamentos testados (morfológico, geográfico, fitogeográfico e “taxonômico”), a partição da variação genética se mostrou maior entre as populações dentro dos grupos (entre 21 e 35%) do que entre os grupos (entre 3 e 17%) (Tabela 5). Isso mostra que estes grupos formados não são geneticamente homogêneos e não apresentam boa estruturação, ou seja, não há correlação entre estruturação genética das populações e os grupos testados. A não correlação entre estrutura genética e padrões pré-determinados também foi relatado tanto para táxons da família (*Eucalyptus* sp.; Balasaravanan *et al.* 2005), quanto para espécies de outros grupos de plantas (por exemplo, complexo *Vellozia hirsuta* Goethart & Henrard; Barbosa 2011).

Os grupos formados a partir da análise Bayesiana (Tabela 6) foram os que mostraram maior estruturação genética, por se tratarem de grupos mais homogêneos e mais diferentes entre si. Pode-se notar, neste caso, que a variação genética entre os grupos formados (27%) é maior que a variação encontrada entre as populações dentro de cada grupo (12%) (Tabela 5). Todas as populações que pertencem à mesma região geográfica foram agrupadas nesta análise, exceto aquelas populações que representam espécies diferentes. Este resultado corrobora o fato das populações mais próximas geograficamente apresentarem maior similaridade genética entre si e serem mais parecidas morfologicamente. No caso do complexo estudado, *M. laruotteana* apresenta ampla distribuição, sendo que as populações mais ao norte são mais parecidas morfologicamente com formas de *M. tomentosa* e populações mais ao sul são mais parecidas com *M. selloi* e/ou *M. lajeana*, mostrando um certo gradiente geográfico na morfologia destas plantas.

Apesar dos baixos suportes estatísticos do dendrograma construído a partir dos grupos da análise Bayesiana (Figura 3), pode-se notar a formação de dois grandes grupos. O primeiro agrupamento reuniu todas as populações de *Myrcia tomentosa* estudadas (ANA, BRA-1, PRA, RBS), separando-as das demais espécies. O segundo grande grupo misturou as populações de *M. laruotteana*, *M. selloi* e *M. lajeana*. As populações que representam *M. laruotteana* foram separadas em dois subgrupos, o primeiro reunindo as populações de MG e DF (CXC e BRA-2, respectivamente), e o segundo juntando as populações do PR (LON, CAM e CMOU) com populações de *M. lajeana* e *M. selloi*. Apesar de as populações CXC e BRA-2 não terem sido unidas às populações de *M. tomentosa*, estes agrupamentos formados mostram, mais uma vez, o gradiente geográfico na morfologia foliar discutido anteriormente.

O segundo grande grupo observado no dendrograma ainda pode ser separado em dois subgrupos, um que representa a distribuição mais ao norte destas espécies (NIT, BRA-2 e CXC), e outro representando a distribuição sul delas (QUI-1/QUI-2, NOP/SFP, LON/CAM/CMOU, PIRA, JOIN/SFS), com suporte de 68,9%. Esta conformação pode ser uma evidência de que estes subgrupos apresentam um ancestral comum e se separaram devido a algum evento biogeográfico.

Os agrupamentos formados nas árvores também podem ser discutidos de acordo com os padrões de morfologia de folha das populações amostradas (Figura 1). O padrão 1

reúne todas as populações de *M. tomentosa*, que também foram agrupadas no dendrograma. As populações CXC e BRA-2, que representam a distribuição mais ao norte de *M. laruotteana*, estão agrupadas e representam o padrão 2. O último grupo formado junta populações de diferentes espécies que representam os padrões 3, 4, 5 e 6. De acordo com o proposto acima, esperava-se que a população NIT se agrupasse a este último grupo, pois ela representa o padrão 5 junto com a população PIRA, porém isso não foi observado. Além disso, *M. selloi* tem como característica distintiva das outras espécies o cálice caduco, que levaria a crer, mais uma vez, a união de NIT com PIRA, JOIN e SFS.

Implicações taxonômicas

Os testes realizados a partir de padrões morfológicos foliares e a partir da circunscrição taxonômica atual das espécies do complexo *M. laruotteana* (*M. laruotteana* x *M. lajeana* x *M. selloi* x *M. tomentosa*) não apresentaram boa estruturação genética entre os grupos e não mostraram descontinuidade genética entre as populações estudadas, mostrando que essas diferenças morfológicas e a divisão do complexo em quatro nomes, não tem sustentação taxonômica. A estruturação genética revelada a partir dos grupos formados na análise Bayesiana também mostrou que nenhum dos táxons foi completamente agrupado, assim como nenhum grupo reuniu populações de espécies diferentes (Tabela 6; Figura 2).

De acordo com o conceito filogenético, toda espécie é uma unidade monofilética (Donoghue 1985). Apesar dos baixos suportes estatísticos, a primeira evidência clara de separação de táxons incluídos no complexo está na análise de agrupamento demonstrada pelo dendrograma, onde todas as populações de *M. tomentosa* formam um grupo monofilético. Esta espécie também pode ser reconhecida pelo padrão de morfologia foliar (padrão 1; Tabela 2).

No outro grupo monofilético apresentado no dendrograma, as populações que representam *M. laruotteana*, *M. lajeana* e *M. selloi* se misturam, corroborando a pouca sustentação genética apresentada em outras análises e com os diversos padrões morfológicos que elas representam. Desta forma, seria esperado que estas populações representassem uma única espécie, sob o nome de *M. laruotteana*. *Myrcia lajeana* não apresenta nenhuma característica distintiva que a separe como entidade taxonômica, pois os

caracteres utilizados na descrição da espécie confundem-se com caracteres de *M. laruotteana*, lembrando que esta última espécie apresenta grande variação morfológica ao longo de sua ampla distribuição geográfica.

Já *M. selloi* apresenta o hipanto e o cálice caducos nos frutos, uma característica muito peculiar utilizada na distinção desta espécie e que sustentaria o reconhecimento de *M. selloi* e *M. laruotteana* como entidades distintas. A falta de variação genética entre espécies não é necessariamente uma evidência que elas constituam realmente uma única espécie, uma vez que podem existir outros loci mais variáveis, não selecionados nas análises feitas, que as diferencie (Barrett & Freudenstein 2011). Por isso, é necessário levar em conta vários aspectos relativos à biologia dessas espécies, além dos dados moleculares e genéticos existentes. De acordo com Rieseberg & Brouillet (1994), a classificação específica baseada somente em monofiletismo não é uma ferramenta efetiva na descrição e ordenação da diversidade biológica, por isso muitos grupos parafiléticos são considerados espécies em plantas. Com este panorama, uma nova classificação taxonômica deve ser feita para o complexo, levando em consideração tanto os dados genéticos apresentados aqui, quanto aspectos morfológicos das plantas estudadas.

Referências Bibliográficas

Balasaravanan, T.; Chezian, P.; Kamalakannan, R.; Ghosh, M.; Yashoda, R.; Varghese, M.; Gurumurth, K. 2005. Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **Tree Physiology** 25:1295-1305.

Barbosa, A.R. 2011. **Biossistemática do complex *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada na análise filogeográfica e genética de populações**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Barrett, C.F.; Freudenstein, J.V. 2011. An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. **Molecular Ecology** 20:2771-2786.

Biffin, E.; Lucas, E.J.; Craven, L.A.; Costa, I.R.; Harrington, M.G.; Crisp, M.D. 2010. Evolution of exceptional species richness among lineages of flesh-fruited Myrtaceae. **Annals of Botany** 106:79-93.

Brandão, M. M.; Vieira, F.A.; Carvalho, D. 2011. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore** 35(5):957-964.

Crawford, D.J.; Mort, M.E. 2004. Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. **Taxon** 53(3):631-635.

Donoghue, M.J. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. **The Bryologist** 88(3):172-181.

Doyle, J. J.; Doyle J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13-15.

Fang, D.Q.; Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics** 95:408-417.

Faria, J.E.Q. & Proença, C.E.B. 2012. *Eugenia pyrifera* (Myrtaceae), a new species from the Cerrado vegetation of Goiás, Brazil. **Kew Bulletin** 67:1-5.

Felsenstein, J. 1993. **PHYLIP (Phylogeny inference package)**. Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Gaiero, P.; Mazzella, C.; Agostini, G.; Bertolazzi, S.; Rossato, M. 2011. Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Buttia* Becc. species based on ISSR. **Plant Systematics and Evolution** 292:105-116.

Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B.K.; Landrum, L.L.; Matsumoto, K.; Mazine, F.F.; Nic Lughadha, E.; Proença, C.; Soares-Silva, L.H.; Wilson, P.G.; Lucas, E. 2012. **World Checklist of Myrtaceae**. Royal Botanical Gardens, Kew. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/>. Acesso em: 10/11/2012.

Gressler, E.; Pizo, M.A.; Morellato, P.C. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 4:509-530.

Guillot, G. & Santos, F. 2010. Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. **Molecular Ecology Resources** 10(6):1082-1084.

Hamrick J.L.; Godt M. J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L.; Weir, B.S (eds.), **Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sinauer, Sunderland, pp. 43-63.

Kawasaki, M. L.1989. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 11:121-170.

Krings, A. & Xiaoling, J.Q. 2005. Taxonomy of the *Gonolobus* complex (Apocynaceae, Asclepiadoideae) in the Southeastern United States: ISSR evidence and parsimony analysis. **Harvard Papers in Botany** 10(2):147-159.

Landrum, L.R. & Oliveira, M.I.U. 2010. A new species of *Campomanesia* from Bahia, Brazil, based on specimens collected by J.S. Blanchet over 150 years ago. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas** 4:603-607.

Legrand, C. D.; Klein, R. M. 1969. Mirtáceas – *Myrcia*. In: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 218-330.

Loveless, M.D.; Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics** 15: 65-95.

Lucas, E.J.; Belsham, S.R.; Nic Lughadha, E.M.; Orlovich, D.A.; Sakuragui, C.M.; Chase, M.W.; Wilson, P.G. 2005. Phylogenetic patterns in the flesy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution** 251:35-51.

Lucas, E.J. Harris, S.A.; Mazine, F.F.; Belsham, S.R.; Nic Lughadha, E.M.; Telford, A.; Gasson, P.E.; Chase, M.W. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon** 56(4):1105-1128.

Lucas, E.J.; Matsumoto, K.; Harris, S.A.; Nic Lughadha, E.M.; Benardini, B.; Chase, M.W. 2011. Phylogenetics, morphology, and evolution of the large genus *Myrcia* s.l. (Myrtaceae). **International Journal of Plant Sciences** 172(7):915-934.

Manica-Cattani M.F., Zacaria, J., Pauletti, G., Atti-Serafini, L. & Echeverrigaray, S. 2009. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology** 69: 375-380.

Mazine, F.F. & Souza, V.C. 2010. Three new species of *Eugenia* sect. *Racemosae* from the cerrados of State of Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 33:285-288.

Nagaoka, T.; Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 94:597-602.

Nybom, H.; Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** 3: 93-114.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology** 13: 1143-1155.

Okun, D.O.; Kenya, E.U.; Oballa, P.O.; Odee, D.W.; Muluvi, G.M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology** 7(13):2119-2123.

Page, R.D.M. 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational and Applied Biosciences** 12: 357–358.

Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica** 121:9-18.

Peakall, R. & Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** 28(19):2537-2539.

Proença, C.E.B.; Gibbs, P.E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. **New Phytologist** 126:343-354.

Proença, C.E.B.; Jennings, L.V.S.; Lucas, E.J. 2011. Two new species of Myrtaceae (Myrteae) from northern South America. **Brittonia** 63(1):46-50.

Rana, T.S.; Narzary, D.; Ohri, D. 2012. Molecular differentiation of *Chenopodium album* complex and some related species using ISSR profiles and ITS sequences. **Gene** 495:29-35.

Rieseberg, L.H.; Brouillet, L. 1994. Are many plant species paraphyletic? **Taxon** 43(1):21-32.

Rotman, A. D. 1969. Myrtaceae. In: Burkart, A. **Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina), Buenos Aires.**

Santos, J. 2011. **Estrutura populacional de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no Brasil: subsídios para a conservação.** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Soares-Silva, L.H. 2000. **A família Myrtaceae – subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do Rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil.** Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Sobral, M. 2003. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul.** 1ed. Unisinos, São Leopoldo. 215p.

Sobral, M. & Mazine, F.F. 2010. *Eugenia goiapabana* (Myrtaceae), a new species from Espírito Santo, Brazil. **Novon** 20:348-350.

Sobral, M.; Faria Júnior, J.E.Q.; Proença, C.E.B. 2010. A new species of *Algrizea* (Myrteae, Myrtaceae) from Bahia, Brazil. **Neodiversity** 5:1-6.

Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. 2012. Myrtaceae in **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>. Acesso em: 10/11/2012.

Souza, H.A.V. & Lovato, M.B. 2010. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology** 38: 49-56.

Thiers, B. 2012. **Index Herbariorum**: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em <<http://sweetgum.nybg.org/ih>>. Acesso em 10/11/2012.

Thormann, C.E.; Ferreira, M.E.; Camargo, L.E.A.; Tivang, J.G.; Osborn, T.C. 1994. Comparision of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics** 88:973-980.

Trindade, M.G.; Chaves, L.J. 2005. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology** 28(3):407-413.

Vekemans, X. 2002. **AFLP-SURV version 1.0**. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

Veloso, H.P.; Rangel Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. IBGE, Rio de Janeiro, 123 p.

Wilson, P. G.; O'brien, M. M.; Gadek, P. A.; Quinn, C. J. 2001. Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany** 88: 2013-2025.

Wilson, P.G.; O'brien, M.M.; Heslewood, M.M.; Quinn, C.J. 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution** 251: 3-19.

Wolfe, A.D.; Xiang, Q.; Kephart, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology** 7:1107-1125.

Wright, M.E. 2007. **A genetic comparison of bog vs. forest populations of *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae) in Hawaii**. Tese (Mestrado em Artes) – University of Colorado.

Wright, S. 1921. Systems of mating. **Genetics** 6:111-178.

Xiaoling, Y. 2010. **Mating system and genetic diversity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae) detected by ISSR markers**. Tese (Mestrado em Filosofia) – The University of Hong Kong.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176-183.

Zucchi, M.I.; Brondani, R.P.V.; Pinheiro, J.B.; Chaves, L.J.; Coelho, A.S.G.; Vencovsky, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC. in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology** 26(4):449-457.

CAPÍTULO 2

Estudos taxonômicos e nova sinonimização
para o complexo *Myrcia laruotteana*
Cambess. (Myrtaceae)

Resumo – Complexos de espécies mal delimitadas são comuns em famílias com elevado número de espécies, como Myrtaceae. Além do número elevado de espécies, a falta de uma revisão taxonômica completa e atualizada faz com que *Myrcia* apresente muitos destes complexos, como é o caso do complexo *M. laruotteana*. No presente trabalho é apresentado o tratamento taxonômico das espécies que compõem este complexo. *Myrcia tomentosa* e *M. laruotteana* podem ser reconhecidas principalmente pelo indumento, geralmente denso na primeira e quase ausente na segunda. *Myrcia selloi* pode ser reconhecida pela queda dos remanescentes do hipanto e do cálice, deixando os frutos com uma cicatriz circular apical. É também proposta a sinonimização de *M. lajeana* sob *M. laruotteana*.

Palavras-chave: *Myrcia lajeana*, *Myrcia selloi*, *M. tomentosa*, Myrteae.

Abstract – Species complexes that are poorly defined are common in families with a high number of species, such as Myrtaceae. In addition to the large number of species, the lack of a complete and updated taxonomic revision makes *Myrcia* one genus with many of these complexes, as the case of the *M. laruotteana* complex. In this work we present the taxonomic treatment for the species that compose this complex. *Myrcia tomentosa* and *M. laruotteana* differ from each other mainly by the indumenta, which is dense in the former and almost absent in the latter. *Myrcia selloi* differs from the others by the caduceus remnants of the hypanthium and calyx, leaving circular apical scar on the fruit. We also propose the synonymization of *M. lajeana* under *M. laruotteana*.

Key-words: *Myrcia lajeana*, *Myrcia selloi*, *M. tomentosa*, Myrteae.

Introdução

A família Myrtaceae conta com aproximadamente 132 gêneros e mais de 5600 espécies (Govaerts *et al.* 2012). Ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo a Austrália, Sudeste da Ásia e América do Sul como centros de diversidade (Wilson *et al.* 2001). No Brasil, Myrtaceae é a família mais rica no Cerrado (Oliveira-Filho & Fontes 2000) e no estrato arbóreo da Floresta Atlântica (Mori *et al.* 1983).

Myrcia é o segundo maior gênero da tribo Myrteae, com cerca de 396 espécies (Govaerts *et al.* 2012) e ocorre desde o México e Caribe até o norte da Argentina e Uruguai (Landrum & Kawasaki 1997). No Brasil, ela ocorre em todos os tipos de vegetação (Sobral *et al.* 2012). São árvores ou arbustos, com tricomas simples ou dibráquiados. Geralmente apresentam inflorescências paniculadas, flores 5-meras, e cálice aberto no botão floral. O hipanto pode ser prolongado ou não acima do ovário. O ovário é 2-4-locular, cada lóculo com 2 óvulos e placentação axilar. O fruto é globoso, coroado pelos lobos do cálice, encerrando 1-2 sementes com testa membranácea ou crustácea. O embrião é do tipo mircióide (Landrum & Kawasaki 1997; Legrand & Klein 1969).

A última revisão taxonômica realizada para o gênero foi feita por Berg (1857-1859). Desde então, foram realizados apenas estudos taxonômicos em escalas locais, e o número de espécies novas descritas para a família como um todo vem aumentando, tendo como consequência a formação de complexos de espécies mal delimitadas. Um destes complexos de espécies é constituído por *Myrcia laruotteana* Cambess., *M. selloi* (Spreng.) N.Silveira, *M. lajeana* D.Legrand e *M. tomentosa* (Aubl.) DC., aqui denominado de complexo *M. laruotteana*. Estas espécies pertencem à seção *Aulomyrcia*, caracterizada pelos frutos globosos e pelo hipanto elevado acima do ápice do ovário (Lucas *et al.* 2011). Apenas *M. lajeana* não foi amostrada em estudo filogenético que mostrou que estas espécies formam um grupo monofilético com alto suporte estatístico (Lucas *et al.* 2011). Neste mesmo trabalho os autores ainda amostram uma forma incomum de *M. selloi*, identificada até então como *M. aff. selloi*, provinda de Niterói (RJ). As espécies do complexo se diferem de outras espécies do gênero pelos botões com uma constrição abaixo do ovário, pelas panículas em forma de um triângulo abruptamente estreito e com ramos assimétricos, pelos lobos do cálice livres, reflexos e pontiagudos, com seus remanescentes no fruto em forma

de estrela, e pelas bractéolas pontiagudas embaixo de cada flor, usualmente persistentes depois que os frutos caem (Lucas *et al.* 2011). Entretanto, estas espécies apresentam grande variação morfológica e podem apresentar possíveis híbridos, tornando a separação delas uma tarefa difícil (Legrand & Klein 1969).

Em estudo usando marcadores ISSR (Capítulo 1), diferentes padrões testados para populações do complexo *M. laruotteana* não apresentaram boa estruturação genética. Neste trabalho, há uma evidência da separação do complexo em dois grandes grupos, um composto por *M. tomentosa* e outro composto por uma mistura de populações de *M. laruotteana*, *M. lajeana* e *M. selloi*. Levando em consideração o conceito filogenético de espécie (Donoghue 1985), seriam reconhecidas no complexo apenas duas espécies, *M. tomentosa* e *M. laruotteana*, porém a classificação específica baseada somente em monofiletismo não é uma ferramenta efetiva na descrição e ordenação da diversidade biológica (Rieseberg & Brouillet 1994). Segundo os mesmo autores, várias espécies de plantas podem ser, desta forma, parafiléticas. Apesar da grande semelhança genética (Capítulo 1) e morfológica, *Myrcia selloi* apresenta remanescentes do cálice e do hipanto caducos nos frutos, uma característica muito peculiar que a diferencia das outras espécies estudadas, e que tornaria não justificável a sua sinonimização sob *M. laruotteana*. Já *M. lajeana* não apresentaria uma característica distintiva capaz de separá-la de *M. laruotteana*. Assim, o objetivo do presente estudo é propor uma nova classificação taxonômica para o complexo *M. laruotteana*, com base na morfologia externa das plantas e nos dados genéticos disponíveis (Capítulo 1).

Metodologia

O presente trabalho foi realizado através da análise de material coletado em campo e de exsicatas selecionadas depositadas nos herbários BHCB, HBR, HUEFS, HUEM, ICN, MBM, RB, UEC, UPCB (acrônimos segundo Thiers 2012). Foram também analisadas imagens de tipos nomenclaturais, obtidos a partir dos herbários P e BM. Não foram aceitos táxons infra-específicos por não apresentarem diferenças consistentes quando toda a variação morfológica é considerada.

Foram realizadas 20 coletas no período de maio de 2011 a agosto de 2012, entre os estados do Rio Grande do Sul e Goiás. As coletas estão depositadas nos herbários UEC e UPCB, além de outros herbários brasileiros. Tanto os dados de floração e frutificação quanto as distribuições geográficas foram descritos com base nas coleções dos herbários visitados e nas observações em campo. Os mapas foram confeccionados com o auxílio da ferramenta SpeciesMapper (<http://splink.cria.org.br/mapper?criaLANG=pt>). Os pontos dos mapas representam o local de coleta dos materiais examinados. Para sinonímia completa de todas as espécies tratadas no presente trabalho, ver Sobral *et al.* (2012).

Resultados e Discussão

Myrcia DC. ex Guill., Dict. Class. Hist. Nat. 11:406. 1827. Lectótipo: *Myrcia bracteolaris* (Poir.) DC.; McVaugh (1956).

Subarbustos a árvores. Folhas simples, inteiras, opostas. Inflorescências geralmente panículas. Bractéolas persistentes ou decíduas ao longo da antese. Flores 5-meras, lobos do cálice individualizados, com remanescentes persistentes nos frutos; hipanto elevado ou não acima do ovário; pétalas sempre presentes, brancas ou levemente amareladas; estames numerosos, livres; anteras rimosas; ovário 2-3-locular, 2 óvulos por lóculo. Bagas globosas ou elipsóides com 1-3 sementes. Embrião do tipo mircióide.

Chave de identificação para o complexo *Myrcia laruotteana*

1. Frutos com cicatriz circular no ápice, resultado da queda dos remanescentes do hipanto e do cálice. Folhas geralmente com nervura marginal linear ... 2. *Myrcia selloi*

1'. Frutos com remanescentes do hipanto e do cálice persistentes. Folhas geralmente com nervura marginal formada por arcos das nervuras secundárias

2. Face abaxial das folhas jovens e inflorescências geralmente tomentosas. Flores geralmente sésseis 3. *Myrcia tomentosa*

2'. Face abaxial das folhas jovens e inflorescências glabras a pubescentes. Flores com pedicelos de até 3 mm comp. 1. *Myrcia laruotteana*

1. *Myrcia laruotteana* Cambess. Fl. Bras. Merid. 2:311. 1832. Tipo: Brasil. “Prov. Goyaz”, s.d., A. St. Hilaire, 917 (holótipo: P [P00161421]) (Figuras 1, 2, 3)

Myrcia lajeana D. Legrand Sellowia 13:291. 1961. *Aulomyrcia undulata* O. Berg in Mart., Fl. bras. 14(1):89. 1857. Tipo: Brasil. Lages, entre Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Sellow s.n. (holótipo: B[†]); Brasil. Santa Cecília, Campo do Areão, 19 Dez. 1962, Reitz & Klein 14184 (neótipo: HBR!, designado aqui), non *Myrcia undulata* O.Berg in Mart. *Syn. Nov.*

Arbustos a árvores até 5 m alt. Ramos, folhas jovens e pecíolos pubescentes ou velutinos, com tricomas até 1 mm comp.; folhas adultas com tricomas do mesmo tipo esparsos ao longo da nervura primária em ambas as faces; inflorescências, cálice, ovário e frutos glabros a pubescentes. Folhas com pecíolo 0,8-8 mm comp., canaliculado; lâmina 2,5-13,5x1-4,5 cm, elípticas ou ovadas, cartácea, raramente coriácea; ápice agudo a acuminado; base aguda a arredondada, ocasionalmente cordada; nervura primária plana ou saliente na face adaxial, saliente da face abaxial; nervuras secundárias 9-13 de cada lado, planas e apenas visíveis ou raramente salientes na face adaxial, salientes na face abaxial; nervura marginal 0,6-1,5 mm da borda, normalmente formada por arcos das nervuras secundárias. Panículas axilares, ramificadas 1-2 vezes, eixo central 1,5-10 cm comp.; flores com pedicelos até 3 mm comp.; bractéolas 0,8-3 mm comp., lineares ou lanceoladas, persistentes ou decíduas antes da antese; botões florais globosos; lobos do cálice triangulares, 0,4-1,5x0,9-1,5 mm, ciliados. Frutos globosos, 4-5 mm de diâmetro, negros quando maduros, coroados pelos remanescentes do hipanto e do cálice.

Material examinado: **ARGENTINA**. Misiones: Guarani, 13 Jan. 2006, *Keller & Prance* 3340 (HUEFS). **BOLÍVIA**. Ichilo: Santa Cruz, 9 Nov. 1990, *Stutter* 17 (RB); Santa Cruz: Samaipata, 8 Jul. 2002, *Mello-Silva* et al. 2045 (RB). **BRASIL**. Bahia: Canudos, 22 Nov. 2003, *Silva* et al. 475 (HUEFS); Tucano, 24 Fev. 2006, *Melo* et al. 4260 (HUEFS). Distrito Federal: Brasília, 4 Out. 2011, *Faria* et al. 1983 (UB, UEC). Espírito Santo: Santa Teresa, 3 Jun. 1985, *Fernandes* 1213 (RB). Goiás: Chapadão do Céu, 5 Out. 1999, *Batalha* 3927 (UB). Maranhão: São Luiz do Maranhão, 24 Jan. 1976, *Barroso & Guimarães* 354 (RB). Mato Grosso: Posto da Mata, Out. 2005, *Sobral* et al. 10221 (BHCB, MBM); Rio Casca, 20

Set. 1988, *Pereira* 411 (RB); Rio Xingu, 7 Nov. 1977, *Lima* 6015 (RB); Vila Rica, Out. 2005, *Sobral* et al. 10066 (BHCB, MBM). Mato Grosso do Sul: Rio Ivinheima, 27 Jul. 1992, *Souza* 865 (HUEM); Taquarussu, 26 Ago. 1998, *Tanaka* 211 (HUEM); 16 Jun. 2000, *Romagnolo* 527 (HUEM); 27 Jul. 1992, *Souza* 863 (HUEM); Jateí, 15 Jun. 2000, *Romagnolo* 512 (HUEM); 3 Out. 2008, *Kita* et al. 881 (HUEM); Bonito, 17 Jul. 1990, *Assis* s.n. (HUEM 1679). Minas Gerais: Braúnas, 9 Out. 1973, *Tameirão Neto & França* 974 (BHCB, MBM, FURB); Brumadinho, 7 Mar. 2002, *Fonseca* et al. 186 (BHCB); Conceição do Mato Dentro, 11 Out. 2002, *Mota* et al. 2264 (BHCB); Coronel Xavier Chaves, 27 Out. 2011, *Lima* et al. 299 (UEC, UPBC); Gouveia, 24 Out. 1999, *Hatschbach* et al. 69656 (MBM, SP, UPCB); Itabirito, 30 Set. 1994, *Teixeira* s.n. (BHCB 25304, RB); 4 Out. 2004, *Teixeira* s.n. (BHCB 90585); Marliéria, 4 Nov. 2003, *França* 446 (BHCB, HUEFS); Mata da Casca D'anta, 16 Out. 1983, *Ramalho & Mota* 2799 (RB); Serro, 25 Out. 1999, *Hatschbach* et al. 69744 (BHCB, MBM, SP, UPCB). Paraná: Arapoti, 21 Nov. 1968, *Hatschbach* 18846 (MBM, UPCB); Araucária, 31 Out. 1972, *Hatschbach* 30606 (MBM, UPCB); Barra do Chopim, 9 Jul. 1997, *Borgo & Isernhagen* 112 (UPCB); Cambé, 1 Ago. 1997, *Kinupp* et al. 701 (FUEL, UPCB); 23 Ago. 2011, *Lima & Soller* 296 (UEC, UPCB); Campina Grande do Sul, 22 Out. 1961, *Hatschbach* 8351 (MBM, UPCB); Campo Mourão, 25 Ago. 2011, *Lima* et al. 297 (UEC, UPCB); 4 Ago. 2004, *Santos* 4 (HCF, UPCB); Céu Azul, Ago. 1997, *Sobral & Jarenkow* 8578 (MBM, UPCB); Colombo, 15 Nov. 1984, *Bidá* et al. 546 (UPCB); 27 Out. 2004, *Possette & Maschio* 365 (UPCB); 1 Nov. 2005, *Possette* 575 (UPCB); Cornélio Procópio, 26 Out. 1999, *Pavão* et al. s.n. (FUEL, UB, UPCB 43449); Curitiba, s.d., *Laroca* s.n. (UPCB 4846); 28 Nov. 1984, *Kummrow* 2542 (MBM, UPCB); 21 Out. 1988, *Nadolny* s.n. (UPCB 15729); 3 Out. 1995, *Carrião* 2 (NY, UPCB); 31 Out. 1975, *Hatschbach* 37378 (MBM, HUEFS, UB, UPCB); 18 Out. 1987, *Silva* 369 (ESA, HUEM, MBM, SP, UPCB); 9 Out. 1996, *Kozera & Dittrich* 233 (UPCB); 17 Mai. 1997, *Kozera* 558 (UPCB); 22 Set. 2012, *Lima* 353 (UEC, UPCB); Irati, 8 Dez. 2004, *Tauererig* 429 (BHCB); 30 Out. 1998, *Bujokas* et al. 34 (UPCB); Mai. 2005, *Stefanello* s.n. (UPCB 53303); Foz do Iguaçu, 3 Out. 2006, *Labiak* et al. 3820 (UPCB); Guaratuba, 23 Nov. 1996, *Santos* et al. 294 (NY, UPCB); Jaguariaíva, 16 Dez. 1991, *Cervi* et al. 3593 (MBM, UPCB); Londrina, 23 Ago. 2011, *Lima & Soller* 295 (UEC, UPCB); Piraquara, 22 Nov. 1983, *Oliveira* 787 (ESA, MBM, UPCB); Ponta Grossa, 9 Nov. 1989, *Cervi* &

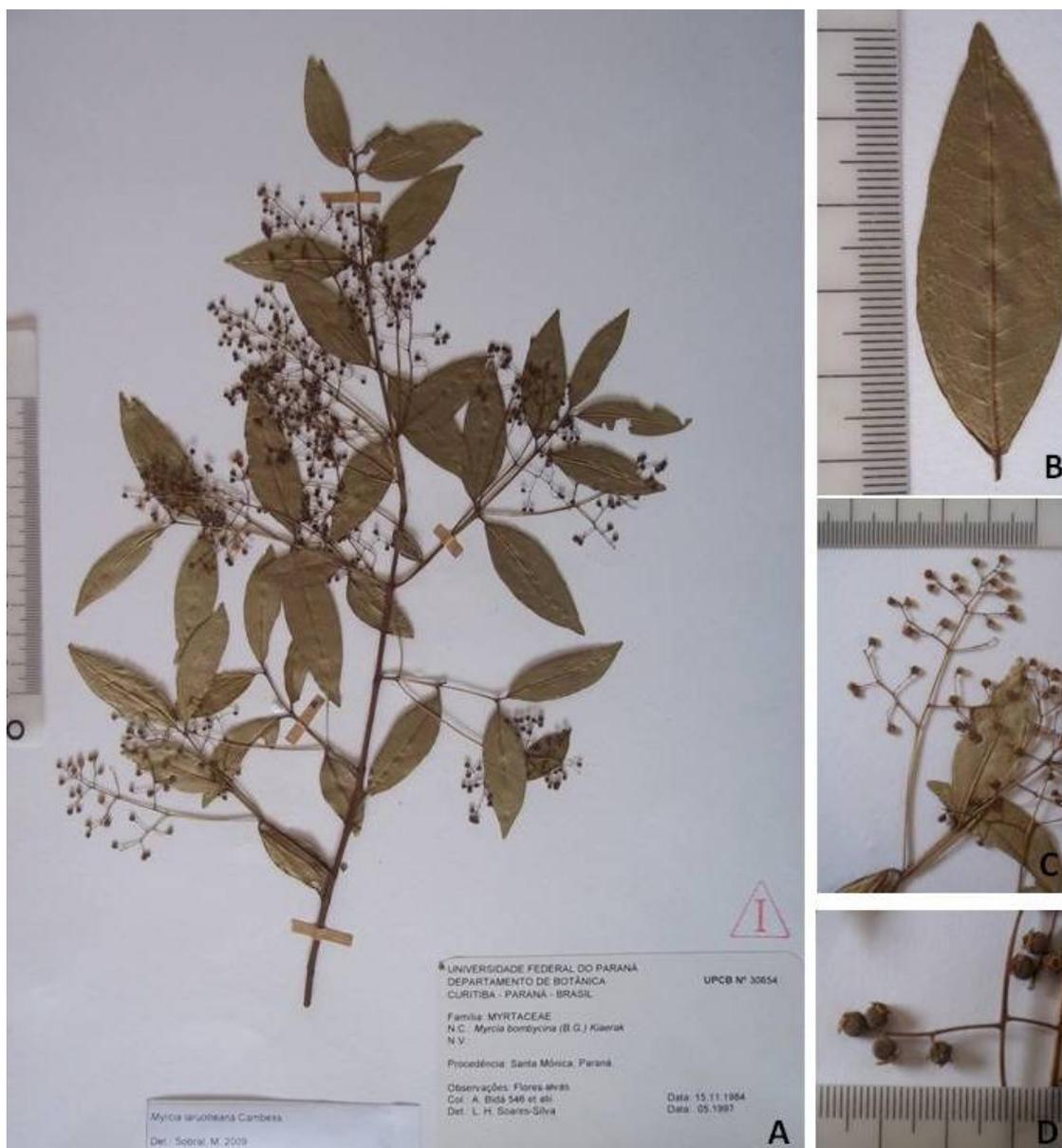


Figura 1. *Myrcia laruotteana*. A – Aspecto geral do ramo (Bidá et al. 546). B – Face abaxial da folha (Bidá et al. 546). C – Inflorescência (Bidá et al. 546). D – Frutos com remanescentes do hipanto e do cálice presentes (Siani s.n., RB 361717).

Hatschbach 3011 (MBM, UPCB); 16 Set. 1995, *Cervi* et al. 5961 (UPCB); Porto Amazonas, 13 Out. 1963, *Hatschbach* 10250 (MBM, UPCB); Porto Rico, 29 Set. 2000, *Romagnolo* 635 (HUEM); Rio Pequeno, 8 Nov. 1960, *Braga* et al. 319 (UPCB); Três Barras do Paraná, 5 Ago. 1997, *Borgo & Isernhagen* 117 (UPCB). Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, s.d., *Beatriz* s.n. (RB 219595). Rio Grande do Sul: Barracão, 6 Fev. 1985, *Silveira*

et al. 2133 (RB); Nova Petrópolis, 28 Fev. 2012, *Lima & Molz* 347 (UEC, UP CB); Nova Prata, 4 Nov. 1982, *Mattos et al.* 23679 (RB); São Francisco de Paula, 28 Fev. 2012, *Lima & Molz* 348 (UEC, UP CB). Santa Catarina: Campo Alegre, 19 Nov. 1992, *Cordeiro & Poliquesi* 942 (MBM, NY, SP, UP CB); Garuva, 17 Nov. 2011, *Lima & Vieira* 335 (UEC, UP CB); *Lima & Vieira* 336 (UEC, UP CB); Itaiópolis, 26 Nov. 2007, *Dreveck et al.* 49 (FUEL, FURB, RB); Mafra, 28 Nov. 2007, *Dreveck et al.* 61 (FUEL, FURB, RB). São Paulo: Campinas, 6 Out. 2000, *Siani* s.n. (RB 361717); Rio Claro, 14 Dez. 1992, *Mencacci & Zipparro* 20 (HUEM); *Mencacci & Zipparro* 23 (HUEM); *Mencacci & Zipparro* 25 (HUEM); *Mencacci & Zipparro* 26 (HUEM); *Mencacci & Zipparro* 29 (HUEM). **PARAGUAI.** Central, Tavarory, 9 Set. 1990, *Zardini* 23435 (RB).

Distribuição: Ocorre no Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia. No Brasil, ocorre desde o Maranhão e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul, não existindo registros para poucos estados (Figura 2).

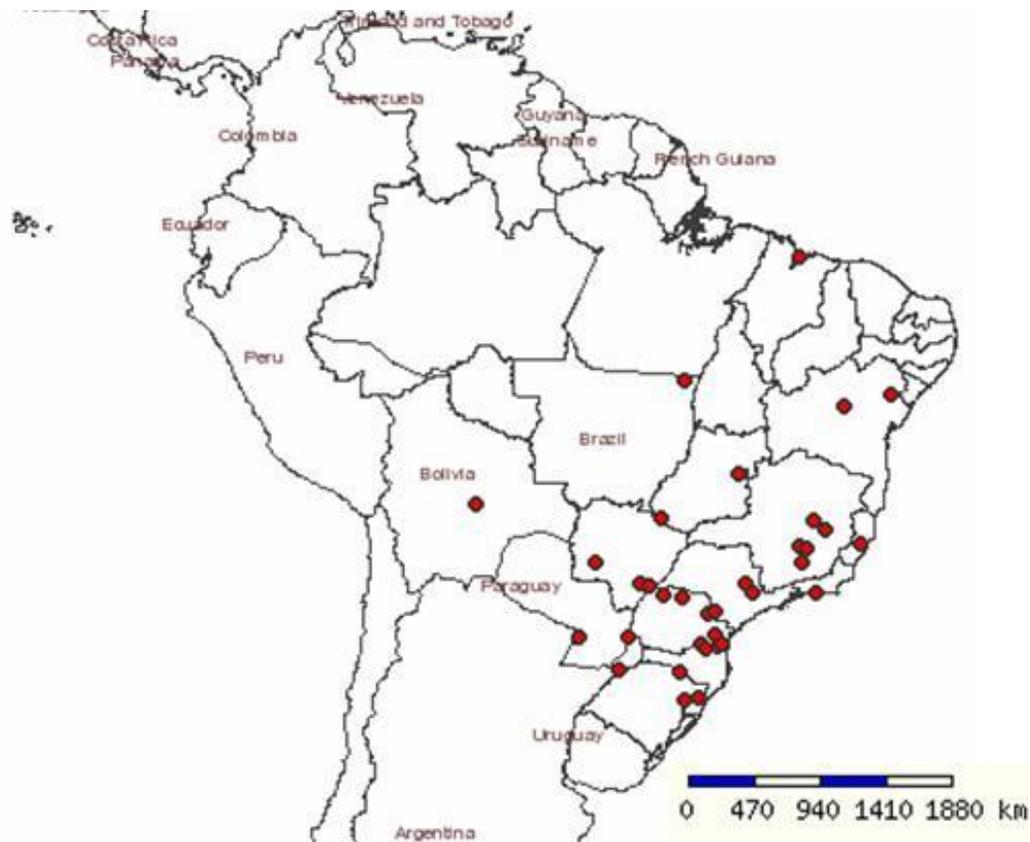


Figura 2. Distribuição de *Myrcia laruotteana*.

Myrcia laruotteana apresenta grande variação na morfologia foliar (Figura 3), sendo que indivíduos localizados mais ao norte de distribuição da espécie são parecidos com algumas formas de *M. tomentosa*. Estas espécies se diferem pelo indumento menos denso, principalmente nas inflorescências, e pelas inflorescências mais desenvolvidas em *M. laruotteana*. As folhas apresentam nervação delicada, com reticulação densa e bem evidente. Seus frutos quando imaturos são verdes e apresentam os remanescentes do cálice negros. Geralmente é encontrada próxima a cursos d'água e até mesmo em áreas brejosas. Encontrada com flores de agosto a dezembro e com frutos de outubro a janeiro.

Myrcia lajena foi um nome novo criado por Legrand (1961) para *Aulomyrcia undulata* O. Berg, planta característica por ser muito ramificada e ter a margem de suas folhas onduladas. Levando em consideração toda a variação morfológica que existe em *M. laruotteana* e os resultados observados nas análises moleculares com marcadores ISSR (Capítulo 1), fica claro que as poucas diferenças notadas por Berg (1857-1859) fazem parte da variação de *M. laruotteana*. Não existe nenhuma característica que possa separá-las consistentemente, assim é proposta a sinonimização de *M. lajeana* sob *M. laruotteana*.

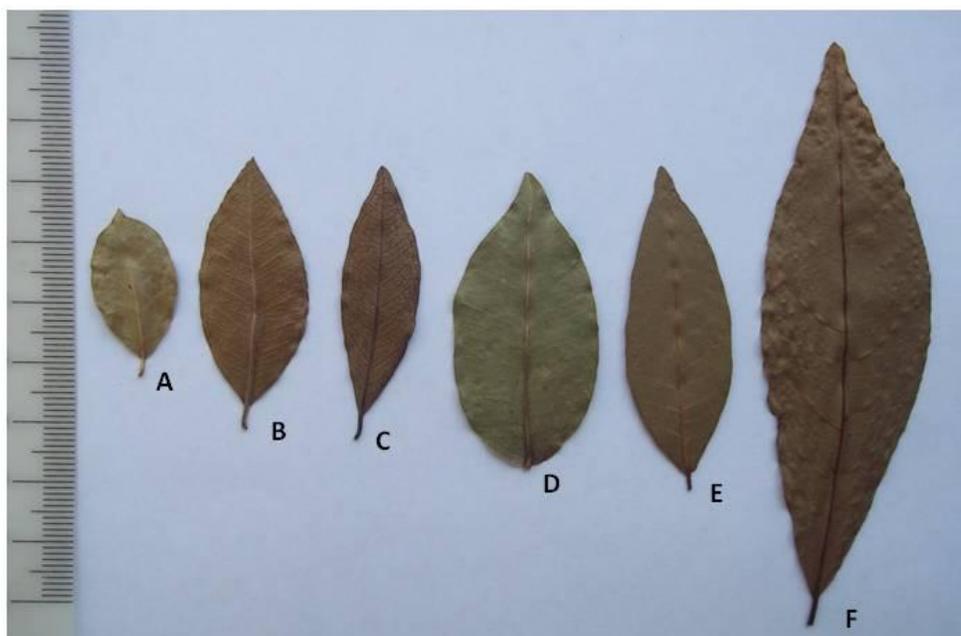


Figura 3. Variação morfológica foliar em *Myrcia laruotteana*. A – Cordeiro & Poliquesi 942. B – Dreveck & Godoy 49. C – Dreveck e Godoy 61. D – Santos 4. E – Bidá et al. 546. F – Sobral et al. 10221.

2. *Myrcia selloi* (Spreng.) N.Silveira, *Loefgrenia* 89:5. 1986. *Myrtus selloi* Spreng., *Syst. Veg.* 2:482. 1825. Tipo: Brasil, Sellow s.n. (holótipo: B[†]); Brasil. Rio Grande do Sul, Santo Antônio das Missões, BR-285 Km 499, 14 Nov. 1975, *Porto* et al. 1784 (neótipo: ICN!, designado aqui). (Figuras 4, 5)

Arbustos ou arvoretas até 3 m alt., raramente árvores. Plantas glabras, raramente com ramos e folhas jovens pubescentes, com tricomas até 0,5 mm compr. Folhas com pecíolo 1,5-3 mm comp., canaliculado ou não; lâmina 2-7x0,7x3,5 cm, elípticas ou obovadas, cartáceas ou coriáceas; ápice agudo a obtuso; base obtusa a arredondada; nervura primária plana na face adaxial, saliente na face abaxial; nervuras secundárias 10-15 de cada lado, planas e apenas visíveis ou salientes na face adaxial, salientes na face abaxial; nervura marginal 0,7-2,5 mm da borda, linear ou raramente formada por arcos das nervuras secundárias. Panículas axilares, ramificadas 1-2 vezes, eixo central 3-5,5 cm comp.; flores com pedicelos 1,6-3 mm comp.; bractéolas 0,8-1,5 mm comp., lanceoladas, decíduas na antese; botões florais obovais, frequentemente estrangulados no ápice no ovário; lobos do cálice triangulares, 0,6-1x0,8-1 mm, ciliados. Frutos globosos, 3-6 mm de diâmetro, vermelhos ou alaranjados quando maduros, com cicatriz circular no ápice devido à queda dos remanescentes do hipanto e do cálice.

Material examinado: **ARGENTINA**. Corrientes: Mercedes, 19 Fev. 1982, *Landrum* 4322 (MBM, RB); San Martín, 26 Abr. 2006, *Arbo* et al. 9133 (HUEFS). **BRASIL**. Bahia: Gerais do Vieira, 10 Dez. 1996, *Ligia* 965 (RB). Goiás: Formosa, 14 Jul. 2002, *Tameirão Neto* 3506 (BHCB, HUEFS). Mato Grosso do Sul: Jateí, 10 Dez. 2009, *Souza* et al. 101 (HUEM); Taquarussu, 27 Set. 2000, *Romagnolo* 603 (HUEM); *Romagnolo* 608 (HUEM); 16 Fev. 2001, *Romagnolo* 709 (HUEM). Minas Gerais: Lagoa Santa, 23 Out. 1995, *Brina & Costa* s.n. (BHCB 36722, SP); Matozinho, 30 Nov. 1995, *Brina & Costa* s.n. (BHCB 36685); *Brina & Costa* s.n. (BHCB 36686); São Sebastião do Paraíso, s.d., *Theodoro* 739 (RB). Paraná: Guarapuava, 19 Out. 1991, *Britez* et al. 2095 (UPCB); São José dos Pinhais, 25 Out. 2003, *Lucas* et al. 110 (ESA, HUEM, MBM); 30 Out. 2003, *Lucas* et al. 154 (ESA, HUEM, MBM). Rio de Janeiro: Cabo Frio, 8 Nov. 1995, *Lima* 5192 (RB); Niterói, 2 Ago. 2012, *Lima* et al. 353 (UEC, UPCB). Rio de Janeiro, 28 Set. 1989, *Gonçalves & Correia* 43 (RB). Rio Grande do Sul: Santana da Boa Vista, Jan. 1990, *Sobral* et al. 6417 (ICN,



Figura 4. *Myrcia selloi*. A – Aspecto geral do ramo (Lucas et al. 110). B – Face abaxial da folha (Arbo et al. 9133). C – Botões (Tameirão Neto 3506). D – Frutos com cicatriz circular apical devido à queda dos remanescentes do hipanto e do cálice (Arbo et al. 9133).

MBM); Santa Catarina: Campo Alegre, 1 Fev. 1957, *Smith & Klein* 10560 (RB); Joinville, Fev. 2007, *Vieira* 1896 (BHCB); 18 Nov. 2011, *Lima & Vieira* 337 (UEC, UPCB); Laguna, 13 Dez. 2000, *Hatschbach* et al. 71898 (MBM, UPCB); São Francisco do Sul, 14 Jan. 2012, *Lima* et al. 344 (UEC, UPCB). São Paulo: Campinas, 10 Nov. 1998, *Falmoreas*

78 (BHCB); 22 Out. 1999, *Bertoni & Geremias* 103 (BHCB, IAC); 24 Out. 2001, *Bertoni* 605 (BHCB, IAC); Piracicaba, 1 Jun. 2012, *Lima & Pinto* 350 (UEC, UPCB).
PARAGUAI. Paraguari: Caapucu, 29 Abr. 1984, *Hahn* 2382 (ICN).

Distribuição: Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. No Brasil, tem distribuição desde o estado da Bahia e Goiás até o Rio Grande do Sul.

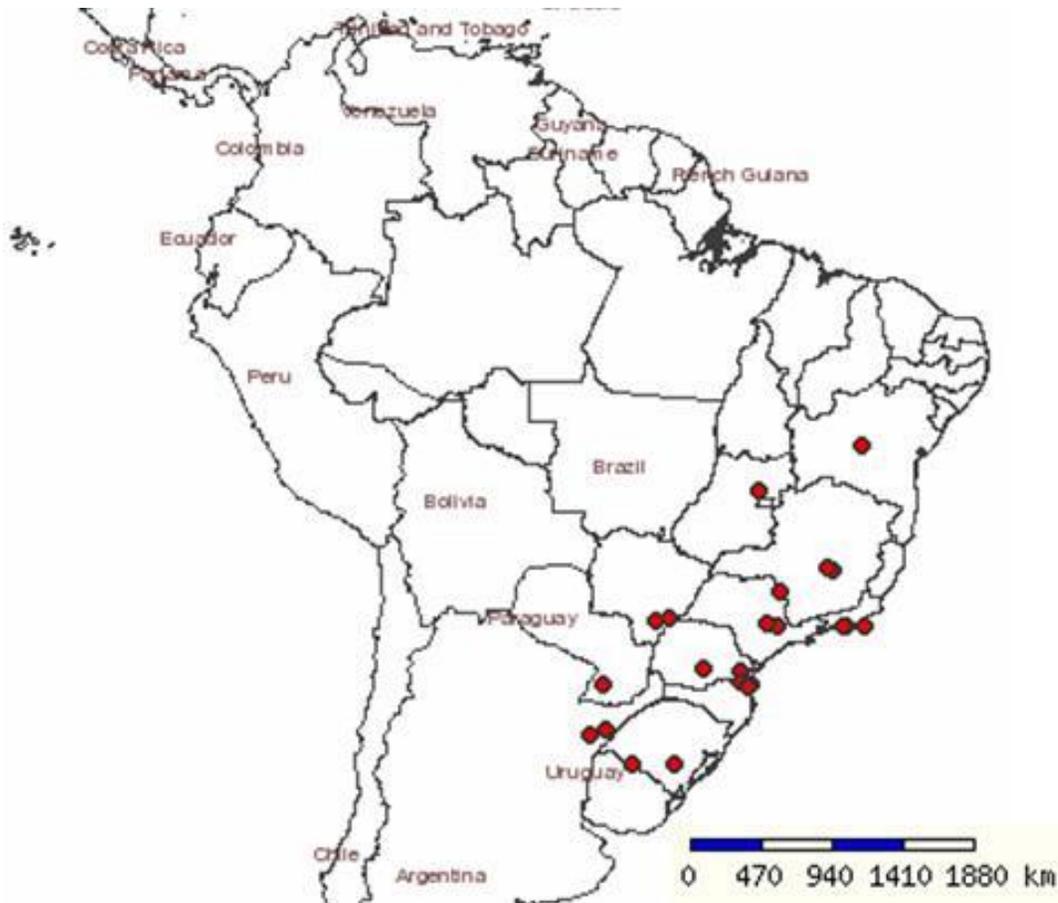


Figura 5. Distribuição de *Myrcia selloi*.

Myrcia selloi é caracterizada por seus botões estrangulados acima do ovário e pelos frutos com uma cicatriz circular no ápice, indicando a queda dos remanescentes do hipanto e do cálice. Ocasionalmente esta queda ocorre na antese. Vegetativamente, algumas formas de *M. selloi* são muito parecidas com *M. larutteaana*, mas geralmente apresentam folhas menores. O material coletado em Piracicaba (*Lima & Pinto* 350) mostra variação foliar que pode ocorrer em um mesmo indivíduo, com suas folhas mais basais idênticas a folhas de

algumas formas de *M. laruotheana*. Encontrada com flores em julho e entre setembro e novembro, com frutos em agosto e entre dezembro e janeiro.

3. *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC., Prod. 3:245. 1828. *Eugenia tomentosa* Aubl., Hist. Pl. Guiane 1:504. 1775. Tipo: Guiana Francesa, Aublet s.n. (holótipo: BM [BM000953642]). (Figuras 6, 7)

Arbustos a árvores até 6 m alt. Ramos, folhas jovens, pecíolos, inflorescências, bractéolas, cálice, ovário e frutos tomentosos, frequentemente pubescentes, com tricomas até 3 mm comp.; folhas adultas glabras ou com tricomas do mesmo tipo esparsos, raramente tomentosas, ou apenas com a nervura primária tomentosa. Folha com pecíolo 1-12 mm comp., canaliculado; lâmina 3-18,5x1,5-8,5 cm, obovadas, ovadas ou elípticas, cartácea ou coriácea; ápice agudo a arredondado, ocasionalmente levemente acuminado; base aguda a arredondada; nervura primária sulcada ou plana na face adaxial, saliente na abaxial; nervuras secundárias 7-10 de cada lado, evidentes e salientes em ambas as faces; nervura marginal 0,7-3,5 mm da borda, formada por arcos das nervuras secundárias. Panículas axilares ou terminais, ramificadas 1-2 vezes, eixo central 2,5-13 cm comp.; flores sésseis; bractéolas 0,6-6,5 mm comp., lineares, persistentes; botões florais piriformes; lobos do cálice triangulares, 1-4x1-2 mm. Frutos globosos, 3-6,5 mm de diâmetro, amarelos ou vermelhos a negros quando maduros, coroados pelos remanescentes do hipanto e cálice.

Material examinado: **BRASIL**. Alagoas: Pilar, 7 Nov. 2002, *Lyra-Lemos* 7089 (ESA, HUEFS). Amazonas: Barcelos, 25 Mar. 1984, *Pipoly* et al. 6896 (NY). Bahia: Abaíra, 10 Set. 1993, *Ganev* 2218 (HUEFS, UB); Campo Formoso, 29 Set. 2005, *Moraes* et al. 59 (HUEFS); Caitité, Fev. 2008, *Mendes* et al. 528 (BHCB, HUEFS); Caturama, 4 Jul. 2007, *Conceição* et al. 2326 (HUEFS); Coração de Bahia, 2 Dez. 1992, *Arbo* et al. 5521 (HUEFS, RB, UB); Licínio de Almeida, 10 Dez. 2009, *Guedes* et al. 16771 (HUEFS); 10 Dez. 2009, *Melo* et al. 7403 (HUEFS); Piatã, 5 Set. 1996, *Harley* et al. 28269 (BHCB, HUEFS); Rio de Contas, 29 Ago. 1998, *Carvalho* et al. 6656 (BHCB, RB, SP); 29 Ago. 1998, *Carvalho* et al. 6629 (BHCB, RB, SP); 28 Out. 1988, *Harley* et al. 25728 (HUEFS); Santo Amaro, 22 Nov. 1986, *Queiroz* 1364 (HUEFS). Ceará: Barbalha, 11 Jan. 2007, *Silva*

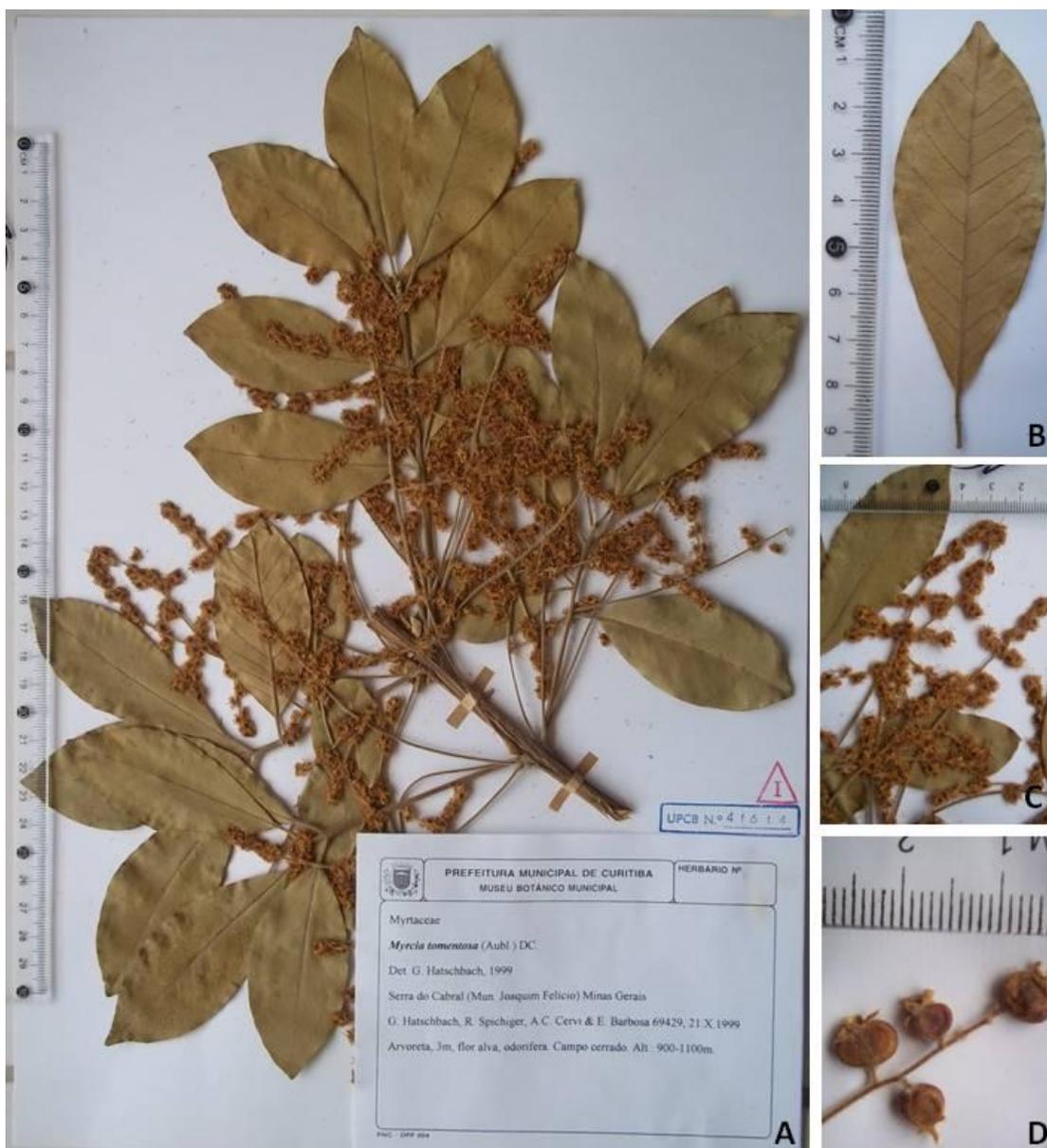


Figura 6. *Myrcia tomentosa*. A – Aspecto geral do ramo (Hatschbach et al. 69429). B – Face abaxial da folha (Hatschbach et al. 69429). C – Inflorescências (Hatschbach et al. 69429). D – Frutos com remanescentes do hipanto e do cálice presentes (Tameirão Neto 3128).

s.n. (BHCB 121042). Distrito Federal: Brasília, 27 Mai 2011, Lima & Faria 294 (UEC, UPCB); Gama, 2 Out. 2000, Gomes et al. 93 (BHCB). Espírito Santo: Santa Teresa, 28 Nov. 2006, Lucas et al. 756 (BHCB, ESA, RB, UB). Goiás: Anápolis, 26 Mai 2011, Lima

& Faria 290 (UEC, UPCEB); Colinas do Sul, 22 Ago. 2001, *Pereira-Silva & Pereira* 5333 (HUEFS); Hidrolândia, 8 Nov. 2007, *Pastore* 2254 (HUEFS); Niquelândia, 4 Ago. 1992, *Filgueiras & Lopesi* 2413 (RB); Padre Bernardo, 12 Jun. 2002, *Fonseca et al.* 3465 (RB). Maranhão: São Luis, 8 Jan. 1998, *Salino* 3893 (BHCB, MBM, SP). Mato Grosso: Nova Brasilândia, 7 Out. 1997, *Souza et al.* 20159 (ESA) . Mato Grosso do Sul: Aquidauana, 21 Nov. 1980, *Guimarães* 1312 (RB); Rio Brillhante, 22 Out. 1970, *Hatschbach* 25092 (MBM, UPCEB, RB). Minas Gerais: Curvelo, 3 Jun. 1999, *Tameirão Neto* 3128 (BHCB); Joaquim Felício, 21 Out. 1999, *Hatschbach et al.* 69429 (MBM, UPCEB); Januária, 24 Out. 1997, *Lombardi* 2059 (BHCB, MBM, SP); Lagoa Santa, Set. 1995, *Brina & Costa* s.n. (BHCB 36728, SP); Montes Claros, 18 Ago. 2002, *Hatschbach et al.* 73661 (BHCB, MBM); Prados, 27 Set 2011, *Lima et al.* 300 (UEC, UPCEB); Sete Lagoas, 15 Set. 1983, *Carvalho* 155 (BHCB, MBM). Pará: Maracanã, 10 Fev. 2003, *Lobato* 2949 (BHCB). Paraíba: Mamanguape, 22 Nov. 2003, *Barbeiro* 2182 (BHCB). Paraná: Rio Branco do Sul, 5 Jan. 1990, *Silva & Cordeiro* 769 (BHCB, MBM); 1 Nov. 2003, *Lucas et al.* 160 (ESA, HUEM, MBM); 7 Mai. 1968, *Hatschbach* 19191 (FUEL, MBM, SP, UPCEB); 27 Nov 2011, *Lima et al.* 338 (UEC, UPCEB); Tibagi, 3 Nov. 2003, *Lucas et al.* 180 (ESA, HUEM). Pernambuco: Cabo de Santo Agostinho, 18 Out. 1994, *Miranda et al.* 2032 (BHCB). Piauí: Piriipiri, 15 Set. 1977, *Barroso* 225 (RB). Rio de Janeiro: Nova Friburgo, 5 Dez. 1993, *Vieira et al.* 464 (RB); Petrópolis, Out. 1944, *Góes* 1118 (RB). São Paulo: Águas de Santa Bárbara, 8 Dez. 1989, *Assis & Meira Neto* 505 (HUEM); Porto Ferreira, 23 Out. 1954, *Wasicky* s.n. (HUEFS 32137); São Paulo, 14 Fev 2012 *Goldenberg et al.* 1641 (UEC, UPCEB); 14 Fev. 2012, *Goldenberg et al.* 1638 (UEC, UPCEB). Tocantins: Dianópolis, 18 Set. 2007, *Spínola & Faria Jr.* P-61 (UB). **GUIANA**. Mai. 1926, *Alston* 501 (RB). **GUIANA FRANCESA**. Monpé Soula: Bassin du Haut-Maroini, 6 Set. 1987, *Granville et al.* 10088 (RB). **VENEZUELA**. Aragua: Ricaurte, 15 Jun. 1984, *Davidse* 28197 (SP).

Distribuição: Segundo Kawasaki (1989), *M. tomentosa* é uma das espécies do gênero mais amplamente distribuída, desde a América Central até o Sudeste do Brasil. Foram encontrados registros na Venezuela e Guianas. No Brasil, ela ocorre em praticamente todo o território, com limite de distribuição sul no estado do Paraná (Figura 7). Existe um

material coletado em Santa Catarina (*Kuhlmann* s.n., s.d.; RB 347638) cuja procedência é duvidosa, e por isso não foi incluída na lista de materiais examinados.

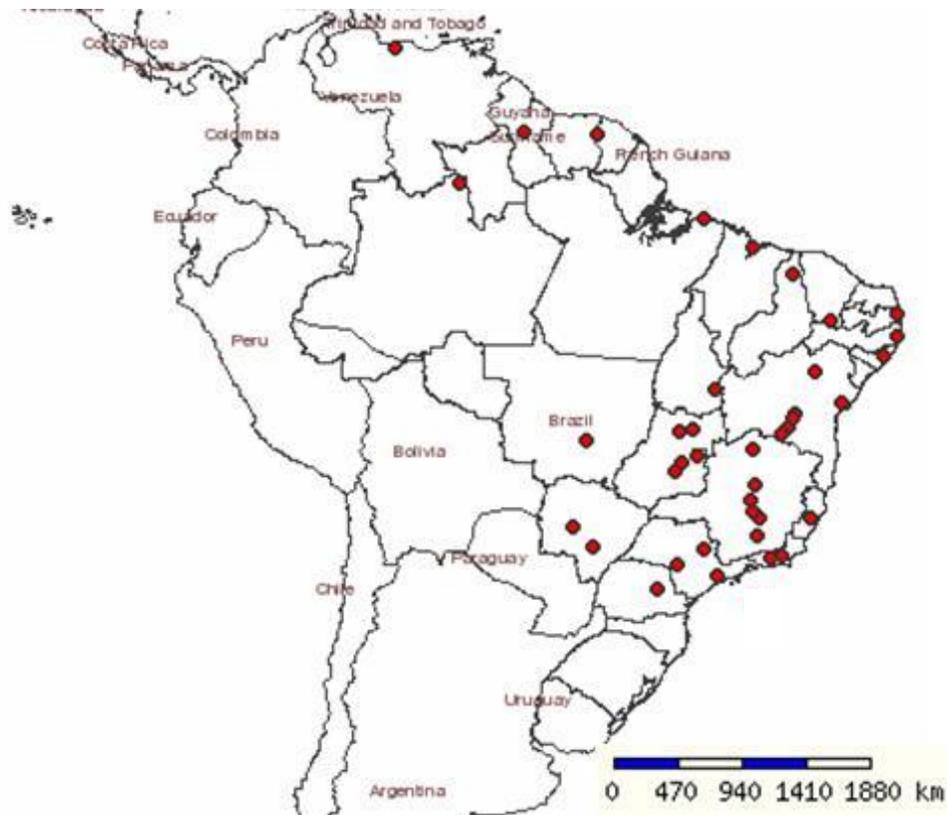


Figura 7. Distribuição de *Myrcia tomentosa*.

Esta espécie apresenta grande variação morfológica, principalmente de folha, ao longo de sua distribuição geográfica. É comum também encontrarmos esta variação em um mesmo indivíduo. Em geral, *M. tomentosa* pode ser reconhecida pelo tronco liso e tortuoso, com ritidoma de coloração marrom-avermelhado, e pelos tricomas densos pelo menos nas inflorescências e flores. As folhas apresentam nervação laxa, saliente e muito evidente em ambos os lados. Normalmente as nervuras secundárias se encontram formando arcos na borda da folha, não evidenciando a formação de uma nervura coletora verdadeira. As inflorescências geralmente apresentam poucas flores, com os ramos basais maiores que os apicais, e flores sempre sésseis. Encontrada com flores entre setembro e dezembro e com frutos entre outubro e março.

Referências

Berg, O. Myrtaceae. 1857-1859. In: Martius, C. F. P. **Flora Brasiliensis** 14(1):1-656.

Donoghue, M.J. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. **The Bryologist** 88(3):172-181.

Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B.K.; Landrum, L.L.; Matsumoto, K.; Mazine, F.F.; Nic Lughadha, E.; Proença, C.; Soares-Silva, L.H.; Wilson, P.G.; Lucas, E. 2012. **World Checklist of Myrtaceae**. Royal Botanical Gardens, Kew. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/>. Acesso em: 10/11/2012.

Kawasaki, M. L. 1989. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 11:121-170.

Landrum, L. R.; Kawasaki, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** 49(4):508-536.

Legrand, C.D. 1961. Mirtáceas del estado de Santa Catarina. **Sellowia** 13:265-363.

Legrand, C. D.; Klein, R. M. 1969. Mirtáceas – *Myrcia*. In: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 218-330.

Lucas, E.J.; Matsumoto, K.; Harris, S.A.; Nic Lughadha, E.M.; Benardini, B.; Chase, M.W. 2011. Phylogenetics, morphology, and evolution of the large genus *Myrcia* s.l. (Myrtaceae). **International Journal of Plant Sciences** 172(7):915-934.

Mori, S.A.; Boom, B.M.; Carvalino, A.M.; Santos, T.S. 1983. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica** 15(1): 68-70.

Oliveira-Filho, A.T.; Fontes, M.A.L. 2000. Patters of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of the climate. **Biotropica** 32(4b):793-810.

Rieseberg, L.H.; Brouillet, L. 1994. Are many plant species paraphyletic? **Taxon** 43(1):21-32.

Rotman, A. 1994. Las espécies argentinas del gênero *Myrcia* (Myrtaceae). **Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica** 30:81-93.

Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. 2012. Myrtaceae in **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/>. Acesso em: 10/01/2012.

Thiers, B. 2012. **Index Herbariorum**: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/ih>>. Acesso em 10/12/2012.

Wilson, P. G.; O'brien, M. M.; Gadek, P. A.; Quinn, C. J. 2001. Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany** 88: 2013-2025.

Considerações Finais

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos de variabilidade e estruturação genética de populações de *Myrcia laruotteana*, *M. lajeana*, *M. selloi* e *M. tomentosa*, espécies que compõem um dos muitos complexos que existem no gênero. Os dados obtidos a partir destas análises foram usados para propor uma nova classificação específica do complexo.

Tendo em vista toda a variação morfológica existente nas espécies estudadas, com muita sobreposição de características, a identificação destas espécies tornou-se uma tarefa difícil, e somente a taxonomia clássica não é suficiente na resolução deste problema. A utilização de marcadores ISSR se mostrou bastante útil na detecção de variabilidade genética em *Myrcia*, como já havia sido relatado em outros trabalhos com Myrtaceae. Este foi o primeiro trabalho realizado com o marcador ISSR para complexo de espécies na tribo Myrteae, abrindo perspectivas para novos trabalhos abordando outros complexos de espécies da tribo.

Os resultados de variabilidade genética mostraram que as populações amostradas apresentam baixa diversidade, porém existem poucos estudos tratando a família que podem explicar a causa. Neste sentido, este estudo abre perspectivas de novos estudos relacionados principalmente à biologia da reprodução, não só das espécies do complexo *M. laruotteana*, mas da família como um todo. Estes estudos auxiliam no entendimento de diversos padrões encontrados na natureza, pois podem responder questões relativas ao fluxo gênico e a auto-compatibilidade, por exemplo.

De acordo com as diferentes análises de estruturação genética realizadas, pode-se notar que apenas *M. tomentosa* mostrou-se como um táxon distinto dos demais. Entretanto, é inconveniente tomar decisões taxonômicas a partir somente de dados moleculares, quando estes não entram em total acordo com os dados macroscópicos. No caso do complexo *M. laruotteana*, embora a morfologia foliar não apresente separações claras, os frutos de *M. selloi* se diferem facilmente das demais espécies. Por isso, neste trabalho foi optado por mantê-la como uma espécie distinta. Já no caso de *M. lajeana*, não existe nenhuma característica que a diferencie consistentemente de *M. laruotteana*, corroborando com os dados moleculares.

Existem algumas formas intermediárias entre *M. laruotheana* e *M. tomentosa* que não foram amostradas neste trabalho. Neste sentido, outras questões que ainda podem ter deixado algumas dúvidas serão solucionadas apenas com uma amostragem mais ampla de populações ao longo da distribuição geográfica destas espécies.

Estudos filogeográficos usando marcadores para cpDNA também são muito interessantes no caso de complexos de espécies, pois inferem processos históricos além dos processos contemporâneos tratados aqui. Estes estudos já estão sendo realizados para o complexo *M. laruotheana*.

Vários são os sinônimos já propostos para *M. laruotheana*, *M. tomentosa* e *M. selloi*. Existem também espécies que não fazem parte do complexo, mas que possivelmente são aparentadas a ele. O presente trabalho certamente auxiliará em outros estudos que contemplem todas estas espécies, e não somente os quatro nomes tratados aqui.