

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia



Itayguara Ribeiro da Costa

Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e
filogenéticos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e gêneros
relacionados

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ITAYGUARA RIBEIRO DA COSTA
Eliana Forni Martins
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título
de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Regina Forni-Martins

Campinas – SP

Abril – 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C823e

Costa, Itayguara Ribeiro da
Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos
citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando
Psidium e gêneros relacionados / Itayguara Ribeiro da
Costa. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Eliana Regina Forni-Martins.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cromossomos vegetais. 2. Citotaxonomia das
plantas. 3. Myrtaceae. 4. Plantas - Filogenia. 5.
Poliploidia. I. Forni-Martins, Eliana Regina. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evolutionary studies in Myrtaceae: cytotaxonomic and phylogenetic approach, emphasizing *Psidium* and related genera.

Palavras-chave em inglês: Plant chromosomes; Plant cytotaxonomy; Myrtaceae; Plants - Phylogeny; Polyploidy.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Eliana Regina Forni-Martins, Kikyo Yamamoto, Julie Henriette Antoinette Dutilh, Carolyn Elinore Barnes Proença, Fiorella Fernanda Mazine Capelo.

Data da defesa: 28/04/2009.

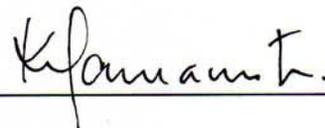
Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 28 de abril de 2009

Profa. Dra. Eliana Regina Forni-Martins
(Orientadora)



Profa. Dra. Kikyo Yamamoto



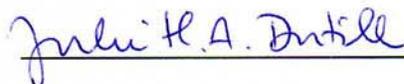
Profa. Dra. Fiorella Fernanda Mazine Capelo



Profa. Dra. Carolyn Elinore Barnes Proença



Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh



Prof. Dr. André Olmos Simões

Dra. Vanessa Mancuso de Oliveira

Prof. Dr. Marcos Eduardo Guerra Sobral

Índice

RESUMO	4
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO GERAL	8
ABORDAGENS EVOLUTIVAS EM MYRTACEAE (TRIBO MYRTEAE)	10
Estudos cromossômicos	10
Tamanho do genoma	12
Filogenia	13
A SUBTRIBO MYRTINAE E O <i>PIMENTA</i> GROUP	15
Figura 1. Representação esquemática dos grupos informais propostos por McVaugh (1968) para a os gêneros de Myrteae.	17
Tabela 1. Circunscrição geral dos gêneros de Myrtinae segundo os principais autores. Alguns gêneros apresentam as atuais sinonímias entre parênteses.	19
Tabela 2. Gêneros pertencentes à subtribo Myrtinae, com sua distribuição na região neotropical e número de espécies no Brasil, de acordo com Landrum & Kawasaki (1997) e Govaerts <i>et al.</i> (2008).	20
O GÊNERO <i>PSIDIUM</i> L.	22
Tabela 3. Espécies de <i>Psidium</i> , seguindo a classificação infragenérica de Berg (1855-56, 1857-59).	23
Tabela 4. Distribuição de algumas espécies de <i>Psidium</i> L. em complexos	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	32
APRESENTAÇÃO GERAL DESTA TESE	33
CAPÍTULO 1 - ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM MYRTACEAE: A DISTRIBUIÇÃO DE NÚMEROS CROMOSSÔMICOS E A EVOLUÇÃO NA FAMÍLIA	35
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	39
Coleta de dados de literatura.....	39
Análise dos dados.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
A evolução dos estudos cromossômicos em Myrtaceae	41

A distribuição dos números cromossômicos em Myrtaceae.....	44
Subfamília Psiloxylloideae.....	46
Subfamília Myrtoideae.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
Tabela 1. Caracteres diagnósticos das duas atuais subfamílias de Myrtaceae, de acordo com Wilson <i>et al.</i> (2005).	73
Tabela 2. Quantidade de determinações de números cromossômicos em cada uma das tribos na subfamília Myrtoideae (sensu Wilson <i>et al.</i> 2005) ao longo dos anos. ...	74
Tabela 3. Distribuição geral do dos números cromossômicos diplóides (2x) e poliplóides (3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x) nas diferentes tribos em Myrtaceae.	75
Tabela 4. Distribuição geral dos números cromossômicos básicos em Myrtaceae sem considerar a ocorrência dos citótipos poliplóides.....	76
Tabela 5. Distribuição da incidência de citótipos poliplóides em relação a $x = 11$, nas diferentes tribos de Myrtaceae.....	77
Tabela 6. Espécies de Myrtaceae com mais de um número cromossômico (citótipos).	78
Apêndice. Lista com os taxa cujos números cromossômicos foram compilados em literatura.	80
Figura 1. Quantidade espécies de Myrtaceae com números cromossômicos determinados cumulativamente ao longo dos anos.....	95
Figura 2. Distribuição dos números cromossômicos somáticos (2n) para as 554 espécies de Myrtaceae.....	96
Figura 3. História evolutiva dos estados de caracteres cromossômicos (número, poliploidia, disploidia e citótipos) em Myrtaceae	97
CAPÍTULO 2 - ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM MYRTACEAE: NOVAS RELATOS DE NÚMEROS CROMOSSÔMICOS E DISTRIBUIÇÃO DA POLIPLÓIDIA NA TRIBO MYRTEAE	98
INTRODUÇÃO	98
MATERIAL E MÉTODOS	101
Coleta de material.....	101
Estudos cromossômicos	101
Análise dos dados de literatura	102
RESULTADOS	102
DISCUSSÃO	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
Figura 1. Árvore <i>sensu stricto</i> resultante da análise de parcimônia com pesagens	

sucessivas e análise bayesiana das sequências ITS, ETS, <i>psbA-trnH</i> and <i>matK</i> ..	121
Figura 2. Metáfases mitóticas em espécies de Myrtinae (Myrtaceae).	122
Figura 3. Distribuição dos números cromossômicos somáticos (2n) entre as espécies de Myrtaceae (tribo Myrteae), incluindo os resultados deste estudo (Tabela 1) e os obtidos na literatura (Tabela 2).	123
Figura 4. Distribuição dos números cromossômicos em Myrteae, ao longo da espinha da árvore filogenética (adaptada) de Lucas <i>et al.</i> (2007), resultantes de uma análise de parcimônia buscando os estados de caracteres ancestrais.	124
Tabela 1. Espécies analisadas no presente estudo.	125
Tabela 2. Lista de números cromossômicos em espécies da tribo Myrteae.	127
Tabela 3. Gêneros de Myrteae com número de espécies com contagem cromossômica (Num. Crom) e número de espécies estimadas (Num. Esp.), acompanhados da porcentagem de espécies com número cromossômico conhecido (Abrangência %). As estimativas foram retiradas do WCM (Govaerts <i>et al.</i> 2008).....	133
CAPÍTULO 3 - KARYOTYPE ANALYSIS IN SOUTH AMERICAN MYRTACEAE	134
INTRODUCTION	136
MATERIAL AND METHODS	138
RESULTS AND DISCUSSION.....	139
ACKNOWLEDGEMENTS	145
REFERENCES.....	146
FIGURE LEGENDS	149
Figs. 1- 12. Mitotic metaphases in species of Myrteae	150
Fig 13. Idiograms of Eugeniinae species.....	151
Fig 14. Idiograms of Myrceiinae species.....	152
Fig 15. Idiograms of Myrtinae species.....	153
Fig 16. Dispersion of symetry indices.....	154
Table 1 Karyotypic parameters of Myrtaceae.....	155
CAPITULO 4 - DISTRIBUIÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNAR 45S POR MEIO DE FISH EM ESPÉCIES DE <i>PSIDIUM</i> E GÊNEROS PRÓXIMOS (MYRTACEAE)	156
INTRODUÇÃO	156
MATERIAIS E MÉTODOS	160
1. Material utilizado	160
2. Preparação das lâminas (esmagamento).....	161
3. A técnica de hibridação <i>in situ</i> fluorescente - FISH	162

RESULTADOS E DISCUSSÃO	168
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
Tabela 1. Espécies de <i>Psidium</i> utilizadas nos ensaios com a técnica de hibridação <i>in situ</i> (rDNA 45S), com respectivos número cromossômico e número de sítios de hibridação com rDNA 45S.	176
Figura 1. Fotos ilustrando alguns dos principais problemas encontrados com a aplicação da técnica de FISH em espécies de Myrtaceae.	177
CAPÍTULO 5 - NUCLEAR GENOME SIZE VARIATION IN FLESHY-FRUITED NEOTROPICAL MYRTACEAE.....	179
Introduction	181
Material and Methods	183
Results	185
Discussion	186
LIST OF FIGURES	195
Figure 1. Box-plot distribution of 2C-values (pg DNA) in species of Myrtaceae, according the intra-familiar classification proposed by Wilson <i>et al.</i> (2005).....	196
Figure 2. Distribution of 2C-values (pg DNA) and 2n chromosome number in Fleshy-fruited Myrteae species	197
Table 1. Fleshy-fruited Myrteae analyzed species and vouchers details.	198
Table 2. Chromosome numbers (2n) and genome size estimations for fleshy-fruited Myrteae species in this work	200
CAPÍTULO 6 - VARIAÇÃO NO TAMANHO DO GENOMA EM ESPÉCIES DE <i>PSIDIUM</i> (MYRTACEAE) ESTIMADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	202
INTRODUÇÃO	202
MATERIAL E MÉTODOS	204
Coleta de material	204
Contagens cromossômicas.....	204
Preparação das suspensões nucleares para a citometria de fluxo	205
RESULTADOS E DISCUSSÃO	205
REFERÊNCIAS	208
Tabela 1. Espécies de <i>Psidium</i> analisadas.	212
Figura 1. Distribuição dos valores de conteúdo de DNA nuclear (2C), em relação ao número cromossômico (2n) em espécies de <i>Psidium</i>	213
CAPÍTULO 7 - RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS GÊNEROS DE MYRTEAE (MYRTACEAE) A PARTIR DE CINCO MARCADORES MOLECULARES.....	214

INTRODUÇÃO	214
MATERIAL E MÉTODOS	216
Amostragem	216
Extração, seqüenciamento e alinhamentos de DNA	216
Análise filogenética	217
RESULTADOS	218
DISCUSSÃO	220
REFERÊNCIAS	222
Tabela 1. Táxons amostrados, com respectiva origem, detalhes do voucher e tipos de seqüências utilizadas.....	224
Tabela 2. Primers e condições de PCR para amplificar as regiões nucleares (ITS e ETS) e plastidiais (<i>psbA-trnH</i> e <i>ndhF</i>).....	228
Tabela 3. Características das seqüências utilizadas.	229
Figura 1. Uma árvore simples das 1350 árvores mais parcimoniosas com comprimentos de ramos gerados pela busca heurística dos dados combinados de ITS, ETS, <i>psbA-trnH</i> , <i>ndhF</i> e <i>matK</i>	230
Figura 2. Árvore consenso <i>stricto</i> resultante da análise de parcimônia com pesagens sucessivas e análise bayesiana das seqüências de ITS, ETS, <i>psbA-trnH</i> , <i>ndhF</i> e <i>matK</i>	231
CONSIDERAÇÕES FINAIS	232

“Eu não podia imaginar as coisas que me aconteceriam, o início foi incerto, confuso e incomum, onde todos os estranhos faziam parte da minha vida, onde todos os cantos teriam histórias escondidas. Aqui passei os melhores anos de minha vida, fiz amigos, muitos dos quais, me acompanharão para sempre. Por isso tenho que comemorar!

Esse é um momento especial! É hora de olhar para trás e ver por tudo o que já passei. Sem dúvida, muitas tristezas e conflitos, mas, felizmente, por inúmeros bons momentos, de alegria, de vitórias e de cumplicidade.

Devo esquecer aqueles que me impuseram obstáculos infundados e agradecer àqueles que me impulsionaram adiante. É hora, mais do que nunca, de valorizar as amizades e os conhecimentos adquiridos aqui.”

“Despedida”- autor desconhecido

Dedico à:
À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

*"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.
Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.
Essa é a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."*

Charles Chaplin

A Profa. Dra. Eliana Regina Forni-Martins, agradeço de forma especial pela paciente orientação em todos esses anos, pela confiança depositada em mim, por sua amizade e pelo exemplo de pessoa e profissional que pretendo seguir ao longo de minha vida;

Aos membros da pré-banca e banca pela criteriosa leitura e pelas valiosas sugestões para a melhoria deste trabalho e para trabalhos futuros;

Aos meus co-orientadores em Kew - Eve Lucas, Félix Forest e Eimear NicLughadha - pela calorosa acolhida e por todos os ensinamentos durante meu período em Londres e principalmente por sua amizade;

Aos diversos financiadores pelas diferentes formas de auxílio para a realização deste trabalho:

- CNPq pela concessão das bolsas de Doutorado no Brasil e no exterior,
- FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste projeto,
- Andrew Mellow Foundation e o Programa KLARF (Kew Latin American Research Fellowships), pelo apoio financeiro para a realização dos estudos de filogenia molecular no Jodrell Laboratory, em Kew. Em especial a Amélia Baracat e a William Milliken,
- IAPT (International Association for Plant Taxonomy) pelo apoio financeiro para a realização de algumas coletas adicionais e IOPB (International Organization for Plant Biosystematics) pelo auxílio para apresentação de parte dos resultados desta tese no X IOPB Symposium;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal pelos ensinamentos e agradável convivência, e ao curso de pós-graduação em Biologia Vegetal;

Pela agradável convivência, paciência, brigas, viagens de coleta, doação de material e principalmente pelo amor e sincera amizade durante todos esses anos agradeço a todos os meus amigos: no Departamento de Biologia Vegetal, no Laboratório de Biossistemática, no Jodrell Laboratory e na vida cotidiana em Campinas, Fortaleza e Londres. Não citarei nomes para evitar cometer o clássico erro de esquecimento da última hora. Cada um de vocês tem consciência da importância que tiveram e tem em minha vida, tanto pessoal como profissional e isto já foi, vem sendo e será manifestado ao longo de nossas vidas. Lamento não poder levar todos comigo, mas saibam que vou estar sempre com vocês, esteja onde estiver, pois os amigos são a família que escolhemos...

Ao meu amigo e companheiro de todas as horas, Christiano, pela convivência e cumplicidade, pelas risadas e brigas, bons e maus momentos pelos quais passamos durante toda esta árdua caminhada no doutoramento.

As famílias que me adotaram. A família Martins, que me acolheu quando aqui cheguei, serei eternamente grato por isso. A família Verola, que me adotou como “o filho preto” e por serem minha referência familiar durante todos estes anos e que continuarão sendo por muito tempo.

A toda a minha família, em especial aos meus pais e minha irmã por todo o esforço dispensado de todas as maneiras possíveis e impossíveis e às renúncias pelas quais passaram para me verem chegar aonde cheguei. Sem o amor e o apoio de vocês isto hoje não seria possível...

É muito difícil agradecer a todos que de alguma maneira participaram direta ou indiretamente do meu amadurecimento tanto pessoal como profissional e espero não ter sido injusto com ninguém.

Muito obrigado a todos vocês por tudo!!!

RESUMO

Myrtaceae é considerada uma das mais importantes famílias em diversidade de espécies nos neotrópicos, principalmente ao longo da Mata Atlântica e do Cerrado, representando de 10 a 15% da diversidade destes biomas. Myrteae é a mais diversificada tribo (73 gêneros e 2375 espécies) da família. Em termos gerais, os representantes sul-americanos de Myrtaceae são considerados táxons complexos e estudos biosistemáticos são fundamentais para uma melhor delimitação taxonômica de suas espécies. Provavelmente, a dificuldade de identificação das mirtáceas brasileiras possa ser atribuída à especiação decorrente de hibridação e poliploidia, com aparecimento de tipos recombinantes com características intermediárias entre os taxa originais, sendo o fluxo gênico interrompido por diferenciação cromossômica, especialmente pela duplicação do número cromossômico. Este trabalho teve como objetivos principais contribuir para o conhecimento citotaxonômico / citogenético da família, bem como aprimorar a filogenia da tribo Myrteae, onde as relações entre os gêneros ainda são incertas, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados (grupo *Pimenta*). Em termos gerais, a poliploidia surgiu de maneira independente ao longo da diversificação das diferentes linhagens na família, ocorrendo em 16% das espécies com número cromossômico conhecido, além de ser observada uma redução drástica de números cromossômicos em relação à $x = 11$, chegando a $x = 5$ e $x = 6$ na tribo Chamelaucieae, clado que concentra metade dos registros poliplóides. Na tribo Myrteae, a ocorrência do número cromossômico $x = 11$ é quase constante, com exceção de 26% das espécies analisadas que são poliplóides. *Eugenia* e *Psidium*, dois dos principais gêneros de Myrteae nos neotrópicos e *Decaspermum*, essencialmente australasiano, registram a maioria das variações poliplóides da

tribo, o que possivelmente tenha favorecido a colonização de novos habitats e ampliado a distribuição geográfica em relação aos demais gêneros da tribo. Do ponto de vista cariotípico, os cromossomos em Myrteae são pequenos ($<2\mu\text{m}$), porém é observado certo grau de assimetria nos cariótipos de espécies com de frutos carnosos quando comparadas com as de frutos secos, nas quais os cariótipos são altamente simétricos. Do ponto de vista molecular, a variação no número de sítios DNAr 45S forneceu subsídios para a diferenciação de espécies em alguns complexos de *Psidium*, bem como indicou a possível origem alopoliplóide em um par de citótipos de *P. cattleianum*, sendo este o primeiro trabalho desta natureza em Myrtaceae. O tamanho do genoma em Myrteae é pequeno e correspondeu diretamente ao nível de ploidia das espécies. Em *Psidium*, esta variação foi da ordem de 9x e os resultados obtidos para espécies do complexo *P. grandifolium* podem ser utilizados em discussões taxonômicas, além de fornecer indícios adicionais sobre a evolução alopoliplóide entre algumas populações de *P. cattleianum*. Estas abordagens são inéditas para representantes de Myrteae. A análise filogenética (94 espécies de 38 gêneros) confirmou o monofiletismo de Myrteae, bem como do gênero *Psidium* e suas relações de parentesco dentro do grupo *Pimenta*. O gênero-irmão de *Psidium* é *Myrrhinium*. São reconhecidos sete grupos informais: grupo *Eugenia*, grupo *Myrceugenia*, grupo *Myrcia*, grupo *Myrteola*, grupo *Pimenta*, grupo *Plinia* e grupo Australasiano. Futuramente, serão explorados os caracteres macromorfológicos e biogeográficos que sustentem uma nova proposta de classificação para os gêneros de Myrteae.

ABSTRACT

Myrtaceae is one of the most diverse families in Neotropical region; principally belong to Mata Atlântica and Cerrado, reaching 10 to 15% of biodiversity of these biomes. Myrteae is the most generically tribe (73 genera and 2375 species) in this family. Generally, South-American taxa are considered a complex group and biosystematic studies are necessary to understand the taxonomic delimitation of their species. Probably, the identification difficulties of Brazilian Myrtaceae would be due to speciation by hybridization and polyploidy, appearing species with intermediate characters between parental taxa and the genetic flow blocked by chromosomal differentiation, principally by chromosome duplication. This work aims to contribute to Cytotaxonomical/Cytogenetical knowledge in Myrtaceae and to update the Myrteae phylogeny, where the relationships between some genera are unclear, emphasizing *Psidium* and related genera (*Pimenta* group). Polyploidy evolves independently belong to diverse lineages belong Myrtaceae, reaching 16% of species that the chromosome numbers are know, besides is observed a drastic reduction of chromosome numbers in relation to $x = 11$, reaching to $x = 5$ or $x = 6$ in the Chamelaucieae tribe, this tribe concentrates half of polyploid records in Myrtaceae. In Myrteae, the occurrence of chromosome number $x = 11$ is practically constant, exception to 26% of polyploid species. *Eugenia* and *Psidium* are two of the principal Neotropical genera of Myrteae and *Decaspermum*, an Australasian genus, presents the majority of polyploidy variations in Myrteae, that would explicate the widespread distribution and the new habitat colonization in relation to the others genera in Myrteae. The chromosome length are small ($<2\mu\text{m}$), wherever was observed asymmetric karyotypes in fleshy-fruited taxa against dry-fruited taxa whit higher symmetric karyotypes. The variation of DNAr 45S loci supplied

additional parameters to species differentiation in some *Psidium* complexes and supplied indications about the possible allopolyploid origin in cytotypes of *P. cattleianum*, being this the first approach with molecular cytogenetic in Myrtaceae. The species of Myrteae presents a very small genome, and was observed a positive correlation with ploidy levels. In *Psidium*, the variation of genome size was 9x and the obtained results for *P. grandifolium* complex would be useful in taxonomic discussions besides supply additional characters about the allopolyploid origin in some populations of *P. cattleianum*. This approach also represents new records in Myrteae. The phylogenetic study (94 species and 38 genera) confirm that the tribe Myrteae and the genus *Psidium* are monophyletic. The sister group of *Psidium* is *Myrrhinium*. Seven informal clades are recognized: *Eugenia* group, *Myrceugenia* group, *Myrcia* group, *Myrteola* group, *Pimenta* group, *Plinia* group e Australasian group. In the future, we will to explore morphological and biogeographical characters that would be support a new classification of Myrteae.

INTRODUÇÃO GERAL

Inserida na ordem Myrtales (*sensu* APG 2003), a família Myrtaceae destaca-se pela diversidade de espécies, com cerca de 3800 a 5800 espécies distribuídas em 130 gêneros (Govaerts *et al.* 2008, Wilson *et al.* 2001). Tradicionalmente, a família era dividida em duas grandes subfamílias, Myrtoideae (com frutos bacóides e filotaxia oposta) e Leptospermoideae (frutos capsulares secos e filotaxia alterna). Recentemente, Wilson *et al.* (2005) reavaliaram esta classificação, agrupando os gêneros anteriormente distribuídos nestas duas subfamílias em Myrtoideae (com 15 tribos) e propondo uma nova subfamília (Psiloxylloideae) com apenas duas tribos monoespecíficas. Todos os representantes neotropicais de Myrtaceae encontram-se atualmente circunscritos na subfamília Myrtoideae, tribo Myrteae, com distribuição em toda a América tropical e subtropical (McVaugh 1968). Myrteae é composta por aproximadamente 49 gêneros e cerca de 2500 espécies (Govaerts *et al.* 2008), sendo a mais diversificada tribo em relação ao número de gêneros em Myrtaceae (Lucas *et al.* 2007). Com base em caracteres morfológicos do embrião, a tribo Myrteae tem sido tradicionalmente dividida em três subtribos (Berg 1855-56, 1857-59): Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae. Em análise filogenética recente, Lucas *et al.* (2005, 2007) demonstraram que Eugeniinae e Myrtinae são grupos polifiléticos enquanto Myrciinae (excluindo *Myrceugenia*) é monofilética, e apontaram ainda alguns gêneros sem posição filogenética definida (como *Myrceugenia*, *Blepharocalyx* e *Luma*). Lucas *et al.* (2005, 2007) sugeriram então, que a classificação intrafamiliar de Berg deva ser abandonada. Mas para facilitar o entendimento e enquanto uma nova classificação intergenérica em Myrteae ainda não é definida, em alguns capítulos da presente tese, estamos levando em consideração a circunscrição geral da tribo proposta por Berg (1855-56, 1857-59).

As espécies neotropicais de Myrtaceae (tribo Myrteae) caracterizam-se pelo hábito arbustivo a arbóreo, cujo caule pode ou não esfoliar-se. Possuem numerosos canais oleíferos nas folhas, flores, frutos e sementes, folhas quase sempre opostas, raro ternadas ou sub-opostas, com nervura marginal. Suas flores em geral são brancas ou às vezes vermelhas, efêmeras, hermafroditas, de simetria radial, em geral pentâmeras, muitas das vezes com o receptáculo bem desenvolvido, polistêmones com deiscência rimosa e ovário sempre ínfero, com variado número de lóculos e de lóculos por óvulo (Barroso 1991).

No Brasil, a família está representada por aproximadamente 1200 espécies pertencentes a 25 gêneros. Landrum & Kawasaki (1997) estimam que menos da metade das espécies tenha sendo tratada por especialistas. Os gêneros mais representativos em espécies são *Eugenia* (1000), *Myrcia s.l.* (incluindo *Calyptranthes*, *Gomidesia* e *Marlierea*, 760), *Psidium* (92) e *Campomanesia* (37) (Govaerts *et al.* 2008).

Inúmeros levantamentos florísticos e fitossociológicos nos mais diversos tipos de ambiente, desde formações savânicas como o cerrado (Castro *et al.* 1999) e campos rupestres (Kawasaki 1989), até formações florestais (Oliveira-Filho & Fontes 2000), registram Myrtaceae como sendo a mais importante ou estando entre as mais importantes famílias em riqueza de espécies. Essas formações, dentro de um contexto mundial, estão incluídas entre as mais ricas em diversidade de espécies vegetais e endemismos na América do Sul (Myers *et al.* 2000). De acordo com Oliveira-Filho & Fontes (2000), Myrtaceae é a família mais diversificada em espécies tanto na Mata Atlântica como no cerrado, representando de 10 a 15% da diversidade de espécies nestes biomas. Estimativas recentes evidenciam o grau de desmatamento da cobertura vegetal original destes biomas, restando cerca de 5% da cobertura original da Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica 1998) e menos de 20% no cerrado (Mittermier *et al.* 2000), dos

quais menos de 1% encontram-se protegidos em Unidades de Conservação.

ABORDAGENS EVOLUTIVAS EM MYRTACEAE (TRIBO MYRTEAE)

Estudos cromossômicos

Segundo McVaugh (1956) e Barroso (1991), as Myrtaceae americanas compreendem um grupo muito complexo que necessitam muitos estudos sistemáticos. Barroso (1991) enfatizou a necessidade de levantamentos regionais aliados a estudos biosistemáticos objetivando uma melhor delimitação dos seus táxons. Dentro da Biosistemática, a Citotaxonomia tem subsidiado estudos taxonômicos e evolutivos em inúmeros grupos taxonômicos, em diferentes níveis hierárquicos (Stace 1991).

Em Myrtaceae, grande parte dos estudos citotaxonômicos encontra-se restrita a espécies com frutos capsulares pertencentes à antiga subfamília Leptospermoideae (Atchinson 1947, Rye 1979, Matsumoto *et al.* 2000). Estudos sobre cromossomos em Myrteae ainda são escassos. Os primeiros estudos em Myrtaceae neotropicais foram realizados por Forni-Martins *et al.* (1995), Andrade & Forni-Martins (1998), Pedrosa *et al.* (1999) e Forni-Martins & Martins (2000), onde foram determinados números cromossômicos de cerca de 10 espécies, sendo várias delas inéditas, inclusive para gêneros como *Campomanesia* e *Myrcia*.

Recentemente, Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, b, 2007a), determinaram o número cromossômico para cerca de 50 espécies de Myrteae, distribuídas nas três diferentes subtribos *sensu* Berg (Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae), com predomínio de $2n = 22$. Os registros apresentados por estes autores são inéditos para a maioria das espécies, até mesmo para alguns gêneros, como *Gomidesia*, *Marlierea* e *Plinia*, além de terem ampliado o conhecimento de

números cromossômicos para os dois maiores gêneros, *Eugenia* e *Myrcia*. Foi observada alta taxa de normalidade de tétrades e viabilidade polínica nas espécies estudadas, mas também espécies triplóides ($2n = 3x = 33$), como *E. dysenterica*, *E. klotzschiana* e *E. puniceifolia*, provavelmente apomíticas. Porém, para *E. dysenterica*, Proença & Gibbs realizaram estudos de biologia reprodutiva nesta espécie que produziu frutos por polinizações cruzadas, o que sugere que esta espécie não seja apomítica, mas vale ressaltar que foram amostradas populações das aqui analisadas por Costa & Forni-Martins (2006a).

Vários gêneros neotropicais ainda não são conhecidos do ponto de vista cromossômico, como *Accara*, *Algrizea*, *Blepharocalyx*, *Calycolpus*, *Calycorectes*, *Calyptranthes*, *Curitiba*, *Hexachlamys*, *Mosiera*, *Neomitranthes*, *Siphoneugena* e *Ugni*. Nos gêneros proximamente relacionados à *Psidium*, existem relatos de números cromossômicos apenas em *Acca* (*Feijoa*) *sellowiana*, *Pimenta dioica* e *P. racemosa* (Janaki Ammal 1945 in Bolkhovskikh et al. 1969), além de espécies de *Psidium* e *Campomanesia* (Costa 2004, Costa & Forni-Martins 2006b).

De acordo com Atchinson (1947) e Raven (1975), o número básico para a família é $x = 11$, ocorrendo pequena variação no número cromossômico, sendo registrado na maioria dos gêneros, circunscritos em diferentes subfamílias e tribos (Rye 1979). Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, b, 2007) corroboraram a uniformidade de números cromossômicos apontada anteriormente. Algumas espécies de *Eugenia* divergem do número básico $x = 11$, apresentando $2n = 24$ (Moussel 1965 in Moore 1977) e $2n = 32$ (Forni-Martins & Martins 2000).

Espécies displóides ocorrem com maior frequência nas Myrtoideae de frutos secos (tribos Chamelaucieae, Leptospermeae e Melaleuceae) (Rye 1979), enquanto a poliploidia é muito comum em táxons de frutos carnosos (tribo Myrteae). Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, b) ressaltaram a

importância da poliploidia como um importante processo evolutivo em Myrteae, registrando origem por poliploidia ($2n = 33$ e 44) em 21% das espécies de *Eugenia* e 75% das espécies de *Psidium* por eles analisadas. Também verificaram a ocorrência freqüente de citótipos diferenciados pelo nível de ploidia em diversas espécies, variando de 22, 33 e 44 cromossomos, porém não realizaram estudos mais aprofundados para determinar a natureza destes poliplóides.

Provavelmente, a dificuldade de identificação das mirtáceas brasileiras possa ser atribuída à especiação decorrente de hibridação e poliploidia (Costa 2004), com aparecimento de tipos recombinantes com características intermediárias entre os taxa originais, sendo o fluxo gênico interrompido por diferenciação cromossômica, especialmente pela duplicação do número cromossômico.

Informações sobre a morfologia dos cromossomos de espécies de Myrteae praticamente inexitem, pois os mesmos são pequenos, raramente atingindo $2,5\mu\text{m}$ (Costa 2004). Cariótipos de algumas espécies foram descritos como assimétricos, pela presença de cromossomos com o centrômero próximo à região terminal (Viajayakumar & Subramanian 1985), enquanto em outras, como *Psidium acutangulum*, foram descritos como simétricos pelo predomínio de cromossomos metacêntricos (Forni-Martins & Martins 2000). Devido à uniformidade do número básico $x = 11$ e ao pequeno tamanho dos cromossomos (Andrade & Forni-Martins 1998, Forni-Martins & Martins 2000), a aplicação de técnicas convencionais não tem sido suficiente para caracterizar as espécies de Myrtaceae neotropicais e elucidar as relações cromossômicas entre elas.

Tamanho do genoma

Para Myrtaceae, as estimativas do tamanho do genoma ou conteúdo de

DNA por núcleo haplóide (valor-2C) são encontradas de maneira escassa e dispersa na literatura. Poucas espécies que possuem frutos capsulares (gêneros *Callistemon*, *Eucalyptus* e *Melaleuca*) tiveram seu tamanho de genoma estimado (Ohri & Kumar 1986, Bennett & Leitch 1995, 1997; Azmi *et al.* 1997, Rani & Raina 1998, Bennett & Leitch 2004, 2005). A primeira espécie da tribo Myrteae investigada foi *Psidium guajava* L., onde os autores encontraram diferentes valores-2C, estimados por densitometria de núcleos corados com Feulgen: 0.7 pg (Bennett & Smith 1991) e 1.3 pg (Bennett & Leitch, 1997), ambas as amostras com $2n = 22$. Dornelas (*com.pess.*) estimou o tamanho do genoma para cerca de 20 espécies de Myrteae e verificaram que o tamanho do genoma das espécies ao longo de Myrteae era muito menor em relação ao das espécies de frutos capsulares e secos.

Filogenia

Diversos estudos cladísticos incluindo dados morfológicos, anatômicos e macromoleculares têm sido desenvolvidos nos últimos anos, enfocando principalmente as relações de Myrtaceae com as demais famílias pertencentes às Myrtales (Briggs & Johnson 1979, Conti *et al.* 1996, 1997, Johnson & Briggs 1984). Na análise filogenética de Johnson & Briggs (1984), com base em dados morfológicos e anatômicos, as tradicionais Leptospermoideae mostraram-se parafiléticas e as Myrtoideae, monofiléticas. Com a aplicação de dados moleculares (gene *matK*), as Leptospermoidae apresentaram-se como basais e parafiléticas, enquanto que as Myrtoideae mostraram-se como um grupo monofilético (Wilson *et al.* 2001).

Mais recentemente, os estudos filogenéticos se voltaram às relações intrafamiliares em Myrtaceae (Gadek *et al.* 1996, Lucas *et al.* 2005, Wilson *et al.* 2001, 2005). Em uma análise baseada em dados morfológicos e em seqüências dos

genes plastidiais *matK* e *psbA-trnH* e nucleares como a região do ITS (*ITS-1*, 5.8S rRNA e *ITS-2*) (Gadek *et al.* 1996, Lucas *et al.* 2005, Wilson *et al.* 2001, 2005), a monofilia da tribo Myrteae foi fortemente apoiada. Segundo os estudos de Wilson *et al.* (2001), o estado de caráter de fruto deiscente das Leptospermoideae é plesiomórfico, ao passo que os frutos indeiscentes surgiram independentemente em quatro ocasiões em Myrtaceae (Wilson *et al.* 2001). Os resultados obtidos por Wilson *et al.* (2005) não apóiam a divisão de Myrteae nas três subtribos (*sensu* Berg) com base na morfologia do embrião. Porém, os autores reconhecem a limitação da amostragem dos gêneros sul-americanos e admitem que conclusões seriam prematuras. Lucas *et al.* (2005, 2007) estudaram uma amostragem mais representativa de grupos sul-americanos. Neste estudo, as relações entre as três subtribos de Myrteae (*sensu* Berg) foram melhor analisadas, sendo que Myrtinae e Eugeniinae, de distribuição pantropical, mostraram-se polifiléticas enquanto Myrciinae, que é exclusivamente neotropical, mostrou-se monofilética (excluindo-se *Myrceugenia*).

O estudo de Lucas *et al.* (2005) ainda detalhou mais especificamente as relações entre os gêneros de Myrciinae, onde *Calypttranthes* e *Gomidesia* se mostraram monofiléticos e gêneros anteriormente circunscritos neste grupo apresentaram-se como anômalos, sendo posicionados em um clado distinto. Mazine (2006) realizou um estudo filogenético enfocando principalmente as relações intergenéricas em Eugeniinae e as relações infragenéricas em *Eugenia*. Um único estudo com Myrtinae foi realizado por Salywon (2003), principalmente enfocando *Mosiera*, onde foi confirmada a monofilia do gênero, e indicou que *Psidium* seria parafilético e grupo irmão de *Mosiera*.

Análises filogenéticas posteriores, envolvendo um maior número de espécies de Myrtaceae e diferentes regiões gênicas, como ITS, ETS (nucleares) e *psbA-trnH* (plastidial), reforçaram as hipóteses de Wilson *et al.* (2005) e de Lucas

et al. (2005) sobre as conceituações infratribais. Para Lucas *et al.* (2007), a tradicional divisão de Myrteae nas três subtribos propostas por Berg também não é sustentada, tendo encontrado seis agrupamentos que os autores denominam informalmente como ‘grupo pois são encontrados seis grupos informais: ‘grupo *Plinia*’, ‘grupo *Eugenia*’, ‘grupo *Myrcia*’, ‘grupo *Myrceugenia*’, ‘grupo *Myrteola*’ e ‘grupo *Pimenta*’, embora com baixos valores de bootstrap (*b.s.*) para a sustentação dos ramos. Alguns gêneros como *Blepharocalyx*, *Luma* e *Myrceugenia* ainda não têm posição filogenética definida (Lucas *et al.* 2005).

As análises filogenéticas mais recentes vêm sendo realizadas com mais ênfase por Lucas *et al.* (2007) no *Myrcia group*, que envolve os gêneros *Myrcia*, *Marlierea*, *Gomidesia* e *Calyptanthus* (tradicionais Myrciinae). Apenas os dois últimos são monofiléticos (*b.s.* 100%). Estudos no *Eugenia group* foram realizados por Mazine (2006), enfatizando a relação e a integridade das seções em *Eugenia* e as suas relações com o *Plinia group* (*Plinia*, *Myrciaria*, *Neomitranthes* e *Siphoneugena*, tradicionais Eugeniinae).

A Subtribo Myrtinae e o *Pimenta* group

As espécies desta subtribo podem ser caracterizadas por possuírem flores solitárias, ou em dicásios simples ou compostos, geralmente pentâmeras. O cálice pode ser aberto ou fechado, rompendo-se em caliptra ou por ruptura irregular do hipanto. Possuem ovário com número de lóculos variando de 2 a 18, multiovulados. A semente possui testa variando de uma textura coriácea a óssea, com embrião composto por dois cotilédones rudimentares no ápice da radícula, curvado em forma de C.

Berg (1855-56, 1857-59) admitiu a existência de dois grupos em Myrtinae (citada como Pimentoideae), fazendo menção à quantidade de óvulos por lóculo e

à textura das sementes (Tabela 1). O primeiro grupo era formado pelos gêneros *Psidium*, *Calycolpus*, *Blepharocalyx* e *Myrtus*, onde as flores apresentam lóculos 2-4 ovulados e sementes com testa coriácea. O segundo grupo reunia os gêneros *Campomanesia* e *Pimenta* (além de outros atualmente sinonimizados com estes dois), com 4-6 óvulos por lóculo e sementes com testa membranosa.

McVaugh (1968) dividiu os gêneros americanos de Myrtaceae em seis grupos informais, sendo os gêneros pertencentes à Myrtinae divididos em três grupos (correspondendo aos grupos de números 4, 5 e 6, Tabela 1), com base nas características das flores, frutos e sementes. Assim, o grupo 4 (*Campomanesia* e afins) reunia os gêneros *Campomanesia*, *Paivea* (hoje sinônimo de *Campomanesia*), *Blepharocalyx* e *Temu* (hoje sinônimo de *Blepharocalyx*), caracterizados por possuírem vários lóculos (4 a 18) multiovulados, sementes com testa membranácea ou coriácea e embrião curvado. O grupo 5 (*Psidium* e afins) agrupava sete gêneros: *Amomyrtus*, *Amomyrtella*, *Calycolpus*, *Myrteola*, *Myrtus*, *Psidium* e *Ugni*, caracterizados pela presença de 5-7 lóculos multiovulados e sementes com testa óssea e embrião levemente curvado, enquanto o último grupo (grupo 6) reunia dois gêneros com ovário bilocular e flores tetrâmeras agrupadas em panículas, *Pseudocaryophyllus* e *Pimenta* (Figural).

Briggs & Johnson (1979) agruparam os gêneros em duas alianças, com base nas características do embrião e tipo de germinação das sementes (Tabela 1). A “aliança *Myrtus*” é caracterizada por embriões retos ou espiralada, com pequenos cotilédones e um longo hipocótilo, pela germinação fanerocotiledonar. A “aliança *Cryptorhiza*” apresenta embriões retos ou curvados, e os cotilédones fundidos cobrindo o hipocótilo e a radícula, e germinação criptocotiledonar.

De acordo com Landrum (1986), os gêneros da subtribo Myrtinae podem ser divididos em três grupos distintos: Complexo *Campomanesia* (*Campomanesia*, *Blepharocalyx*, *Pimenta* e *Legrandia*), Complexo *Myrrhinium* (*Myrrhinium* e

Acca) e os demais gêneros (*Psidium*, *Calycolpus*, *Mosiera* e *Ugni*) formavam um complexo à parte (Tabela 1). O complexo *Campomanesia* foi caracterizado pela testa da semente membranosa ou cartilaginosa, com minúsculos cotilédones, enquanto o complexo *Myrrhinium* diferenciava-se por suas flores vermelhas ou púrpuras, com estames exertos de cor vermelha e cotilédones do mesmo comprimento do hipocótilo. Os demais gêneros eram caracterizados por apresentarem sementes com testa óssea e cotilédones um pouco mais curtos que o comprimento do hipocótilo. Uma sinopse deste histórico da classificação da subtribo é apresentada na Tabela 1.

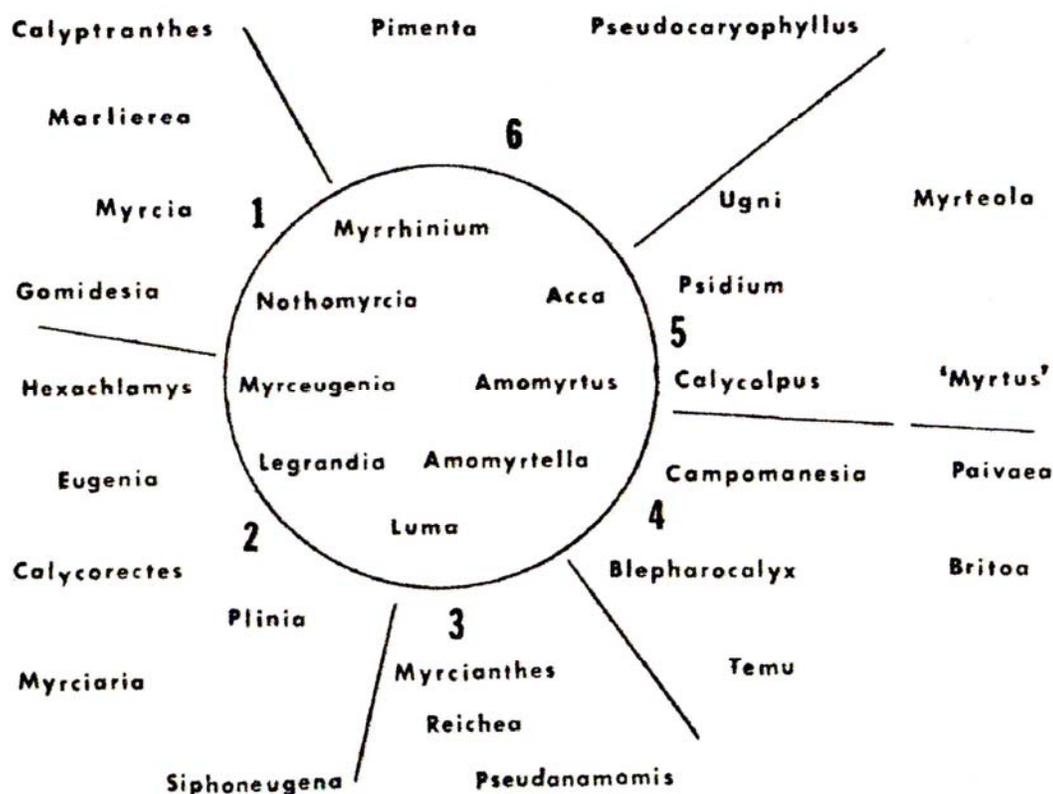


Figura 1. Representação esquemática dos grupos informais propostos por McVaugh (1968) para os gêneros de Myrteae.

O “*Pimenta group*” (*sensu* Lucas *et al.* 2007) abrange alguns dos gêneros anteriormente circunscritos da subtribo Myrtinae *sensu* Berg. É um grupo monofilético, reunindo gêneros brasileiros como *Acca*, *Campomanesia*, *Pimenta* e *Psidium*, com uma sustentação acima de 95% de probabilidade Bayesiana (Lucas *et al.* 2007). Neste grupo, relações intergenéricas permanecem incertas, pois o apoio estatístico para elas é baixo. Para Lucas *et al.* (2007), *Campomanesia* é considerado o grupo irmão de *Psidium* que se apresenta monofilético. Para Salywon (2003), *Psidium* é considerado parafilético e grupo irmão do gênero essencialmente caribenho *Mosiera*. Este grupo ainda carece de uma investigação filogenética robusta. Alguns gêneros pertencentes às tradicionais Myrtinae *sensu* Berg não foram incluídos ou a amostragem é reduzida nos trabalhos de Salywon (2003) e Lucas *et al.* (2005, 2007). A Figura 2 ilustra alguns dos gêneros pertencentes a este grupo.

Na sinopse apresentada por Landrum & Kawasaki (1997), constam dez gêneros na subtribo Myrtinae no Brasil (Tabela 2). Alguns destes gêneros como *Accara*, *Curitiba* e *Myrrhinium* são monotípicos, enquanto *Acca*, *Blepharocalyx*, *Pimenta* e *Ugni* apresentam de três a 14 espécies, com ocorrência de apenas uma espécie no Brasil (à exceção de *Blepharocalyx*, com duas). *Calycolpus* com 10 espécies apresenta distribuição no Norte/Nordeste da América do Sul, das quais cinco ocorrem no Brasil. Os dois maiores gêneros, *Campomanesia* (cerca de 30 espécies) e *Psidium* (de 90 a 100), têm a maior parte das espécies ocorrendo no Brasil. Alguns destes gêneros apresentam distribuição geográfica restrita a algumas regiões do Brasil, como *Acca* e *Curitiba* no sul e *Ugni* no norte; *Accara* é encontrado apenas no estado de Minas Gerais, enquanto *Pimenta* e *Blepharocalyx* são encontrados no Centro-oeste, Sul e Sudeste do país (Tabela 2).

Tabela 1. Circunscrição geral dos gêneros de Myrtinae segundo os principais autores. Alguns gêneros apresentam as atuais sinonímias entre parênteses.

Autores	Gêneros
Berg (1857)	<p>“Subtribo Pimentoideae” <i>Blepharocalyx</i>, <i>Calycolpus</i>, <i>Campomanesia</i>, <i>Myrtus</i> e <i>Psidium</i>, <i>Abbevillea</i>, <i>Acrandra</i>, <i>Britoa</i> e <i>Lacerdaea</i> (= <i>Campomanesia</i>) e <i>Pseudocaryophyllus</i> (= <i>Pimenta</i>)</p>
McVaugh (1968)	<p>“<i>Campomanesia and related</i>” <i>Campomanesia</i>, <i>Blepharocalyx</i>, <i>Temu</i> (= <i>Blepharocalyx</i>) e <i>Paivea</i> (= <i>Campomanesia</i>) “<i>Psidium and related</i>” <i>Calycolpus</i>, <i>Myrtus</i>, <i>Myrteola</i>, <i>Psidium</i>, <i>Ugni</i>, <i>Amomyrtus</i> e <i>Amomyrtella</i> “<i>Pseudocariophyllus e Pimenta</i>”</p>
Briggs & Johnson (1979)	<p>“<i>Myrtus alliance</i>” <i>Acca</i>, <i>Amomyrtella</i>, <i>Amomyrtus</i>, <i>Calycolpus</i>, <i>Feijoa</i> (= <i>Acca</i>), <i>Mosiera</i>, <i>Myrrhinium</i>, <i>Myrteola</i>, <i>Myrtus</i>, <i>Pimenta</i>, <i>Pseudocaryophyllus</i> (= <i>Pimenta</i>), <i>Psidiopsis</i> (= <i>Calycolpus</i>), <i>Psidium</i> e <i>Ugni</i> “<i>Cryptorhiza alliance</i>” <i>Blepharocalyx</i>, <i>Campomanesia</i>, <i>Cryptorhiza</i> (= <i>Pimenta</i>), <i>Legrandia</i>, <i>Marlieriopsis</i> (<i>Blepharocalyx</i>), <i>Paivea</i> (= <i>Campomanesia</i>) e <i>Pilidiostigma</i></p>
Landrum (1986), emmend	<p>“<i>Complexo Campomanesia</i>” <i>Blepharocalyx</i>, <i>Campomanesia</i>, <i>Legrandia</i> e <i>Pimenta</i> “<i>Complexo Myrrhinium</i>”</p>
Landrum & Salywon (2007)	<p><i>Acca</i> e <i>Myrrhinium</i> “<i>Complexo Psidium</i>” <i>Calycolpus</i>, <i>Mosiera</i>, <i>Psidium</i> e <i>Ugni</i> <i>Curitiba</i></p>

Tabela 2. Gêneros pertencentes à subtribo Myrtinae, com sua distribuição na região neotropical e número de espécies no Brasil, de acordo com Landrum & Kawasaki (1997) e Govaerts *et al.* (2008).

Gênero	(Total de espécies / Brasil) Distribuição geográfica
<i>Acca</i> O. Berg	(3 / 1) Duas espécies nos Andes (Peru). <i>A. sellowiana</i> O. Berg no S do Brasil
<i>Accara</i> Landrum	(1 / 1) <i>A. elegans</i> (DC.) Landrum, SE do Brasil (MG)
<i>Blepharocalyx</i> O. Berg	(3 / 2) Do Caribe ao Sul do Chile. <i>B. eggersii</i> no Amazonas e <i>B. salicifolius</i> no S e SE do Brasil
<i>Calycolpus</i> O. Berg	(10 / 5) Maioria no norte / nordeste da América do Sul
<i>Campomanesia</i> Ruiz & Pávon	(30 / 24) Em toda a América tropical e subtropical
<i>Curitiba</i> Salywon & Landrum	(1 / 1) <i>C. prismatica</i> (D. Legrand) Salywon & Landrum, S do Brasil
<i>Myrrhinium</i> Schott.	(1 / 1) <i>M. atropurpureum</i> Schott, S e SE do Brasil (PR e RJ)
<i>Pimenta</i> Lindl.	(14 / 1) Caribe. Somente <i>P. pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum, S e SE do Brasil. Esta espécie apresenta três variedades.
<i>Psidium</i> L.	(92 / 70) Desde o México e Caribe até o Norte da Argentina. A maioria das espécies ocorre no Brasil.
<i>Ugni</i> Turcz.	(4 / 1) Chile ao México. <i>U. myricoides</i> (Kunth) O. Berg, N do Brasil (RR)

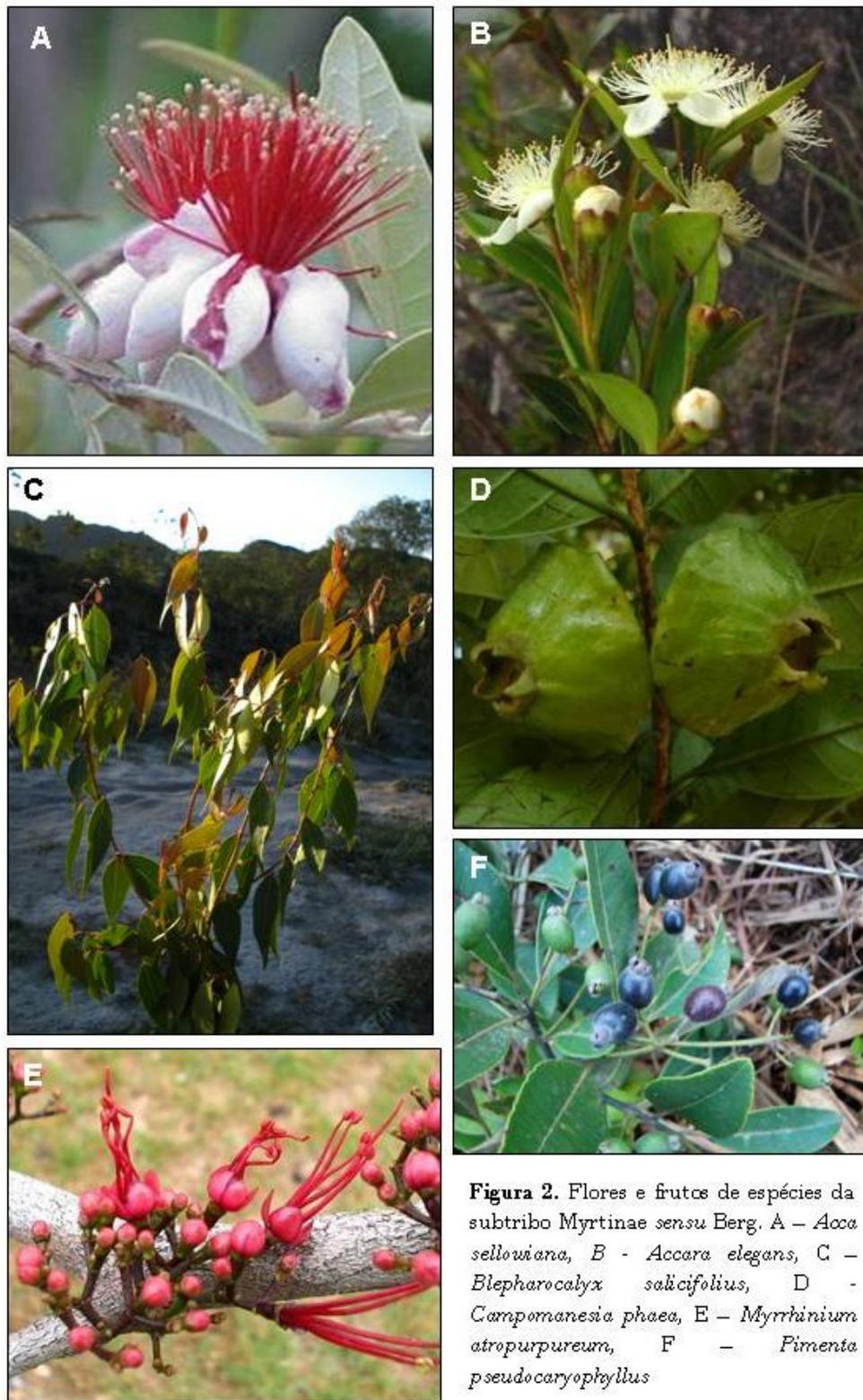


Figura 2. Flores e frutos de espécies da subtribo Myrtinae sensu Berg. A – *Acca sellowiana*, B - *Accara elegans*, C – *Blepharocalyx salicifolius*, D - *Campomanesia phaea*, E – *Myrrhinium atropurpureum*, F – *Fimenta pseudocaryophyllus*

O GÊNERO *PSIDIUM* L.

O gênero *Psidium* L. pode ser caracterizado pelo hábito que varia de subarbustivo a arbóreo, apresentando flores solitárias ou agrupadas em dicásio axilares (geralmente com 1-3 flores). O cálice é fechado, rompendo-se em quatro ou cinco lobos irregulares durante a antese e o hipanto elevado ou não sobre o ovário, à exceção de algumas espécies com dois ou três lóbulos ou caliptra (*P. amplexicaule*, *P. oligospermum*). Suas espécies apresentam numerosos estames com deiscência rimosa (longitudinal), portando cavidades secretoras no conectivo e lóculos multiovulados inseridos em uma placenta lamelar, originada a partir do dobramento dos bordos carpelares. Seus frutos são bacóides, com as sépalas persistentes ou raramente decíduas com o amadurecimento do fruto. Suas sementes possuem testa óssea e embrião mirtóide, com dois cotilédones muito pequenos e uma longa radícula encurvada (Landrum & Sharp 1989, Landrum 2003). A Figura 3 ilustra alguns dos caracteres diagnósticos do gênero.

Com aproximadamente 92 espécies (Govaerts *et al.* 2008), o gênero *Psidium* encontra-se distribuído desde o México e Caribe até o Uruguai e norte da Argentina, estendendo-se até as Ilhas Galápagos, sendo que em território brasileiro suas espécies ocorrem desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (Landrum 2003).

Berg (1855-56, 1857-59) dividiu o gênero *Psidium* em seis seções: *Albotomentosa*, *Apertiflora*, *Costata*, *Crenatifolia*, *Obversifolia* e *Rigidifolia*. Estas foram delimitadas a partir de vários caracteres morfológicos, como textura das folhas, forma do cálice e quantidade de lóculos presentes no ovário (Tabela 3).

A grande maioria das espécies descritas por Berg (1855-56, 1857-59) ocorre nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. McVaugh (1968) comentou a grande necessidade de estudos taxonômicos mais aprofundados com estas espécies, pois as mesmas são muito próximas e de difícil delimitação.

Landrum (2003, 2005) vem realizando trabalhos de revisão no gênero, caracterizando complexos de espécies (Tabela 4). O complexo *Psidium salutare* (Landrum 2003) corresponde a um grupo de espécies com distribuição desde o México até o Uruguai e abrange duas espécies: *P. laruotteanum* e *P. salutare*, sendo que esta última agrupa cinco variedades (var. *salutare* = *P. salutare*, var. *pohlianum* = *P. pohlianum*, var. *decussatum* = *P. decussatum*, var. *mucronatum* = *P. luridum* e var. *sericeum* = *P. incanum*), anteriormente reconhecidas como por Berg (1855-56, 1857-59) como espécies válidas. Neste mesmo artigo, o autor cita o complexo *P. oligospermum*, que inclui *P. oligospermum* e *P. sartorianum*.

Tabela 3. Espécies de *Psidium*, seguindo a classificação infragenérica de Berg (1855-56, 1857-59). Os nomes em negrito correspondem aos binômios recentemente atualizados de acordo com Govaerts *et al.* (2008). As espécies seguidas por (*) encontram-se com os binômios provisoriamente aceitos. As espécies seguidas por (**) não foram consideradas nas recentes sinonimizagens.

Seção / Espécies

Albo-tomentosa

P. albidum Camb. (***P. grandifolium*** Mart. ex DC.)

P. cinereum Mart. (***P. grandifolium*** Mart. ex DC.)

P. cuneatum Camb. (***P. australe*** var. ***argenteum*** (O. Berg) Landrum)

P. grandifolium Mart. ex DC.

P. incanescens Mart. (***P. grandifolium*** Mart. ex DC.)

P. lacteum O. Berg (***P. grandifolium*** Mart. ex DC.)

P. laruotteanum Cambess.

P. microcarpum Camb. (***P. grandifolium*** Mart. ex DC.)

P. multiflorum Camb. (***P. guineense*** Sw.)

P. radicans O. Berg (***P. grandifolium*** Mart. ex DC.)

Apertiflora

P. aerugineum O. Berg (***P. laruotteanum*** Cambess.)

P. anceps O. Berg (***P. australe*** var. ***australe*** (O. Berg) Landrum)

P. argenteum O. Berg (***P. australe*** var. ***argenteum*** (O. Berg) Landrum)

P. cupreum O. Berg (***P. rufum*** Mart. ex DC.)

P. decussatum DC. (***P. salutare*** var. ***decussatum*** (DC.) Landrum)

P. densicomum Mart. ex DC.

P. elegans Mart. (***Accara elegans*** (DC.) Landrum)

P. firmum* O. BergP. gardnerianum* O. Berg (*P. myrsinites* DC.)*P. hians* Mart. (*Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg)*P. macrospermum* O. Berg (*P. rufum* Mart. ex DC.)*P. maranhense* O. Berg (*P. riparium* Mart. Ex. DC.)*P. mengahiense* Camb. (*P. riparium* Mart. Ex. DC.)***P. myrsinites* DC.***P. myrsinoides* O. Berg (*P. myrsinites* DC.)***P. myrtoides* O. Berg*****P. nutans* O. Berg****P. ovatifolium* O. Berg (*P. densicomum* Mart. ex DC.)*P. paraense* O. Berg (*P. riparium* Mart. Ex. DC.)*P. pohlianum* O. Berg (*P. salutare* var. *pohlianum* (O. Berg) Landrum)***P. refractum* O. Berg******P. rhombeum* O. Berg*****P. riparium* Mart. ex. DC.***P. rubescens* O. Berg (*P. grandifolium* Mart. ex DC.)***P. rufum* Mart. ex DC.***P. sericeum* O. Berg (*P. grandifolium* Mart. ex DC.)*P. sieberianum* O. Berg (*P. riparium* Mart. Ex. DC.)*P. suffruticosum* O. Berg (*P. salutare* var. *suffruticosum* (O. Berg) Landrum)*P. turbiniflorum* Mart. (*P. striatulum* DC.)*P. widgrenianum* O. Berg (*P. rufum* Mart. ex DC.)*P. ypanemense* O. Berg (*P. guineense* Sw.)**Costata***P. araça* Raddi (*P. guineense* Sw.)*P. guayava* Raddi*****P. inaequilaterum* O. Berg***P. ooideum* O. Berg (*P. guineense* Sw.)*P. polycarpon* Camb. (*P. guineense* Sw.)***P. sorocabense* O. Berg****P. sprucei* O. Berg (*P. guyanense* Pers.)**Crenatifolia*****P. acutangulum* Mart. ex DC.***P. leptocladum* O. Berg. (*P. striatulum* DC.)***P. maribense* Mart. ex DC.***P. persicifolium* Berg (*P. striatulum* DC.)***P. striatulum* DC.****Obersifolia*****P. australe* Cambess.***P. coriaceum* Mart. (*P. cattleianum* Afzel ex Sabine)***P. itanareense* O. Berg****P. obovatum* Mart. (*P. cattleianum* Afzel ex Sabine)***P. robustum* O. Berg**

P. sellowianum O. Berg (*P. arboreum* Vell.)
P. variabile O. Berg (*P. cattleianum* Afzel ex Sabine)

Rigidifolia

P. oligospermum Mart. ex DC.

Tabela 4. Distribuição de algumas espécies de *Psidium* L. em complexos (Landrum, 2003, 2005 e comunicação pessoal *).

<i>Psidium acutangulum</i> *	<i>P. acutangulum</i> <i>P. montanum</i>	<i>P. friedrichsthalianum</i> 2 novas espécies
<i>Psidium cattleianum</i> *	<i>P. cattleianum</i> <i>P. myrtoides</i>	<i>P. longipetiolatum</i> <i>P. spathulatum</i>
<i>Psidium grandifolium</i> (Landrum 2005)	<i>P. missionum</i> <i>P. grandifolium</i> = <i>P. cinereum</i> , <i>P. incanescens</i> <i>P. australe</i> var. <i>argenteum</i> = <i>P. cuneatum</i> var. <i>suffruticosum</i> = <i>P. suffruticosum</i> e <i>P. alatum</i> var. <i>australe</i> = <i>P. mucronatum</i>	
<i>Psidium guajava</i> *	<i>P. guajava</i> <i>P. guineense</i>	
<i>Psidium oligospermum</i> *	<i>P. oligospermum</i> <i>P. sartorianum</i>	
<i>Psidium rufum</i> *	<i>P. rufum</i> Várias outras ainda não revisadas	
<i>Psidium salutare</i> (Landrum 2003)	<i>P. salutare</i> var. <i>sericeum</i> = <i>P. incanum</i> var. <i>mucronatum</i> = <i>P. luridum</i> var. <i>decussatum</i> = <i>P. decussatum</i> var. <i>pohlianum</i> = <i>P. pohlianum</i> var. <i>salutare</i> = <i>P. salutare</i> <i>P. larruotteanum</i>	



O complexo *Psidium grandifolium* (Landrum 2005) é composto por três espécies: *P. australe*, *P. grandifolium* e *P. missionum*. Neste complexo, quatro espécies foram caracterizadas como variedades de *P. australe* (*P. alatum*, *P. cuneatum*, *P. mucronatum* e *P. suffruticosum*) e outras duas reduzidas a variedades de *P. grandifolium* (*P. cinereum* e *P. incanescens*).

Em comunicação pessoal, o autor relatou a ocorrência do complexo *P. acutangulum*, cuja publicação encontra-se em fase final de preparação. Este complexo abrange cinco espécies: *P. acutangulum*, *P. friedrichsthalianum*, *P. montanum* e duas novas espécies, todas com distribuição na região amazônica. O quinto complexo “*P. cattleianum*”, abrange *P. cattleianum*, *P. myrtoides*, *P. longipetiolatum*, *P. longipetalum* e *P. spathulatum*. As espécies *P. guajava* e *P. guineense* formam um complexo à parte, com muitas formas híbridas entre elas. Outro complexo é formado *P. rufum*, onde serão futuramente enquadradas várias espécies ainda não revisadas (dados não publicados).

Em resumo, o gênero *Psidium* é amplamente distribuído em toda a região neotropical, constituído por espécies que ocorrem nos mais diferentes biomas (caatinga, cerrado *s.l.*, campos rupestres, florestas amazônica, atlântica, decíduais, restingas, entre outros) e sujeitas às mais diferentes pressões ambientais, que ocasionam uma grande plasticidade fenotípica, dificultando a identificação e delimitação de suas espécies. Especialistas (Dra. Carolyn Proença – Universidade de Brasília e Dr. Leslie Landrum – Universidade do Arizona) ressaltam a importância e a necessidade de estudos mais aprofundados no gênero, visando uma melhor delimitação e caracterização de suas espécies. É neste contexto que se insere a presente tese, na qual empregamos a citotaxonomia para análises sistemáticas de espécies neotropicais (brasileiras) da tribo Myrteae, com ênfase no gênero *Psidium* e afins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade FG & Forni-Martins ER. 1998. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae. *Genetics and Molecular Biology* 21(3 – suppl.): 166.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399–436
- Atchinson E. 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany* 34: 159-164.
- Azmi A, Noin M, Landré P, Prouteau M, Boudet AM & Chriqui D. 1997. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. Hypocotyls: Ontogenesis and policy level of the regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 9-16.
- Barroso GM. 1991. Myrtaceae. *In: Sistemática de angiospermas do Brasil*, vol. 2. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, Viçosa.
- Bennett MD & Leitch IJ. 1995. Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Ann Bot* 76: 113-176.
- Bennett MD & Leitch IJ. 1997. Nuclear DNA amounts in Angiosperms – 583 new estimates. *Ann Bot* 80: 169-196.
- Bennett MD & Leitch IJ. 2004. Angiosperm DNA C-values database (release 5.0, Dec. 2004) <http://www.rbgtkew.org.uk/cvalues/homepage.html> (12 Nov. 2007).
- Bennett MD & Leitch IJ. 2005. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Ann Bot* 95: 45-90.
- Bennett MD & Smith JB. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 334: 309-345.
- Berg O. 1855-56. *Revisio Myrtacearum Americae*. *Linnaea* 27: 1-472
- Berg. O. 1857-59. *Myrtaceae*. *In: von Martius C. F. P. (ed.). Flora Brasiliensis* 14: 1 - 655.
- Bolkhovskikh Z, Matvejeva VG & Zakharyeva O. 1969. Chromosome numbers of Flowering Plants. Academy of Sciences to the USSR.
- Briggs BG. & Johnson LAS. 1979. Evolution in the *Myrtaceae*: evidence from inflorescence structure. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* 102: 155 - 256.
- Castro AAJE, Martins FR, Tamashiro JY & Shepherd GJ. 1999. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86:192-225.

- Conti E, Litt A & Systma K. 1996. Circumscription of Myrtales and their relationships to other Rosids: evidences from *rbcL* sequence data. *American Journal of Botany* 83: 221-233.
- Conti E, Litt A, Wilson P, Graham SA, Briggs BG, Johnson L & Systma K. 1997. Interfamilial relationships in Myrtales: Molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany* 22: 629-647.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006a. Chromosome studies in *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54: 409-415.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006b. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia* 59: 7-13.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2007a. Chromosome studies in species of *Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* and *Myrcia* (Myrtaceae, subtribe Myrciinae). *Kew Bulletin* 62: 113-118.
- Costa IR. 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.
- Forni-Martins ER & Martins FR. 2000. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetics and Molecular Biology* 23: 947-955.
- Forni-Martins ER, Pinto-Maglio CAP & Cruz ND. 1995. Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. *Revista Brasileira de Genética* 18: 281-288.
- Gadek, PA, Wilson, PG & Quinn, C. 1996. Phylogenetic reconstruction in Myrtaceae using *matK*, with particular reference to the position of *Psiloxylon* and *Heteropyxis*. *Australian Systematic Botany* 29: 159-184.
- Govaerts R, Sobral M, Ashton P, Barrie F, Holst B, Landrum L, Lucas, E, Matsumoto K, Mazine F, Proença C, Soares-Silva L, Wilson P & NicLughdha E. 2008. World Checklist of selected plant families – Myrtaceae.
- Johnson LAS & Briggs BG. 1984. Myrtales and Myrtaceae – a phylogenetic analysis. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: 700-756.
- Kawasaki ML. 1989. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 11: 121-170.
- Landrum LR & Kawasaki ML. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.
- Landrum LR & Sharp WP. 1989. Seed coat characters of some American Myrtinae (Myrtaceae): *Psidium* and Related Genera. *Systematic Botany* 14:

370-376.

- Landrum LR. 1986. Flora Neotropica. Monograph 45. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhynium* and *Luma* (Myrtaceae). The New York Botanical Garden Publishers
- Landrum LR. 2003. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae). Sida 20: 1149-1469.
- Landrum LR. 2005. A revision of the *Psidium grandifolium* complex (Myrtaceae). Sida 21: 1335-1354.
- Lucas E, Belsham S, Nic Lughada E, Orlovich D, Sakuragui C, Chase M & Wilson P. 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251: 35-51.
- Lucas E, Harris AS, Mazine FF, Belsham SR, Nic Lughada EM, Telford A, Gasson PE & Chase M. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128.
- Mazine FF. 2006. Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Eugenia* L. (Myrtaceae), com ênfase em *Eugenia* sect. *Racemosae* O. Berg. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Matsumoto ST, Marin-Morales MA, Ruas CF & Ruas PM. 2000. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Caryologia* 53: 205-212.
- McVaugh R. 1956. Tropical American Myrtaceae. Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. *Fieldiana: Botany* 29(3).
- McVaugh R. 1968. The genera of American Myrtaceae – An interim report. *Taxon* 17: 354-418.
- Mittermier RA, Myers N, Mittermier CG. 2000. Hotspots: Earths` s biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: CEMEX.
- Moore RJ. 1977. Index to Plant Chromosome Numbers 1967-1971. International Association for Plant Taxonomy.
- Myers N, Mittermeier RA, Mitermeier CG, Fonseca GAB & Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Ohri D & Kumar A (1986) Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods. *Caryologia* 39: 303-307.
- Oliveira-Filho A & Fontes MA. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Pedrosa A, Gitaí J, Barros e Silva AE, Felix LP & Guerra M. (1999). Citogenética

- de Angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Botanica Brasilica* 13: 49-60.
- Raven P. 1975. The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62: 724 - 764.
- Rye B. 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. *Australian Journal of Botany* 27: 547-573.
- Salywon, AM. 2003. A monograph of *Mosiera* (Myrtaceae). Tese de Doutorado. Arizona State University.
- SOS Mata Atlântica (1998) *Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990–1995*. Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo, Brazil.
- Stace CA. 1991. *Plant taxonomy and Biosystematics*. 2nd edition, University Press: Cambridge.
- Vijayakumar N & Subramanian D. 1985. Cytotaxonomical studies in South Indian Myrtaceae. *Cytologia* 50: 513-520.
- Wilson P, O'Brien MM, Gadek PA & Quinn CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of interfamilial groups. *American Journal of Botany* 88: 2013-2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM & Quinn CJ. 2005. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: 3-19.

OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

1. Contribuir para o conhecimento citotaxonômico / citogenético de Myrtaceae, realizando:
 - a) Análise citotaxonômica (com base em distintos caracteres cromossômicos) em espécies do gênero *Psidium*, confrontando os dados obtidos com as diferentes circunscrições para o gênero propostas por diversos autores, a fim de elucidar a delimitação entre as mesmas.
 - b) Análise citotaxonômica em outros pequenos gêneros próximos a *Psidium* no sistema de Berg (1855-56, 57-59), ainda desconhecidos do ponto de vista cariológico, como *Accara*, *Blepharocalyx*, *Mosiera* e *Ugni*. Também se pretende ampliar o conhecimento cromossômico em *Acca*, *Campomanesia*, *Myrrhinium* e *Pimenta*
 - c) Análise do tamanho do genoma em algumas espécies de Myrtaceae, com maior esforço de amostragem em *Psidium*, visando fornecer caracteres adicionais para a análise citotaxonômica.
2. Aprimorar a filogenia da tribo Myrteae, contribuindo para a delimitação e verificação do monofiletismo de *Psidium* e a sua relação filogenética com os gêneros afins.

APRESENTAÇÃO GERAL DESTA TESE

Para facilitar o entendimento, esta tese está sendo apresentada na forma de capítulos. Os capítulos apresentados correspondem a artigos científicos/partes de artigos a serem submetidos ou já publicados em diferentes periódicos.

Capítulo 1. Estudos cromossômicos em Myrtaceae: a distribuição de números cromossômicos e a evolução da família.

Uma revisão de números cromossômicos já realizados para a família, incluindo os dados da literatura e os atuais ainda não publicados (capítulos 2, 4, 5 e 6) é apresentada.

Capítulo 2. Estudos cromossômicos em Myrtaceae: novos relatos de número cromossômicos e a poliploidia na tribo Myrteae.

Este capítulo apresenta uma revisão de todos os números cromossômicos já obtidos na tribo Myrteae, incluindo os dados da literatura e os atuais ainda não publicados.

Capítulo 3. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae.

Traz análise detalhada da morfologia cromossômica de 15 espécies pertencentes a diferentes gêneros em Myrteae. Este capítulo encontra-se na forma na qual foi publicado no periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Capítulo 4. Distribuição de sítios de seqüências DNAr 45S em espécies de *Psidium* e gêneros próximos por meio de FISH.

Neste capítulo são apresentados dados de citogenética molecular para 15

espécies em diferentes gêneros, avaliando o potencial da aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) no entendimento das relações evolutivas em *Psidium*.

Capítulo 5. Genome size variation in the fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae.

Neste capítulo são incluídas as estimativas do tamanho do genoma em 30 espécies de Myrtaceae de diferentes gêneros. Encontra-se na forma na qual foi publicado no periódico *Plant Systematics and Evolution*.

Capítulo 6. Variação no tamanho do genoma em espécies de *Psidium* (Myrtaceae) estimadas por citometria de fluxo.

Uma análise preliminar da variação do tamanho do genoma, associado ao nível de ploidia para 10 espécies de *Psidium* é apresentada neste capítulo.

Capítulo 7. Relações filogenéticas entre os gêneros de Myrteae (Myrtaceae) a partir de cinco diferentes marcadores moleculares.

Neste capítulo é apresentada uma análise filogenética com 94 espécies de 38 dos 47 gêneros pertencentes à tribo.

CAPÍTULO 1

Estudos cromossômicos em Myrtaceae: a distribuição de números cromossômicos e a evolução na família

RESUMO - Neste trabalho compilamos 902 registros de números cromossômicos em Myrtaceae publicados nos últimos 70 anos. Os dados são apresentados e discutidos à luz das novas classificações intrafamiliares recentemente propostas para a família, apoiadas pelos estudos filogenéticos. Os registros somam ao todo 568 binômios. A maior parte das espécies (74%) apresentou $2n = 22$. A poliploidia aparece em oito das 18 linhagens terminais em Myrtaceae, ocorrendo em aproximadamente 16% dos registros. Espécies displóides são menos comuns (6%), com poucos relatos em apenas quatro tribos: Chamelaucieae, Melaleuceae, Myrteae e Syzigieae. Em alguns grupos é observada uma redução nos números cromossômicos básicos, culminando com $x = 5$ e $x = 6$ na tribo Chamelaucieae, clado que concentra a metade dos registros de variações poliplóides na família. Nos grupos neotropicais, a poliploidia exerceu um papel fundamental na diversificação de dois dos maiores gêneros de Myrteae, *Eugenia* e *Psidium*, e em um dos gêneros australasianos, *Decaspermum*, incluindo a ocorrência de vários citótipos.

Introdução

A classificação intrafamiliar em Myrtaceae tem sido tema de muitos estudos ao longo dos anos, desde os tempos de De Candolle (1828), que reconhecia três grandes grupos na família: Myrtoideae (frutos carnosos), Leptospermeae (frutos capsulares) e Chamelaucieae (frutos secos indeiscentes). Esta classificação foi formalizada por Niedenzu (1838): Myrtoideae (frutos carnosos e filotaxia freqüentemente oposta) e Leptospermoideae (frutos secos e filotaxia alterna), e tem sido amplamente utilizada ao longo dos últimos 150 anos em diversas obras de referência em taxonomia de Myrtaceae, como as de Berg (1855-56, 1857-59), McVaugh (1956, 1968) e Briggs & Johnson (1979). Schimid (1980) estabeleceu a tribo Chamelaucieae em Leptospermoideae e apresentou uma revisão sobre a

problemática da circunscrição dos grandes grupos intrafamiliares em Myrtaceae.

O tratamento mais completo no que diz respeito às relações intrafamiliares em Myrtaceae é o trabalho de Briggs & Johnson (1979), onde estabeleceram grupos informais (alianças), sugerindo estas poderiam equivaler a tribos e subtribos em um sistema formal. Somente nas últimas décadas estes conceitos puderam ser novamente avaliados, principalmente após o surgimento e a aplicação de métodos cladísticos.

Johnson & Briggs (1984) realizaram uma análise cladística com base em dados morfológicos e perceberam que a tradicional divisão intrafamiliar até então utilizada (Niedenzu 1838) deveria ser abandonada. Para estes autores Myrtoideae (*sensu* Berg 1855-56, 1857-59) não formava um grupo monofilético, pois o gênero *Syzygium* (dentro do grupo *Acmena*) destacou-se como um grupo monofilético e distante das demais Myrtoideae *sensu stricto*. Por outro lado, segundo Johnson & Briggs (1984), as Leptospermoideae (*sensu* Niedenzu 1838) eram parafiléticas, formando 12 grupos informais.

Recentemente, alguns estudos filogenéticos com dados macromoleculares vêm sendo realizados visando estabelecer as relações entre os gêneros, subtribos e tribos de Myrtaceae, principalmente testando as hipóteses de Briggs & Johnson (1979). Diversos estudos desta natureza têm sido recentemente publicados, principalmente enfatizando as relações entre os gêneros cujas relações são controversas.

Ladiges *et al.* (1999) estudaram os gêneros *Melaleuca*, *Callistemon* e outros próximos, cuja amostragem foi posteriormente ampliada nos estudos de Brown *et al.* (2001). Udovic *et al.* (1995), McKinnon *et al.* (1999), Steane *et al.* (1999, 2002), Udovic & Ladiges (2000) e Parra-O (2006) estudaram as relações entre *Eucalyptus* e gêneros próximos (*Corymbia* e *Angophora*). Outros estudos foram desenvolvidos em grupos de gêneros que são considerados como alianças, como por exemplo, *Leptospermum* (O'Brien *et al.* 2000), *Chamelaucium* (Lam *et al.* 2002) e *Acmena*

(Harrington & Gadek 2004). Para os grupos com frutos carnosos, destacam-se os trabalhos de Lucas *et al.* (2005, 2007) enfatizando as relações entre os gêneros das tradicionais subtribos de Myrteae (*sensu* Berg 1855-56, 1857-59), de Merwre *et al.* (2005) para as espécies africanas de *Eugenia*, e de Biffin *et al.* (2006) para *Syzygium* e gêneros próximos.

Wilson *et al.* (2001) realizaram a análise filogenética com dados de seqüenciamento do gene plastidial *matK*. Neste trabalho foi confirmado que os taxa de frutos carnosos (Myrtoideae *sensu* Berg 19885-56, 57-59; Niedenzu 1838) não formavam um grupo monofilético, corroborando a exclusão de *Syzygium* de Myrtoideae, já proposta por Johnson & Briggs (1984). As conclusões de Wilson *et al.* (2001) também são apoiadas por diversas evidências, como anatomia floral (Schmid 1972) e anatomia da madeira (Ingle & Dadswell 1953). As tradicionais Leptospermoideae mostraram-se um grupo parafilético e basal em Myrtaceae (Wilson *et al.* 2001).

Baseados em seqüências de macromoléculas (plastidiais e nucleares), Wilson *et al.* (2005) propuseram uma nova classificação intrafamiliar em Myrtaceae. Estes autores expandiram o conceito de Myrtoideae (*sensu* Niedenzu 1838) incluindo nesta todos os gêneros tradicionalmente circunscritos em Leptospermoideae. Segundo estes autores, Myrtaceae pode ser dividida em duas tribos: Myrtoideae e Psiloxoideae. Estas duas tribos são sustentadas, além de dados moleculares, por diversas evidências morfológicas (Tabela 1).

Este breve histórico sobre os problemas taxonômicos envolvendo a conceituação dos diferentes grupos intrafamiliares em Myrtaceae mostra o quão complexa é esta família. A necessidade de estudos biossistemáticos visando uma melhor demilitação dos seus taxa sul-americanos já havia sido enfatizada por McVaugh (1956) e Barroso (1991), que consideraram as Myrtaceae como um grupo taxonomicamente complexo. Dentro de um contexto biossistemático, a Citotaxonomia tem subsidiado diversos estudos taxonômicos e evolutivos em

inúmeros grupos taxonômicos, em diferentes níveis hierárquicos (Raven 1975, Stace 1991). Do ponto de vista cromossômico, os estudos em Myrtaceae são relativamente escassos e pontuais.

De acordo com Rye (1979), Myrtaceae tem passado por uma extensa radiação, mostrando uma imensa diversidade morfológica; no entanto, é um grupo quase homogêneo do ponto de vista cromossômico, com a maioria de suas espécies apresentando número cromossômico básico $x = 11$. De maneira geral, ocorre pouca variação no número cromossômico em Myrtaceae, com exceção para táxons de frutos secos, onde são registrados $2n = 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24$ e 28 , distribuídos em vários gêneros (Rye 1979). Contrário a isto, em grupos com frutos carnosos predomina o número cromossômico $2n = 22$, ou suas variações poliplóides (Costa 2004; Costa & Forni-Martins 2006a, b, 2007a, Capítulo 2). Apesar dos esforços recentemente empregados neste grupo, vários gêneros ainda continuam com seu número cromossômico desconhecido.

A poliploidia ocorre em níveis intra e inter-específicos em Myrtaceae (Rye 1979, Costa & Forni-Martins 2006a, b). Rye (1979) compilou os estudos cromossômicos publicados até a sua época (147 espécies) chegando a um percentual de 36% de espécies poliplóides em Myrtoideae contra 10% em Leptospermoideae. Esta autora também estimou a ocorrência de disploidia em 21% das Leptospermoideae contra apenas 5% em Myrtoideae. No entanto, estes resultados estavam baseados e discutidos segundo a classificação tradicional proposta por Niedenzu (1838), que reconhecia apenas dois grupos em Myrtaceae: um com frutos secos (Leptospermoideae) e outro com frutos carnosos (Myrtoideae).

Diante disto, este trabalho visa a apresentar uma ampla revisão dos estudos cromossômicos realizados na família, utilizando-se das classificações intrafamiliares mais recentes em Myrtaceae à luz dos estudos filogenéticos com seqüências de DNA. Também é nosso objetivo, registrar a ocorrência/distribuição

de citótipos nas diferentes linhagens terminais de Myrtaceae, adotando a circunscrição de Wilson *et al.* (2005).

Material e métodos

Coleta de dados de literatura

Foi feito um levantamento bibliográfico dos relatos de números cromossômicos para as espécies de Myrtaceae disponíveis na literatura. Primeiramente, foram consultados os dados da base de números cromossômicos do Missouri Botanic Garden – Index to Plant Chromosome Number (IPCN, <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>) e das obras de referência de números cromossômicos: Bolkolviskh (1969), Moore (1973, 1974, 1977), Goldblatt (1981, 1984, 1985, 1988) e Goldblatt & Johnson (1990, 1991, 1994, 1998, 2000). Para a compilação dos resultados, estamos considerando apenas os registros de número cromossômico somático ($2n$). Na ausência deste, o número cromossômico gamético (n) foi duplicado para padronizar a apresentação dos resultados. Vários registros foram encontrados com determinação até gênero, porém só foram consideradas as espécies com seus binômios completos.

De posse de todos os registros, estes foram organizados em uma planilha (Excell for Windows) para as análises posteriores. A correta nomenclatura foi checada de acordo com o Myrtaceae World Checklist, Kew (Govaerts *et al.* 2008). Todas as estimativas apresentadas sobre o número de espécies nos respectivos gêneros também foram obtidos a partir do WCM-Kew.

Análise dos dados

A partir dos números cromossômicos compilados, realizamos primeiramente o censo de todos os trabalhos publicados. Nesta etapa, separamos os dados em dois conjuntos: um contendo todas as espécies com frutos carnosos e

outros com as espécies de frutos secos.

Em outra etapa, os resultados foram organizados em tabelas contendo o senso total de números cromossômicos distribuídos nos diferentes gêneros e tribos, de acordo com a proposta de classificação de Wilson *et al.* (2005). Para avaliar a proporção de números cromossômicos, ocorrência de poliploidia, disploidia e citótipos e permitir uma análise comparativa com os trabalhos de Rye (1979), os dados cromossômicos foram separados em duas categorias: táxons de frutos secos x frutos carnosos. Estas proporções são apresentadas de acordo com o número total de contagens cromossômicas disponíveis para cada grupo. A árvore filogenética mais parcimoniosa apresentada por Wilson *et al.* (2005) foi reconstruída para discussão da distribuição dos dados de números cromossômicos e ocorrência dos eventos de poliploidia, disploidia e presença de citótipos em Myrtaceae. Os táxons incluídos na filogenia proposta por Wilson *et al.* (2005) foram compilados em uma matriz de presença/ausência para os seguintes caracteres: a) número cromossômico básico: (1) $x < 11$, (2) $x = 11$ e (3) $x > 11$, e b) (1) presença de espécies poliplóides, (2) displóides e (3) ocorrência de citótipos. Foi realizada uma análise de parcimônia traçando a história evolutiva, buscando reconstruir os estados de caráter ancestrais com o auxílio do programa Mesquite (Maddison & Maddison 2007).

Para facilitar a compreensão, os dados serão apresentados e discutidos juntamente com os resultados dos principais estudos filogenéticos recentemente publicados para a família em diferentes grupos: Udovic *et al.* (1995), Ladiges *et al.* (1999), McKinnon *et al.* (1999), Steane *et al.* (1999, 2002), O'Brien *et al.* (2000), Udovic & Ladiges (2000), Brown *et al.* (2001), Wilson *et al.* (2001, 2005), Lam *et al.* (2002), Harrington & Gadek (2004), Lucas *et al.* (2005, 2007), Merwre *et al.* (2005), Biffin *et al.* (2006) e Parra-O (2006).

Resultados e Discussão

A evolução dos estudos cromossômicos em Myrtaceae

Ao todo, foram compilados 902 registros de número cromossômico em 94 diferentes trabalhos até 2007, correspondendo a 568 espécies (ver Apêndice). Deste total, 688 (76%) são registros para táxons com frutos secos (444 espécies) e 214 (24%) para frutos carnosos (124 espécies). Uma representação gráfica destes resultados é apresentada de maneira geral na Figura 1.

O primeiro estudo cromossômico foi realizado por Greco (1929) em *Myrtus communis*. Até o final de 1940, somente oito trabalhos foram encontrados na literatura enfatizando estudos cromossômicos na família (Greco 1929, 1930; Sugiura 1931, 1936; Harrison 1934 *in* Bolkhovskh *et al.* 1969; Van der Pijl 1934; McAulay *et al.* 1936, 1937a, b). Até então, só eram conhecidos números cromossômicos para 36 espécies, sendo a grande maioria dos registros em espécies das tradicionais Leptospermoideae (Figura 1). Durante as décadas de 40 e 80, houve um incremento do conhecimento de números cromossômicos, totalizando respectivamente, 202 (23 trabalhos) e 727 espécies (73 trabalhos) (Figura 1). As contribuições mais importantes em termos de números de espécies estudadas nestes períodos são os trabalhos de Atchinson (1947), Smith-White (1942, 1948, 1950) e Rye (1979).

Até o final da década de 1980, cerca de 80% das espécies com número cromossômico conhecido eram predominantemente de taxas de frutos secos (Tabela 2, Figura 1) pertencentes principalmente às tribos Chamelaucieae, Eucalypteae e Melaleuceae (*sensu* Wilson *et al.* 2005). Dentre os principais trabalhos realizados nesta época destacam-se os de Smith-White (1942, 1948, 1950, 1954, 1959), Ruggeri (1960 a-e, 1961, 1962) e Rye (1979), que trouxeram

uma importante contribuição para os estudos citotaxonômicos na família, principalmente com espécies australianas.

Nas décadas de 1970 e 80, os estudos passaram a ampliar a amostragem de taxas de frutos carnosos pertencentes às tribos Myrteae e Syzygieae (*sensu* Wilson *et al.* 2005). Foi estudado principalmente o gênero *Syzygium*, em muitos dos trabalhos considerado como *Eugenia* (Roy & Jha 1962, Mehra & Khosla 1969, Mehra 1972, Mehra & Khosla 1972, Gill 1973, Bir *et al.* 1980, Singhal & Gill 1984, Singhal *et al.* 1985, Vijayakumar & Subramanian 1985). A maioria destes trabalhos foi realizado com representantes de distribuição paleotropical e em espécies amplamente cultivadas.

A partir da década de 1980, encontramos um total de 363 registros de números cromossômicos em 46 trabalhos compilados (Figura 1, Tabela 2). O número de trabalhos com espécies de frutos carnosos tem aumentado desde então (Figura 1, Tabela 2). Alguns trabalhos que enfatizaram espécies com frutos carnosos (em diferentes gêneros) nesta época são: Singhal *et al.* (1980, 1984, 1985), Landrum (1981), Sanders *et al.* (1983), Dawson (1987), Vijayakumar & Subramanian (1985), Bernadello *et al.* (1990) e Sun *et al.* (1990).

Mais recentemente, os estudos têm se concentrado em espécies pertencentes à tribo Myrteae (*sensu* Wilson *et al.* 2005). Desde o início da década de 1990, vários estudos vêm sendo conduzidos em espécies indígenas brasileiras de frutos carnosos. Os primeiros estudos em Myrtaceae neotropicais foram realizados por Forni-Martins *et al.* (1995), Andrade & Forni-Martins (1998), Pedrosa *et al.* (1999) e Forni-Martins & Martins (2000), onde foram determinados números cromossômicos de cerca de 10 espécies, sendo várias delas inéditas, até mesmo para gêneros, como *Campomanesia* e *Myrcia*.

Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, b, 2007a) determinaram o número cromossômico para cerca de 50 espécies de Myrteae em nove gêneros, com predomínio de $2n = 22$, corroborando o número cromossômico básico

anteriormente proposto para a família, $x = 11$ (Atchinson 1947, Raven 1975). Os registros apresentados por estes autores foram inéditos para a maioria das espécies, inclusive para alguns gêneros, como *Gomidesia*, *Marlierea* e *Plinia*; ampliaram o conhecimento de números cromossômicos para os dois dos maiores gêneros de Myrtaceae, *Eugenia* e *Myrcia* e observaram variações por poliploidia em cerca de 20% das espécies analisadas, inclusive com a ocorrência de citótipos em espécies como *Eugenia hyemalis*, *E. puniceifolia* (Costa & Forni-Martins 2006a) e *Psidium cattleianum* (Costa & Forni-Martins 2006b). Estes autores registraram poliploidia em espécies de *Eugenia* e *Psidium*, porém não realizaram estudos mais aprofundados para determinar a natureza destes poliplóides.

Em um trabalho mais recente, Costa & Forni-Martins (Capítulo 2), fizeram uma revisão dos números cromossômicos até então publicados em espécies de Myrteae (*sensu* Wilson *et al.* 2005), chegando a pouco mais de 100 espécies com número cromossômico determinado. Este grupo é considerado o mais diversificado em gêneros e espécies em Myrtaceae (Lucas *et al.* 2007) e a poliploidia exerceu papel essencial na sua evolução. As espécies poliplóides surgiram de maneira independente ao longo dos diferentes gêneros, sendo a maioria das espécies poliplóides nos gêneros *Decaspermum*, *Eugenia* e *Psidium*, incluindo a ocorrência de citótipos.

Detalhes sobre a morfologia dos cromossomos são escassos para a família como um todo. Os únicos registros de cariótipos detalhados referem-se a poucas espécies de *Eucalyptus* (Matsumoto *et al.*, 2000; Matsumoto & Marin-Morales, 2001), a *Psidium guajava* (Vijayakumar & Subramanian 1985) e a 15 espécies da tribo Myrteae (Costa & Forni-Martins 2007b). Os dados cariotípicos apresentados por Costa & Forni-Martins (2007b) mostraram maior grau de assimetria nas espécies desta tribo em relação aos cariótipos de espécies com frutos secos, considerados mais primitivos.

Em um trabalho mais recente, Costa *et al.* (2008, Capítulo 5) estimaram o tamanho do genoma de 30 espécies de Myrteae, associando aos seus respectivos níveis de ploidia. Os autores encontraram tamanhos menores do que os estimados para os táxons de frutos secos.

A ocorrência de espécies híbridas e de poliplóides é comum em vários gêneros. Para *Psidium* mostramos evidências de uma possível origem alopoliplóide em *P. cattleianum* (ver capítulo 4 e 6). Esta hipótese foi parcialmente confirmada pela análise por citometria de fluxo e hibridização *in situ* com seqüências de DNAr 45S. Apesar do aumento crescente no número de estudos cromossômicos em espécies de Myrteae (Figura 1, Tabela 2) e da elevada freqüência de registros do número cromossômico $x = 11$, esta tribo ainda representa um grande potencial para ser explorado. A maioria dos trabalhos aqui citados limita-se a simples contagens cromossômicas por meio de coloração convencional. Outras abordagens como bandeamentos cromossômicos diversos e hibridação de DNA *in situ* devem ser aplicadas aos diferentes grupos na família para expandir o estado atual de conhecimento das relações intrafamiliares, bem como descobrir a origem dos citótipos e possíveis híbridos nos diferentes gêneros / grupos em Myrtaceae. Uma análise conjunta com diferentes abordagens torna-se urgentemente necessária para o completo entendimento da evolução deste grupo tão intrigante e complexo.

A distribuição dos números cromossômicos em Myrtaceae

Depois de conferidos todos os sinônimos específicos, o número de espécies com números cromossômicos relatados em literatura chega a 568 espécies de 63 gêneros (Apêndice). O número cromossômico $2n = 22$ é o mais freqüente, ocorrendo em 388 (ca. 74%) espécies e os demais 26% consistem em 16 diferentes

números cromossômicos (Figura 2). Dentro de 560 espécies, para 494 delas (91%) é registrado apenas um número cromossômico (Tabelas 3 e 4). O restante das espécies apresenta citótipos (Tabela 6).

Nestas 494 espécies com apenas um número cromossômico, 329 foram registradas com $2n = 22$ (diplóides com $x = 11$) distribuídos em praticamente todas as tribos (Tabela 3). Dentre os poliplóides, os principais níveis encontrados foram o triplóide ($2n = 3x$) em 26 registros, tetraplóide ($2n = 4x$) com 28 registros e pentaplóide ($2n = 5x$) com 24 registros (Tabela 4).

Há citações de oito diferentes números cromossômicos básicos em Myrtaceae: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (Rye 1979). Destes, o número cromossômico $x = 11$ foi observado em 76% dos registros (375 espécies, Figura 3A). As tribos com maior número de determinações foram Chamelaucieae, Eucalypteae, Myrteae, Melaleuceae e Leptospermeae (Tabela 4). Para as demais tribos, o número de registros variou de 1 a 16 espécies (Tabela 4).

Espécies exclusivamente poliplóides foram mais freqüentes na tribo Chamelaucieae (7,9%), onde foram constatados os níveis $3x$, $4x$ e $5x$ (Tabelas 2 e 3).

Citótipos poliplóides foram freqüentes nas tribos Myrteae, Chamelaucieae, Syzygieae, Melaleuceae e Leptospermeae (Tabelas 5 e 6, Figura 3). Nas espécies com citótipos, o mais freqüente foi a ocorrência de diplóides e tetraplóides, principalmente derivados de $x = 11$ (Tabela 6). A disploidia foi menos freqüente, sendo registrada em apenas sete espécies de quatro diferentes tribos (Tabela 6, Figura 3).

Ao longo da história evolutiva de Myrtaceae, ocorre uma redução drástica de números cromossômicos, desde $x = 12$ na subfamília Psiloxylloideae até $x = 5$ na subfamília Myrtoideae, tribo Chamelaucieae (Figura 3A). Na análise filogenética conduzida por Wilson *et al.* (2005), onde os autores estabeleceram a subfamília Psiloxylloideae, pode ser observado o mesmo número cromossômico

básico do grupo-irmão de Myrtaceae, Vochysiaceae ($x = 12$) (Figura 3). Ao longo da espinha dorsal da filogenia da família, é observada a ocorrência de $x = 11$ em praticamente todos os terminais, com exceção da tribo Chamelaucieae, com $x = 10, 9, 8, 7, 6$ e 5 (Figura 3A). A tribo Chamelaucieae concentra metade dos registros de espécies poliplóides na família (ver ao longo do texto). No entanto, a poliploidia ocorreu de maneira independente pelo menos oito vezes ao longo da história evolutiva da família Myrtaceae (Figura 3B).

A seguir, os dados referentes à ocorrência de espécies diplóides, poliplóides, displóides e citótipos (Apêndice) serão discutidos em cada uma das tribos seguindo a classificação proposta por Wilson *et al.* (2005).

SUBFAMÍLIA PSILOXYLOIDEAE

É composta por apenas duas tribos monogenéricas: Psiloxyleae e Heteropyxieae. A subfamília é considerada nas análises de Wilson *et al.* (2005) como grupo irmão (valores de *bootstrap* de 100%) de todos os outros grupos de Myrtaceae, incluídos por estes autores em outra subfamília, Myrtoideae (Figura 3). De acordo com Wilson *et al.* (2005), o número básico para esta subfamília é $x = 12$. São registrados $2n = 24$ para duas espécies de Psiloxylaceae: na única espécie de *Psiloxylon*, *P. mauritianum*, baseado em um espécime cultivado em Sydney (Johnson & Briggs 1984), e em uma espécie de *Heteropyxis* (Fernandes 1971).

Este número cromossômico básico de $x = 12$ foi proposto por Raven (1975) para a ordem Myrtales, sugerindo que o número cromossômico de Myrtaceae tenha sido originado por disploidia, chegando a $x = 11$, hipótese posteriormente reforçada pelos estudos de Johnson & Briggs (1984) e Graham *et al.* (1993). O número cromossômico $x = 12$ pode ser observado em diferentes grupos dentro de

Myrtales (*sensu* APG 2003), como em Combretaceae e Oliniaceae (Raven 1975), e para alguns gêneros de Lythraceae (Raven 1975, Graham *et al.* 1993).

Dentro da ordem Myrtales (*sensu* APG 2003), Vochysiaceae é considerada o grupo irmão de Myrtaceae com base em uma série de evidências (para detalhes consultar Tobe & Raven 1987, 1990; Conti *et al.* 1996, 1997; Gadek *et al.* 1996; Wilson *et al.* 2001). Apesar de os dados de números cromossômicos em Vochysiaceae serem escassos, parecem reforçar a sustentação de Vochysiaceae como grupo irmão de Myrtaceae. São encontrados registros para apenas duas espécies: $2n = 24$ para *Vochysia venezuelana* Stafl (Löve 1987) e $2n = 22$ para *Vochysia lomatophylla* Standl. (Goldblatt 1979). No entanto, Barbosa *et al.* (2003) apresentaram números cromossômicos para várias espécies de Vochysiaceae, encontrando espécies com $2n = 22$ (*Callisthene* e *Qualea*) e com $2n = 24$ (*Vochysia* e *Salvertia*). Os autores sugerem que uma disploidia tenha ocorrido para separar estes dois grupos que foram reconhecidos em análises filogenéticas incluindo dados moleculares (gene *matK*) (Litt 1999).

Até o momento, nenhuma espécie poliplóide, displóide ou apresentando citótipos foi encontrada na subfamília Psiloxylodeae.

SUBFAMÍLIA MYRTOIDEAE

O conceito desta subfamília foi recentemente re-avaliado com base em estudos filogenéticos utilizando sequências de DNA plastidial (*matK*) (Wilson *et al.* 2005). Segundo Wilson *et al.* (2005), este grupo é composto por 15 diferentes tribos, com número cromossômico básico $x = 11$. A seguir discutiremos os resultados em cada uma das tribos propostas por estes autores.

Tribos Xanthospermeae e Lophostemoneae

Estas duas tribos formam um grupo monofilético e grupo-irmão das demais 13 tribos em Myrtoideae, ocupando uma posição basal na subfamília (Wilson *et al.* 2005) (Figura 3).

A tribo Xanthospermeae é formada por três gêneros: *Xanthostemon*, *Pleurocalyptus* e *Purpureostemon*. Não existem, até o momento desta revisão, dados sobre os números cromossômicos em representantes desta tribo.

Na Tribo Lophotemoneae estão atualmente incluídos quatro gêneros: *Lophostemon*, *Welchiodendron*, *Kjellbergiodendron* e *Whiteodendron*. Só existem relatos de números cromossômicos para apenas uma espécie de *Lophostemon*, *L. confertus*, com $2n = 22$ (diplóide), determinado por Smith-White (1942) como *Tristania conferta*.

Tribos Melaleuceae e Osbornieae

Também formam um grupo monofilético e irmão das 11 tribos subsequentes (Wilson *et al.* 2005) (Figura 3). A tribo Osbornieae é formada por apenas um único gênero, *Osbornia*, para o qual dados cromossômicos inexistem.

A tribo Melaleuceae é composta por nove gêneros: *Beaufortia*, *Callistemon*, *Calothamnus*, *Eremaea*, *Lamarchea*, *Melaleuca*, *Petraeomyrtus*, *Phymatocarpus* e *Regelia*. Neste grupo existem informações cromossômicas para 86 espécies, sendo 72% (62 espécies) dos registros para o gênero tipo *Melaleuca* (Smith-White 1948, Brigton & Fergunson 1976, Rye 1979, Vijayakumar & Subramanian 1985 e Oginuama *et al.* 1992).

No gênero *Beaufortia*, Rye (1979) determinou o número cromossômico para seis espécies. Esta autora encontrou uma redução displóide em relação ao número básico $x = 11$, com quatro espécies apresentando $x = 8$ (*B. elegans*, *B. purpurea*, *B. schaueri* e *B. squarrosa*) e duas espécies com $x = 10$ (*B. decussata* e *B. sparsa*). A poliploidia não foi registrada; no entanto, a amostragem de espécies é limitada para subsidiar uma discussão sobre os eventos de disploidia neste gênero

que, de acordo com Ladiges *et al.* (1999), é monofilético.

Para *Callistemon*, existem relatos na literatura para 13 espécies (Smith-White 1942, 1948, Mehra 1976, Vijayakumar & Subramanian 1985, Oginuma *et al.* 1992). A maioria das espécies é diplóide ($2n = 22$), e apenas uma espécie, *C. viminalis*, é tetraplóide ($2n = 44$). Foi verificada poliploidia intra-específica (citótipos) em três espécies: *C. linearis* ($2n = 22, 33, e 44$), *C. pinifolius* ($2n = 22, 30, 33$) e *C. rigidus* ($2n = 22, 44$).

O gênero *Melaleuca* tem a maioria de suas espécies com $2n = 22$, no entanto ocorrem algumas variações neste número. Duas espécies são triplóides com $2n = 33$, *M. adnata* e *M. densa*, ambas citadas por Brighton & Ferguson (1976) como tendo origem híbrida. *Melaleuca fulgens* é tetraplóide, com $2n = 44$ (Brighton & Ferguson 1976, Rye 1979). Citótipos poliplóides ocorreram em apenas duas espécies, *M. raphiophylla* com $2n = 22$ e 44 (Brighton & Ferguson 1976), e *M. teretifolia*, com $2n = 22$ e 66 (Brighton & Ferguson 1976, Rye 1979). A disploidia ocorre em apenas duas espécies, *M. radula* e *M. squamea* que possuem $2n = 24$ cromossomos (Brighton & Ferguson 1976). Uma série displóide foi apresentada por Brighton & Ferguson (1976) em *M. lanceolata* ($2n = 22$ e 24).

Ladiges *et al.* (1999) conduziram uma análise filogenética com base em sequências de DNAr 5S e *ITS-1* em espécies da aliança *Beaufortia* (*sensu* Briggs & Johnson 1979, Johnson & Briggs 1983) que inclui nove gêneros de espécies arbustivas e esclerófilas endêmicas da Austrália. Nesta análise, as espécies australasianas de *Callistemon* surgem como grupo monofilético e irmão das *Melaleuca* australasianas. O gênero *Melaleuca* se mostrou parafilético, sendo que as espécies de ambos os gêneros, *Melaleuca* e *Callistemon*, endêmicas da região da Nova Caledônia formaram um grupo monofilético.

Em *Calothamnus*, existem relatos para duas espécies, *C. quadrifidus* (Rye 1979) e *C. villosus* (Smith-White 1948), ambas diplóides ($2n = 22$). Não foi observada poliploidia neste gênero. *Beaufortia* e *Calothamnus* são monofiléticos e

grupos irmãos (Ladiges *et al.* 1999), sendo *Beaufortia*, com $x = 8$ e 10, cromossomicamente caracterizado pela redução displóide e não-redução em *Calothamnus*.

Para o gênero *Regelia*, duas espécies (*R. inopsis* e *R. velutina*) apresentam $2n = 22$ (Rye 1979). Este gênero é citado por Wilson *et al.* (2005) como pertencente a tribo Melaleuceae, no entanto não foi incluído em sua análise filogenética, pois as relações entre este e os gêneros próximos já haviam sido bem delimitadas por Ladiges *et al.* (1999), que propuseram *Regelia*, como grupo-irmão de *Lamarchea*, gênero no qual dados cromossômicos inexistem. *Regelia* também é um gênero monofilético e grupo irmão de *Lamarchea*. Estes dois gêneros são irmãos do clado *Beaufortia* + *Calothamnus* e têm distribuição restrita na região sudoeste da Austrália.

Para *Conothamnus*, existem relatos para apenas uma única espécie, *C. trinervius* com $2n = 20$ (Rye 1979), mesmo número observado para *Phymatocarpus sparsiflorus* (Rye 1979).

Eremaea tem uma única espécie com número cromossômico conhecido, *E. beaufortioides*, com $2n = 22$ (Rye 1979). Forma um grupo monofilético com o clado formando pelos gêneros *Phymatocarpus* e *Conothamnus* (Ladiges *et al.* 1999). Neste pequeno grupo, as relações de parentesco entre *Phymatocarpus* e *Conothamnus* podem ser reforçadas pelos dados cromossômicos, onde ambos os gêneros apresentam registros de espécies com $2n = 20$ (Rye 1979), ao passo que *Eremaea* tem $2n = 22$ (Rye 1979). Possivelmente, a diversificação entre estes gêneros seguiu por uma disploidia descendente, com a perda de dois cromossomos. No entanto, isto merece ser melhor investigado, com um maior número de espécies, tanto nos aspectos cromossômicos como filogenéticos. Esse grupo monofilético é irmão das espécies de *Melaleuca* e *Callistemon* da Nova Caledônia (Ladiges *et al.* 1999).

A derivação de Melaleuceae pode ser associada à considerável variação de

números cromossômicos, principalmente em *Beaufortia* onde é observada uma redução displóide de $x = 11$ para $x = 10$ e $x = 8$; e em *Melaleuca*, com a ocorrência de poliplóides, alguns displóides e citótipos. Uma das explicações para a ocorrência destas variações poliplóides e de algumas populações displóides, pode ser resultante do interessante padrão de distribuição geográfica destes gêneros, com populações geograficamente isoladas e ocupando diferentes habitats na região da Austrália e Nova Caledônia (Ladiges *et al.* 1999).

Tribo Kanieae

‘É um grupo monofilético formado pelos gêneros *Barongia*, *Basisperma*, *Kania*, *Lysicarpus*, *Mitrantia*, *Ristantia*, *Sphaerantia* e *Tristaniopsis* (Wilson *et al.* 2005). ‘É uma tribo bastante diversificada em gêneros, mas só existem relatos de número cromossômico para uma única espécie, *Tristaniopsis laurina*, registrado por Smith-White (1948) como *Tristania laurina*, com $2n = 22$.

Tribos Metrosidereae e Backhousieae

Estas duas tribos formam um grupo monofilético e irmão do clado composto pelas tribos Syzigieae e Tristanieae (Wilson *et al.* 2005).

A tribo Backhousieae é composta somente por dois gêneros, *Backhousia* e *Choricarpia*, enquanto a tribo Metrosidereae é formada por quatro gêneros, *Carpolepis*, *Mearnsia*, *Metrosideros* e *Tepualia*. Apesar de Metrosidereae ser uma tribo com relativa baixa diversidade de gêneros, apresenta um interessante padrão de distribuição geográfica, com apenas um dos gêneros ocorrendo na América do Sul, *Tepualia* (McVaugh 1968), e os demais gêneros exclusivamente na Austrália (Wilson *et al.* 2005).

Só existem relatos para duas espécies no gênero *Backhousia*: *B. citriodora* e *B. myrtifolia*, com $2n = 22$ (Smith-White 1942, 1948).

Na tribo Metrosidereae, somente existem relatos de número cromossômico para um único gênero, *Metrosideros*, onde são registrados dados para 15 espécies, todas diplóides, com $2n=22$.

Tribos Syzygieae e Tristanieae

As tribos Syzygieae e Tristaniae constituem um grupo monofilético formado por oito gêneros, sendo três (*Tristania*, *Thaleropia* e *Xanthomyrtus*) pertencentes à tribo Tristanieae, e cinco (*Acmena*, *Acmenosperma*, *Anetholea*, *Syzygium* e *Waterhousea*) à tribo Syzygieae (Wilson *et al.* 2005).

Dados de números cromossômicos são inexistentes para a tribo Tristanieae como um todo. Em Syzygieae, só existem dados para 23 espécies do gênero *Syzygium* distribuídos em diversos trabalhos (Van der Pijl 1934; Bhaduri & Islam 1949; Roy & Jha 1962; Mehra & Khosla 1969, 1972; Mehra 1972, 1976; Gill 1973; Carr 1978; Bir *et al.* 1980; Singhal & Gill 1984; Chen *et al.* 1985b; Singhal *et al.* 1985; Vijayakumar & Subramanian 1985; Sandhu & Mann 1988; Dawson 1987). Em muitos desses trabalhos, as espécies de *Syzygium* foram tratadas como espécies de *Eugenia*.

A maioria das espécies de *Syzygium* (14) é diplóide ($2n = 2x = 22$). Apenas duas espécies são tetraplóides ($2n = 4x = 44$), *Syzygium australe* (como *Eugenia myrtifolia*) e *S. smithii* (como *Eugenia smithii*) (Darlington & Wylie 1961) e duas são hexaplóides ($2n = 6x = 66$), *S. curzii* (como *Eugenia curzii*) e *S. venosum* (como *Eugenia frondosa*) (Mehra & Khosla 1969, 1972, Mehra 1976).

Variações nos níveis de ploidia são comuns em três espécies. Para *Syzygium aromaticum*, Vijayakumar & Subramanian (1985) relataram $2n = 22$ e 44 (como *Eugenia caryophyllata*) enquanto que Oginuma *et al.* (1992) relataram $2n = 22$. Em *Syzygium cumini*, estudada como *S. jambolana*, são relatadas variações $2x$, $3x$, $4x$, $5x$ e $6x$ por diferentes autores (Roy & Jha 1962; Mehra & Khosla 1969, 1972; Mehra 1972; Gill 1973; Bir *et al.* 1980; Singhal & Gill 1984; Singhal *et al.*

1985; Vijayakumar & Subramanian 1985). Variações displóides são encontradas em *S. jambos*, com os seguintes números cromossômicos: $2n = 28, 33, 42, 44, 46, 54$ e 66 . O mais elevado nível poliplóide, $2n = 110$, ocorre em *Syzygium samarangense*, relatado por Van der Pijl (1934) como *Eugenia javanica* e apresentando também $2n = 44$.

Algumas variações displóides ocorrem em algumas espécies de *Syzygium*. Em *Syzygium cumini*, Darlington & Wylie (1961) citam $2n = 42$ (como *Eugenia cuminni*) enquanto que $2n = 46$ é citado para a mesma espécie por Badhuri & Islan (1949) (como *Eugenia jambolana*). Situação semelhante ocorre para *Syzygium jambos*, onde são encontrados $2n = 28, 42, 46$ e 54 em dois diferentes trabalhos (Van der pijl 1934, Badhuri & Islan 1949). Em *Syzygium samarangense*, Van der pijl (1934) encontrou $2n = 42$ (como *Eugenia javanica*).

Biffin *et al.* (2006) conduziram uma análise filogenética em *Syzygium* e gêneros próximos como *Acmena*, *Acmenosperma*, *Piliocalyx* e *Waterhousea*, com base em três diferentes seqüências plastidiais (*matK*, *ndhF* e *rpl16*). Estes autores consideram o conceito de *Syzygium sensu lato*, uma vez que as espécies daqueles gêneros ficam alojados entre as espécies de *Syzygium*, formando um grupo monofilético dividido em quatro grupos (I-IV).

A maioria das espécies onde existem contagens cromossômicas está restrita ao Grupo I, com exceção de *S. maire* ($2n = 22$), posicionada no grupo mais basal (Grupo IV). As demais espécies que apresentam variações poliplóides, incluindo a ocorrência de citótipos (*S. aromaticum*, *S. australe*, *S. cumini*, *S. fruticosum*, *S. jambos*, *S. kurzii*, *S. samarangense*, *S. smithii* e *S. venosum*) ocorrem no grupo I, o mais derivado no gênero. Neste grupo *S. cumini* e *S. jambos* são consideradas espécies-irmãs, formando um grupo monofilético. Estas espécies apresentam a maior variação de número cromossômico, com algumas populações diplóides ($2n = 2x = 22$) até hexaplóides ($2n = 6x = 66$), além dos mais variados registros de

disploidia. A distribuição de espécies poliplóides no Grupo I (Biffin *et al.* 2006) reforça a condição mais derivada das espécies deste grupo.

Tribo Myrteae

É considerada a tribo mais diversificada em gêneros em Myrtaceae, e distribuída em toda a região pantropical (Lucas *et al.* 2007). Compreende cerca de 2500 espécies agrupadas em 49 gêneros (Govaerts *et al.* 2008) e distingue-se das 14 demais tribos de Myrtoideae *sensu* Wilson *et al.* (2005) pela presença de frutos carnosos indeiscentes, sistema vascular transeptal e pêlos uni ou multicelulares (Wilson *et al.* 2001, Lucas *et al.* 2007, Schmid 1972).

Segundo Costa (Capítulo 2) a ocorrência do número cromossômico $2n = 22$ ($x = 11$) é quase constante nesta tribo, ocorrendo em todos os gêneros desta tribo. Foram apresentadas contagens inéditas para diversas espécies e gêneros e foi realizada uma extensa revisão em literatura sobre os estudos cromossômicos nesta tribo, discutindo os dados de acordo com os estudos filogenéticos recentes (Lucas *et al.* 2007). Atualmente, são conhecidos os números cromossômicos de 104 espécies de 25 gêneros que embora representem apenas 4,1% das espécies, totalizam a metade dos gêneros da tribo.

Lucas *et al.* (2007) dividiram a tribo Myrteae (*sensu* Wilson *et al.* 2005) em sete grupos que correspondem a clados bem sustentados, com base em dados de seqüências de quatro diferentes genes (dois plastidiais e dois nucleares), dados anatômicos, morfológicos e biogeográficos: grupos *Eugenia*, *Pimenta*, *Myrteola*, *Myrceugenia*, *Myrcia*, *Plinia* e Australasiano. Segundo estes autores, a divisão proposta por Berg (1855-56, 1857-59) em três subtribos (Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae) deverá ser futuramente abandonada.

A poliploidia teve um importante papel na diferenciação das espécies em diferentes gêneros nesta tribo Myrteae. A ocorrência de 32 registros poliplóides (31%), ou derivados por poliploidia seguida de disploidia ($2n = 32$ e $2n = 98$)

reforça a importância deste tipo de variação numérica em Myrtaceae, como ressaltada anteriormente em diversos estudos (Athinson 1947; Rye 1979; Costa & Forni-Martins 2006a, b, 2007a). Destacam-se dois dos maiores gêneros neotropicais, *Eugenia* (quatro espécies poliplóides e seis espécies com citótipos poliplóides) e *Psidium* (90% de espécies e citótipos poliplóides), e em um dos gêneros australasianos, *Decaspermum*, poliplóide. Além destes gêneros, espécies poliplóides são registradas em outros gêneros como *Myrteola* e *Myrcia* (com um citótipo poliplóide conhecido), este último neotropical. Para maiores detalhes sobre a distribuição de números cromossômicos nesta tribo, consultar o Capítulo 2.

Tribo Eucalypteae

Esta tribo é formada por sete gêneros (*Allosyncarpia*, *Angophora*, *Arrillastrum*, *Corymbia*, *Eucalyptopsis*, *Eucalyptus* e *Stockwellia*) caracterizados pela ausência de tricomas, flores com perianto caliptrado, numerosos estames, ovário semi-ínfero, frutos capsulares e embriões com cotilédones deflexos (Wilson *et al.* 2005).

O conceito genérico de *Eucalyptus*, um dos gêneros ecológica e economicamente mais importantes na Austrália (Williams & Brooker 1997), tem mudado ao longo dos anos. Os estudos filogenéticos são consistentes com marcadores moleculares e morfológicos que indicaram que o gênero *Eucalyptus* divergiu por duas grandes linhagens evolutivas: uma compreendendo os gêneros “bloodwoods”, com madeira vermelha (*Angophora* e *Corymbia*) e os demais (*Eucalyptus* s.s.) “non-bloodwoods”, sem madeira avermelhada (Sale *et al.* 1993, 1996; Hill & Johnson 1995; Ladiges *et al.* 1995; Udovic *et al.* 1995; Steane *et al.* 1999, 2002; Udovic & Ladiges 2000; Parra-o *et al.* 2006).

Os gêneros *Arrillastrum*, *Eucalyptopsis* e *Stockwellia* possuem de uma a duas espécies cada e formam um grupo monofilético e irmão do clado

Angophora+*Corymbia* (Parra-O *et al.* 2006).

Nesta tribo, existem dados de números cromossômicos para três gêneros: *Angophora* (quatro espécies), *Corymbia* (20) e *Eucalyptus* (114). Todos os registros apontam para a uniformidade do número cromossômico $2n = 22$, salvo algumas exceções com disploidia e poliploidia. No gênero *Angophora*, quatro espécies, *A. costata*, *A. floribunda*, *A. hispida* (Smith-White 1942) e *A. subvelutina* (Moussel 1965), apresentam $2n = 22$. Para as 20 espécies de *Corymbia*, todos os registros apontam $2n = 22$, com exceção de *Corymbia citriodora*, tratada por diversos autores (Sugiura 1931, 1936; Atchinson 1947; Smith-White 1948; Haque 1984; Huang *et al.* 1985, 1989; Vijayakumar & Subramanian 1985; Bedi *et al.* 1989; Huang *et al.* 1989, Bachir & Addellah 2006) como *Eucalyptus citriodora*, para o qual são citados diferentes números cromossômicos, como $2n = 20, 22, 24, 28$ e 44 . Bachir & Addellah (2006) sugeriram que os registros de Sugiura (1936) ($2n = 20, 24$ e 28) eram errôneos. A contagem de $2n = 44$, apresentada por Smith-White (1948a), é o primeiro registro de poliploidia em *Corymbia*.

A maior parte dos dados cromossômicos para esta tribo pertence ao gênero *Eucalyptus*. A contribuição mais importante em termos de número de espécies analisadas foram os trabalhos de Atchinson (1947), Rye (1979), e mais recentemente, o de Bachir & Addellah (2006) com 59 espécies, onde 14 delas correspondem atualmente a *Corymbia*. São relatados 15 registros displóides oito espécies de *Eucalyptus*, com $2n = 20, 24, 28$ e 32 (Sugiura 1931, 1936; Harrison 1934; Atchinson 1947; Ruggeri 1960, 1961; Mehra & Khosla 1972; Griffin *et al.* 1989). Bachir & Addellah (2006) contestam todas as contagens anteriores encontradas na literatura com números diferentes de $2n = 22$, ($2n = 20$ e 24), afirmando que podem ter sido erroneamente interpretadas, devido a disjunção nos braços dos primeiros pares cromossômicos, que são ligados por uma extensa região de heterocromatina. Isto também já havia sido relatado por Rye (1979) para *E. conglobata*, o que dá a aparência de um par de cromossomos suplementar

levando a uma contagem incorreta (Bachir & Addellah 2006). Não foram encontrados registros de espécies poliplóides em *Eucalyptus*, com exceção de alguns tetraplóides artificiais (Janaki Ammal & Khosla 1969, Kappoor & Sharma 1985).

Dados sobre a morfologia cromossômica são extremamente escassos neste grupo, como nas demais tribos, à exceção de Myrteae. Os únicos registros são os de Haque *et al.* 1984 e Matsumoto *et al.* (2000), relatando cariótipos altamente simétricos, com todos os cromossomos metacêntricos. Matsumoto *et al.* (2000) sugeriram que a evolução deste gênero tenha seguido de maneira conservativa em relação ao número cromossômico, concordando com Mehra & Khosla (1972), que haviam anteriormente sugerido que a especiação em *Eucalyptus* devia-se a mutações gênicas e rearranjos cromossômicos. Costa & Forni-Martins (2007b) encontraram cariótipos relativamente mais assimétricos na tribo Myrteae. A falta de dados sobre a morfologia dos cromossomos dificulta uma análise interpretativa mais consistente sobre como ocorreu a evolução cromossômica na família.

Tribo Syncarpieae

Nestas tribos, só existe relato de número cromossômico para uma espécie, *Syncarpia glomulifera*, estudada por Smith-White (1948) como *Syncarpia laurifolia*, apresentando $2n = 22$. Syncarpieae fica em uma politomia juntamente com Eucalypteae, Lindsayomyrteae, Myrteae e Leptospermeae + Chamelaucieae, e as relações entre estas tribos ainda é incerta.

Tribo Lyndsayomyrteae

Esta tribo é grupo-irmão do clado monofilético composto pelas tribos Leptospermeae e Chamelaucieae (Wilson *et al.* 2005) e não existem relatos de números cromossômicos pra esta tribo.

Tribo Leptospermeae

Oito gêneros estão incluídos na atual circunscrição desta tribo. São eles: *Agonis*, *Angasomyrtus*, *Asteromyrtus*, *Homalospermum*, *Kunzea*, *Leptospermum*, *Neofabricia* e *Pericalymma*. Existem relatos de números cromossômicos para espécies de *Agonis* (uma), *Kunzea* (seis) e *Leptospermum* (26). Todos os registros apontam para $2n = 22$, além de suas espécies com citótipos, *K. ericoides* e *L. roei*. Dois registros de disploidia ocorreram nesta tribo, *L. continentale* ($2n = 10$) e *L. myrsinoides* ($2n = 24$) (O'Brien & Calder 1993).

Algumas espécies tetraplóides ($2n = 4x = 44$) são encontradas na literatura somente no gênero *Leptospermum*: *L. minutifolium*, *L. myrtifolium*, *L. parviflorum* e *L. parvifolium* (Smith-White 1948; Dawson 1987, Thompson 1989). *Kunzea ericoides* apresenta citótipos diplóide e tetraplóide.

O'Brien *et al.* (2000) realizaram uma análise filogenética com base em três diferentes seqüências de DNA plastidial em espécies da sub-aliança *Leptospermum* (*sensu* Briggs & Johnson 1979), que inclui os gêneros atualmente incluídos em Leptospermeae. Alguns gêneros como *Kunzea* e *Leptospermum* são parafiléticos, no entanto, existe um pequeno clado monofilético formado por três espécies de *Kunzea*: *K. ambigua*, *K. capitata* e *K. ericoides*. Segundo estes autores, *K. capitata* e *K. ericoides* são espécies mais relacionadas, esta última apresentando citótipos $2x$ e $4x$. Situação contrária é observada no clado contendo *Leptospermum parvifolium* ($2n = 44$) e *L. trinervium* ($2n = 22$), onde a diferenciação entre as duas espécies teria ocorrido por meio de poliploidização direta.

Tribo Chamelaucieae

É uma das tribos com maior diversidade de gêneros (23), superada apenas por Myrteae com cerca de 50 gêneros (Govaerts *et al.* 2008). São eles: *Actinodium*, *Aluta*, *Astartea*, *Babingtonia*, *Baekkea*, *Balaustion*, *Calytrix*, *Chamelaucium*,

Corynanthera, *Darwinia*, *Euryomyrtus*, *Homalocalyx*, *Homoranthus*, *Hypocalymma*, *Malleostemon*, *Micromyrtus*, *Ochrosperma*, *Pileanthus*, *Rinzia*, *Scholtzia*, *Thryptomene*, *Triplarina* e *Verticordia*.

Os estudos filogenéticos com marcadores moleculares evidenciaram claramente o monofilétismo deste grupo, no entanto, as relações entre os gêneros ainda são incertas (Lam *et al.* 2002). Vários gêneros deste grupo são parafiléticos, como *Astartea*, *Babingtonia*, *Baeckea sensu lato*, *Darwinia* e *Hypocalymma*, enquanto outros como *Baeckea sensu stricto*, *Euryomyrtus*, *Ochlosperma*, *Rinzia*, *Scholtzia* e *Triplarina* são perfeitamente monofiléticos e sustentados por altos valores de *bootstrap* (Lam *et al.* 2005).

Para este grupo, informações cromossômicas são disponíveis na literatura para 74% dos gêneros (17).

De acordo com Lam *et al.* (2005), o grupo monofilético mais basal e irmão dos demais gêneros em Chamelaucieae é o clado formado pelos gêneros *Ochlosperma*, *Calytrix* e *Homalocalyx*. Estes dois últimos formam um grupo monofilético e irmão de *Ochlosperma*. Neste clado existem estudos para *Calytrix* e *Homalocalyx*.

No gênero *Calytrix* existem dados para 12 espécies, todas com número básico $x = 11$, sendo oito diplóides ($2n = 22$): três apresentam citótipos diplóides e tetraplóides ($2n = 44$) e apenas uma espécie, *Calytrix longiflora*, é exclusivamente tetraplóide (Rye 1979, Smith-White 1960). Em *Homalocalyx* só existem registros para *H. coarctatus* e *H. tryptomenioides*, ambas diplóides, com número básico $x = 11$, e tratadas originalmente por Rye (1979) como espécies do gênero *Wehlia*.

Chamelaucium e *Verticordia* são grupos-irmãos (Lam *et al.* 2002); no entanto, é observado o predomínio de $x = 11$ em *Chamelaucium*, enquanto que em *Verticordia* são observados quatro números básicos distintos, $x = 6, 7, 8, 9, 11$,

conforme assinalado por Rye (1979).

Em *Chamelaucium*, para as seis espécies com registro em literatura, apenas *C. ciliatum* apresentou citótipos poliplóides com $2n = 22, 44$ e 66 em distintas populações (Rye 1979). As demais cinco espécies estudadas (*C. axillare*, *C. brevifolium*, *C. drummondii*, *C. pauciflorum* e *C. uncinatum*) são diplóides (Rye 1979 e Smith-White 1950). Smith-White (1948) determinou $2n = 18$ para outra população de *C. uncinatum*, mas não tivemos acesso à publicação original para confirmar a identificação da espécie.

No gênero *Verticordia* são disponíveis contagens cromossômicas para 58 espécies, sendo a maioria destes registros obtidos nos trabalhos de Rye (1979), Dawson (1987) e Tyagi *et al.* (1991). A ocorrência de uma redução displóide, de $x = 11 \rightarrow 9 \rightarrow 8 \rightarrow 6$ foi observada por Smith-White (1950, 1954, 1959 *in* Rye 1979). Smith-White (1954, 1959) enfatizou a necessidade de uma revisão taxonômica em *Verticordia*, sugerindo a aplicação de dados cromossômicos no estabelecimento de grupos “naturais” no gênero. Rye (1979) encontrou uniformidade de números cromossômicos em apenas uma das seções de *Verticordia* estabelecidas por Bentham (1867), com $x = 8$, afirmando serem necessárias contagens para mais espécies. No entanto, até hoje, isto ainda não foi realizado.

Nas espécies de *Verticordia* com $x = 6$ (seis espécies e uma variedade), quatro espécies e uma variedade são diplóides. Três espécies apresentam citótipos poliplóides, *V. browni* ($2x$ e $3x$), *V. densiflora* ($2x$ e $4x$) e *V. monadelpha* ($2x, 3x, 6x$). Apenas *V. serrata* apresentou número básico $x = 7$. Quinze espécies e uma variedade apresentaram $x = 8$, sendo sua maioria diplóide. Apenas uma espécie, *V. chrysantha* é tetraplóide; e *V. chrysanthella* apresentou citótipos di e tetraplóides. O número $x = 9$ é registrado em oito espécies, todas diplóides, à exceção de *V. habrantha*, com citótipos di e tetraplóides. O número $x = 11$ é o

mais freqüente, ocorrendo em 28 espécies, a maioria diplóide, sendo encontrada apenas uma espécie tetraplóide (*V. grandis*) e outra com citótipos 2x e 4x (*V. pennigera*) (apêndice).

Gêneros como *Actinodium*, *Darwinia* e *Homoranthus* também formam um grupo monofilético (Lam *et al.* 2002, Wilson *et al.* 2005). O único registro para *Actinodium* é para *A. cunninghami*, com $2n = 12$ ($x = 6$) (Smith-White 1950, Rye 1979). Para o gênero *Homoranthus*, são conhecidos números cromossômicos para três espécies, todas com $2n = 18$ ($x = 6$ ou 9) (Smith-White 1954).

No gênero *Darwinia*, são disponíveis contagens cromossômicas para 31 espécies, com números cromossômicos básicos variando de $x = 5, 6, 7$ e 9 . Apenas uma espécie, *D. oederoides*, apresenta $x = 5$ ($2n = 10$) (Rye 1979). A maioria das espécies tem $x = 6$, com registro de apenas uma tetraplóide, *D. helichrysoides* (Rye 1979). Quatro espécies têm $x = 7$, sendo que *D. diosmoides* apresenta citótipos 2x e 4x (Smith-White 1954, Rye 1979) sendo as demais diplóides. Duas espécies diplóides com $x = 9$ foram registradas, *D. pauciflora* e *D. vestita* (Smith-White 1954, Rye 1979). *Darwinia speciosa* apresenta o maior número cromossômico neste gênero, $2n \sim 42$ (Rye 1979), podendo ser um hexaplóide ($x = 7$) ou heptaplóide ($x = 6$). Este é um dos gêneros que necessita de uma investigação filogenética mais ampla, com um maior número de espécies. Talvez a aplicação dos números cromossômicos possa auxiliar no estabelecimento de táxons infragênicos em *Darwinia*, como sugerido por Smith-White (1954, 1959).

Os gêneros irmãos *Mallaeostemom* e *Scholtzia* são monofiléticos em Chamelauciae (Lam *et al.* 2002). Em *Mallaeostemom*, são registrados números cromossômicos para três espécies, todos múltiplos de $x = 11$: *M. hursthousei* ($2n = 44$, como *Mycromyrtus hursthousei*), *M. roseus* ($2n = 22, 44$, como *Mycromyrtus rosea*) e *M. tuberculatus* ($2n = 22, 44$, como *Trypthonene tuberculata*) (Rye 1979).

Em *Scholtzia*, Rye (1979) determinou o número cromossômico para quatro espécies, todas diplóides com $x = 11$, à exceção de uma tetraplóide, *S. drummundii*.

O número cromossômico básico $x = 11$ ocorre em outros gêneros como *Astartea*, *Baeckea*, *Calythropsis*, *Euryomyrtus*, *Hypocalymma*, *Lhotskia*, *Micromyrtus* e *Pileanthus*.

Astartea, *Baeckea* e *Hypocalymma* são grupos polifiléticos nas análises filogenéticas apresentadas por Lam *et al.* (2002). A única espécie de *Astartea* com número cromossômico conhecido é *A. clavulata*, com $2n = 44$ (Rye 1979). Para *Baeckea* são conhecidos números cromossômicos para 12 espécies (Smith-White 1948, Moussel 1965, Rye 1979), sendo quatro tetraplóides (*B. crispiflora*, *B. leptophylla*, *B. pentagonantha* e *B. virgata*) e uma apresentando citótipos di e tetraplóides, *B. preiseina* (Rye 1979). Em *Hypocalymma*, Rye (1979), apresentou registro para três espécies, *H. angustifolium* ($2n = 22, 44$), *H. robustum* e *H. xanthopetalum* ($2n = 22$).

Para outros cinco gêneros (*Calythropsis*, *Euryomyrtus*, *Lhotskia*, *Micromyrtus* e *Pileanthus*), a ocorrência de espécies diplóides com $x = 11$ é constante (Smith-White 1948, 1950, 1954; Rye 1979). Dentre estes, apenas *Euryomyrtus* e *Micromyrtus* estão presentes na análise filogenética de Lam *et al.* (2002) como grupos monofiléticos, porém em linhagens distintas dentro de Chamelaucieae.

No gênero *Thryptomene* são observados quatro números cromossômicos básicos ($x = 11, 10, 9$ e 6), evidenciando também uma série displóide. Com o número $x = 11$, a maioria das espécies é diplóide, com exceção dos tetraplóides *T. australis* e *T. denticulata* (Rye 1979). Para os demais números cromossômicos básicos só existe registro para uma única espécie em cada, sendo diplóides para aquelas com $x = 6$ e $x = 10$, enquanto que em *T. baeckeacea*, com $x = 9$, foi

relatada a ocorrência de citótipos diplóide e tetraplóide (Rye 1979). Este gênero não tem sido utilizado nas análises filogenéticas recentes, com exceção do trabalho de Wilson *et al.* (2005), onde apenas uma espécie estudada posicionou-se em uma politomia com os demais gêneros *Babingtonia* e *Euryomyrtus*. O gênero *Babingtonia* foi alvo de uma recente revisão (Wilson *et al.* 2007), onde os autores estabeleceram três gêneros distintos (dois novos e uma nova circunscrição) com base nas análises filogenéticas com um maior número de espécies. Para este gênero só existe relato de uma espécie, *B. acutangula*, com $2n = 26$ (Sarkar *et al.* 1982), no entanto esta espécie não consta no WCM (Govaerts *et al.* 2008) e nem na revisão de Wilson *et al.* (2007).

Dentre as 17 tribos atualmente reconhecidas em Myrtaceae, é observada variação de números cromossômicos, desde $x = 5$ (tribos Chamelaucieae e Leptospermeae, subfamília Myrtoideae) até $x = 12$ (subfamília Psyloxyloideae). A ocorrência do número cromossômico básico $x = 11$ é quase constante em Myrtaceae, ocorrendo em 11 tribos: Backhousieae, Chamelaucieae, Eucalypteae, Kanieae, Leptospermeae, Lophostemoneae, Melaleuceae, Metrosidereae, Myrteae, Syncarpieae e Syzygieae. Eventos de poliploidia (16% do total de espécies são poliplóides) são registrados (pelo menos uma espécie) em seis tribos: Chamelaucieae (concentra metade dos registros poliplóides existentes), Eucalypteae, Leptospermeae, Melaleuceae, Myrteae e Syzygieae. Destas tribos, as variações poliplóides em Myrteae ocorrem em relação à $x = 11$, enquanto nas demais tribos, em relação a $x = 5, 6, 7, 8, 10$ e 11 . A disploidia está concentrada em espécies das tribos Chamelaucieae ($x = 12$ a $x = 5$) e Leptospermeae, com poucos registros em Myrteae e Melaleuceae. Dados são ausentes para cinco tribos: Kanieae, Lyndsayomyrteae, Osbornieae, Tristanieae e Xanthostemoneae.

Referências bibliográficas

- Andrade FG & Forni-Martins ER. 1998. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae. *Genetics and Molecular Biology* 21(3 – suppl.): 166.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399–436
- Atchinson E. 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany* 34: 159-164.
- Bachir O & Abdellah B. 2006. Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L'Herit. (Myrtaceae). *Caryologia* 59: 207-212.
- Barroso GM. 1991. *Myrtaceae*. In: Sistemática de angiospermas do Brasil, vol. 2. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, Viçosa.
- Bentham G. 1869. Notes on Myrtaceae. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 10: 101–166.
- Berg O. 1855-56. *Revisio Myrtacearum Americae*. *Linnaea* 27: 1-472
- Berg. O. 1857-59. *Myrtaceae*. In: von Martius C. F. P. (ed.). *Flora Brasiliensis* 14: 1 - 655.
- Bernadello LM, Stiefkens LB & Piovano MA. 1990. Números cromossômicos em dicotiledôneas argentinas. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 26: 149-157.
- Bhaduri PN, Islan AS, Bose S (1949). Cytogenetics of some common fruit trees. I-II. Proceedings of the 36th Indian Science Congress pt3, 139
- Barbosa et al 2003
- Biffin E, Craven LA, Crisp MD, Gadek PA. 2006. Molecular systematic of *Syzygium* and allied genera (Myrtaceae): evidence from the chloroplast genome. *Taxon* 55: 79-94
- Bir SS, Gill BS, Bedi YS & Singhal VK. 1980. *Evolutionary status of the woody taxa of Garhwal Himalaya*. Khosla PK (ed.), Improvement of forest biomass 81-96. Indian Society of tree scientists, Solan (India).
- Bolkhovskikh Z, Matvejeva VG & Zakharyeva O. 1969. *Chromosome numbers of Flowering Plants*. Academy of Sciences to the USSR.
- Briggs BG. & Johnson LAS. 1979. Evolution in the *Myrtaceae*: evidence from inflorescence structure. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* 102: 155 - 256.

- Briggs BG. 1962. The New south Wales species of *Darwinia*. *Contr. N. S. Wales Natl. Herb.* 3: 129-150.
- Brighton CA & Ferguson IK. 1976. Chromosome counts in the genus *Melaleuca* (Myrtaceae). *Kew Bulletin* 31: 27-32.
- Carr GD. 1978. Chromosome numbers of Hawaiian flowering plants and the significance of cytology in selected taxa. *American Journal of Botany* 65: 236-242.
- Conti E, Litt A & Systma K. 1996. Circumscription of Myrtales and their relationships to other Rosids: evidences from rbcL sequence data. *American Journal of Botany* 83:221-233.
- Conti E, Litt A, Wilson P, Graham SA, Briggs BG, Johnson L & Systma K. 1997. Interfamilial relationships in Myrtales: Molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany* 22: 629-647.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006a. Chromosome studies in *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54: 409-415.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006b. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia* 59: 7-13.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2007a. Chromosome studies in species of *Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* and *Myrcia* (Myrtaceae, subtribe Myrciinae). *Kew Bulletin* 62: 113-118.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2007b. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 571-580.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2008. *Estudos cromossômicos em Myrtaceae: novos relatos de números cromossômicos e o papel da poliploidia na tribo Myrteae*. Capítulo 2.
- Costa IR, Dornelas MC & Forni-Martins ER. 2008. *Evolution of nuclear DNA contents among Neotropical Myrtaceae (fleshy-fruited Myrteae)*. Capítulo 5, publicado na Plant systematics and Evolution.
- Costa IR. 2004. *Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.
- Darlington CD & Wylie AP. 1955. *The chromosome atlas of flowering plants*. George Allen and Unwin Ltd., London.
- Dawson MI. 1987. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand

- flora – 29. Myrtaceae. *New Zealand Journal of Botany* 25: 367-369
- D'Cruz R & Rao GB. 1962. Cytogenetic studies in two guava aneuploids. *Journal of the Indian Botanical Society* 41: 316-321.
- De Candolle AP. 1828. Myrtaceae. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* 3, 207-296.
- Fernandes A. 1971. Contribution à la connaissance du genre *Heteropyxis* Harv. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 10, 207-234.
- Forni-Martins ER & Martins FR. 2000. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetics and Molecular Biology* 23: 947-955.
- Forni-Martins ER, Pinto-Maglio, CAP & Cruz ND. 1995. Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. *Revista Brasileira de Genética* 18: 281-288.
- Gadek, P. A., Wilson, P. G. & Quinn, C. J. 1996. Phylogenetic reconstruction in Myrtaceae using *matK*, with particular reference to the position of *Psiloxylon* and *Heteropyxis*. *Australian Systematic Botany* 9: 283-290.
- Gill BS, Bir SS, Sidha MS & Singhal VK. 1984. Chromosome number reports LXXXIV. *Taxon* 33: 536-539.
- Gill BS. 1974. *Polyploidy in the woody genus Eugenia (Myrtaceae)*. In: Kachroo P (ed.). *Adv. Front. Cytogenet* 348-356. Hindustan Publ. Co. Dehli.
- Gill BS. 1974. Polyploidy in the woody genus *Eugenia* (Myrtaceae). In Kachroo, P. (ed.) 'Advancing Frontiers in Cytogenetics', pp. 348-356. (Hindustan Publ. Corp: Delhi.)
- Goldblatt P & Johnson DE. 1990. Index to Plant Chromosome Numbers 1986–1987 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 30.
- Goldblatt P & Johnson DE. 1991. Index to Plant Chromosome Numbers 1988–1989 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 40.
- Goldblatt P & Johnson DE. 1994. Index to Plant Chromosome Numbers 1990–1991 (editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 51.
- Goldblatt P & Johnson DE. 1998. Index to Plant Chromosome Numbers 1994–1995 (editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 58.
- Goldblatt P & Johnson DE. 2000. Index to Plant Chromosome Numbers 1996–1997 (editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 81.
- Goldblatt P. 1981. Index to Plant Chromosome Numbers 1974–1978 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 6: 1–553.
- Goldblatt P. 1984. Index to Plant Chromosome Numbers 1979–1981 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 8.

- Goldblatt P. 1985. Index to Plant Chromosome Numbers 1982–1983 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 13.
- Goldblatt P. 1988. Index to Plant Chromosome Numbers 1984–1985 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 23.
- Goldblatt, P. 1979. Miscellaneous chromosome counts in angiosperms II, including new families and generic records. *Annals of the Missouri Botanic Garden* 66: 856-861.
- Govaerts R, Sobral M, Ashton P, Barrie F, Holst B, Landrum L, Lucas, E, Matsumoto, K, Mazine F, Proença, C, Soares-Silva, L, Wilson, P & NicLughdha, E. 2008. World Checklist of selected plant families – Myrtaceae. Kew Publishing.
- Graham, S. A., Oginuma, K., Raven, P. H. & Tobe, H. 1993. Chromosome numbers in *Sonneratia* and *Duabanga* (Lythraceae s.l.) and their systematic significance. *Taxon* 42: 35--41.
- Greco. 1929. Notizie preliminari sull'embriologia e la cariologia de *Myrtus communis* L. *Nuovo Giord. Bot. Ital.* 36: 57-59
- Griffin AR, Burgess IP & Wolf L. 1989. Patterns of natural and manipulated hybridization in the genus *Eucalyptus* L'Hérit. A review. *Australian Journal of Botany* 36: 41-66
- Haque MS. 1984. Chromosome morphology in four species of *Eucalyptus* L'Hér. *Cytologia* 49: 547-550.
- Harrington MG & Gadek PA. 2004 Molecular systematics of the *Acmena* alliance (Myrtaceae): phylogenetic analyses and evolutionary implications with reference to Australian taxa. *Australian Systematic Botany* 17, 63–72
- Hirano RT & Nakazone HY. 1969. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 94: 83-86.
- Huang S-F, Zhao Z-F, Chen Z-y, Chen AS-J & Huang X-x. 1985b. Preliminary report on chromosome numbers of plants. *Yaliu Keji (Asian Forest. Sci. Technol.)* 1: 1-15 (in chinese)
- Huang S-F, Zhao Z-F, Chen Z-y, Chen AS-J & Huang X-x. 1989. Chromosome counts on one hundred species and intraespecific taxa. *Acta. Bot. Austro Sin* 5: 161-176.
- Johnson, L. A. S. & Briggs, B. G. 1984. Myrtales and Myrtaceae – a phylogenetic analysis. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 71: 700-756.
- Kumar LSS & Ranade SG. 1952. Autotriploidy in guava (*Psidium guajava* Linn.). *Current Science* 21: 75-76.

- Ladiges PY, Udovicic F & Drinnan A.N. 1995. Eucalypt phylogeny – molecules and morphology. *Australian Systematic Botany* 8: 483–497.
- Landrum LR. 1981. A monograph of the genus *Myrceugenia* (Myrtaceae). *Flora Neotropica* 29: 1-137.
- Lange PJ & Murray BG. 2004. Chromosome numbers in *Kunzea* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 52: 609-617.
- Litt A. 1999. *Floral morphology and phylogeny of Vochysiaceae*. PhD dissertation. City University of New York, New York.
- Löve A. 1987. Chromosome number reports XCV. *Taxon* 36: 493-498.
- Lucas E, Belsham S, Nic Lughada E, Orlovich D, Sakuragui C, Chase M & Wilson P. 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251: 35-51.
- Lucas E, Harris AS, Mazine FF, Belsham SR, Nic Lughada EM, Telford A, Gasson PE & Chase M. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128.
- Maddison WP & Maddison DR. 2007. *Mesquite: A modular system for evolutionary analysis*. Version 2.01. <http://mesquiteproject.org>.
- Matsumoto ST, Marin-Morales MA, Ruas CF & Ruas PM. 2000. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Caryologia* 53: 205-212.
- Matsumoto ST, Marin-Morales MA. 2001. Paternity study of an interspecific natural hybrid of the genus *Eucalyptus* L'Hér (Myrtaceae) based on cytogenetic data. *Cytologia* 66: 437-443.
- McAulay AL, Cruickshank FD & Brett RG. 1936. Chromosome numbers of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus johnstonii*. *Nature* 138: 550.
- McAulay C. 1937a. Evidence for the existence of a natural hybrid between *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus ovata*. *Papers and Proc. Roy. Soc. Tasmania, 1937*: 45-46.
- McAulay C. 1937b. The male meiotic cycle in the genus *Eucalyptus*. *Papers and Proc. Roy. Soc. Tasmânia, 1937*: 41-44
- McKinnon GE, Steane DA, Potts BM & Vaillancourt RE. 1999. Incongruence between chloroplast and species phylogenies in *Eucalyptus* subgenus *Monocalyptus* (Myrtaceae). *Amer. J. Bot.* 86: 1038 - 1046.
- McVaugh R. 1956. Tropical American Myrtaceae. Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. *Fieldiana: Botany* 29, 3.

- McVaugh R. 1968. The genera of American Myrtaceae – An interim report. *Taxon* 17: 354-418.
- Mehra PN & Khosla PK. 1969. IOPB chromosome number reports XX. *Taxon* 18, 213-221.
- Mehra PN & Khosla PK. 1972. Cytogenetical studies of East Himalayan Hamamelidaceae, Combretaceae and Myrtaceae. *Silvae Gene* 21: 186-190.
- Mehra PN. 1976. IOPB Chromosome number reports LIV. *Taxon* 25: 631-349.
- Merwe MM, Wyk AE & Botha AM. 2005. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. *Plant systematics and Evolution* 251: 21-34.
- Moore RJ. 1973. Index to Plant Chromosome Numbers for 1967-1971 (editor). *Regnum Veg.* 90: 1-539.
- Moore RJ. 1974. Index to Plant Chromosome Numbers for 1972 (editor). *Regnum Veg.* 91: 1-108.
- Moore RJ. 1977. Index to Plant Chromosome Numbers for 1973-1974 (editor). *Regnum Veg.* 96. 1-257.
- Moussel B. 1965. Contribution à l'étude cyto-taxinomique des Myrtacées. *Mémoires du Museum National d'Histoire Naturelle. Serie B. Botanique* 16, 1: 91-125.
- Niendenzu F. 1893. Myrtaceae: In: Egler, A . & Prantl, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien 3: 57-105.
- O'Brien SP & Calder DM. 1993. Reproductive biology and floral phenologies of the sympatric species *Leptospermum myrsinoides* and *L. continentale* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 41: 527-239
- Oginuma H, Kato A, Tobe H, Mathenge SG & Juma FD. 1993. Chromosomes of some woody plants in Kenya. *Acta. Phytotax. Geobot* 44: 53-58
- Oginuma H, Sun KY, Lee YH & Tobe H. 1992. Karyomorphology of some Myrtaceae from Singapore. *Gard. Bull. Singapore* 44: 135-139
- Parra-O C, Baylyl M, Udovicic F & Ladiges P. 2006. ETS sequences support the monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* (Myrtaceae). *Taxon* 55: 653–663.
- Pedrosa A, Gitaí J, Barros e Silva AE, Felix LP & Guerra M. 1999. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Botanica Brasilica* 13: 49-60.
- Raven P. 1975. The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62: 724 - 764.

- Roy RP & Jha. 1962. Cytological studies in Myrtaceae. *Proc. 49th. Indian Sci. Congr. Pt3*, abstracts 336.
- Ruggeri C. 1959. Numero cromosomico di *Eucalyptus x trabulti* Vilmerin (Myrtaceae). *Proc. IX. Internatl. Bot. Congr. 2*. abstracts: 260-261
- Ruggeri C. 1960a. Il numero cromosomico di *Eucalyptus x trabulti* Vilmorin (Myrtaceae). *Pubbl. Cent. Sper. Agric. For. Rome 4*: 39-44.
- Ruggeri C. 1960b. Primo contributo alla conoscenza cariologica del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Pubbl. Cent. Sper. Agric. For. Rome 4*: 121-126.
- Ruggeri C. 1960c. Secondo contributo alla conoscenza cariologica del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Pubbl. Cent. Sper. Agric. For. Rome 4*: 139-150.
- Ruggeri C. 1960d. Il numero cromosomico di *Eucalyptus flocktoniae* Maiden (Myrtaceae). *Pubbl. Cent. Sper. Agric. For. Rome 4*: 211-223.
- Ruggeri C. 1960e. Nuovo contributo alla cariologia del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Nuovo Giord. Bot. Ital.* 67: 613-614
- Ruggeri C. 1962. Terzo contributo alla conoscenza cariologica del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Pubbl. Cent. Sper. Agric. For. Rome 6*: 39-45.
- Ruggeri C. 1961. Contributo alla cariologia del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Caryologia* 14: 11-120.
- Rye B. 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. *Australian Journal of Botany* 27: 547-573.
- Sale, M. M., Potts, B. M., West, A. K. & Reid, J. B. 1993. Relationships within *Eucalyptus* using chloroplast DNA. *Austral. Syst. Bot.* 6: 127-138.
- Sale, M., Potts, B. M., West, A. K. & Reid, J. B. 1996. Relationships within *Eucalyptus* using PCR-amplification and southern hybridization of chloroplast DNA. *Austral. Syst. Bot.* 9: 273-282.
- Sanders RW, Stuessy TF & Rodríguez R. 1983. Chromosome numbers from the flora of the Juan Fernandez Islands. *American Journal of Botany* 70(6): 799-810.
- Sandhu PS & Mann SK. 1988. SOGGI plant chromosome number reports VIII. *J. Cytol. Genet* 23: 219-228
- Sarkar AK, Datta N, Chatterjee V & Hazra D. 1982. IOPB Chromosome number reports LXXV. *Taxon* 31: 576-579
- Schmid R. 1972. A resolution of the *Eugenia-syzygium* controversy (Myrtaceae). *American Journal of Botany* 59: 423-436.
- Schmid R. 1980. Comparative anatomy and morphology of *Psiloxylon* and

- Heteropyxis*, and the subfamilial and tribal classification of Myrtaceae. *Taxon* 29: 559-595.
- Singhal VK, Gill BS & Bir SS. 1984. Cytology of cultivated woody species (Polypetalae). Proceedings of the Indian Science Congress Association 71(3-VI), 143-144.
- Singhal VK, Gill BS & Bir SS. 1985. Cytology of woody species. *Proc. Indian Acad. Sci (Plant Sci.)* 94: 607-617.
- Singhal VK, Gill BS & Bir SS. 1980. Chromosome number reports LXVII. *Taxon* 29: 355-357.
- Smith-White S. 1942. Cytological studies in the Myrtaceae. I. Microsporogenesis in several genera of the tribe Leptospermoideae. *Proc. Linn. Soc. N.S. W.* 67: 335-42.
- Smith-White S. 1948. Cytological studies in the Myrtaceae. 11. Chromosome numbers in the Leptospermoideae and Myrtoideae. *Proc. Linn. Soc. N.S. W.* 73: 16-36.
- Smith-White S. 1950. Cytological studies in the Myrtaceae. 111. Cytology and phylogeny in the Chamaelaucioideae. *Proc. Linn. Soc. N.S. W.* 75: 99-121.
- Smith-White S. 1954. Cytological studies in the Myrtaceae. IV. The sub-tribe Euchamaelaucinae. *Proc. Linn. Soc. N.S. W.* 79: 21-8.
- Smith-White S. 1959. Cytological evolution in the Australian flora. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 24: 273-89.
- Srivastava HC. 1970. Chromosome studies in *Psidium molle* Bertol. *Science & Culture* 36: 177.
- Srivastava HC. 1977. Cytological studies in *Psidium friedrichstalianum* Niedenzu. *Cytologia* 42: 395-400.
- Stace CA. 1991. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2nd Edition, University Press: Cambridge.
- Steane DA, McKinnon GE, Vaillancourt RE & Potts BM. 1999. ITS sequence data resolve higher level relationships among the eucalypts. *Molec. Phylog. Evol.* 12: 215-223.
- Steane DA, Nicolle D, McKinnon GE, Vaillancourt RE & Potts BM. 2002. Higher level relationships among the eucalypts are resolved by ITS-sequence data. *Austral. Syst. Bot.* 5: 49-62.
- Sugiura. 1931. A list of chromosome numbers in angiosperms plants. *Bot. Mag. (Tokyo)* 45: 353-355

- Sugiura. 1936a. A list of chromosome numbers in angiosperms plants II. *Proc. Imp. Acad. Tokyo* 12: 144-146
- Sun BY, Stuessy TF & Crawford DJ. 1990. Chromosome counts from the flora of the Juan Fernandez Islands, Chile III. *Pacific Science* 44: 258-264.
- Thompson J. 1989. A revision of the genus *Leptospermum* (Myrtaceae). *Telopea* 3: 301-449
- Tyagi AP, McComb J & Considine J. 1991. Cytogenetic and pollination studies in the genus *Verticordia* DC. *Australian Journal of Botany* 39: 261-272.
- Udovic F & Ladiges P. 2000. Informativeness of nuclear and chloroplast DNA regions and the phylogeny of the eucalypts and related genera (Myrtaceae). *Kew Bulletin* 55: 633-645.
- Udovic F, McFadden GI & Ladiges P. 1995. Phylogeny of *Eucalyptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 4: 247-256.
- Vijayakumar N & Subramanian D. 1985. Cytotaxonomical studies in South Indian Myrtaceae. *Cytologia* 50: 513-520.
- Wilson P, O'Brien MM, Gadek PA & Quinn CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of interfamilial groups. *American Journal of Botany* 88: 2013-2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM & Quinn CJ. 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: 3-19.

Tabela 1. Caracteres diagnósticos das duas atuais subfamílias de Myrtaceae, de acordo com Wilson *et al.* (2005).

Caracteres diagnósticos	MYRTOIDEAE	PSILOXYLOIDEAE
Fenótipo sexual	Homóicas	Dióicas
Disposição das folhas	Espiraladas ou opostas	Espiralada
Conteúdo das cavidades secretoras	Óleos essenciais	Óleos essenciais, exceto em <i>Psiloxylon</i>
Estames	Inflexos no botão	Não inflexos no botão
Anteras	Biloculares	Tetraloculares
Sacos embrionários	Tipo <i>Polygonum</i>	Tipo <i>Allium</i>
Número cromossômico básico (<i>x</i>)	11	12

Tabela 2. Quantidade de determinações de números cromossômicos em cada uma das tribos na subfamília Myrtoideae (sensu Wilson *et al.* 2005) ao longo dos anos. Os números entre parênteses representam o número de gêneros conhecidos do ponto de vista cromossômico / número total de gêneros na tribo.

TRIBO (número de gêneros)	até 1930	1931-40	1941-50	1951-60	1961-70	1971-80	1981-90	1991-00	2001-07	Total geral
Backhousieae (1/2)			3			5				8
Chamelaucieae (18/23)			20	41	13	85	51	51		293
Eucalypteae (3/7)		18	45	8	4	1	23	7	59	201
Kanieae (1/8)			1							1
Leptospermeae (3/8)			18	2	1	1	21	2	6	51
Lophostemoneae (1/4)			1							1
Melaleuceae (9/6)			35		1	73	3	4		116
Metrosidereae (1/4)						3	13			16
Myrteae (24/47)	1	1	8	2	21	8	27	6	67	159
Syncarpieae (1/1)			1							1
Syzygieae (1/5)		3	2	1	9	17	9	6		47
Total geral	1	22	134	54	76	242	147	76	150	902

Tabela 3. Distribuição geral do dos números cromossômicos diplóides (2x) e poliplóides (3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x) nas diferentes tribos em Myrtaceae. A circunscrição das tribos segue Wilson *et al.* (2005). Nesta tabela foram incluídos todos os registros de um único número cromossômico, ou seja, os citótipos não estão incluídos. *x*: número cromossômico básico, NE: número total de espécies com número cromossômico determinado em cada tribo. Os registros da última linha referem-se a gêneros não incluídos em nenhuma das tribos *sensu* Wilson *et al.* (2005).

Tribos	2x								3x			4x					5x	6x	8x	NE	
	<i>x</i>	5	6	7	8	9	10	11	12	6	8	11	5	6	7	8	11	11	11		11
Backhouseiae								2													2
Chamelaucieae	1	27	4	13	18	1	38	1	12	1				1	1	12		12			142
Eucalypteae								121	6		6			6	1						140
Kanieae								1													1
Leptospermeae	1							24	1		1			1				4			32
Lophostemoneae								1													1
Melaleuceae					4		2	38	2		2	2	2	2				2			56
Metrosidereae								15													15
Myrteae								74			2					1		5	1	2	85
Syncarpieae								1													1
Syzygieae								13										1	2		16
(<i>inserta sedis</i>)								1	1				1								3
Total geral	2	27	4	17	18	4	329	10	12	10	4	3	10	1	1	13		24	3	2	494

Tabela 4. Distribuição geral dos números cromossômicos básicos em Myrtaceae sem considerar a ocorrência dos citótipos poliplóides. Os números representam valores absolutos e entre os parênteses valores relativos. %P: Percentual de ocorrência da poliploidia.

Tribo / x	5	6	7	8	9	10	11	12	Total (%)	% P	Ploidia
Backhousieae							2 (0,4)		2 (0,4)	0.0	2x
Chamelaucieae	1 (0,2)	40 (8,1)	4 (0,8)	15 (3,0)	18 (3,6)	1 (0,2)	62 (12,6)	1 (0,2)	142 (28,7)	7.9	2x, 3x, 4x, 5x
Eucalypteae		6 (1,6)	1 (0,2)	6 (1,2)			121 (24,5)	6 (1,2)	140 (28,3)	2.6	2x, 4x
Kanieae							1 (0,2)		1 (1)	0.0	2x
Leptospermeae	1 (0,2)	1 (0,2)		1 (0,2)			28 (5,7)	1 (0,2)	32 (6,5)	1.2	2x, 3x, 4x, 5x
Lophostemoneae							1 (0,2)		1 (0,2)	0.0	2x
Melaleuceae	2 (0,4)	2 (0,4)		6 (1,2)		2 (0,4)	42 (8,5)	2 (0,4)	56 (11,3)	2.0	2x, 3x, 4x, 6x
Metrosidereae							15 (3,0)		15 (3,0)	0.0	2x
Myrteae							85 (17,2)		85 (17,2)	2.2	2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 8x
Syncarpieae							1 (0,2)		1 (0,2)	0.0	2x
Syzygieae							16 (3,2)		16 (3,2)	0.6	2x, 4x, 5x, 6x
(<i>inserta sedis</i>)	1 (0,2)					1 (0,2)	1 (0,2)		3 (0,6)	0.2	2x
Total geral	5 (1,0)	49 (9,9)	5 (1,0)	28 (5,7)	18 (3,6)	4 (0,8)	375 (75,9)	10 (2,0)	494 (100,0)	16.8	

Tabela 5. Distribuição da incidência de citótipos poliplóides em relação a $x = 11$, nas diferentes tribos de Myrtaceae. As tribos que não aparecerem na tabela não apresentaram citótipos ou estudos são inexistentes. Os números entre parênteses referem-se ao número absoluto de registros de cada série poliplóide.

Tribo	Poliploidia		Displóidia	
	Total	%	Total	%
Myrteae	11	39.3	1	14.3
Chamelaucieae	8	28.6	1	14.3
Syzygieae	4	14.3	3	42.7
Melaleuceae	3	10.7	2	28.6
Leptospermeae	2	7.1	0	0
Total geral	28	100	7	100

Tabela 6. Espécies de Myrtaceae com mais de um número cromossômico (citótipos). A circunscrição das tribos segue Wilson *et al.* (2005). As espécies seguidas por (*) apresentam variações displóides. (x) número cromossômico básico.

TRIBO	2n	Ploidia (x)	Referência
Gênero (x)			
Espécie			
CHAMELAUCIEAE			
<i>Baeckea</i> (x = 11)			
<i>preissiana</i> (Schauer) Druce	22, 44	2x, 4x	33
<i>Calytrix</i> (x = 11)			
<i>flavescens</i> A.Cunn.	22, 44	2x, 4x	33
<i>fraseri</i> A.Cunn.	22, 44	2x, 4x	33, 40
<i>Chamelaucium</i> (x = 11)			
<i>ciliatum</i> Desf.	22, 44, 66	2x, 4x, 6x	33
<i>Darwinia</i> (x = 7)			
<i>diosmoides</i> (DC.) Benth.	14, 28	2x, 4x	33, 41
<i>Hypocalymma</i> (x = 11)			
<i>angustifolium</i> (Endl.) Schauer	22, 44	2x, 4x	33
<i>Malleostemon</i> (x = 11)			
<i>roseus</i> (E.Pritz.) J.W.Green	22, 44	2x, 4x	33
(como <i>Mycromyrtus rosea</i> (E. Pritzel) S. Moore)			
<i>tuberculatus</i> (E.Pritz.) J.W.Green	22, 44	2x, 4x	33
(como <i>Thryptomene tuberculata</i> E. Pritzel)			
<i>Thryptomene</i> (x = 9)			
<i>baeckeacea</i> F.Muell.	18, 36	2x, 4x	33
<i>Verticordia</i> (x = 6, 8)			
<i>brownii</i> (Desf.) A.Cunn. ex DC.	12, 18	2x, 3x	14, 41, 44
<i>chrysanthella</i> A. S. George	16, 32	2x, 4x	14, 44
<i>densiflora</i> Lindl.	12, 24	2x, 4x	14, 33, 44
<i>habrantha</i> Schauer	18, 36	2x, 4x	14, 33, 41, 44
<i>monadelpha</i> Turcz.	12, 18, 36	2x, 4x, 6x	14, 33, 41, 44
EUCALYPTEAE			
<i>Corymbia</i> (x = 11)			
<i>citriodora</i> (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22, 44	2x, 4x	1, 2, 18, 20, 21, 39, 45
(como <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.)			
LEPTOSPERMEAE			
<i>Kunzea</i> (x = 11)			
<i>ericoides</i> (A.Rich.) Joy Thomps.	22, 44	2x, 4x	14, 23, 29
<i>Leptospermum</i> (x = 11)			
<i>roei</i> Benth.	22, 44	2x, 4x	33, 43
MELALEUCEAE			
<i>Callistemon</i> (x = 11)			
<i>linearis</i> (Sm.) Colv. ex Sweet	22, 33, 44	2x, 3x, 4x	38, 39
<i>pinifolius</i> (J.C.Wendl.) Sweet*	22, 30, 33	2x, 3x	39
<i>rigidus</i> R.Br.	22, 44	2x, 4x	39
<i>Melaleuca</i> (x = 11)			
<i>lanceolata</i> Otto*	22, 24	2x	5

<i>rhaphiophylla</i> Schauer	22, 44	2x, 4x	5
<i>teretifolia</i> Endl.	22, 66	2x, 6x	5, 33
MYRTEAE			
<i>Decaspermum</i> (x = 11)			
<i>parviflorum</i> (Lam.) A.J.Scott subsp. <i>parviflorum</i> (como <i>Decaspermum paniculatum</i> Duth.)	44, 88	4x, 8x	24, 26, 27
<i>Eugenia</i> (x = 11)			
<i>dysenterica</i> DC.	22, 33	2x, 3x	8, 15
<i>hyemalis</i> Cambess.	22, 44	2x, 4x	8
<i>pitanga</i> (O.Berg) Nied.	22, 44	2x, 4x	8
<i>punicifolia</i> (Kunth) DC.	22, 33	2x, 3x	8
<i>pyriformis</i> Cambess.	22, 33	2x, 3x	8
<i>uniflora</i> L. (como <i>Eugenia costata</i> Cambess.)	22, 33	2x, 3x	8, 29, 35, 36, 37
<i>Gomidesia</i> (x = 11)			
<i>ericalyx</i> (DC.) O. Berg	22, 44	2x, 4x	10
<i>Psidium</i> (x = 11)			
<i>cattleianum</i> Afzel. ex Sabine	44, 66, 77, 88	4x, 6x, 7x, 8x	1, 9, 12, 19, 35
<i>friedrichsthalianum</i> (O.Berg) Nied.	22, 44	2x, 4x	11, 19, 28, 42
<i>guajava</i> L.*	21, 22, 30, 33, 44	2x, 3x, 4x	1, 9, 13, 19, 21, 22, 28, 35, 42, 45
SYZYGIEAE			
<i>Syzygium</i> (x = 11)			
<i>aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry (como <i>Eugenia caryophyllata</i> Thumb.)	22, 44	2x, 4x	30, 45
<i>cumini</i> (L.) Steels* (como <i>Eugenia jambolana</i> Lam. e / ou <i>Eugenia cumini</i> Merr.)	22, 33, 42, 44, 46, 55, 66	2x, 3x, 4x, 5x, 6x	3, 4, 16, 24, 25, 26, 32, 36, 37,45
<i>jambos</i> (L.) Alston* (como <i>Eugenia jambosa</i>)	28, 33, 42, 44, 46, 54, 66	3x, 4x, 6x	6, 7, 17, 30, 31, 32, 46
<i>samarangense</i> (Blume) Merr. & L.M.Perry* (como <i>Eugenia javanica</i> Lam.)	42, 44, 110	4x, 11x	46

1- Atchison 1947; **2-** Bedi *et al.* 1989; **3-** Bhaduri 1949; **4-** Bir *et al.* 1980; **5-** Brighton & Ferguson 1976; **6-** Chen 1993; **7-** Chen *et al.* 1985; **8-** Costa & Forni-Martins 2006a; **9-** Costa & Forni-Martins 2006b; **10-** Costa & Forni-Martins 2007a; **11-** Costa & Forni-Martins, *unpublished*; **12-** Costa *et al.* 2008; **13-** D´Cruz & Rao 1962; **14-** Dawson 1987; **15-** Dornelas *et al.*, *unpublished*; **16-** Gill 1973; **17-** Goldblatt 1981; **18-** Haque 1984; **19-** Hirano & Nakazone 1969; **20-** Huang *et al.* 1985; **21-** Huang *et al.* 1989; **22-** Kumar & Ranade 1952; **23-** Lange & Muray 2004; **24-** Mehra & Khosla 1969; **25-** Mehra & Khosla 1972; **26-** Mehra 1972; **27-** Mehra 1976; **28-** Molero *et al.* 2006; **29-** Moussel 1965; **30-** Oginuma *et al.* 1992; **31-** Oginuma *et al.* 1993; **32-** Roy & Jha 1962; **33-** Rye 1979; **34-** Singhal & Gill 1984; **35-** Singhal *et al.* 1980; **36-** Singhal *et al.* 1984; **37-** Singhal *et al.* 1985; **38-** Smith-White 1942; **39-** Smith-White 1948; **40-** Smith-White 1950; **41-** Smith-White 1954, **42-** Srivastava 1977; **43-** Thompson 1989; **44-** Tyagi *et al.* 1991; **45-** Vijayakumar & Subramanian 1985; **46-** Van der Pijl 1934.

Apêndice. Lista com os taxa cujos números cromossômicos foram compilados em literatura. A circunscrição das tribos com os seus respectivos gêneros segue Wilson *et al.* (2005). Os epítetos seguem as sinonimizicações conforme Govaerts *et al.* (2008)

TRIBO

Gênero

Espécie

2n

SUB-FAMÍLIA PSYLOXILOIDEAE

HETEROPYXIEAE

Heteropyxis 12

Heteropyxis sp.

PSILOXYLEAE

Psiloxylon

mauritanum (Bouton ex Hook.f.) Baill. 12

SUB-FAMÍLIA MYRTOIDEAE

BACKHOUSIEAE

Backhousia

citriodora F.Muell. 22

myrtifolia Hook. & Harv. 22

CHAMELAUCIEAE

Actinodium

cunninghamii Schauer ex Lindl 12

Astartea

clavulata Turcz. 44

Baeckea

crispiflora (F.Muell.) F.Muell. 44

densifolia (Sm.) F.Muell. 22

diosmifolia Rudge 22

elderiana Pritz. 22

grandiflora Benth. 22

grandis Pritz. 22

imbricata (Gaertn.) Druce 22

leptophylla (Turcz.) Domin 44

linifolia Rudge 22

pentagonantha F.Muell. 44

preissiana (Schauer) Druce 22, 44

virgata (J.R.Forst. & G.Forst.) F.Muell. 44

Calythropsis

ecalycata Craven 22

Calytrix

brevifolia (Meisn.) Benth. 22

breviseta subsp. *stipulosa* (W.Fitzg.) Craven 22

decandra DC. 22

flavescens A.Cunn. 22, 44

fraseri A.Cunn. 22, 44

<i>glutinosa</i> Lindl.	22
<i>gracilis</i> Benth.	22
<i>leschenaultii</i> (Schauer) Benth.	22, 44
<i>longiflora</i> (F.Muell.) Benth.	44
<i>sapphirina</i> Lindl.	22
<i>strigosa</i> A.Cunn.	22
<i>tetragona</i> Labill.	22
<i>Chamelaucium</i>	
<i>axillare</i> F.Muell. ex Benth.	22
<i>brevifolium</i> Benth.,	22
<i>ciliatum</i> Desf.	22, 44, 66
<i>drummondii</i> (Turcz.) Meisn.	22
<i>pauciflorum</i> (Turcz.) Benth.	22
<i>uncinatum</i> Schauer	18, 22
<i>Darwinia</i>	
<i>biflora</i> (Cheel) B.G.Briggs	12
<i>camptostylis</i> B.G.Briggs	12
<i>carnea</i> C.A.Gardner	12
<i>citriodora</i> (Endl.) Benth.	12
<i>collina</i> Gardner	12
<i>diminuta</i> B.G.Briggs	12
<i>diosmoides</i> (DC.) Benth.	14, 28
<i>fascicularis</i> Rudge	12
<i>glaucophylla</i> B.G.Briggs	12
<i>grandiflora</i> (Benth.) R.T.Baker & H.G.Sm.	12
<i>helichrysoides</i> (Meisn.) Benth.	24
<i>hypericifolia</i> (Turcz.) Domin	12
<i>leiosyla</i> (Turcz.) Domin	12
<i>leptantha</i> B.G.Briggs	12
<i>macrostegia</i> (Turcz.) Benth.	12
<i>meeboldii</i> C.A.Gardner	12
<i>micropetala</i> (F.Muell.) Benth.	14
<i>neildiana</i> F.Muell.	12
<i>oederoides</i> (Turcz.) Benth.	10
<i>oldfieldii</i> Benth.	12
<i>oxylepis</i> (Turcz.) N.G.Marchant & Keighery	12
<i>pauciflora</i> Benth.	18
<i>peduncularis</i> B.G.Briggs	12
<i>pinifolia</i> (Lindl.) Benth.	14
<i>procera</i> B.G.Briggs	12
<i>purpurea</i> (Endl.) Benth.	14
<i>sanguinea</i> (Meisn.) Benth.	12
<i>speciosa</i> (Meisn.) Benth.	12, 42
<i>squarrosa</i> (Turcz.) Domin	12
<i>taxifolia</i> A.Cunn.	12

<i>vestita</i> (Endl.) Benth.	18
<i>Euryomyrtus</i>	
<i>maidenii</i> (Ewart & Jean White) Trudgen	22
<i>ramosissima</i> (A.Cunn.) M.E.Trudgen subsp. <i>ramosissima</i>	22
<i>Homalocalyx</i>	
<i>coarctatus</i> (F.Muell.) Craven	22
<i>thryptomenoides</i> (F.Muell.) Craven	22
<i>Homoranthus</i>	
<i>darwinioides</i> (Maiden & Betche) Cheel	18
<i>flavescens</i> Schauer	18
<i>virgatus</i> A.Cunn. ex Schauer	18
<i>Hypocalymma</i>	
<i>angustifolium</i> (Endl.) Schauer	22, 44
<i>robustum</i> (Endl.) Lindl.	22
<i>xanthopetalum</i> F.Muell.	22
<i>Lhotskya</i>	
<i>acutifolia</i> (Lindl.) Craven	22
<i>Malleostemon</i>	
<i>hursthusei</i> (W.Fitzg.) J.W.Green	44
<i>roseus</i> (E.Pritz.) J.W.Green	22, 44
<i>tuberculatus</i> (E.Pritz.) J.W.Green	22, 44
<i>Micromyrtus</i>	
<i>ciliata</i> (Sm.) Druce	22
<i>obovata</i> (Turcz.) J.W.Green	22
<i>racemosa</i> Benth.	22
<i>Pileanthus</i>	
<i>peduncularis</i> Endl.	22
<i>filifolius</i> Meisn.	22
<i>limacis</i> Labill.	22
<i>Scholtzia</i>	
<i>drummondii</i> Benth.	44
<i>obovata</i> (DC.) Schauer	22
<i>parviflora</i> F.Muell.	22
<i>umbellifera</i> F.Muell.	22
<i>Thryptomene</i>	
<i>australis</i> Endl.,	44
<i>baeckeacea</i> F.Muell.,	18, 36
<i>calycina</i> (Lindl.) Stapf	22
<i>denticulata</i> (F.Muell.) Benth.,	44
<i>hyporhytis</i> Turcz.,	22
<i>maisonneuvei</i> (F.Muell.) Rye & Trudgen	22
<i>mucronulata</i> Turcz.	22
<i>saxicola</i> (A.Cunn. ex Hook.) Schauer	22
<i>stenophylla</i> E.Pritz.,	22
<i>strongylophylla</i> F.Muell. ex Benth.,	20

<i>wittweri</i> J.W.Green	12
<i>Verticordia</i>	
<i>acerosa</i> Lindl.	16
<i>argentea</i> A.S.George	22
<i>attenuata</i> A.S.George	22
<i>aurea</i> A.S.George	16
<i>bifimbriata</i> A.S.George	22
<i>blepharophylla</i> A.S.George	22
<i>brachypoda</i> Turcz.	16
<i>brownii</i> (Desf.) A.Cunn. ex DC.	12, 18
<i>chrysantha</i> Endl.	32
<i>chrysanthella</i> A.S.George	16, 32
<i>chrysostachys</i> Meisn.	22
<i>cooloomia</i> A.S.George	16
<i>densiflora</i> Lindl.	12, 22, 24
<i>dichroma</i> A.S.George	22
<i>drummondii</i> Schauer	22
<i>endlicheriana</i> Schauer	16
<i>etheliana</i> C.A.Gardner	22
<i>fastigiata</i> Turcz.	12
<i>fimbrilepis</i> Turcz.	18
<i>forrestii</i> F.Muell.	22
<i>fragrans</i> A.S.George	22
<i>grandiflora</i> Endl.	12
<i>grandis</i> J.Drumm.	44
<i>habrantha</i> Schauer	18, 36
<i>helichrysantha</i> F.Muell. ex Benth.	22
<i>huegelii</i> Endl.	16
<i>hughanii</i> F.Muell.	22
<i>humilis</i> Benth.	16
<i>insignis</i> Endl.	18
<i>lepidophylla</i> F.Muell.	22
<i>lindleyi</i> Schauer	22
<i>luteola</i> A.S.George	22
<i>minutiflora</i> F.Muell.	16
<i>mitchelliana</i> C.A.Gardner	18
<i>monadelpha</i> Turcz.	12, 18, 36
<i>muelleriana</i> E.Pritz.	22
<i>multiflora</i> Turcz.	16
<i>nitens</i> (Lindl.) Endl.	16
<i>nobilis</i> Meisn.	12
<i>oculata</i> Meisn.	22
<i>ovalifolia</i> Meisn.	22
<i>oxylepis</i> Turcz.	16
<i>paludosa</i> A.S.George	22

<i>patens</i> A.S.George	16
<i>penicillaris</i> F.Muell.	18
<i>pennigera</i> Endl.	22, 44
<i>pholidophylla</i> F.Muell.	22
<i>picta</i> Endl.	22
<i>plumosa</i> (Desf.) Druce	22
<i>polytricha</i> Benth.	12
<i>pritzelii</i> Diels	18
<i>pulchella</i> A.S.George	18
<i>roei</i> Endl.	18
<i>serrata</i> (Lindl.) Schauer	14
<i>spicata</i> F.Muell.	22
<i>staminosa</i> C.A.Gardner & A.S.George	16
<i>tumida</i> A.S.George	22
<i>venusta</i> A.S.George	22
EUCALYPTEAE	
<i>Angophora</i>	
<i>costata</i> (Gaertn.) Hochr. ex Britten	22
<i>floribunda</i> (Sm.) Sweet	22
<i>hispidata</i> (Sm.) Blaxell	22
<i>subvelutina</i> F.Muell.	22
<i>Corymbia</i>	
<i>foelscheana</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>bleeseri</i> (Blakely) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>bloxsomei</i> (Maiden) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>calophylla</i> (R.Br. ex Lindl.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>citriodora</i> (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	20, 22, 28, 44
<i>dichromophloia</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>ferruginea</i> (Schauer) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>ficifolia</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>gummifera</i> (Gaertn.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>jacobsiana</i> (Blakely) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>latifolia</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>maculata</i> (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>nesophila</i> (Blakely) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>peltata</i> (Benth.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>polycarpa</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>ptychocarpa</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>setosa</i> (Schauer) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>terminalis</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>torelliana</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>trachyphloia</i> (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson	22
<i>Eucalyptus</i>	
<i>aggregata</i> H.Deane & Maiden	22
<i>alba</i> Reinw. ex Blume	22

<i>albens</i> Benth	22
<i>amplifolia</i> Naudin	22
<i>amygdalina</i> Labill.	22
<i>angulosa</i> Schauer	22
<i>argillacea</i> W.Fitzg. ex Maiden	22
<i>astringens</i> (Maiden) Maiden	22
<i>behriana</i> F.Muell.	22
<i>bicolor</i> A.Cunn. ex Hook.	24
<i>botryoides</i> Sm.	22
<i>brassiana</i> S.T.Blake	22
<i>bridgesiana</i> F.Muell. ex R.T.Baker	22
<i>brockwayi</i> C.A.Gardner	22
<i>caleyi</i> Maiden	22
<i>calycogona</i> Turcz.	22
<i>camaldulensis</i> Dehnh.	22
<i>cameronii</i> Blakely & McKie	22
<i>capitellata</i> Sm.	22
<i>cinerea</i> F.Muell. ex Benth.	22
<i>cladocalyx</i> F.Muell.	22, 24
<i>cloeziana</i> F.Muell.	22
<i>conglobata</i> (Benth.) Maiden	22
<i>contracta</i> L.A.S.Johnson & K.D.Hill	22
<i>cordata</i> Labill.	22
<i>cornuta</i> Labill.	22
<i>crebra</i> F.Muell.	22
<i>cullenii</i> Cabbage	22
<i>dalrympleana</i> Maiden	22
<i>deanei</i> Maiden	22
<i>decorticans</i> (F.M.Bailey) Maiden	22
<i>deglupta</i> Blume	22
<i>delegatensis</i> F.Muell. ex R.T.Baker	22
<i>diversicolor</i> F.Muell.	23
<i>dives</i> Schauer	22
<i>dunnii</i> Maiden	22
<i>erythrocoris</i> F.Muell.	22
<i>erythronema</i> Turcz.	22, 24
<i>fastigata</i> H.Deane & Maiden	22
<i>flocktoniae</i> (Maiden) Maiden	22, 24
<i>forrestiana</i> Diels	24
<i>gardneri</i> Maiden	22
<i>globoidea</i> Blakely	22
<i>globulus</i> Labill.	20, 22, 28
<i>gomphocephala</i> A.Cunn. ex DC.	22
<i>goniocalyx</i> F.Muell. ex Miq.	22
<i>grandis</i> W.Hill	22, 32

<i>griffithsii</i> Maiden	22
<i>gunnii</i> Hook.f.	22
<i>haemastoma</i> Sm.	22
<i>incrassata</i> Labill.	22
<i>jenseni</i> Maiden	22
<i>johnstonii</i> Maiden	22
<i>laevopinea</i> F.Muell. ex R.T.Baker	22
<i>lansdowneana</i> F.Muell. & J.E.Br. in J.E.Brown	22
<i>lehmannii</i> (Schauer) Benth	22
<i>lesouefii</i> Maiden	22
<i>longifolia</i> Link	22
<i>macarthurii</i> H.Deane & Maiden	22
<i>macrorhyncha</i> F.Muell. ex Benth.	22
<i>mannensis</i> Boomsma	22
<i>marginata</i> Donn ex Sm.	22
<i>megacarpa</i> F.Muell.	22
<i>megacornuta</i> C.A.Gardner	22
<i>melanophloia</i> F.Muell.	22
<i>melliodora</i> A.Cunn. ex Schauer	22
<i>microcorys</i> F.Muell.	22
<i>microneura</i> Maiden & Blakely	22
<i>moluccana</i> Wall. ex Roxb.,	22
<i>nitens</i> (H.Deane & Maiden) Maiden,	22
<i>nova-anglica</i> H.Deane & Maiden	22
<i>obliqua</i> L'Hér.	22, 28
<i>occidentalis</i> Endl.	22
<i>odontocarpa</i> F.Muell.	22
<i>oligantha</i> Schauer in W.G.Walpers	22
<i>ovata</i> Labill.	22
<i>paniculata</i> Sm.	22
<i>pauciflora</i> Sieber ex Spreng.	22
<i>pilularis</i> Sm.	22
<i>planchoniana</i> F.Muell.	22
<i>polyanthes</i> Schauer	22
<i>preissiana</i> Schauer	22
<i>propinqua</i> H.Deane & Maiden	22
<i>pulchella</i> Desf.	22
<i>pulverulenta</i> Sims	22
<i>punctata</i> A.Cunn. ex DC.	22
<i>pyriformis</i> Turcz.	24
<i>racemosa</i> subsp. <i>racemosa</i>	22
<i>redunca</i> Schauer in J.G.C.Lehmann	24
<i>resinifera</i> Sm.	22
<i>robusta</i> Sm	28
<i>rubida</i> H.Deane & Maiden	22

<i>rudis</i> Endl.	22
<i>saligna</i> Sm.	22
<i>shirleyi</i> Maiden	22
<i>siderophloia</i> Benth.	22
<i>sideroxylon</i> A.Cunn. ex Woolls	22
<i>staigeriana</i> F.Muell. ex F.M.Bailey	22
<i>steadmanii</i> C.A.Gardner	22
<i>stoatei</i> C.A.Gardner	22
<i>stricklandii</i> Maiden	22
<i>tenuipes</i> (Maiden & Blakely) Blakely & C.T.White	22
<i>tereticornis</i> Sm.	22
<i>tetraptera</i> Turcz.	22
<i>tetrodonta</i> F.Muell.	22
<i>torquata</i> Luehm.	22
<i>umbra</i> F.Muell. ex R.T.Baker	22
<i>viminalis</i> Labill.	22, 24, 90
<i>wandoo</i> Blakely	22
<i>wilcoxii</i> Boland & Kleinig	22
x <i>cordieri</i> Trab.	24
x <i>kirtoniana</i> F.Muell.	22
<i>youmanii</i> Blakely & McKie	22
<i>youngiana</i> F.Muell.	22
KANIEAE	
<i>Tristaniopsis</i>	
<i>laurina</i> (Sm.) Peter G.Wilson & J.T.Waterh.	22
LEPTOSPERMEAE	
<i>Agonis</i>	
<i>flexuosa</i> (Muhl. ex Willd.) Sweet	22
<i>Kunzea</i>	
<i>ambigua</i> (Sm.) Druce	22
<i>baxteri</i> (Klotzsch) Schauer	22
<i>capitata</i> (Sm.) Heynh.	22
<i>ericoides</i> (A.Rich.) Joy Thomps.	22, 44
<i>parvifolia</i> Schauer	22
<i>sinclairii</i> (Kirk) W.Harris	22
<i>Leptospermum</i>	
<i>arachnoides</i> Gaertn.	22
<i>continentale</i> Joy Thomps.	10
<i>erubescens</i> Schauer	22
<i>glabrescens</i> N.A.Wakef.	22
<i>glaucescens</i> Schauer	22
<i>grandifolium</i> Sm.	22
<i>incanum</i> Turcz.	22
<i>juniperinum</i> Sm.	22
<i>laevigatum</i> (Gaertn.) F.Muell.	22

<i>lanigerum</i> (Aiton) Sm.	22
<i>liversidgei</i> R.T.Baker & H.G.Sm.	22
<i>minutifolium</i> (Benth.) C.T.White	44
<i>myrsinoides</i> Schlttdl.	24
<i>myrtifolium</i> Sieber ex DC.	44
<i>parviflorum</i> Valetton	44
<i>parvifolium</i> Sm.	44
<i>petersonii</i> F.M.Bailey	22
<i>polygalifolium</i> Salisb. subsp. <i>polygalifolium</i>	22
<i>roei</i> Benth.	22, 44
<i>rotundifolium</i> (Maiden & Betche) F.A.Rodway	22
<i>rupestre</i> Hook.f.	22
<i>scoparium</i> J.R.Forst. & G.Forst.	22
<i>sphaerocarpum</i> Cheel	22
<i>squarrosus</i> Gaertn.	22
<i>trinervium</i> (Sm.) Joy Thomps.	22
LOPHOSTEMONEAE	
<i>Lophostemon</i>	
<i>confertus</i> (R.Br.) Peter G.Wilson & J.T.Waterh.	22
MELALEUCEAE	
<i>Beaufortia</i>	
<i>decussata</i> R.Br.	20
<i>elegans</i> Schauer	16
<i>purpurea</i> Lindl.	16
<i>schaueri</i> Preissler ex Schauer	16
<i>sparsa</i> R.Br.	20
<i>squarrosa</i> Schauer	16
<i>Callistemon</i>	
<i>acuminatus</i> Cheel	22
<i>citrinus</i> (Curtis) Skeels	22
<i>coccineus</i> F.Muell.	22
<i>comboynensis</i> Cheel	22
<i>glaucus</i> (Bonpl.) Sweet	22
<i>lanceolatus</i> (Sm.) Sweet	22
<i>linearis</i> (Sm.) Colv. ex Sweet	22, 33, 44
<i>pachyphyllus</i> Cheel in J.H.Maiden	22
<i>phoeniceus</i> Lindl.	22
<i>pinifolius</i> (J.C.Wendl.) Sweet	22, 30, 33
<i>rigidus</i> R.Br.	22, 44
<i>salignus</i> (Sm.) Colv. ex Sweet	22
<i>viminalis</i> (Sol. ex Gaertn.) G.Don ex Loudon	44
<i>Calotahmnus</i>	
<i>quadrifidus</i> R.Br.	22
<i>villosus</i> R.Br.	22
<i>Eremaea</i>	

<i>beaufortioides</i> Benth.	22
<i>Melaleuca</i>	
<i>acuminata</i> F.Muell.	22
<i>adnata</i> Turcz.	33
<i>alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	22
<i>armillaris</i> (Sol. ex Gaertn.) Sm.	22
<i>brevifolia</i> Turcz.	22
<i>cardiophylla</i> F.Muell.	22
<i>cheelii</i> C.T.White	22
<i>ciliosa</i> Turcz.	22
<i>cordata</i> Turcz.	22
<i>cucullata</i> Turcz.	22
<i>dealbata</i> S.T.Blake,	22
<i>decora</i> (Salisb.) Britten	22
<i>decussata</i> R.Br	22
<i>densa</i> R.Br.	33
<i>diosmifolia</i> Andrews	22
<i>elliptica</i> Labill.	22
<i>ericifolia</i> Sm.	22
<i>erubescens</i> Nees	22
<i>filifolia</i> F.Muell.	22
<i>foliolosa</i> A.Cunn. ex Benth.	22
<i>fulgens</i> R.Br.	44
<i>gibbosa</i> Labill.	22
<i>glaberrima</i> F.Muell.	22
<i>globifera</i> R.Br.	22
<i>glomerata</i> F.Muell.	22
<i>halmaturorum</i> F.Muell. ex Miq.	22
<i>hamulosa</i> Turcz.	22
<i>huegelii</i> Endl.	22
<i>hypericifolia</i> Sm.	22
<i>incana</i> R.Br.	22
<i>juputi</i> Powell	22
<i>lanceolata</i> Otto	22, 24
<i>lateriflora</i> Benth.	22
<i>lateritia</i> A.Dietr.	22
<i>leiocarpa</i> F.Muell.	22
<i>leucadendra</i> (L.) L.	22
<i>linariifolia</i> Sm	22
<i>macronychia</i> Turcz.	22
<i>megacephala</i> F.Muell.	22
<i>microphylla</i> Sm.	22
<i>minutifolia</i> F.Muell.	22
<i>nodosa</i> (Sol. ex Gaertn.) Sm.	22
<i>pauciflora</i> Turcz.	22

<i>pauperiflora</i> F.Muell.	22
<i>pentagona</i> Labill.	22
<i>pungens</i> Schauer	22
<i>quadrifaria</i> F.Muell.	22
<i>quinquenervia</i> (Cav.) S.T.Blake	22
<i>radula</i> Lindl.	24
<i>rhaphiophylla</i> Schauer	22, 44
<i>squamea</i> Labill.	24
<i>squarrosa</i> Sm.	22
<i>striata</i> Labill.	22
<i>stypelioides</i> Sm.	22
<i>suberosa</i> (Schauer) C.A.Gardner	22
<i>systema</i> Craven	22
<i>teretifolia</i> Endl.	22, 66
<i>thymifolia</i> Sm.	22
<i>thymoides</i> Labill.	22
<i>uncinata</i> R.Br.	22
<i>violacea</i> Schauer	22
<i>wilsonii</i> F.Muell.	22
<i>Regelia</i>	
<i>inops</i> (Schauer) Schauer	22
<i>velutina</i> (Turcz.) C.A.Gardner	22
METROSIDEREAE	
<i>Metrosiderus</i>	
<i>albiflora</i> Sol. ex Gaertn.	22
<i>bartlettii</i> J.W.Dawson	22
<i>carminea</i> W.R.B.Oliv.	22
<i>colensoi</i> Hook.f.	22
<i>collina</i> (J.R.Forst. & G.Forst.) A.Gray	22
<i>diffusa</i> (G.Forst.) Sm.	22
<i>excelsa</i> Sol. ex Gaertn.	22
<i>fulgens</i> Sol. ex Gaertn.	22
<i>kermadecensis</i> W.R.B.Oliv.	22
<i>parkinsonii</i> Buchanan	22
<i>perforata</i> (J.R.Forst. & G.Forst.) Druce	22
<i>robusta</i> A.Cunn.	22
<i>tremuloides</i> (A.Heller) Rock	22
<i>umbellata</i> Cav.	22
<i>xanthocarpa</i> (Mart.) O.Berg	22
MYRTEAE	
<i>Acca</i>	
<i>sellowiana</i> (O.Berg) Burret	22
<i>Accara</i>	
<i>elegans</i> (DC.) Landrum	22
<i>Blepharocalyx</i>	

<i>salicifolius</i> (Kunth) O.Berg	22
<i>Calyptranthes</i>	
<i>brasiliensis</i> Spreng.	22
<i>clusiifolia</i> O.Berg	22
<i>concinna</i> DC.	22
<i>lucida</i> Mart. ex DC.	22
<i>Campomanesia</i>	
<i>adamantium</i> (Cambess.) O.Berg	22
<i>eugenioides</i> (Cambess.) D.Legrand	22
<i>guaviroba</i> (DC.) Kiaersk.	22, 88
<i>guazumifolia</i> (Cambess.) O.Berg	22
<i>laurifolia</i> Gardner	22
<i>phaea</i> (O.Berg) Landrum	22
<i>pubescens</i> (Mart. ex DC.) O.Berg	22
<i>schlechtendaliana</i> (O.Berg) Nied.	22
<i>xanthocarpa</i> (Mart.) O.Berg	22
<i>Decaspermum</i>	
<i>fruticosum</i> J.R.Forst. & G.Forst.	88
<i>parviflorum</i> (Lam.) A.J.Scott subsp. <i>parviflorum</i>	44, 88
<i>Eugenia</i>	
<i>aurata</i> O.Berg	22
<i>axillaris</i> (Sw.) Willd.	22
<i>bimarginata</i> DC.	32
<i>brasiliensis</i> Lam.	22
<i>crenata</i> Vell.	22
<i>dysenterica</i> DC.	22, 33
<i>francavilleana</i> O.Berg	22
<i>hyemalis</i> Cambess.	22, 44
<i>involucrata</i> DC.	22
<i>klotzschiana</i> O.Berg	33
<i>lilloana</i> D.Legrand	22
<i>luschnathiana</i> (O.Berg) Klotzsch ex B.D.Jacks.	22
<i>magnifica</i> Spring ex Mart	22
<i>monticola</i> (Sw.) DC.	44
<i>multicostata</i> D.Legrand	22
<i>pardensis</i> O.Berg	22
<i>pitanga</i> (O.Berg) Nied.	22, 44
<i>pluriflora</i> DC.	66
<i>punicifolia</i> (Kunth) DC.	22, 33
<i>pyriformis</i> Cambess.	22, 33
<i>sonderiana</i> O.Berg	22
<i>stigmatica</i> DC.	22
<i>uniflora</i> L.	22, 33
<i>uruguayensis</i> Cambess.	24
<i>Hexachlamys</i>	

<i>edulis</i> (O.Berg) Kausel & D.Legrand	22
<i>Lophomyrtus</i>	
<i>bullata</i> Burret	22
<i>obcordata</i> (Raoul) Burret	22
× <i>ralphii</i> (Hook.f.) Burret	22
<i>Luma</i>	
<i>apiculata</i> (DC.) Burret	22
<i>Marlierea</i>	
<i>clausseniana</i> (O.Berg) Kiaersk	22
<i>tomentosa</i> Cambess.	22
<i>warmingiana</i> Kiaersk.	22
<i>Mosiera</i>	
<i>ehrenbergii</i> (O.Berg) Landrum,	22
<i>Myrceugenia</i>	
<i>alpigena</i> (DC.) Landrum	22
<i>brevipedicellata</i> (Burret) D.Legrand & Kausel	22
<i>euosma</i> (O.Berg) D.Legrand	22
<i>exsucca</i> (DC.) O.Berg	22
<i>fernandeziana</i> (Hook. & Arn.) Johow	22
<i>miersiana</i> (Gardner) D.Legrand & Kausel	22
<i>myrcioides</i> (Cambess.) O.Berg	22
<i>ovata</i> (Hook. & Arn.) O.Berg	22
<i>pilotantha</i> (Kiaersk.) Landrum	22
<i>schulzii</i> Johow	22
<i>Myrcia</i>	
<i>bella</i> Cambess.	22
<i>brasiliensis</i> Kiaersk.	22
<i>ericalyx</i> DC.	22, 44
<i>guianensis</i> (Aubl.) DC.	22
<i>hebeptala</i> DC.	22
<i>hilariana</i> O.Berg	22
<i>laruotteana</i> Cambess.	22
<i>multiflora</i> (Lam.) DC.	22
<i>obovata</i> (O.Berg) Nied.	22
<i>selloi</i> (Spreng.) N.Silveira	22
<i>splendens</i> (Sw.) DC.	22
<i>torta</i> DC.	22
<i>Myrcianthes</i>	
<i>cisplatensis</i> (Cambess.) O.Berg	22
<i>fragrans</i> (Sw.) McVaugh	22
<i>pungens</i> (O.Berg) D.Legrand	22
<i>delicatula</i> (DC.) O.Berg	22
<i>dubia</i> (Kunth) McVaugh	22
<i>tenella</i> (DC.) O.Berg	22

<i>glazioviana</i> (Kiaersk.) G.M.Barroso ex Sobral	22
<i>Myrrhinium</i>	
<i>atropurpureum</i> Schott	22
<i>Myrteola</i>	
<i>nummularia</i> (Lam.) O.Berg	44
<i>Myrtus</i>	
<i>communis</i> L.	22
<i>Neomyrtus</i>	
<i>pedunculata</i> (Hook.f.) Allan	22
<i>Pimenta</i>	
<i>dioica</i> (L.) Merr.	22
<i>pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum	22
<i>racemosa</i> (Mill.) J.W.Moore	22
<i>Plinia</i>	
<i>cauliflora</i> (Mart.) Kausel	22
<i>Psidium</i>	
<i>acutangulum</i> Mart. ex DC.	44
<i>arboreum</i> Vell.	98
<i>australe</i> Cambess.	55
<i>cattleianum</i> Afzel. ex Sabine	44, 66, 77, 88
<i>friedrichsthalianum</i> (O.Berg) Nied.	22, 44
<i>grandifolium</i> Mart. ex DC.	44
<i>guajava</i> L.	22, 33, 44, 21, 30
<i>guineense</i> Sw.	22, 44, 55
<i>montanum</i> Sw.	33
<i>myrtoides</i> O.Berg	88
<i>rufum</i> Mart. ex DC.	55
<i>Rhodomyrtus</i>	
<i>tomentosa</i> (Sol.) Hassk.	22
<i>Ugni</i>	
<i>molinae</i> Turcz.	22
<i>selkirkii</i> (Hook. & Arn.) O.Berg	44
SYNCARPIEAE	
<i>Syncarpia</i>	
<i>glomulifera</i> (Sm.) Nied.	22
SYZYGIEAE	
<i>Syzygium</i>	
<i>aqueum</i> (Burm.f.) Alston	22
<i>aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry	22, 44
<i>australe</i> (J.C.Wendl. ex Link) B.Hyland	44
<i>calophyllifolium</i> (Wight) Walp.	22
<i>claviflorum</i> (Roxb.) Wall. ex A.M.Cowan & Cowan	22
<i>cumini</i> (L.) Skeels	22, 33, 44, 55, 66, 42, 46
<i>formosum</i> (Wall.) Masam.	22
<i>fruticosum</i> DC.	22, 44

<i>grande</i> (Wight) Walp.	22
<i>jambos</i> (L.) Alston	28, 33, 42, 44, 46, 54, 66
<i>khasianum</i> (Duthie) N.P.Balacr.	22
<i>kurzii</i> (Duthie) N.P.Balacr.	66
<i>maire</i> (A.Cunn.) Sykes & Garn.-Jones	22
<i>oblatum</i> (Roxb.) Wall. ex A.M.Cowan & Cowan	22
<i>operculatum</i> (Roxb.) Nied.	22
<i>ramosissimum</i> (Blume) N.P.Balacr.	22
<i>reticulatum</i> (Wight) Walp.	22
<i>revolutum</i> (Wight) Walp.	22
<i>samarangense</i> (Blume) Merr. & L.M.Perry	42, 44, 110
<i>sandwicense</i> (A.Gray) Müll.Stuttg.	22
<i>smithii</i> (Poir.) Nied.	44
<i>tetragonum</i> (Wight) Wall. ex Walp.	22
<i>venosum</i> DC.	66
Não determinado	
<i>Conothamus</i>	
<i>trinervis</i> Lindl.	20
<i>Monimiastrum</i>	
<i>pyxidatum</i> J.Guého & A.J.Scott	22

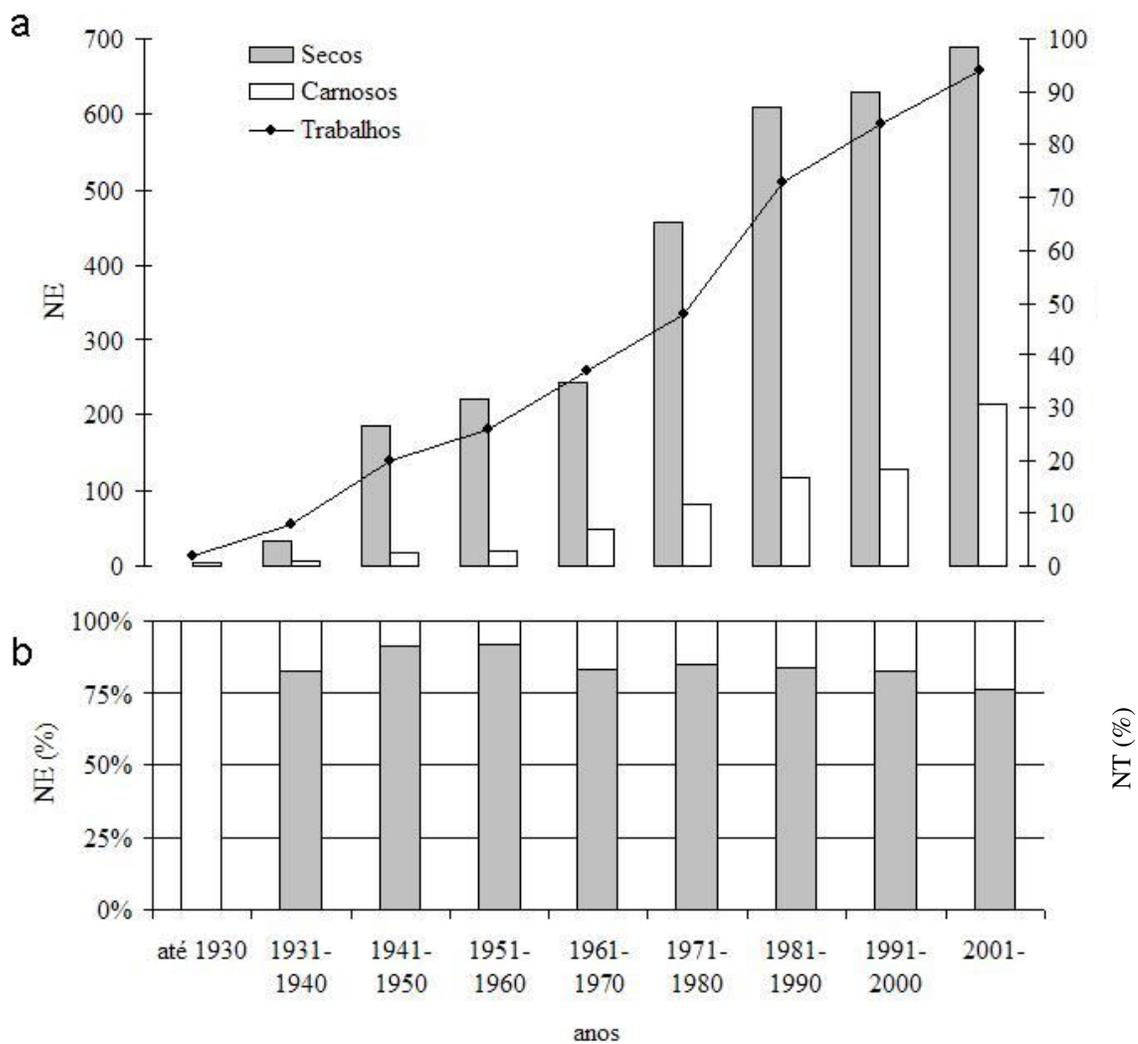


Figura 1. Quantidade espécies de Myrtaceae com números cromossômicos determinados cumulativamente ao longo dos anos. (a) valores absolutos e (b) valores relativos (%). NE – número de espécies, NT – número de trabalhos. Os dados obtidos foram separados de acordo com o tipo de frutos: frutos carnosos (tribos Myrteae e Syzygieae) e, frutos capsulares e secos (demais tribos).

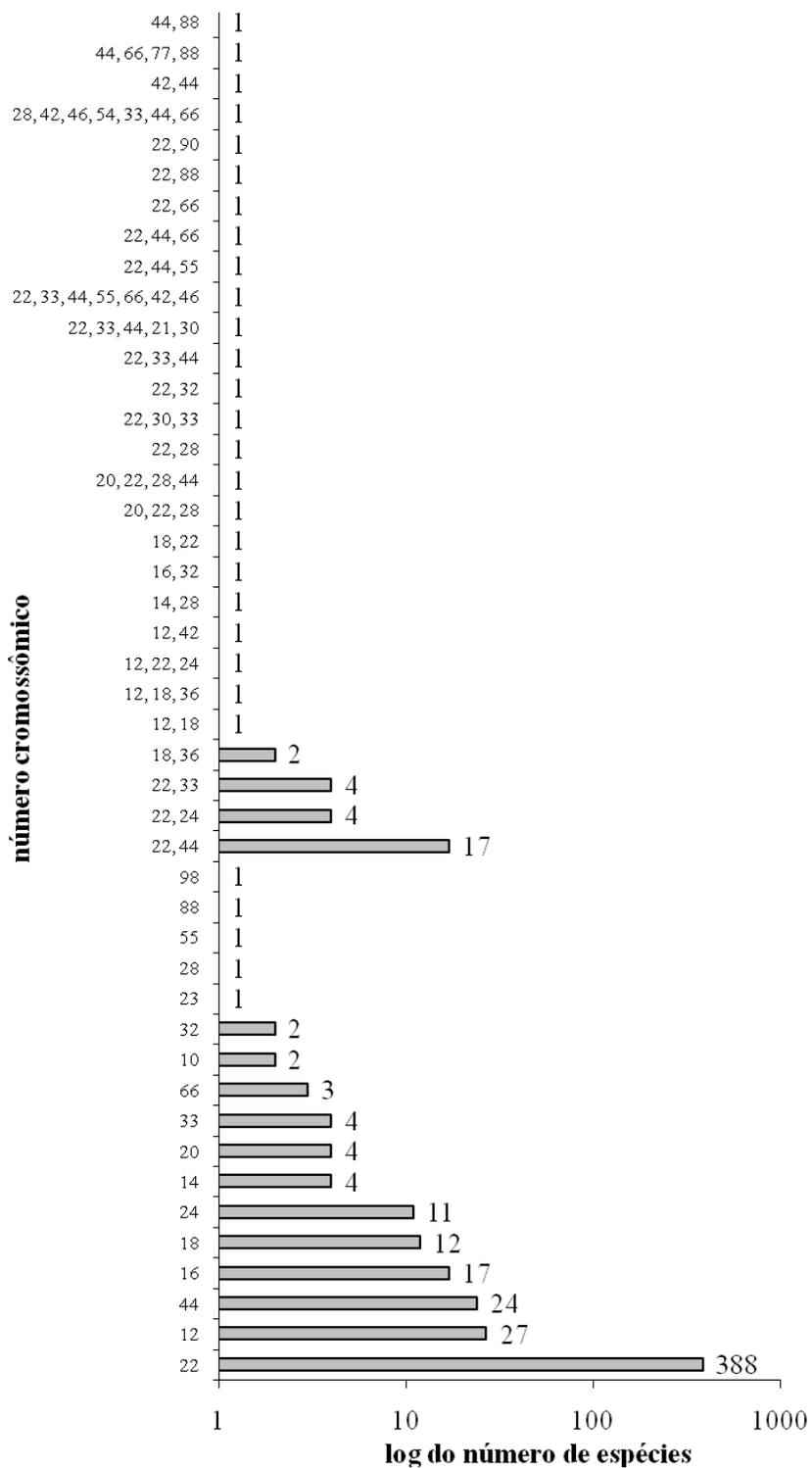


Figura 2. Distribuição dos números cromossômicos somáticos (2n) para as 554 espécies de Myrtaceae.

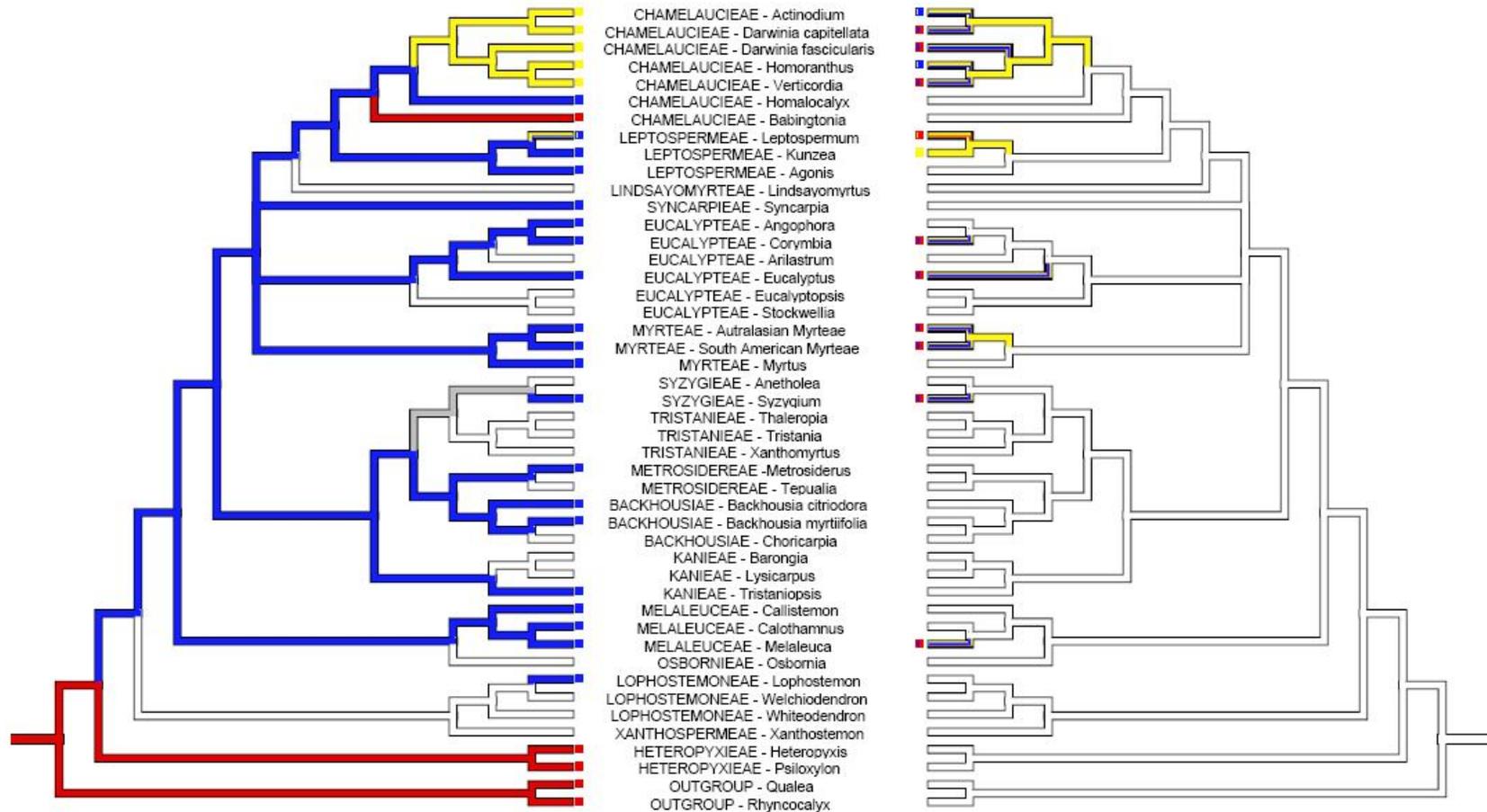


Figura 3. História evolutiva dos estados de caracteres cromossômicos (número, poliploidia, dispolidia e citótipos) em Myrtaceae, resultantes da análise de parcimônia realizada com o auxílio do programa Mesquite (Maddison & Maddison 2007) sobre a árvore mais parcimoniosa apresentada por Wilson *et al.* (2005). **(A)** Distribuição dos números cromossômicos básicos: $x < 11$ – amarelo; $x = 11$ – azul; $x > 11$ – vermelho, em branco mostra lacunas no conhecimento. Os ramos em cinza mostram caminhos onde a análise de parcimônia é equívoca. **(B)** Distribuição da ocorrência (em pelos menos uma espécie) dos eventos de dispolidia (amarelo), poliploidia (azul) e citótipos (vermelho). Os ramos em branco demonstram lacunas não conhecimento e não ocorrência destes eventos.

CAPÍTULO 2

Estudos cromossômicos em Myrtaceae: novos relatos de números cromossômicos e distribuição da poliploidia na tribo Myrteae

RESUMO - Em Myrtaceae (tribo Myrteae) a ocorrência do número cromossômico $2n = 22$ é quase constante, e há registro de poliploidia em diversas espécies. Foram compilados dados de números cromossômicos de 104 espécies pertencentes a 25 gêneros de Myrteae. O número cromossômico $2n = 22$ ocorreu em 72% dos registros, observando-se poliploidia, incluindo a ocorrência de citótipos, em outros 26%, além de poucos registros de disploidia ($2n = 32$ e $2n = 98$). Os dados aqui confirmam que a poliploidia é um evento importante na evolução da tribo Myrteae, ocorrendo com maior frequência em dois dos maiores gêneros neotropicais de Myrtaceae, *Eugenia* e *Psidium*, e em um dos gêneros australasianos, *Decaspermum*. Além destes gêneros, espécies poliplóides são registradas em outros gêneros, como *Myrteola* e *Myrcia*, este último essencialmente neotropical. Neste trabalho determinamos o número cromossômico em 45 espécies de 13 gêneros, com amostras de 51 diferentes populações.

Introdução

O continente americano abriga 73 gêneros e 2375 espécies (Schmid 1980) de Myrtaceae, sendo considerado o segundo centro de diversificação da família. Todas as espécies neotropicais encontram-se circunscritas na subfamília Myrtoideae - tribo Myrteae, caracterizada principalmente pela ocorrência de frutos carnosos e folhas predominantemente opostas. Com base em caracteres morfológicos do embrião, esta tribo tem sido tradicionalmente dividida em três subtribos (Berg 1855-56, 1857-59): Eugeniinae (embrião globoso, com cotilédones carnosos e eixo hipocótilo-radicular insipiente), Myrciinae (embrião com cotilédones foliáceos e eixo hipocótilo-radicular longo) e Myrtinae (embrião com cotilédones insipientes e eixo hipocótilo-radicular longo) (Landrum & Kawasaki

1997).

Com o avanço da sistemática filogenética, a tradicional divisão em duas subfamílias, Myrtoideae (frutos bacóides e filotaxia oposta) e Leptospermoideae (frutos secos, filotaxia alterna) (Niedenzu 1838), sofreu drásticas mudanças. Hoje são reconhecidas duas subfamílias, Myrtoideae, englobando também os antigos táxons de frutos secos, num total de 15 tribos diferentes, e Psyloxyloideae, com duas tribos (Wilson *et al.* 2005). A tribo Myrteae é monofilética (Wilson *et al.* 2001, 2005; Lucas *et al.* 2005, 2007), no entanto as suas tradicionais subtribos (*sensu* Berg 1855-56, 1857-59) Eugeniinae e Myrtinae, ambas com distribuição pantropical, surgem como grupos polifiléticos, ao passo que Myrciinae, exclusivamente neotropical, é monofilética. Além disso, alguns dos gêneros essencialmente neotropicais, como *Myrceugenia*, *Blepharocalyx* e *Luma* não apresentam posição filogenética definida (Lucas *et al.* 2005, 2007), o que indica que futuramente a classificação intrafamiliar proposta por Berg (1855-56, 1857-59) para a tribo Myrteae deva ser readaptada.

A necessidade de estudos bio sistemáticos para uma melhor delimitação dos taxa em Myrteae foi sugerida por McVaugh (1956) e Barroso (1991), que consideraram as Myrtaceae americanas como um grupo taxonomicamente complexo. Dentro de um contexto bio sistemático, a citotaxonomia tem subsidiado diversos estudos taxonômicos e evolutivos em inúmeros grupos taxonômicos, em diferentes níveis hierárquicos (Stace 1991).

Em Myrtaceae, grande parte dos estudos cromossômicos encontrava-se restrita a espécies com frutos secos - antiga subfamília Leptospermoideae (Atchinson 1947, Rye 1979, Matsumoto *et al.* 2000). Os primeiros estudos em Myrtaceae neotropicais foram realizados por Forni-Martins *et al.* (1995), Andrade & Forni-Martins (1998), Pedrosa *et al.* (1999) e Forni-Martins & Martins (2000), onde foram determinados números cromossômicos de cerca de 10 espécies.

Recentemente, Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, b, 2007a)

determinaram o número cromossômico para cerca de 50 espécies de Myrteae distribuídas nas diferentes subtribos *sensu* Berg (Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae), com predomínio de $2n = 22$. Os registros apresentados por estes autores são inéditos para a maioria das espécies, inclusive para alguns gêneros como *Gomidesia*, *Marlierea* e *Plinia*, além de terem ampliado o conhecimento de números cromossômicos para os dois dos maiores gêneros de Myrtaceae, *Eugenia* e *Myrcia*. Foram observadas variações por poliploidia em cerca de 20% das espécies analisadas, inclusive com a ocorrência de citótipos em algumas espécies, como *Eugenia hyemalis*, *E. puniceifolia* (Costa & Forni-Martins 2006a) e *Psidium cattleianum* (Costa & Forni-Martins 2006b). Estes autores ressaltaram a importância da poliploidia como um importante processo evolutivo em Myrteae, registrando origem por poliploidia (principalmente $2n = 33$ e 44) em 21% das espécies de *Eugenia* e 75% das espécies de *Psidium*, porém não realizaram estudos mais aprofundados para determinar a natureza destes poliplóides.

De maneira geral, ocorre pouca variação no número cromossômico em Myrtaceae, com exceção dos táxons com frutos secos, onde são registrados $2n = 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24$ e 28 , distribuídos em vários gêneros (Rye 1979). Com os estudos de Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, c, 2007a), o número básico $x = 11$ proposto por Atchinson (1947) e Raven (1975) pode ser confirmado para Myrtaceae (tribo Myrteae). Mas vários gêneros em Myrteae (*sensu* Wilson *et al.* 2005) ainda não são conhecidos do ponto de vista cromossômico, como *Accara*, *Amomyrtella*, *Amomyrtus*, *Archirhodomyrtus*, *Austromyrtus*, *Blepharocalyx*, *Chamguava*, *Calycolpus*, *Calycorectes*, *Calyptranthes*, *Gossia*, *Hexachlamys*, *Legrandia*, *Lenwebbia*, *Lythomyrtus*, *Meteoromyrtus*, *Myrtastrum*, *Myrtella*, *Neomitranthes*, *Octamyrtus*, *Pilidiostigma*, *Rhodamnia*, *Rhodomyrtus*, *Siphoneugena*, *Stereocaryum* e *Uromyrtus*.

Diante disto, este trabalho visa a ampliar o conhecimento do número cromossômico de espécies de Myrteae e realizar uma revisão dos estudos

cromossômicos existentes na literatura com espécies desta tribo. Neste trabalho, estamos adotando a circunscrição de Wilson *et al.* (2005) para a tribo Myrteae e as relações intergenéricas propostas por Lucas *et al.* (2007).

Material e métodos

Coleta de material

Foram coletadas 45 espécies (uma população de cada espécie, exceto quatro espécies de *Psidium* que foram coletadas duas ou três populações) de 13 gêneros em diferentes formações vegetacionais (cerrado, campos rupestres, floresta atlântica, entre outros) principalmente nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil (Tabela 1). As espécies foram primeiramente identificadas por meio de bibliografia especializada e comparações de herbário e, posteriormente, confirmadas por especialistas (Prof. Marcos Sobral – UFMG, Dra. Eve Lucas - RBGKew e Profa. Dra. Carolyn Proença - UnB). Materiais-testemunho das espécies coletadas encontram-se depositadas no Herbário UEC (Universidade Estadual de Campinas) (Tabela 1).

Estudos cromossômicos

Sementes coletadas de frutos maduros foram germinadas à temperatura ambiente e os ápices radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2mM (5h a 14°C ou 24 horas a 8°C). As raízes foram fixadas em Farmer (álcool etílico absoluto: ácido acético glacial, 3:1, v/v) e estocadas no freezer a -20°C até a preparação das lâminas, utilizando a técnica de HCl-Giemsa (Guerra 1983).

A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico comum e as células em condições adequadas de espalhamento cromossômico foram documentadas em

fotomicroscópio.

Análise dos dados de literatura

Foi feita uma compilação geral dos dados disponíveis na literatura. Primeiramente, foram consultados os dados da base de números cromossômicos do IPCN – Index to Plant Chromosome Number - Missouri Botanical Garden (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>) e das obras de referência de números cromossômicos: Bolkhoviskii (1969), Moore (1973, 1974, 1977), Goldblatt (1981, 1984, 1985, 1988) e Goldblatt & Johnson (1990, 1991, 1994, 1998, 2000). Para os registros das espécies na literatura, foram utilizados os dados de número cromossômico somático ($2n$). Na ausência deste, o número cromossômico gamético (n) foi duplicado.

Após compilar todos os dados disponíveis da literatura, vários registros foram encontrados com determinação até gênero. Na análise final, só foram consideradas as espécies com seus binômios completos. A correta nomenclatura foi checada de acordo com o World Checklist of Myrtaceae, Kew (Govaerts *et al.* 2008). Todas as estimativas apresentadas sobre a diversidade de espécies nos respectivos gêneros também foram obtidos a partir de Govaerts *et al.* (2008).

Resultados

Todas as 45 espécies dos 13 gêneros estudados apresentaram $2n = 22$, à exceção de sete das nove espécies estudadas de *Psidium*, com $2n = 44, 55$ ou 66 (Tabela 1, Figura 2).

Dos 12 gêneros quer apresentaram exclusivamente $2n = 22$, sete tiveram apenas uma espécie analisada. A amostragem foi maior em *Pimenta* (duas espécies), *Calyptranthes* (quatro), *Campomanesia* (cinco), *Myrcia* (sete) e *Eugenia*

(11). Para *Psidium*, foram amostradas nove espécies com números cromossômicos variando de $2n = 22$ (*P. guajava* e *P. guineense*), 44 (*P. acutangulum*, *P. cattleianum*, *P. friedrichstalianum* e *P. grandifolium*), 55 (*P. australe*, *P. rufum*), 66 (*P. cattleianum*) e 88 (*P. myrtoides*). Em apenas uma das espécies analisadas foi possível detectar a presença de citótipos poliplóides, *P. cattleianum*, com $2n = 44$ e $2n = 66$, em três populações. As espécies *P. grandifolium* ($2n = 44$) e *P. guineense* ($2n = 22$) também tiveram três populações analisadas, enquanto em *P. guajava* ($2n = 22$) a amostragem foi de duas espécies.

Somando-se os resultados aqui obtidos aos dados disponíveis na literatura, atualmente são conhecidos números cromossômicos para 104 espécies de 25 gêneros (Tabela 2). O número cromossômico $2n = 22$ foi o mais freqüente, ocorrendo em 87 espécies, sendo exclusivo em 76 (72%) (Tabela 2, Figura 3). A poliploidia, incluindo a ocorrência de citótipos poliplóides com números múltiplos de 11, foi verificada em 26 espécies (25,5%). Deste total, 12 espécies (11,8%) são exclusivamente poliplóides com $2n = 33$, 44, 55, 66 ou 88. Os citótipos (raças cromossômicas) foram representados por 13 espécies (13,7%), sendo que em duas delas não se observou o nível diplóide (Tabela 2, Figura 3). *P. cattleianum* apresentou o maior número de citótipos poliplóides, com $2n = 44$, 66, 77 e 88. Variações no número cromossômico em relação ao número básico $x = 11$ ocorreram em apenas cinco destas espécies (4,9%) (Tabela 2, Figura 3). Destas variações, três encontraram-se no nível diplóide ($2n = 21$ e 24) e três no nível poliplóide ($2n = 30$, 32 e 98).

Discussão

Segundo estimativas de Govaerts *et al.* (2008), cerca de 2500 espécies agrupadas em 49 gêneros são pertencentes à Myrteae, considerada a tribo mais

diversificada em espécies da família Myrtaceae (Lucas *et al.* 2007). Atualmente, são conhecidos os números cromossômicos para 104 espécies em 25 gêneros, que representam apenas 4,1% das 2500 espécies estimadas e metade dos gêneros da tribo (Tabela 2).

A seguir serão apresentados e discutidos os principais resultados de acordo com os estudos filogenéticos recentemente desenvolvidos na tribo Myrteae por Lucas *et al.* (2007). Estes autores dividiram a tribo Myrteae em sete grupos (Figura 1), que correspondem a clados bem sustentados com base em dados de seqüências de quatro diferentes genes (dois plastidiais e dois nucleares), dados anatômicos, morfológicos e biogeográficos: grupos *Eugenia*, *Pimenta*, *Myrteola*, *Myrceugenia*, *Myrcia*, *Plinia* (neotropicais) e Australasiano (paleotropical). Segundo estes autores, a divisão proposta por Berg (1855, 1857) em três subtribos (Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae) deve ser futuramente readaptada. Na presente discussão serão enfatizadas as espécies sul-americanas da tribo Myrteae.

Grupo *Eugenia*

Este grupo caracteriza-se principalmente pela presença de embriões com cotilédones plano-convexos ou completamente fundidos, de sementes com testa membranácea e de 20 a 70 óvulos por lóculo inseridos em um simples ponto no septo ovariano. Este clado monofilético (90% b.s.) é composto pelos gêneros *Eugenia* e *Myrcianthes*, também monofiléticos (100% b.s.) (Lucas *et al.* 2007). *Eugenia* é um dos mais diversificados gêneros em Myrtaceae, com cerca de 1000 espécies e *Myrcianthes* possui 36 espécies (Govaerts *et al.* 2008).

Números cromossômicos são disponíveis para 24 espécies de *Eugenia*, perfazendo um total de 2,7% (Tabelas 2 e 3). Quatro das espécies aqui estudadas, *E. crenata*, *E. florida*, *E. linearifolia* e *E. stigmatica* $2n = 22$. A espécie *E. multicostata* foi estudada por Costa & Forni-Martins (2006a) como *E. mosenii*, também com $2n = 22$. Estes registros somam 2,4% do total de espécies do gênero,

dos quais 22,5% apresentaram variações poliplóides, incluindo a ocorrência de citótipos.

Das 26 espécies de *Eugenia*, três são poliplóides: *E. klotzschiana* ($2n = 3x = 33$), *E. monticola* ($2n = 4x = 44$) e *E. pluriflora* ($2n = 6x = 66$) (Tabela 2). Há ainda a espécie *E. bimarginata*, com $2n = 32$, cujo número cromossômico foi interpretado como uma provável perda de um cromossomo a partir de um estoque de nível de ploidia $3x$ ($2n = 33$) (Forni-Martins & Martins 2000). Para seis espécies, é registrada a ocorrência de raças cromossômicas (citótipos); e em quatro destas espécies (14,8%) (*E. dysenterica*, *E. puniceifolia*, *E. pyriformis* e *E. uniflora*) ocorrem citótipos diplóides ($2x$) e triplóides ($3x$) e para outras duas espécies (*E. hyemalis* e *E. pitanga*), são encontrados citótipos diplóides e tetraplóides ($4x$). Costa & Forni-Martins (2006a) haviam relatado a ocorrência de citótipos em três destas espécies (*E. hyemalis*, *E. puniceifolia* e *E. pitanga*), no entanto não realizaram estudos mais aprofundados para saber a origem destes citótipos poliplóides. São necessários estudos com um maior número de espécies, provenientes de diferentes populações, para se chegar a uma conclusão sobre a origem dos poliplóides em *Eugenia*. O número $2n = 24$ para *E. uruguayensis* (como *E. guabiju*, Moussel 1965) pode representar a existência de um número aneuplóide ou, talvez de um erro de contagem, como evidenciado no gênero *Eucalyptus* por Bachir & Abdellah (2006).

Uma análise cariotípica convencional foi realizada por Costa & Forni-Martins (2007b, Capítulo 6) em quatro espécies de *Eugenia*, sendo três diplóides ($2n = 22$) e uma poliplóide ($2n = 44$), nas quais os autores relataram cariótipos moderadamente assimétricos.

No gênero *Myrcianthes* são encontrados números cromossômicos para três espécies perfazendo cerca de 8% do total de 36 espécies no gênero, todas diplóides com $2n = 22$. Não foi registrada, até o momento, nenhuma espécie poliplóide neste gênero (Tabelas 2 e 3).

Os gêneros *Calycorectes* e *Hexachlamys*, circunscritos na tradicional subtribo Eugeniinae *sensu* Berg não foram incluídos na análise de Lucas *et al.* (2007). Mazine (2006) realizou um estudo filogenético com os gêneros tradicionalmente circunscritos em Eugeniinae, incluindo estes dois gêneros em *Eugenia*. Estes serão, futuramente, circunscritos como subgêneros de *Eugenia* (Mazine 2006). A única espécie de *Hexachlamys*, *H. edulis* apresentou $2n = 22$ e representa 6,7% das 15 espécies do gênero (Tabelas 2 e 3). Até o momento, nenhuma espécie de *Calycorectes* foi analisada.

Grupo *Pimenta*

Neste grupo, Lucas *et al.* (2007) reuniram alguns dos gêneros tradicionalmente circunscritos na subtribo Myrtinae (*sensu* Berg). É caracterizado por apresentar um embrião em forma de C ou às vezes espiralado, com sementes de testa óssea e com 70 a 120 óvulos por lóculo (com exceção de *Pimenta*) e uma placenta intrusiva. É composto por dois cladogramas também monofiléticos: um clado contendo os gêneros *Amomyrtus* e *Legrandia* (australasianos), e um segundo clado contendo *Pimenta*, *Acca*, *Campomanesia* e *Psidium* (neotropicais).

Foram determinados números cromossômicos para 24 espécies de quatro gêneros neotropicais deste grupo: *Acca*, *Campomanesia*, *Pimenta*, *Psidium* (Tabela 2).

O número cromossômico $2n = 22$, encontrado para *Acca sellowiana*, havia sido relatado anteriormente por Bowden (1945) como *Feijoa sellowiana*, baseado em material mantido em cultivo na Índia. Este gênero tem uma posição basal e é considerado grupo irmão do clado *Campomanesia-Psidium* dentro do *Pimenta* group (Lucas *et al.* 2007). É composto por três espécies, sendo as duas outras de distribuição andina e não analisadas ainda, *A. macrostema* e *A. lanuginosa* (Landrum 1986). Sendo assim, a abrangência de números cromossômicos

conhecidos para este gênero chega a 33,3% (Tabela 3).

Para *Campomanesia*, são registrados números cromossômicos para nove espécies (24,3%) do gênero (Tabela 3), todas elas com $2n = 22$, à exceção de *C. guaviroba*, onde foi registrados um par de citótipos com $2n = 22$ e $2n = 88$. O citótipo octaplóide foi relatado por Moussel (1965) para *C. guaviroba* como *Psidium cerasoides*. Os registros para *C. guazumifolia*, *C. laurifolia* e *C. schlechtendaliana* são inéditos e os demais corroboram os dados registrados por Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006b) em outras diferentes populações de *C. guaviroba* e *C. phaea* no litoral sul do estado de São Paulo. Segundo Lucas *et al.* (2007) este gênero é grupo-irmão de *Psidium*. Na análise cariotípica apresentada por Costa & Forni-Martins (2007b) foi analisada uma única espécie deste gênero, *C. pubescens*, onde o comprimento total dos cromossomos foi cerca de 70% maior que o das duas espécies de *Psidium*, *P. cattleianum* e *P. cinereum* (hoje sinônimo de *P. grandifolium*). Mais estudos são necessários para elucidar as relações entre estes gêneros.

Em *Pimenta*, o número $2n = 22$ foi apresentado por Janaki-Ammal (1945 *in* Bolkhoviskikh *et al.* 1969) para *P. acris*. Bolkhoviskikh *et al.* (1969) registraram a ocorrência de $2n = 22$ para outra espécie, *P. officinalis*. Estas duas espécies encontram-se atualmente sinonimizadas em *P. racemosa* e *P. dioica*, respectivamente (Landrum 1986). Sendo assim, são encontrados agora três números cromossômicos, perfazendo um total de 20% das 15 espécies do gênero (Tabela 3). Não foi observada poliploidia neste gênero (Lucas *et al.* 2007).

O gênero *Psidium* é composto por 92 espécies e são registrados números cromossômicos para 11 delas (11,8%) (Tabelas 2 e 3). Segundo Costa & Forni-Martins (2006b), a maioria das espécies estudadas no gênero é poliplóide, chegando a 75% do total de números cromossômicos conhecidos para o gênero. Agora este percentual subiu para cerca de 90% da amostragem.

São registrados números cromossômicos variando de $2n = 22, 33, 44, 55, 66,$

77 e 88 (Tabela 2). No presente estudo, o nível diplóide com $2n = 22$ foi registrado em *P. guajava* (nas variedades de goiaba branca e vermelha) e *P. guineense*. Entretanto, em *P. guajava*, estudos realizados anteriormente revelam grande variação no número cromossômico, com populações derivando tanto por disploidia ($2n = 22, 28, 30, 32, 34$) como poliploidia ($2n = 33, 44$) (Singhal *et al.* 1980, Srivastava 1970, D’Cruz & Rao 1962, Majunder & Mukkerjee 1972, Kumar & Ranade 1952) (Tabela 2). Também em *P. guineense* há relatos de citótipos poliplóides, com $2n = 44$ e 55 (Eder-Silva *et al.* 2007, como *P. araca*; Srivastava 1970, como *P. molle*).

Algumas espécies são exclusivamente tetraplóides, como *P. acutangulum* e *P. grandifolium*, com $2n = 44$, ao passo que outras apresentam variações, com citótipos diplóides e tetraplóides, como *P. cattleianum*, *P. friedrichstalianum*, *P. guajava* e *P. guineense* (Tabela 2).

Níveis de ploidia ímpar são raros, sendo freqüentemente associados a indivíduos com distúrbios na reprodução sexuada, decorrentes de irregularidades meióticas. No presente estudo, foi observado poliploidia em nível ímpar ($2n=55$) para *P. australe* e *P. rufum*, no entanto não foi analisado material proveniente de anteras para detectar possíveis anormalidades meióticas. Também há registro de nível de ploidia ímpar em *P. montanum* ($2n = 33$, Moussel 1965) e em *P. coriaceum*, hoje sinônimo de *P. cattleianum* ($2n = 77$, Singhal *et al.* 1980). Para *P. cattleianum*, já haviam sido registrados $2n = 44$ (Costa & Forni-Martins 2006c) e $2n = 88$ (Atchinson 1947, como *P. variabile*) e aqui obtivemos $2n=66$. *Psidium cattleianum* é uma das espécies com maior amplitude de distribuição no gênero, desde o sul do Brasil até a América Central, sendo cultivada na faixa litorânea na América do Norte e Índia (C. Proença, comunicação pessoal). O registro de $2n = 98$ para *P. arboreum* (Eder-Silva *et al.* 2007) representa um caso de disploidia, com a possível perda de um cromossomo do conjunto $2n = 9x = 99$; no entanto os autores não relatam detalhes desta ocorrência. Segundo comunicação pessoal da Profa. Dra.

Carolyn Proença (UnB, Departamento de Botânica), este nome é um sinônimo pouco utilizado para *P. cattleianum*.

Costa & Forni-Martins (2007b) conduziram a análise cariotípica em duas espécies de *Psidium*, *P. cattleianum* e *P. cinereum* (= *P. grandifolium*), ambas com $2n = 44$, e encontraram diferenças significativas nos parâmetros cariotípicos destas espécies como cromossomos relativamente menores e quantidade de cromossomos submetacêntricos menor em *P. cinereum*. Com a ampliar os estudos com um maior número de populações espera-se que seja possível determinar a natureza destes poliplóides. No Capítulo 4 são apresentados ensaios com a técnica FISH (Hibridação *in situ* fluorescente) com citótipos tetra ($2n = 4x = 44$) e hexaplóides ($2n = 6x = 66$) de *P. cattleianum*. Foram encontrados diferentes números e tipos de sítios de hibridação com seqüências de DNAr 45S. Nestes mesmos citótipos, foi estimado o tamanho do genoma, observando-se uma variação de quase 3x no conteúdo de DNA entre a população tetraplóide e a hexaplóide (ver Capítulo 6).

Potenciais gêneros do Grupo *Pimenta*

Alguns gêneros das tradicionais Myrtinae *sensu* Berg como *Accara*, *Mosiera* e *Myrrhinium* não foram incluídos nas análises de Lucas *et al.* (2007). No entanto, estamos considerando-os como potenciais membros no *Pimenta* group, baseado em uma análise filogenética preliminar, a ser ainda concluídaⁱ.

ⁱ Esta análise preliminar foi realizada em um estágio de Doutorado Sanduíche realizado no Jodrell Laboratory, em Kew sob supervisão dos Drs. Eve Lucas, Eimear Nic Lughdha e Félix Forest, durante o período de Junho a Dezembro de 2008. Os principais resultados são apresentados no

capítulo7

No gênero *Accara*, a contagem de $2n = 22$ para sua única espécie descrita até então, *A. elegans* (DC.) Landrum representa 100% de abrangência. Este gênero foi descrito por Landrum (1990) com base em materiais coletados em afloramentos rochosos no estado de Minas Gerais e em revisão de material anteriormente identificado como *Psidium elegans* DC. O autor diferenciou *Accara* com base em alguns caracteres, como textura das sementes membranácea e lustrosa (óssea em *Psidium*), embrião com reserva de óleo e, principalmente, pelo cálice com quatro lobos em *Accara* (cinco em *Psidium*). Em *Mosiera* é registrado $2n = 22$ para *M. ehrenbergii* (Salywon 2003), representado 4,1% do número de espécies do gênero (Tabelas 2 e 3). Não foi registrada, até então, poliploidia neste gênero. Salywon (2003) realizou uma análise filogenética neste gênero, considerando-o como grupo irmão de *Psidium*. Recentemente, a única espécie brasileira de *Mosiera*, ainda sem análise cromossômica, foi circunscrita em um novo gênero, *Curitiba* Salywon & Landrum (Salywon & Landrum 2007).

Para o gênero *Myrrhinium*, a única espécie analisada, *M. atropurpureum*, apresentou $2n = 22$ (Figura 1). A espécie *M. sarcopetalum* também com $2n = 22$, teve seu número cromossômico relatado por Moussel (1965). Na revisão do gênero para os neotrópicos, Landrum (1986) reduziu todos os nomes de *Myrrhinium* a apenas uma única espécie, *M. atropurpureum* com duas variedades: *atropurpureum*, ocorrente nas restingas no estado do Rio de Janeiro, e *octandrum*, distribuída no interior do continente, associada aos leitos de rios no sul do Brasil e na região dos Andes (Peru e Colômbia). A variedade *atropurpureum* apresenta de 10-14 óvulos por lóculo e folhas coriáceas com margens fortemente revolutas, enquanto que a variedade *octandrum* apresenta de 5-11 óvulos por lóculo e folhas membranáceas, cuja margem pode ou não apresentar-se revoluta. Por observações no campo, pudemos constatar que a variedade *octandrum* apresenta um porte muito maior (hábito arbóreo com até 5m de altura) e uma quantidade

de flores muito superior em relação à variedade *atropurpureum* (hábito subarbustivo a arbustivo, chegando até no máximo 1,5m de altura). Posteriormente, será realizada a análise cromossômica das duas variedades. Embora não tenhamos tido acesso ao material analisado por Moussel (1965), provavelmente deva se tratar da variedade *octadrum*, o que, em princípio, sugere que as duas variedades de *M. atropurpureum* apresentem o mesmo número cromossômico ($2n = 22$). A abrangência neste gênero é de 100%.

Blepharocalyx não é monofilético (Lucas *et al.* 2007) sendo *B. salicifolius* (com $2n = 22$) é considerado grupo-irmão de todos os outros gêneros sul-americanos de Myrteae (Lucas *et al.* 2007). Outra espécie do gênero, *B. cruckshanskii*, encontra-se em outro clado (*Myrceugenia* group) é considerada grupo irmão de *Myrceugenia* e *Luma*.

Grupo *Myrteola*

Composto pelos gêneros *Myrteola*, *Ugni*, *Neomyrtus* e *Lophomyrtus*, este grupo é caracterizado por possuir sementes com testa óssea (como no *Pimenta* group), um embrião em forma de C e de 20 a 70 óvulos inseridos em uma placenta subapical.

Para *Myrteola*, foi registrado o número $2n = 44$ em *Myrteola nummularia* (Sum *et al.* 1990). Este é o único registro e corresponde a 33% do total de espécies do gênero (Tabelas 2 e 3). Este gênero é considerado grupo-irmão do clado que contém os gêneros *Ugni*, *Neomyrtus* e *Lophomyrtus* (Lucas *et al.* 2007).

Em *Ugni*, duas espécies (50% do gênero) tiveram seu número cromossômico determinado, *U. molinae* ($2n = 22$) e *U. selkirkii* ($2n = 44$) (Sanders *et al.* 1983). Este gênero é grupo irmão do clado com os gêneros *Neomyrtus* e *Lophomyrtus* e só foi amostrada uma única espécie nos estudos filogenéticos de Lucas *et al.* (2007), *U. mollinae*.

No último clado deste grupo (Lucas *et al.* 2007), são registrados $2n = 22$

para duas espécies de *Lophomyrtus*, *L. bullata* e *L. obcordata* (Dawson 1987), e uma de *Neomyrthus*, *N. pedunculata* (Dawson 1987) que corresponde à totalidade das espécies destes gêneros (Tabelas 2 e 3).

É necessária a análise cromossômica das outras duas espécies de *Myrteola* e das outras duas espécies de *Ugni* para alcançar 100% da representatividade dos gêneros deste grupo. Ao que parece, este grupo compartilhou um ancestral com $2n = 22$, do qual *Myrteola nummularia* derivou diretamente por poliploidia e os demais clados permaneceram com $2n = 22$, à exceção de *Ugni selkirkii*, com $2n = 44$.

Grupo *Myrceugenia*

Este grupo reúne os gêneros *Myrceugenia*, *Luma* e uma espécie de *Blepharocalyx*, *B. cruckshankii*. É caracterizado pela presença de embriões com cotilédones foliáceos ou muito reduzidos, sementes com testa membranácea, 20 a 70 óvulos por lóculo inseridos ao longo do comprimento do septo do ovário.

O gênero *Myrceugenia* é composto por 45 espécies (Govaerts *et al.* 2008) das quais são conhecidos números cromossômicos para 10 espécies (22,2%), todas com $2n = 22$ (Tabela 3). No gênero *Luma*, a única espécie com número cromossômico conhecido é *L. apiculata*, onde Landrum (1991) encontrou aproximadamente $2n = 22$ e representa 50% do total de espécies do gênero (Tabela 3).

Grupo *Myrcia*

Neste grupo encontram-se os três dos quatro gêneros anteriormente circunscritos na subtribo Myrciinae (*sensu* Berg 1855-56, 1857-58) e são caracterizados pelos embriões com cotilédones foliáceos, sementes com testa membranosa e com até cinco óvulos por lóculo (Lucas *et al.* 2007). *Myrcia* é segundo maior gênero de Myrtaceae na América do Sul, com 374 espécies, e neste

grupo é seguido por *Calythranthes* (264) e *Marlierea* (90). Segundo recomendações de Govaerts (2008), todas as espécies de *Gomidesia* (60) devem ser consideradas como pertencentes a *Myrcia*.

São apresentadas contagens inéditas para cinco espécies de dois gêneros, *Myrcia* e *Calythranthes* (Tabela 1). Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2007a) amostraram 20 espécies em quatro gêneros (*Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* e *Myrcia*), dos quais 17 deles foram inéditos.

No gênero *Myrcia*, são conhecidos ao todo números cromossômicos para 15 espécies, perfazendo um total de apenas 3,5% das espécies do gênero (Tabelas 2 e 3). Neste estudo três contagens inéditas foram obtidas para o gênero, todas com $2n = 22$: *Myrcia brasiliensis*, *M. hebeptala* e *M. torta*, sendo que *M. hebeptala* e *M. brasiliensis* foram tratadas por Costa *et al.* (Capítulo 5) como *Gomidesia affinis* e *G. schaueriana*, respectivamente. *Gomidesia eriocalyx* e *G. spectabilis*, analisadas por Costa & Forni-Martins (2007a) são consideradas atualmente como sinônimos de *Myrcia eryocalyx* e *M. spectabilis*. Sendo assim, apenas uma espécie apresenta citótipos poliplóides neste gênero, *M. eriocalyx*, com $2n = 22$ e 44. Costa & Forni-Martins (2007a) encontraram duas outras espécies poliplóides em *Myrcia*, com $2n = 44$, no entanto identificadas somente a nível de gênero e não consideradas nesta análise. O grupo *Myrcia* (Lucas *et al.* 2007) tem distribuição exclusiva nos neotrópicos, no entanto, é o grupo que apresenta o menor percentual de espécies poliplóides, quando comparado aos demais (Tabela 2).

Para *Marlierea*, são registrados números cromossômicos para apenas três espécies (*M. clauseniana*, *M. tomentosa* e *M. warmingiana*), todas com $2n = 22$ (Costa & Forni-Martins 2007a). Neste trabalho, pudemos analisar outras duas populações de *M. tomentosa* e confirmar os relatos de Costa & Forni-Martins (2007a). Não foi verificada, até o presente, nenhuma espécie poliplóide em *Marlierea*. Este gênero é, aparentemente, polifilético dentro de *Myrcia* e de acordo com Landrum & Kawasaki (1997) diferencia-se de *Myrcia* apenas pelo

grau de prolongamento do hipanto acima do ovário e concrecência do cálice.

O gênero *Calyptranthes* é considerado monofilético (100% b.s) (Lucas *et al.* 2005, 2007) e bem delimitado em relação às demais espécies de *Myrcia* por possuir uma abertura do cálice fechado em forma de caliptra (Landrum & Kawasaki 1997). Todos os registros foram de $2n = 22$ e nenhuma espécie poliplóide é conhecida (Tabelas 1 e 2). Estas contagens perfazem um total de apenas 1,5% do gênero (Tabela 3).

Grupo *Plinia*

Este grupo reúne os gêneros *Plinia*, *Myrciaria*, *Siphoneugena* e *Neomitranthes*, e é o grupo-irmão do gênero monotípico *Algrizea* (Lucas *et al.* 2007). Este grupo é caracterizado pela presença de embriões com cotilédones plano-convexos não fundidos, sementes com testa membranácea, em média nove óvulos por lóculo, inseridos em um simples ponto no septo do ovário (Lucas *et al.* 2007).

Para *Plinia*, só existe informação para uma única espécie, *P. cauliflora*, onde Costa & Forni-Martis (2006a) determinaram $2n = 22$, correspondendo a 1,5% das 65 espécies do gênero. Estes autores também registram $2n = 22$ para *P. glomerata*, no entanto esta espécie é hoje considerada sinônimo de *Myrciaria glazioviana* (Govaerts *et al.* 2008).

O gênero *Myrciaria* é composto por 22 espécies e são relatados números cromossômicos para quatro espécies (Tabelas 2 e 3), todas com $2n = 22$.

Para os demais gêneros do grupo, *Neomitranthes* e *Siphoneugena*, bem como para o grupo-irmão *Algrizea*, não existem dados cromossômicos. Até então, não foi registrada poliploidia no *Plinia* group.

Grupo *Australasiano*

Este grupo é considerado irmão de todo o grupo sul-americano, sendo

composto por gêneros como *Austromyrtus*, *Decaspermum*, *Gossia*, *Octamyrtus*, *Rhodammia* e *Rhodomyrtus*. É caracterizado por embrião em forma de C, testa da semente óssea e por 20 a 70 óvulos por ovário (exceção de *Rhodomyrtus*) (Lucas *et al.* 2007).

Neste grupo são disponíveis números cromossômicos para apenas um único gênero, *Decaspermum*. São registrados $2n = 88$ para *D. fruticosum* e ocorrência citótipos tetra e octaplóide ($2n = 44, 88$) para *D. parviflorum* (Tabela 2). Estes registros somam cerca de 6% do total de espécies do gênero.

A poliploidia em Myrteae

No estado atual do conhecimento, a poliploidia tem um importante papel na diferenciação das espécies em diferentes gêneros dentro de Myrteae, ocorrendo ao menos seis vezes ao longo da história evolutiva da tribo Myrteae (Figura 4). Apenas em dois dos grupos propostos por Lucas *et al.* (2007), *Plinia* group e *Myrceugenia* group, não foram até o momento, encontradas espécies poliplóides, nem citótipos poliplóides. A maioria dos gêneros australasianos carece de determinações de números cromossômicos, havendo relatos de poliploidia em apenas um gênero, *Decaspermum*, até então poliplóide (Figura 4).

A poliploidia também tem um importante papel em dois dos maiores gêneros neotropicais de Myrtaceae, *Eugenia* (grupo *Eugenia*) e *Psidium* (grupo *Pimenta*), onde a ocorrência de citótipos poliplóides é freqüente (Tabela 2). Estes são os mais amplamente distribuídos gêneros em Myrteae e suas espécies ocorrem nos mais diversos tipos de habitats. A poliploidia teve um papel da diversificação destes gêneros, favorecendo a colonização de novos habitats e ampliando a sua distribuição geográfica em relação aos demais gêneros de Myrteae.

Espécies poliplóides são registradas em outros grupos como o grupo *Myrcia*, neotropical. Neste grupo, a incidência de poliploidia é muito baixa, ocorrendo apenas em *Myrcia*. No entanto, é necessária a ampliação da

amostragem neste grupo para avaliar a importância da poliploidia na diversificação de suas espécies.

No grupo *Myrteola*, existem dados de números cromossômicos para todos os gêneros (Tabela 2). Especialmente neste grupo, a poliploidia exerceu um papel importante na diversificação dos gêneros como *Ugni* e *Myrteola*, onde ocorrem espécies poliplóides. Ao contrário, em *Lophomyrtus* e *Neomyrtus* ocorrem apenas espécies diplóides.

A ocorrência de 27 registros poliplóides (26,2%), ou derivados por poliploidia seguida de disploidia ($2n = 32$ e $2n = 98$) reforça esta hipótese da importância desta alteração numérica de cromossomos em Myrtaceae, como ressaltada anteriormente em diversos estudos (Athinson 1947; Rye 1979; Costa & Forni-Martins 2006a, b, 2007a). No entanto, é necessária uma ampliação da amostragem em todos os grupos, nos diferentes gêneros, ainda carentes de investigação cromossômica, para avaliar a distribuição da poliploidia e dos citótipos na evolução da tribo Myrteae como um todo.

Referências bibliográficas

- Andrade FG & Forni-Martins ER. 1998. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae. *Genetics and Molecular Biology* 21(3 – suppl.): 166.
- Atchinson E. 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany* 34: 159-164.
- Bachir O & Abdellah B. 2006. Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L'Herit. (Myrtaceae). *Caryologia* 59: 207-212.
- Barroso GM. 1991. Myrtaceae. In: Sistemática de angiospermas do Brasil, vol. 2. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, Viçosa.
- Berg O. 1855-56. *Revisio Myrtacearum Americae*. *Linnaea* 27: 1-472
- Berg. O. 1857-59. *Myrtaceae*. In: von Martius C. F. P. (ed.). *Flora Brasiliensis* 14: 1 - 655.
- Bolkhovskikh Z, Matvejeva VG & Zakharyeva O. 1969. *Chromosome numbers of*

- Flowering Plants*. Academy of Sciences to the USSR.
- Bowden WM. 1945. A list of chromosome numbers in higher plants I. Acanthaceae to Myrtaceae. *American Journal of Botany* 32: 81-92.
- Coleman JR. 1982. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. *Revista Brasileira de Genética* 5: 533-549.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006a. Chromosome studies in *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54: 409-415.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006b. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia* 59: 7-13.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2007a. Chromosome studies in species of *Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* and *Myrcia* (Myrtaceae, subtribe Myrciinae). *Kew Bulletin* 62: 113-118.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2007b. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 571-580.
- Costa IR. 2004. *Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
- Dawson MI. 1987. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora – 29. Myrtaceae. *New Zealand Journal of Botany* 25: 367-369.
- D'Cruz R & Rao GB. 1962. Cytogenetic studies in two guava aneuploids. *Journal of the Indian Botanical Society* 41 316-321.
- Delay C. 1947. Recherces sur la structure des noyaux quiescents chez lês phanérogames. *Rev. Cytol. Et Cytophysiol. Vég* 9: 169-222; 10: 103-229.
- Éder-Silva E, Felix LP & Bruno RLA. 2007. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29: 110-114.
- Forni-Martins ER & Martins FR. 2000. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetics and Molecular Biology* 23: 947-955.
- Forni-Martins ER, Pinto-Maglio, CAP & Cruz ND. 1995. Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. *Revista Brasileira de Genética* 18: 281-288.
- Gill BS, Bir SS, Sidha MS & Singhal VK. 1984. Chromosome number reports LXXXIV. *Taxon* 33: 536-539.
- Gill BS. 1974. *Polyploidy in the woody genus Eugenia (Myrtaceae)*. In Kachroo P (ed.). *Adv. Front. Cytogenet* 348-356. Hindustan Publ. Co. Dehli.

- Goldblatt P & Johnson DE. 1990. Index to Plant Chromosome Numbers 1986–1987 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 30.
- Goldblatt P & Johnson DE. 1991. Index to Plant Chromosome Numbers 1988–1989 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 40.
- Goldblatt P & Johnson DE. 1994. Index to Plant Chromosome Numbers 1990–1991 (editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 51.
- Goldblatt P & Johnson DE. 1998. Index to Plant Chromosome Numbers 1994–1995 (editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 58.
- Goldblatt P & Johnson DE. 2000. Index to Plant Chromosome Numbers 1996–1997 (editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 81.
- Goldblatt P. 1981. Index to Plant Chromosome Numbers 1974–1978 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 6: 1–553.
- Goldblatt P. 1984. Index to Plant Chromosome Numbers 1979–1981 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 8.
- Goldblatt P. 1985. Index to Plant Chromosome Numbers 1982–1983 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 13.
- Goldblatt P. 1988. Index to Plant Chromosome Numbers 1984–1985 (Editor). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 23.
- Guerra M. 1983. O uso do Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.
- Kumar LSS & Ranade SG. 1952. Autotriploidy in guava (*Psidium guajava* Linn.). *Current Science* 21: 75-76.
- Landrum LR & Kawasaki ML. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.
- Landrum LR. 1986. Flora Neotropica. Monograph 45. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhynium* and *Luma* (Myrtaceae). The New York Botanical Garden Publishers
- Landrum LR. 1990. *Accara*: a new genus of Myrtaceae, Myrtinae from Brazil. *Systematic Botany* 15: 221-225.
- Lucas E, Belsham S, Nic Lughada E, Orlovich D, Sakuragui C, Chase M & Wilson P. 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251: 35-51.
- Lucas E, Harris AS, Mazine FF, Belsham SR, Nic Lughada EM, Telford A, Gasson PE & Chase M. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128.

- Majunder PK & Mukkerjee SK. 1972. Aneuploidy in guava (*Psidium guajava* L.) I. Mechanism of variation in chromosome number. *Cytologia* 37: 541-548.
- Matsumoto ST, Marin-Morales MA, Ruas CF & Ruas PM. 2000. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L`Her. (Myrtaceae). *Caryologia* 53: 205-212.
- Mazine FF. 2006. *Estudos taxonômicos em Eugenia L. (Myrtaceae), com ênfase em Eugenia sect. Racemosae O. Berg.* Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
- McVaugh R. 1956. Tropical American Myrtaceae. Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. *Fieldiana Botany* 29(3).
- Mehra PN. 1976. IOPB Chromosome number reports LIV. *Taxon* 25: 631-349.
- Moore RJ. 1973. Index to Plant Chromosome Numbers for 1967-1971 (editor). *Regnum Veg.* 90: 1-539.
- Moore RJ. 1974. Index to Plant Chromosome Numbers for 1972 (editor). *Regnum Veg.* 91: 1-108.
- Moore RJ. 1977. Index to Plant Chromosome Numbers for 1973-1974 (editor). *Regnum Veg.* 96. 1-257.
- Moussel B. 1965. Contribution à l'étude cyto-taxinomique des Myrtacées. *Mémoires du Museum National d'Histoire Naturelle. Serie B. Botanique* 16: 91-125.
- Niedenzu F. (1893). *Myrtaceae*. In: A. Engler & K. Prantl (ed.), Die Natürlichen Pflanzenfamilien III (7): 57 – 107. W. Engelmann, Leipzig.
- Pedrosa A, Gitaí J, Barros e Silva AE, Felix LP & Guerra M. 1999. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Botanica Brasilica* 13: 49-60
- Raven P. 1975. The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. *Annals of the Missouri Botanic Gardens* 62: 724 - 764.
- Roy RP & Jha. 1962. *Cytological studies in Myrtaceae*. Proc. 49th. Indian Sci. Congr. Pt3, abstracts 336.
- Rye B. 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. *Australian Journal of Botany* 27: 547-573.
- Salywon AM & Landrum LR. 2007. Curitiba (Myrtaceae): A new genus from the Planalto of southern Brazil. *Brittonia* 59: 301–307.
- Salywon AM. 2003. *A monograph of Mosiera (Myrtaceae)*. PhD. Dissertation, Arizona State University, Tempe, Arizona, U.S.A.

- Sanders RW, Stuessy TF & Rodríguez R. 1983. Chromosome numbers from the flora of the Juan Fernandez Islands. *American Journal of Botany* 70: 799-810.
- Schmid R. 1980. Comparative anatomy and morphology of *Psiloxylon* and *Heteropyxis*, and the subfamilial and tribal classification of Myrtaceae. *Taxon* 29: 559-595.
- Singhal VK, Gill BS & Bir SS. 1980. Chromosome number reports LXVII. *Taxon* 29: 355-357.
- Singhal VK, Gill BS & Bir SS. 1985. Cytology of woody species. *Proc. Indian Acad. Sci (Plant Sci.)* 94: 607-617.
- Srivastava HC. 1970. Chromosome studies in *Psidium molle* Bertol. *Science & Culture* 36: 177.
- Srivastava HC. 1977. Cytological studies in *Psidium friedrichstalianum* Niedenzu. *Cytologia* 42: 395-400.
- Stace CA. 1991. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2nd Edition, University Press: Cambridge.
- Sum BY, Stuessy TF & Crawford DJ. 1990. Chromosome counts from the flora of the Juan Fernandez Islands, Chile III. *Pacific Science* 44: 258-264.
- Uchiyama H & Koyama T. 1993. Chromosomes of *Myrciaria dubia*, Myrtaceae. *C.I.S. Chromosome Inform. Serv.* 54: 16-17.
- Vijayakumar N & Subramanian D. 1985. Cytotaxonomical studies in South Indian Myrtaceae. *Cytologia* 50: 513-520.
- Wilson P, O'Brien MM, Gadek PA & Quinn CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of interfamilial groups. *American Journal of Botany* 88: 2013-2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM & Quinn CJ. 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: 3-19.

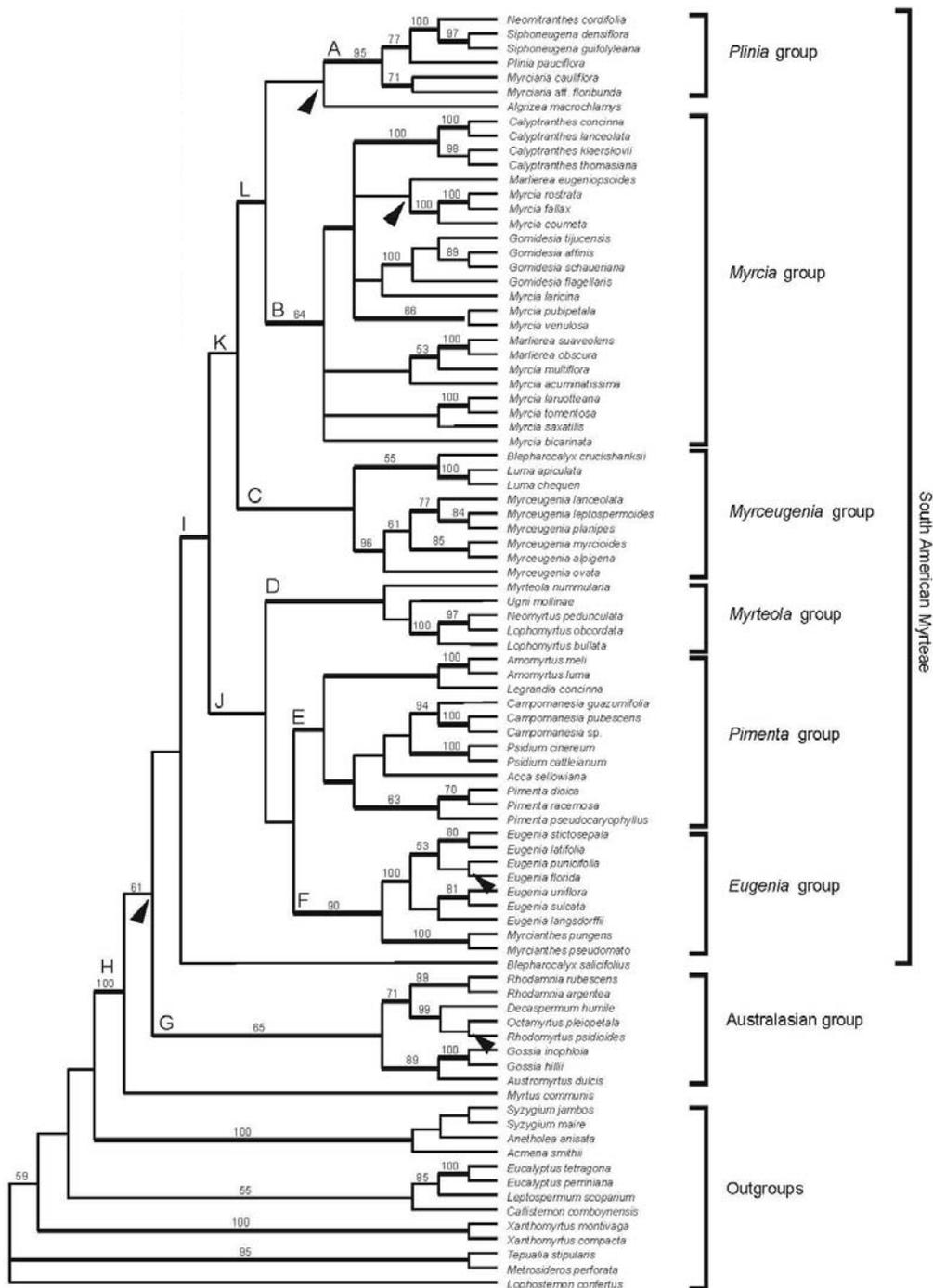


Figura 1. Árvore *sensu stricto* resultante da análise de parcimônia com pesagens sucessivas e análise bayesiana das sequências ITS, ETS, *psbA-trnH* and *matK*. Os valores de bootstrap superiores a 50% são indicados nos ramos; os clados que receberam probabilidades bayesianas superiores a 0.95 estão marcados com linhas mais espessas; os clados que não receberam suporte com a análise bayesiana estão marcados com setas (retirado de Lucas *et al.* 2007, *TAXON* 56 (4): 1105–1128).

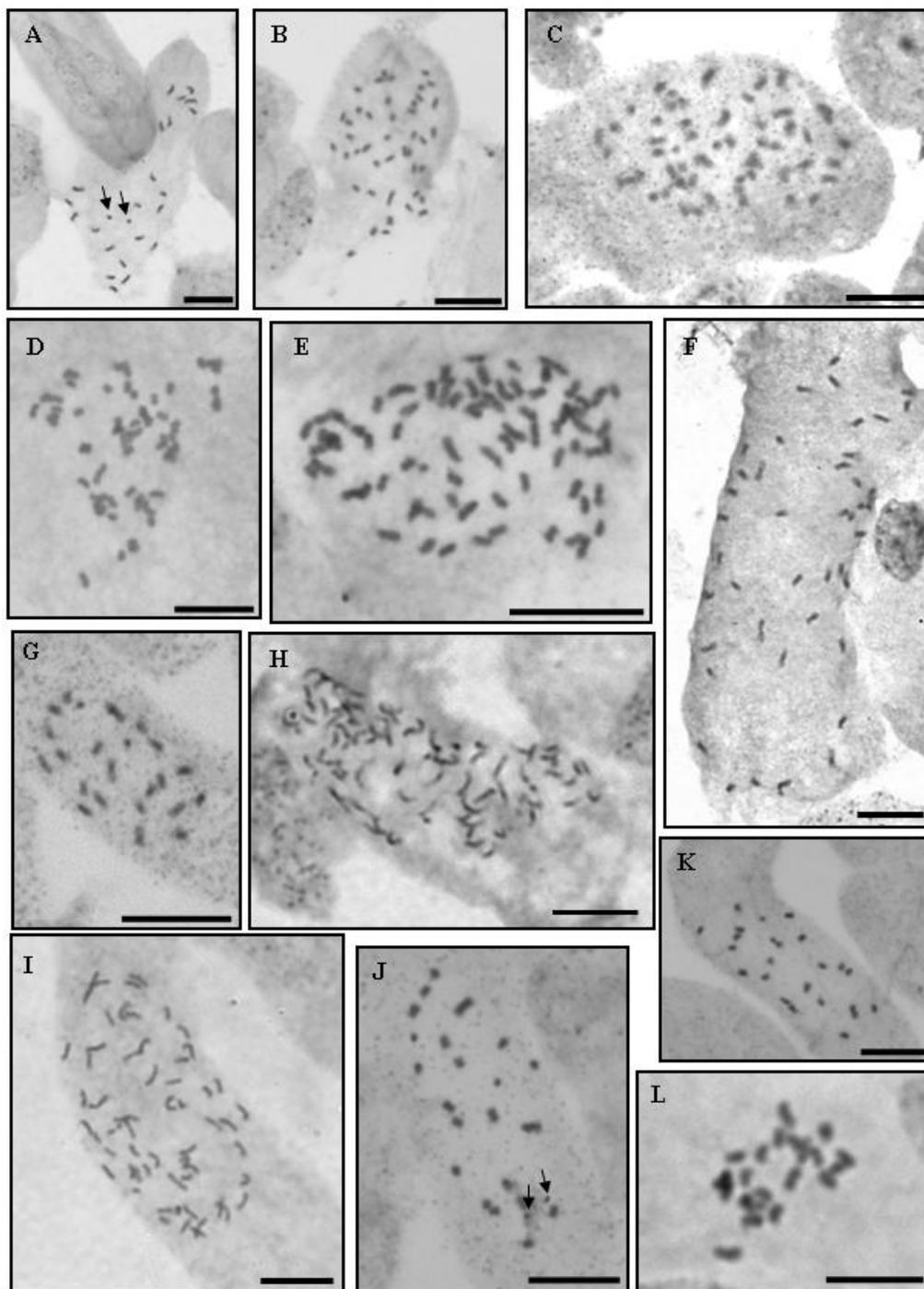


Figura 2. Metáfases mitóticas em espécies de Myrtinae (Myrtaceae). A – *Campomanesia adamantium* ($2n = 22$), B – *Psidium acutangulum* ($2n = 44$), C – *P. australe* ($2n = 55$), D e E – *P. cattleianum* ($2n = 44$ e $2n = 66$, respectivamente), F – *P. friedrichstalianum* ($2n = 44$), G – *P. guineense* ($2n = 22$), H – *P. myrtoides* ($2n = 88$), I – *P. rufum* ($2n = 55$), J - *Pimenta dioica* ($2n = 22$), K – *P. pseudocaryophyllus* ($2n = 22$) e L – *Myrrhinium atropurpureum* var. *atropurpureum* ($2n = 22$). Setas em A e G indicam satélites. Barras: A – K: $10\mu\text{m}$, L - $5\mu\text{m}$.

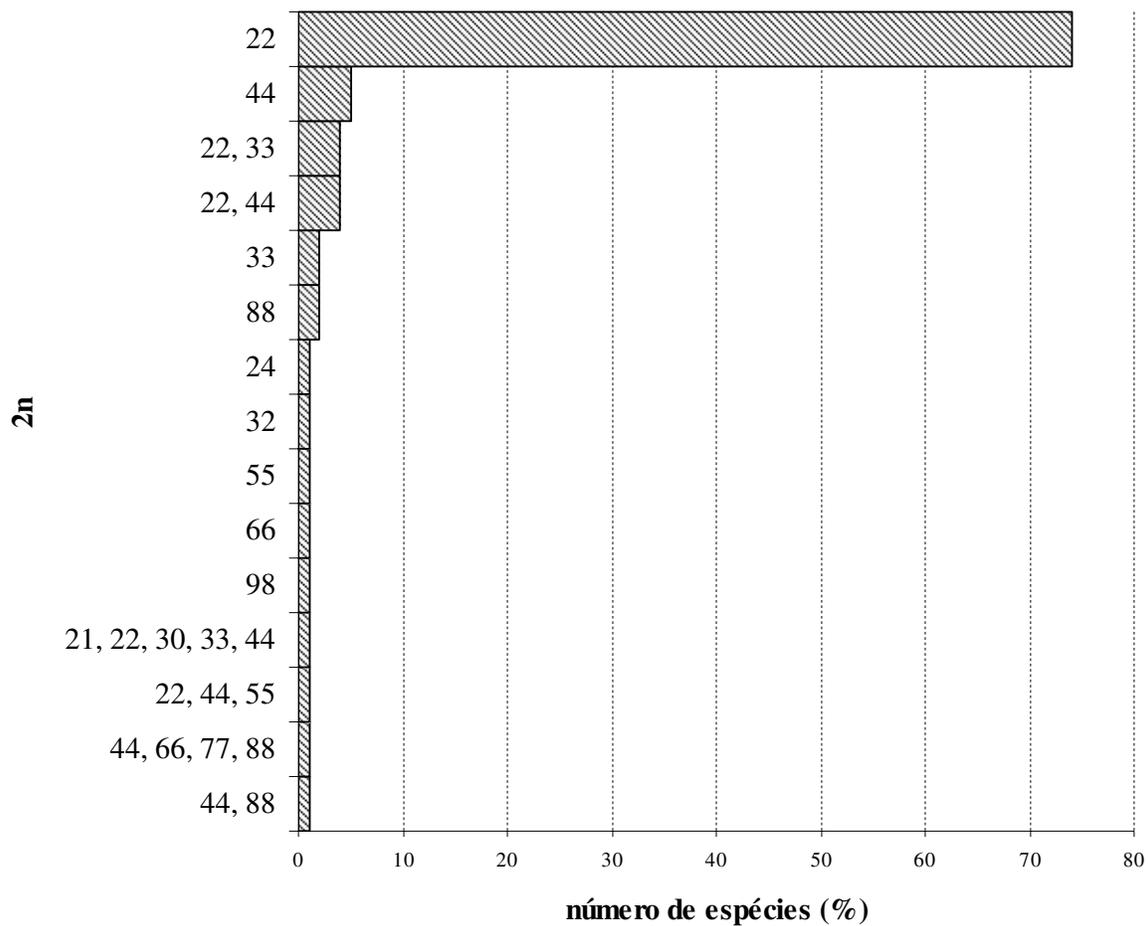


Figura 3. Distribuição dos números cromossômicos somáticos ($2n$) entre as espécies de Myrtaceae (tribo Myrteae), incluindo os resultados deste estudo (Tabela 1) e os obtidos na literatura (Tabela 2).

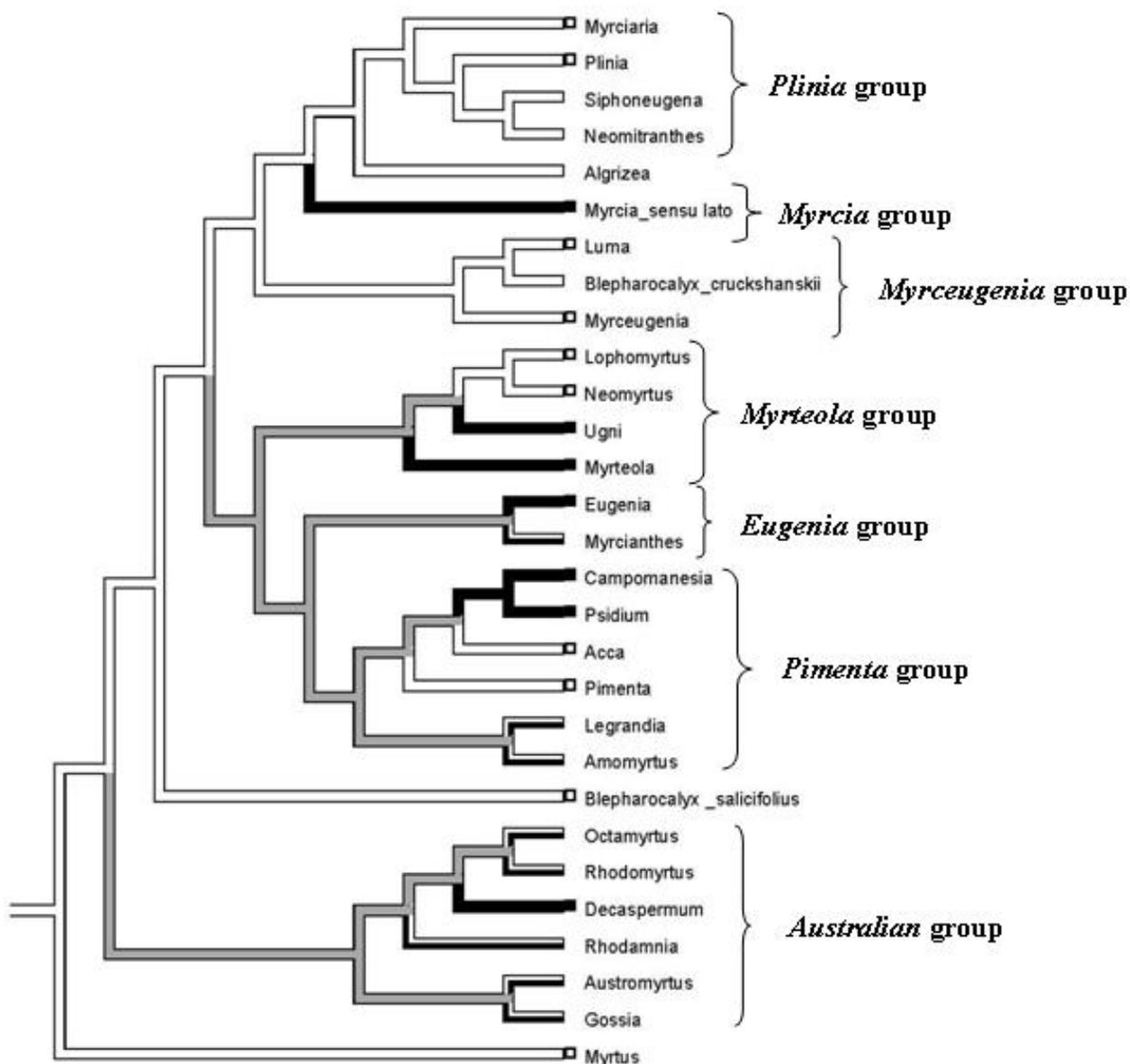


Figura 4. Distribuição dos números cromossômicos em Myrteae, ao longo da espinha da árvore filogenética (adaptada) de Lucas *et al.* (2007), resultantes de uma análise de parcimônia buscando os estados de caracteres ancestrais. Os ramos em cinza e hachurado (preto e branco) representam caminhos equívocos. Os ramos evidenciados em preto representam a ocorrência de espécies poliplóides (exclusivas ou apresentando citótipos). Os seguidos por um quadrado branco representam ausência de alguma espécie poliplóide (até o momento), e onde os quadrados estão ausentes representam ausência de qualquer dado cromossômico. Os outgroups foram retirados e os clados monofiléticos de gêneros individuais foram reduzidos para terminais simples. Lucas *et al.* (2007) utilizaram uma árvore semelhante para a otimização dos caracteres morfológicos e de distribuição geográfica em Myrteae (Figura 8, adaptada de Lucas *et al.* 2007, **TAXON** 56 (4): 1105–1128).

Tabela 1. Espécies analisadas no presente estudo. 2n: número cromossômico somático.
(*) espécies com contagens inéditas

Gênero válido	Espécies válidas	2n	Detalhes do voucher
<i>Acca</i>	<i>sellowiana</i> (O. Berg) Burret	22	BRASIL: SC, Blumenau
<i>Accara</i>	<i>elegans</i> (DC.) Landrum*	22	BRASIL: MG, Cardeal Mota
<i>Blepharocalyx</i>	<i>salicifolius</i> (Kunth) O.Berg*	22	BRASIL: MG, Cardeal Mota
<i>Calyptranthes</i>	<i>brasiliensis</i> Spreng.*	22	BRASIL: SP, Ubatuba
<i>Calyptranthes</i>	<i>clusiifolia</i> O.Berg*	22	BRASIL: SP, Itatiba
<i>Calyptranthes</i>	<i>concinna</i> DC.*	22	BRASIL: SP, Ubatuba
<i>Calyptranthes</i>	<i>lucida</i> Mart. ex DC.*	22	BRASIL: PR, Curitiba
<i>Campomanesia</i>	<i>guazumifolia</i> (Cambess.) O.Berg*	22	BRASIL: RS, Porto Alegre
<i>Campomanesia</i>	<i>laurifolia</i> Gardner*	22	BRASIL: RJ, Rio de Janeiro
<i>Campomanesia</i>	<i>guaviroba</i> (DC.) Kiaesrkou	22	BRASIL: RJ, Rio de Janeiro
<i>Campomanesia</i>	<i>phaea</i> (O. Berg) Landrum	22	BRASIL: SP, São Paulo
<i>Campomanesia</i>	<i>schlechtendaliana</i> (O.Berg) Nied.*	22	BRASIL: RJ, Rio de Janeiro
<i>Eugenia</i>	<i>crenata</i> Vell.*	22	BRASIL: RJ, Rio de Janeiro
<i>Eugenia</i>	<i>florida</i> DC.*	22	BRASIL: MG, Aceburgo
<i>Eugenia</i>	<i>linearifolia</i> DC.*	22	BRASIL: BA, Mucugê
<i>Eugenia</i>	<i>multicostata</i> D. Legrand*	22	BRASIL: SP, Ubatuba
<i>Eugenia</i>	<i>punicifolia</i> (Kunth) DC.	22	BRASIL: BA, Caitité
<i>Eugenia</i>	<i>stigmata</i> DC.*	22	BRASIL: SP, Campinas
<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i> L.	22	BRASIL: RJ, Rio de Janeiro
<i>Eugenia</i>	sp1	22	BRASIL: SP, Campinas, Souzas
<i>Eugenia</i>	sp2	22	BRASIL: SP, Campinas, Souzas
<i>Eugenia</i>	sp3	22	BRASIL: SP, Ubatuba
<i>Eugenia</i>	sp4	22	BRASIL: SP, Ubatuba
<i>Marlierea</i>	<i>tomentosa</i> Cambessèdes	22	BRASIL: SP, Ubatuba
<i>Myrceugenia</i>	<i>alpigena</i> D. Legrand	22	BRASIL: MG Passa Quatro
<i>Myrcia</i>	<i>acutiloba</i> O. Berg*	22	BRASIL: PI, Teresina
<i>Myrcia</i>	<i>brasiliensis</i> Kiaersk.*	22	BRASIL: SP, Ubatuba
<i>Myrcia</i>	<i>hebeptala</i> DC.*	22	BRASIL: MG, Ibitipoca

<i>Myrcia</i>	<i>rodosephala</i> O. Berg*	22	BRASIL: DF, Brasília
<i>Myrcia</i>	<i>selloi</i> O. Berg*	22	BRASIL: SP, Campinas
<i>Myrcia</i>	sp1	22	BRASIL: PI, Teresina
<i>Myrcia</i>	<i>torta</i> DC.*	22	BRASIL: DF, Brasília
<i>Myrciaria</i>	<i>trunciflora</i> O. Berg*	22	BRASIL: SP, Campinas
<i>Myrrhinium</i>	<i>atropurpureum</i> var. <i>atropurpureum</i> Schott*	22	BRASIL: RJ, Rio de Janeiro
<i>Pimenta</i>	<i>pseudocaryophyllus</i> var. <i>rufescens</i> *	22	BRASIL: MG, Carrancas
<i>Pimenta</i>	<i>dioica</i> (L.) Mérr.	22	BRASIL: RJ, Rio de Janeiro (cultivo)
<i>Psidium</i>	<i>acutangulum</i> DC.	44	BRASIL: SP, Campinas (cultivo)
<i>Psidium</i>	<i>australe</i> Cambess.*	55	BRASIL: MG, Carrancas
<i>Psidium</i>	<i>cattleianum</i> Afzel ex Sabine (fruto amarelo (pop1))	44	BRASIL: SP, Campinas
<i>Psidium</i>	<i>cattleianum</i> Afzel ex Sabine (fruto amarelo (pop2))	44	BRASIL: SP, Campinas
<i>Psidium</i>	<i>cattleianum</i> Afzel ex Sabine (fruto vermelho)*	66	BRASIL: RJ, Itatiaia
<i>Psidium</i>	<i>friedrichstalianum</i> O. Berg	44	COSTA RICA: San José
<i>Psidium</i>	<i>grandifolium</i> DC. (pop1)	44	BRASIL: SP, Itirapina
<i>Psidium</i>	<i>grandifolium</i> DC. (pop2)	44	BRASIL: SP, Assis
<i>Psidium</i>	<i>grandifolium</i> DC. (pop3)*	44	BRASIL: MG, Paraopeba
<i>Psidium</i>	<i>guajava</i> L. (cultivar branca)	22	BRASIL: SP, Campinas
<i>Psidium</i>	<i>guajava</i> L. (cultivar vermelha)	22	BRASIL: SP, Campinas
<i>Psidium</i>	<i>guineense</i> Sw. (pop1)*	22	BRASIL: PR, Jaguariaíva
<i>Psidium</i>	<i>guineense</i> Sw. (pop2)	22	BRASIL: BA, Caitité
<i>Psidium</i>	<i>guineense</i> Sw. (pop3)	22	COSTA RICA: San José
<i>Psidium</i>	<i>myrtoides</i> O. Berg*	88	BRASIL: DF, Brasília
<i>Psidium</i>	<i>rufum</i> Mart. ex DC.*	55	BRASIL: DF, Brasília

Tabela 2. Lista de números cromossômicos em espécies da tribo Myrteae. Nomes atualmente aceitos após a conferência das sinonímias no Myrtaceae World Checklist (2007). 2n: número cromossômico somático.

Gênero	Espécies válidas	2n	referência
	<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret	22	Bowden 1945 (como <i>Feijoa sellowiana</i>) Este estudo
	<i>Accara elegans</i> (DC.) Landrum	22	Este estudo
	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O.Berg	22	Este estudo
	<i>Calyptranthes brasiliensis</i> Spreng.	22	Este estudo
	<i>clusiifolia</i> O. Berg	22	Este estudo
	<i>concinna</i> DC.	22	Este estudo
	<i>lucida</i> Mart. ex DC.	22	Este estudo
<i>Campomanesia</i>	<i>adamantium</i> (Cambess.) O. Berg	22	Costa & Forni-Martins 2006b
	<i>eugenioides</i> (Cambess.) D.Legrand	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished
	<i>guaviroba</i> (DC.) Kiaersk.	22	Costa & Forni-Martins 2006b,
		88	Moussel 1965 (como <i>Psidium cerasoides</i>)
	<i>guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg	22	Este estudo
	<i>laurifolia</i> Gardner	22	Este estudo
	<i>phaea</i> (O. Berg) Landrum	22	Costa & Forni-Martins 2006b
	<i>pubescens</i> (Mart. ex DC.) O. Berg	22	Forni-Martins & Martins 2000, Costa & Forni-Martins 2006b
	<i>schlechtendaliana</i> (O. Berg) Nied.	22	Este estudo
	<i>xanthocarpa</i> (Mart.) O. Berg	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished
<i>Decaspermum</i>	<i>fruticosum</i> J.R.Forst. & G.Forst.	88	Mehra 1972
	<i>parviflorum</i> (Lam.) A.J.Scott subsp. <i>parviflorum</i>	44, 88	Mehra 1976, Mehra & Khosla 1972, 1979 (como <i>Decaspermum paniculatum</i>)
<i>Eugenia</i>	<i>aurata</i> O. Berg	22	Forni-Martins & Martins 2000, Costa & Forni-Martins 2006a
	<i>axillaris</i> (Sw.) Willd.	22	Bolkhovskii <i>et al.</i> 1969 (como <i>Eugenia baruensis</i>)

<i>bimarginata</i> DC.	32	Forni-Martins & Martins 2000
<i>brasiliensis</i> Lam.	22	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>crenata</i> Vell.	22	Este estudo
<i>dysenterica</i> DC.	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished
	33	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>florida</i> DC.	22	Este estudo
<i>francavilleana</i> O. Berg	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished (como <i>Eugenia glazioviana</i>)
<i>hyemalis</i> Cambess.	22, 44	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>involutrata</i> DC.	22	Costa & Forni-Martins 2006a (como <i>Eugenia bracteata</i>)
<i>klotzschiana</i> O. Berg	33	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>lilloana</i> D.Legrand	22	Coleman 1982
<i>linearifolia</i> DC.	22	Este estudo
<i>luschnathiana</i> (O. Berg) Klotzsch ex B.D.Jacks.	22	Pedrosa <i>et al.</i> 1999
<i>magnifica</i> Spring ex Mart	22	Costa & Forni-Martins 2006a (como <i>Eugenia moosenii</i>)
<i>monticola</i> (Sw.) DC.	44	Gill 1974 (como <i>Eugenia micrantha</i>)
<i>multicostata</i> D.Legrand	22	Este estudo; Costa & Forni-Martins 2006a (como <i>Eugenia moosenii</i>)
<i>pardensis</i> O. Berg	22	Delay 1947
<i>pitanga</i> (O. Berg) Nied.	22, 44	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>pluriflora</i> DC.	66	Andrade & Forni-Martins 1998
<i>punicifolia</i> (Kunth) DC.	22, 33	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>pyriformis</i> Cambess.	22, 33	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>sonderiana</i> O. Berg	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished
<i>stigmata</i> DC.	22	Este estudo
<i>uniflora</i> L.	22	Este estudo, Costa & Forni-Martins 2006 ^a

	33	Moussel 1965 (como <i>Eugenia costata</i>), Singhal <i>et al.</i> 1980, 1984, 1985
<i>uruguayensis</i> Cambess.	24	Moussel 1965 (como <i>Eugenia guabiju</i>)
<i>Hexachlamys edulis</i> (O. Berg) Kausel & D.Legrand	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished
<i>Lophomyrtus bullata</i> Burret	22	Dawson 1987
<i>obcordata</i> (Raoul) Burret	22	Dawson 1987
<i>Luma apiculata</i> (DC.) Burret	22	Landrum 1981
<i>Marlierea clauseniana</i> (O. Berg) Kiaersk	22	Costa & Forni-Martins 2007a
<i>tomentosa</i> Cambess.	22	Costa & Forni-Martins 2007a
<i>warmingiana</i> Kiaersk.	22	Costa & Forni-Martins 2007a
<i>Mosiera ehrenbergii</i> (O.Berg) Landrum,	22	Salywon 2003
<i>Myrceugenia alpigena</i> (DC.) Landrum	22	Landrum 1981 (como <i>Myrceugenia bracteosa</i>)
<i>brevipedicellata</i> (Burret) D.Legrand & Kausel	22	Landrum 1981
<i>euosma</i> (O. Berg) D.Legrand	22	Landrum 1981
<i>exsucca</i> (DC.) O. Berg	22	Landrum 1981
<i>fernandeziana</i> (Hook. & Arn.) Johow	22	Sanders <i>et al.</i> . 1983
<i>miersiana</i> (Gardner) D.Legrand & Kausel	22	Landrum 1981
<i>myrcioides</i> (Cambess.) O. Berg	22	Costa & Forni-Martins 2007a
<i>ovata</i> (Hook. & Arn.) O. Berg	22	Landrum 1981, Costa & Forni-Martins 2007a
<i>pilotantha</i> (Kiaersk.) Landrum	22	Landrum 1981
<i>schulzii</i> Johow	22	Sanders <i>et al.</i> . 1983
<i>Myrcia acutiloba</i> O. Berg	22	Este estudo
<i>bella</i> Cambess.	22	Costa & Forni-Martins 2007a, Forni-Martins & Martins 2000
<i>brasiliensis</i> Kiaersk.	22	Este estudo (= <i>Gomidesia schaueriana</i>)
<i>eriocalyx</i> DC.	22, 44	Costa & Forni-Martins 2007a (como <i>Gomidesia eryocalyx</i>)

<i>guianensis</i> (Aubl.) DC.	22	Costa & Forni-Martins 2007a, Forni-Martins & Martins 2000 (como <i>Myrcia lingua</i>)
<i>hebetata</i> DC.	22	Este estudo (= <i>Gomidesia affinis</i>)
<i>hilariana</i> O. Berg	22	Costa & Forni-Martins 2007a (como <i>Myrcia formosiana</i>)
<i>laruotteana</i> Cambess.	22	Costa & Forni-Martins 2007a
<i>multiflora</i> (Lam.) DC.	22	Costa & Forni-Martins 2007a
<i>obovata</i> (O. Berg) Nied.	22	Andrade <i>et al.</i> 2007 (como <i>Myrcia crassifolia</i>)
<i>rodosephala</i> O. Berg	22	Este estudo
<i>selloi</i> (Spreng.) N. Silveira	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished Este estudo
<i>spectabilis</i> DC.	22	Costa & Forni-Martins 2007a (como <i>Gomidesia spectabilis</i>)
<i>splendens</i> (Sw.) DC.	22	Costa & Forni-Martins 2007a (como <i>Myrcia fallax</i>)
<i>torta</i> DC.	22	Este estudo
<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O. Berg	22	Bernadello <i>et al.</i> 1990
<i>fragrans</i> (Sw.) McVaugh	22	Landrum 1981
<i>pungens</i> (O. Berg) D.Legrand	22	Dornelas <i>et al.</i> , unpublished
<i>Myrciaria delicatula</i> (DC.) O. Berg	22	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh	22	Uchuyama & Koyama 1993, Dornelas <i>et al.</i> , unpublished
<i>Myrciaria tenella</i> (DC.) O. Berg	22	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>Myrciaria glazioviana</i> (Kiaersk.) G.M.Barroso ex Sobral	22	Costa & Forni-Martins 2006a (como <i>Plinia glomerata</i>)
<i>Myrrhinium atropurpureum</i> Schott	22	Moussel 1965 (como <i>Myrrhinium sarcopetalum</i>), Este estudo
<i>Myrteola nummularia</i> (Lam.) O. Berg	44	Sun <i>et al.</i> 1990
<i>Myrtus communis</i> L.	22	Bolkhovskikh 1969, Delay 1947, Roy & Jha 1962,

		Moussel 1965
<i>Neomyrtus pedunculata</i> (Hook.f.) Allan	22	Dawson 1987
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	22	Este estudo; Bolkhovskikh 1969 (como <i>P. officinalis</i>)
<i>pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum	22	Este estudo
<i>racemosa</i> (Mill.) J.W.Moore	22	Janaki Ammal 1945 (como <i>Pimenta acris</i>)
<i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel	22	Costa & Forni-Martins 2006a
<i>Psidium acutangulum</i> Mart. ex DC.	44	Costa & Forni-Martins 2006b, Forni-Martins & Martins 2000
<i>arboreum</i> Vell.	98	Eder-Silva <i>et al.</i> 2007
<i>australe</i> Cambess.	55	Este estudo
<i>cattleianum</i> Afzel. ex Sabine	44, 66, 77, 88	Atchison 1947 (como <i>Psidium variabile</i> e <i>P. coriaceum</i>) Hirano <i>et al.</i> 1969, Singhal <i>et al.</i> 1980, Costa & Forni-Martins 2006b, Este estudo
<i>friedrichsthalianum</i> (O. Berg) Nied.	22 44	Hirano <i>et al.</i> 1969, Srivastava 1977, Molero <i>et al.</i> 2006, Este estudo
<i>grandifolium</i> Mart. ex DC.	44	Costa & Forni-Martins 2006b (como <i>Psidium cinereum</i>) Janaki Ammal 1945 Atchison 1947
<i>guajava</i> L.	21 22 30 33 44	Kumar & Ranade 1952 D´Cruz & Rao 1962 Hirano <i>et al.</i> 1969 Srivastava 1977 Singhal <i>et al.</i> 1980, Vijayakumar & Subramanian 1985, Costa & Forni-Martins 2006b, Molero <i>et al.</i> 2006
<i>guineense</i> Sw.	22	Este estudo

	44	Srivastava 1970 (como <i>Psidium molle</i>)
	55	Eder-Silva <i>et al.</i> 2007 (como <i>Psidium araça</i>)
<i>montanum</i> Sw.	33	Moussel 1965
<i>myrtoides</i> O. Berg	88	Este estudo
<i>rufum</i> Mart. ex DC.	55	Este estudo
<hr/> <i>Rhodymyrtus tomentosa</i> (Sol.) Hassk.	22	Gill <i>et al.</i> 1984, Vijayakumar & Subramanian 1985
<i>Ugni molinae</i> Turcz.	22	Sanders <i>et al.</i> 1983
<i>selkirkii</i> (Hook. & Arn.) O. Berg	44	Sanders <i>et al.</i> 1983
		<hr/>

Tabela 3. Gêneros de Myrteae com número de espécies com contagem cromossômica (Num. Crom) e número de espécies estimadas (Num. Esp.), acompanhados da porcentagem de espécies com número cromossômico conhecido (Abrangência %). As estimativas foram retiradas do WCM (Govaerts *et al.* 2008).

Gênero	Num. Crom.	Num. Esp.	Abrangência (%)
<i>Acca</i>	1	3	33,3
<i>Accara</i>	1	1	100,0
<i>Blepharocalyx</i>	1	3	33,3
<i>Calyptranthes</i>	4	263	1,5
<i>Campomanesia</i>	9	37	24,3
<i>Decaspermum</i>	2	33	6,1
<i>Eugenia</i>	26	1013	2,6
<i>Hexachlamys</i>	1	15	6,7
<i>Lophomyrtus</i>	2	2	100,0
<i>Luma</i>	1	2	50,0
<i>Marlierea</i>	3	96	3,1
<i>Mosiera</i>	1	24	4,1
<i>Myrceugenia</i>	10	45	22,2
<i>Myrcia</i>	15	369	3,5
<i>Myrcianthes</i>	3	36	8,3
<i>Myrciaria</i>	4	22	18,2
<i>Myrrhinium</i>	1	1	100,0
<i>Myrteola</i>	1	3	33,3
<i>Myrtus</i>	1	2	50,0
<i>Neomyrtus</i>	1	1	100,0
<i>Pimenta</i>	3	15	20,0
<i>Plinia</i>	1	65	1,5
<i>Psidium</i>	12	93	11,8
<i>Rhodomyrtus</i>	1	15	6,7
<i>Ugni</i>	2	4	50,0

CAPÍTULO 3

Karyotype analysis in South American Myrtaceae

Artigo apresentado na íntegra na forma no qual foi publicado no periódico

Botanical Journal of the Linnean Society, 155: 571-580 (2007)

DOI: 10.1111/j.1095-8339.2007.00704.x

Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae

ITAYGUARA R. COSTA^{1*,2} and ELIANA R. FORNI-MARTINS²

¹*Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PhD), Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).*

²*Departamento de Botânica, IB, UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n. Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Fax: ++19 37886168*

*Corresponding author: e-mail: itayguara@gmail.com

Received September 2006; accepted for publication June 2007

In Myrtaceae (Myrteae) the chromosome number $2n=2x=22$ is the most common, however variations occur on ploidy level with some triploid ($2n=3x=33$) and tetraploid ($2n=4x=44$) species. Karyotype details in this group are scarce because the chromosomes are small ($< 2\mu\text{m}$). In this work, we carried out a karyotypic analysis in 15 species of Myrtaceae grouped in different subtribes and genera. To obtain mitotic metaphases, the root tips were pre-treated with 2mM 8-hydroxyquinoline for 24 h, at 8°C, fixed in Farmer solution and frozen (-20°C) until slide preparation and stained with the Giemsa technique. The measures of chromosome length (long arm – L, short arm - S), were taken and diverse karyotypic parameters were calculated for each species. The karyotypes in fleshy-fruited taxa (Myrteae) were more varied than in the other previously analysed dry-fruited group (*Eucalyptus*, Eucalypteae), where the chromosomes were exclusively metacentric. Analysis of the karyotypic parameters was useful for characterization of species in Myrtaceae (Myrteae). © 2009 The Linnean Society of London. *Botanical Journal of the Linnean Society*

ADDITIONAL KEYWORDS: cytotaxonomy – chromosomes – karyotypes – Myrtaceae - Myrteae.

INTRODUCTION

Myrtaceae is one of the most important families of Myrtales (*sensu* APG 2003) with ca. 3800 species and 130 genera (Wilson *et al.*, 2001). It was traditionally divided in two subfamilies: Myrtoideae, with one tribe, and Leptospermoideae, two tribes, according with Niedenzu (1893). Myrtoideae, with only tribe Myrteae (Niedenzu, 1893), circumscribes three subtribes, based mainly on embryo morphology: Eugeniinae, Myrciinae and Myrtinae (Berg 1855-56; 1857-59). Myrtaceae recently had its intrafamilial circumscription reevaluated by Wilson *et al.* (2005), who described 15 tribes in Myrtoideae (grouping all traditional genera with dry and baccoid fruits) and suggested another subfamily, Psyloxiloideae (with two monogeneric tribes, Psiloxyleae e Heteropyxideae). Following Berg (1855-56; 1857-59), all Brazilian species of Myrtaceae were circumscribed in Myrtoideae, tribe Myrteae.

Chromosome studies in Brazilian and Neotropical species of Myrtaceae (Myrteae) are still scarce. Most of the studies were carried out in Australasian species – traditional Leptospermoideae (Athison, 1947; Brighton & Ferguson, 1976; Lange & Murray, 2004; Matsumoto *et al.*, 2000; Rye, 1979; Tyagi *et al.*, 1991). Forni-Martins *et al.* (1995), Andrade & Forni-Martins (1998), Pedrosa *et al.* (1999) and Forni-Martins & Martins (2000) made the first studies in Brazilian species, in which they analyzed chromosome numbers of 10 species, with previously unpublished counts, including species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Myrcia* DC.

Recently, Costa (2004) and Costa & Forni-Martins (2006a, b, c) described chromosome counts of ca. 50 species of Myrteae, belonging to different subtribes (Eugeniinae, Myrciinae and Myrtinae) with predominance of $2n = 22$. These were new for the majority of species and even for some genera, such as *Gomidesia* O. Berg, *Marlierea* Cambess. and *Plinia* L., having also enhanced the knowledge

of chromosome numbers for the two most diverse genera of Myrteae, *Eugenia* L. e *Myrcia*. The authors confirmed the basic chromosome number $x = 11$ for of Myrtaceae, previously proposed by Atchinson (1947) and Raven (1975). However several other neotropical genera, as *Accara* Landrum, *Blepharocalyx* O. Berg, *Calycolpus* O. Berg, *Mosiera* Small e *Ugni* Turcz (Myrtinae), *Calyptranthes* Sw. (Myrciinae), *Calycorectes* O. Berg, *Hexaclamys* O. Berg, *Neomitranthes* D. Legrand e *Siphoneugena* O. Berg (Eugeniinae) are still in need of chromosome studies.

According Costa (2004), the identification of Brazilian species of Myrtaceae is difficult because of the speciation by hybridization and poliploidy, giving rise to recombinant types with intermediate morphological characters between original taxa. Chromosome differentiation, especially by chromosome number duplication, interrupted gene flow between them.

Chromosome numbers and karyotypic parameters, such as form and size of chromosomes, among others, are of great importance, supplying characters for taxonomic studies (Jackson, 1971; Raven, 1975; Stace, 1991). Informations on the morphology of the chromosomes in Myrteae species are practically nonexistent, probably because they are small, reaching 2.0 μ m (Costa, 2004). Karyotype details were described only for some species of *Eucaliptus* L'Hér. (Eucalypteae) that showed highly symmetrical karyotypes with exclusively metacentric chromosomes (Matsumoto *et al.*, 2000; Matsumoto & Marin-Morales, 2001). In Myrteae, Vijayakumar & Subramanian (1985) described the karyotypic variation in different cultivated varieties of *Psidium guajava*. The species presented moderately symmetrical karyotypes (average TF% of 33.9%) and small chromosomes, varying from 1.8 to 0.8 μ m, being the most detailed register of karyotype in this group, with 3 to 6 pairs of chromosomes presenting centromere next to the terminal region (Vijayakumar & Subramanian, 1985), while in *Psidium acutangulum* predominance of metacentric chromosomes was observed (Forni-Martins & Martins, 2000).

The present work describes the karyotypes of some Brazilian species of Myrtaceae, aiming at to evaluate the potential of the karyotype data for species characterization in this group.

MATERIAL AND METHODS

Material collecting - The 15 analyzed species, including eight genera in different subtribes of Myrteae (Eugeniinae, Myrciinae and Myrtinae), had its chromosome numbers previously determined by Costa & Forni-Martins (2006a, b, c). They had been collected in different savanic (*cerrado s.s.*, *campos rupestres*) and forest (Tropical Rain Forest) vegetations in Southeastern Brazil (for voucher details, see Costa, 2004; Costa & Forni-Martins 2006a, b, c). These species had been identified by means of specialized bibliography and comparisons at Herbaria and confirmed by specialists (Prof. Marcos Sobral - UFMG, MSc. Eve Lucas - RBGKew and Dr. Carolyn Proença - UnB). Voucher materials were deposited in the UEC Herbarium (Universidade Estadual de Campinas) (Table 1).

Karyotype analysis - To obtain mitotic metaphases, seeds were germinated at temperatures of 28°-30°C. The root tips were pre-treated with 2mM 8-hydroxyquinoline for 24 h, at 8°C and fixed in Farmer's solution. For slide preparation they were frozen (-20°C) stained with the Giemsa technique (Guerra 1983). The slides were examined by light microscopy and meiotic and mitotic cells with a good chromosome condensation and spreading were photographed with a photomicroscope.

The measures (in 5 to 10 metaphases) of chromosome length (long arm - L, short arm - S), were made using the MicroMeasure program version 3.01 (<http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>). The nomenclature of the chromosome types followed Guerra (1986), having for base the Centromeric

Index ($CI = S/L+S$) and the ratio between arms ($R = L/S$). Ideograms were elaborated for each species based on the average measure of each chromosome pair. The Total Chromatin Length - TCL, with the addition of the length of all the chromosomes; the Index of Karyotypic Symmetry - $TF\% = 100 \sum S. \sum L^{-1}$ (Huziwara, 1962), and Symmetry Indexes of Zarco (1986) – A1 and A2, indicated for comparison of species with few differences in the karyotypic symmetry were also calculated. The intrachromosome asymmetry (A1) is calculated by the ratio between the chromosome arms and the interchromosome asymmetry (A2) is given by the variation in length chromosome, independent of the chromosome number.

RESULTS AND DISCUSSION

The chromosome numbers of $2n = 22$ and $2n = 44$ were distributed between the different species, genera and subtribes, confirming the previous records of Costa & Forni-Martins (2006a, b, c). Among the 15 species (Figs 1-12), only four presented $2n = 4x = 44$: *E. hyemalis* (Fig. 2), *Myrcia* sp. (Fig. 9), *P. cattleianum* (Fig. 11) and *P. cinereum* (Fig. 12). The basic chromosome number of $x = 11$ in Myrtaceae (Myrteae) is constant, with polyploid variations occurring in several species (Athison, 1947; Andrade & Forni-Martins, 1998; Costa, 2004; Costa & Forni-Martins, 2006a, b, c).

All karyotype data referring to the size and chromosome morphology are unknown (Fig. 13, 14 and 15, Table 1). No secondary constrictions were observed, probably due to the small size of the chromosomes and to inespecific coloration. The length of chromosomes varied from $0.38\mu\text{m}$ (in *Psidium cinereum*) to $1.61\mu\text{m}$ (in *C. pubescens*) (Table 1). Among the species with $2n = 22$, the TCL varied from $12.84\mu\text{m}$ in *P. cauliflora* to $22.25\mu\text{m}$ in *C. pubescens*. The higher value of TCL ($34.10\mu\text{m}$) was observed in *E. hyemalis*, due to its polyploidy

chromosome number ($2n = 44$).

In all species, the variation of size between the chromosomes was gradual, it is not possible to recognize groups of long, intermediate, or small chromosomes.

In Myrtaceae, karyomorphological analysis doesn't support the subtribal classification in Myrteae. Alternatively, in other groups, as Malpighiaceae, karyomorphological analysis supported the intrafamilial classification in two great subfamilies: Malpighioideae, with $x = 5$, small chromosomes, species lianoids and winged fruits; and Byrsonimoideae, with $x = 6$, large chromosomes, shrub or tree species with not-winged fruits (Lombello & Forni-Martins, 2002). In Sapindaceae, cytotaxonomy has contributed for the knowledge of taxonomic and evolutive relationships. Variations in the karyotypes due to reduction in the chromosome number associated with the increase of the absolute length of the chromosomes, has supplied indications of the derivation of the tree to the lianoid pattern, characteristic of the Paullineae (Lombello & Forni-Martins, 1998).

Plinia cauliflora was the only species to present exclusively metacentric chromosomes. In general, predominance of metacentric chromosomes was observed, with exception of some species with a bigger proportion of submetacentric chromosomes, as *Eugenia bracteata* and *E. puniceifolia* (in Eugeniinae) and *Marlierea tomentosa* (Myrciinae), all with $2n = 22$. These three species, plus *Myrciaria tenella* (Eugeniinae) and *Gomidesia* sp (Myrciinae) were the only species to present TF % lower than 40.00 (Table 1). The TF% indicates moderate degree of karyotype symmetry in the majority of the species, reaching maximum value in *Myrcia lingua* (45.37). Srivastava & Subramaniam (1985) had also observed karyotypes with moderate degree of symmetry in Myrtaceae in different cultivated varieties of *Psidium*, with TF% varying from 31.1 to 38.4, with 3 to 6 chromosomes with the centromer next to the terminal region. The extremes in the family are: an asymmetric karyotype record in *Eugenia caryophyllata* (TF% = 23.70, Srivastava & Subramaniam, 1985) and the high

symmetry in species of *Eucalyptus*, where the great majority of the chromosomes is metacentric, with values of TF% varying of 45.90 to 48.60 (Matsumoto *et al.*, 2000; Matsumoto & Marin-Morales, 2001). In *Eucalyptus*, only two species present a pair of submetacentric chromosomes (Mora *et al.*, 2005).

The estimates of TF% (Huziwara, 1962) are based only on the differences in the centromere position, not evaluating the relative size of the chromosomes the original parameter considered by Lewitsky (*in* Stebbins, 1971). The Asymmetry Index of Zarco (1986) however, combines centromeric position and relative size of the chromosomes, leading to different results of the ones obtained by means of index TF%. Species with bigger values of A1 and A2 would have more karyotype asymmetry by accumulation of major differences in the centromeric position and chromosome size. Among the five species with TF% lower than 40.00, *Gomidesia* sp and *Eugenia puniceifolia* present more asymmetrical karyotypes, according Zarco (1986). *Marlierea tomentosa* had the highest values of A1 (differences in the centromeric position), however presented chromosomes with similar lengths (low values of A2). Similar situation occurred in *Myrcia* sp, which presented TF% of 42.39 (Table 1). To facilitate the comparative discussion of the karyotypes, TF% will be used only due to the availability of this information in literature.

Following we discuss the results for each subtribe of Myrteae (*sensu* Berg, 1855-56; 1857-59).

Subtribe Eugeniinae O. Berg

In *Eugenia*, the TCL varied from 14.75µm in *E. puniceifolia* to 34.10µm for *E. hyemalis*, this one being the only tetraploid species ($2n = 2x = 44$). Predominance of metacentric chromosomes was observed in two species, *E. hyemalis* and *E. uniflora*, while in *E. bracteata* and *E. puniceifolia* the majority of the chromosomes were submetacentric. *Eugenia puniceifolia* showed the most

asymmetrical karyotype (TF% = 35.80), among all the analyzed species, due to the biggest proportion of submetacentric chromosomes (Table 1, Figs 13 and 16). The only previous study in species of *Eugenia* was presented by Vijayakumar & Subramanian (1985) for *E. caryophyllata* with $2n = 22$, with a high degree of asymmetry (TF% = 23.70) and slightly bigger chromosomes than the ones found here, with variation from $2\mu\text{m}$ to $1\mu\text{m}$, resulting in a TCL of $29.60\mu\text{m}$. However, this species is actually circumscribed in *Syzygium*, as *S. aromaticum* (L.) Merr & L. M. Perry, considered phylogenetically distant from *Eugenia* (Lucas *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005). In accordance with Dornelas (*pers. comm.*), *Syzygium* species present a genome size two to four times bigger than *Eugenia* species.

The *Myrciaria* species, both with $2n = 22$, presented considerable differences in the karyotypic parameters (Table 1, Figs 13 and 16). *Myrciaria tenella* has a more asymmetrical karyotype (TF% = 38.92) with chromosomes varying between $1.38\text{--}0.63\mu\text{m}$ and $\text{TCL} = 21.90\mu\text{m}$, in contrast to *M. delicatula* with more symmetric karyotype (TF % = 43.81) and slightly smaller chromosomes ($1.18\text{--}0.48\mu\text{m}$, $\text{TCL} = 16.40\mu\text{m}$).

For *Plinia*, the only species so far analysed *P. cauliflora* ('jaboticaba'), presented the most symmetric karyotype in Eugeniinae, with TF% = 44.23, smallest Zarco's Symmetry Indexes of the subtribe, the chromosomes varying from $0.82\text{--}0.44\mu\text{m}$ and $\text{TCL} = 12.84\mu\text{m}$ (Table 1, Figs 13 and 16).

The taxonomic delimitation between *Myrciaria* and *Plinia* is complex, with *Plinia* species have a persistent calyx and *Myrciaria* species have a deciduous calyx (Sobral, 1993). Unfortunately, due to small sampling (two species of *Myrciaria* and one of *Plinia*), the comparison of karyotype data was not useful to solve taxonomic problems related to this genera. Karyological data like chromosome morphology, TCL and TF% were more similar between *M. delicatula* and *P. cauliflora* than between *Myrciaria* species.

Subtribe Myrciinae O. Berg

For *Gomidesia*, the only analyzed species (still unidentified) presented chromosomes varying between 1.35-0.52 μm and $\text{TCL} = 18.02\mu\text{m}$. The karyotype was more asymmetrical in comparison with other species and genera of Myrciinae, with $\text{TF}\% = 37.50$ (Table 1, Figs 14 and 16).

Among the two species of *Marlierea*, both with $2n = 22$, *M. tomentosa* had a more asymmetrical karyotype ($\text{TF}\% = 37.62$) with small variation of size between the chromosomes (Fig. 14). In contrast, *M. warmingiana* showed greater karyotype symmetry ($\text{TF}\% = 42.70$). These differences may be due to the higher proportion of submetacentric chromosomes in *M. tomentosa* (Table 1, Fig 14 and 16). The smallest karyotype was observed in *M. tomentosa* (Table 1, Fig. 14), with $\text{TCL} = 13.50\mu\text{m}$.

In *Myrcia*, the two analyzed species didn't show a great difference in the size of the chromosomes (Table 1, Fig. 3), however the TCL varied from 19.60 μm in *M. lingua* to 32.57 μm for *Myrcia* sp, due to the duplicated number of chromosomes ($2n = 44$) of the last one. Both species presented $\text{TF}\% > 40.00$ (Table 1), with *Myrcia* sp presenting more variation between the chromosome arms.

Myrciinae is considered the most derived subtribe of Myrteae, and the delimitation of these three genera (*Gomidesia*, *Marlierea* and *Myrcia*) is unclear, mainly between *Myrcia* and *Marlierea*, which are separated based on hypanthium development and floral bud rupture (Landrum & Kawasaki, 1997). In recent phylogenetic analysis (Lucas *et al.*, 2005), the resolution between genera remains obscure; however *Gomidesia* appears as a monophyletic group, considering both morphological and molecular data. The karyotypic analysis also does not contribute for characterization of these genera, because there are coincidences in the size and chromosome morphology between the species.

Subtribe Myrtinae O. Berg

In this group, all analyzed species had symmetrical karyotypes, with TF% values > 40.00 and predominance of metacentric chromosomes (Table 1, Fig. 15).

Campomanesia pubescens presented larger chromosomes than the two species of *Psidium*, *P. cattleianum* and *P. cinereum* (Table 1, Figs 15 and 16). Although species of *Psidium* presented $2n = 44$, the TCL (31.90 or 28.25 μm) was only about 70% greater than that of *C. pubescens* (TCL=22.25 μm), with $2n = 22$. *Campomanesia pubescens* also presented a more symmetrical karyotype. The karyotypes of *Psidium* species had differences in the parameters TCL, TF% and karyotypic formula (Table 1.), while the karyotype of *P. cinereum* was more asymmetrical than that of *P. cattleianum* (Figs 15 and 16).

Vijayakumar & Subramanian (1985) provided details on karyotype analysis in different cultivated plants of *P. guajava*, all with $2n = 22$ and chromosomes varying from 1.8 to 0.8 μm . Karyotypes revealed differences between cultivars in the amount of metacentric and submetacentric chromosomes (TCL between 21.2 to 32.8 μm) and TF% values (between 31.1 to 38.4%). For this same species, Kumar & Ranade (1952) found a triploid cytotype ($2n = 3x = 33$). In accordance with Leslie Landrum (pers. comm.), diverse Neotropical species have a hybrid origin with *P. guajava* and *P. guineense* (both with $2n = 22$, Costa & Forni-Martins, unpublished).

Myrtinae is considered the most primitive subtribe of Myrteae and *Psidium* the most derived genus in this group. For Lewinski (*in* Jackson, 1971), asymmetrical karyotypes are indicative of most derived taxa, however this relation cannot be established in Myrteae yet. Additional karyotype studies are required in a greater number of species to reach any conclusion.

Although the karyotypic characterization in Myrteae is still not useful in the delimitation of the subtribes or genera, seems promising for the characterization

of the species in the genera. In contrast, in *Eucalyptus* (Eucalyptae), the similar and highly symmetric karyotypes were not useful for species differentiation (Matsumoto *et al.*, 2000; Matsumoto & Marin-Morales, 2001; Mora *et al.*, 2005). This group is considered one of most primitive in Myrtaceae, and this high symmetry observed in the karyotypes of *Eucalyptus* agrees with Lewinski (*in* Jackson, 1971) who considers symmetrical karyotypes in the most primitive groups. Karyotypes of fleshy-fruited Myrtaceae (Myrteae) showed more derivation by the moderate degree of karyotypic symmetry in relation to dry-fruited taxa (Chamelauciae, Eucalyptieae, Melaleuceae, etc.).

Until now, the karyotypic analysis in Myrtaceae has been useful only for the characterization of some species, not distinguishing genera or subtribes, due to similar karyotype characters between these groups that possess small chromosomes, gradual variation of size and predominance of metacentric chromosomes. Additional karyotype analysis of a greater number of species, may identify usefull parameters for genera delimitations. In the future, the application of other techniques will be necessary to visualize the secondary constrictions, as NOR banding and *in situ* hybridization.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Carolyn Proença (UnB), Marcos Sobral (UFMG) and Eve Lucas (RBG-Kew) for identifying the species. I. R. C. is supported by a PhD scholarship from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico) and E. R. F. M. is the recipient of a Research Fellowships from the CNPq. This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (process n° 04/13041-8, 01/13169-6) and CNPq (process 471065/2004-8).

REFERENCES

- Andrade FG, Forni-Martins ER 1998.** Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae. *Genetics and Molecular Biology* **21(Suppl.):** 166.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG) 2003.** An update of angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141:** 399-436.
- Atchinson E. 1947.** Chromosome numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany* **34:** 159-164.
- Berg O. 1855-1856.** Revisio Myrtacearum Americae. *Linnaea* **27:** 1-472.
- Berg O. 1857-1859.** *Myrtaceae*. In: von Martius CFP. (ed.). *Flora Brasiliensis* **14:** 1 - 655.
- Brighton CA, Ferguson IK. 1976.** Chromosome counts in the genus *Melaleuca* (*Myrtaceae*). *Kew Bulletin* **31:** 27 - 33.
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2006a.** Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (*Myrtaceae* Juss.). *Caryologia* **59:** 7-13.
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2006b.** Chromosome studies in *Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* and *Myrcia* (*Myrtaceae*, subtribe *Myrciinae*). *Kew Bulletin* (accepted).
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2006c.** Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (*Myrtaceae*) from south-eastern Brazil. *Australian Journal of Botany* **54:** 409-415.
- Costa IR. 2004.** *Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil*. Masther's Dissertation. Universidade Estadual de Campinas, Brazil.
- Forni-Martins ER, Martins FR. 2000.** Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetics and Molecular Biology* **23:** 947-955.
- Forni-Martins ER, Pinto-Maglio CAP, Cruz ND. 1995.** Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. *Revista Brasileira de Genética* **18:** 281-288.
- Guerra M. 1983.** O uso do Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* **35:** 190-193.
- Guerra M. 1986.** Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Revista Brasileira Brasileira de Genética* **9:** 741-743.
- Huziwara Y. 1962.** Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany* **49:** 116-119.

- Jackson RC.** 1971. The karyotype in systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **2**: 327-368.
- Kumar LSS, Ranade SG.** 1952. Autotriploidy in Guava (*Psidium guajava* Linn.). *Current Science* **3**: 75-76.
- Landrum LR, Kawasaki ML.** 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* **49**: 508-536.
- Lange PJ, Murray BG.** 2004. Chromosome numbers in *Kunzea* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **52**: 609-617.
- Lombello RA, Forni-Martins FR.** 1998. Chromosomal studies and evolution in Sapindaceae. *Caryologia* **51**: 81-93.
- Lombello RA, Forni-Martins FR.** 2002. Cytogenetics of twelve species of Malpighiaceae A. Juss. from Southeastern Brazil. *Caryologia* **55**: 241-250.
- Lucas EJ, Belsham SR, NicLughada EM, Orlovich DA, Sakuragui CM, Chase MW, Wilson PG.** 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* **251**: 35-51.
- Matsumoto ST, Marin-Morales MA.** 2001. Patternity study of an interspecific natural hybrid of the genus *Eucalyptus* L'Hér (Myrtaceae) based on cytogenetic data. *Cytologia* **66**: 437-443.
- Matsumoto, ST, Marin-Morales MA, Ruas CF, Ruas PM.** 2000. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Caryologia* **53**: 205-212.
- Mora F, Palma-Rojas C, Jara-Seguel P.** 2005. Comparación del cariótipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalix* (Myrtaceae). *Agricultura técnica (Chile)* **65**: 20-25.
- Niedenzu F.** 1893. *Myrtaceae. Die Natürlichen Pflanzenfamilien III (7)*: 57-107.
- Pedrosa A, Gitaí J, Barros e Sila AE, Felix LP, Guerra M.** 1999. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Botanica Brasilica* **13**: 49-60.
- Raven PH.** 1975. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **62**: 724-764.
- Rye BL.** 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. *Australian Journal of Botany* **27**: 547-573.
- Sobral M.** 1993. Sinopse de *Myrciaria* (Myrtaceae). *Napaea* **9**: 13-41.
- Stace CA.** 1991. *Plant taxonomy and biosystematics*. Cambridge, UK, University Press.

- Stebbins GL.** 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. London, UK: Edward Arnold.
- Tyagi AP, McComb J, Considine J.** 1991. Cytogenetic and pollination studies in the genus *Verticordia* DC. *Australian Journal of Botany* **39**: 261-272.
- Vijayakumar N, Subramanian D.** 1985. Cytotaxonomical studies in South Indian Myrtaceae. *Cytologia* **50**: 513-520.
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ.** 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. *American Journal of Botany* **88**: 2013-2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM, Quinn CJ.** 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* **251**: 3-19.
- Zarco CR.** 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* **35**: 526-530.

FIGURE LEGENDS

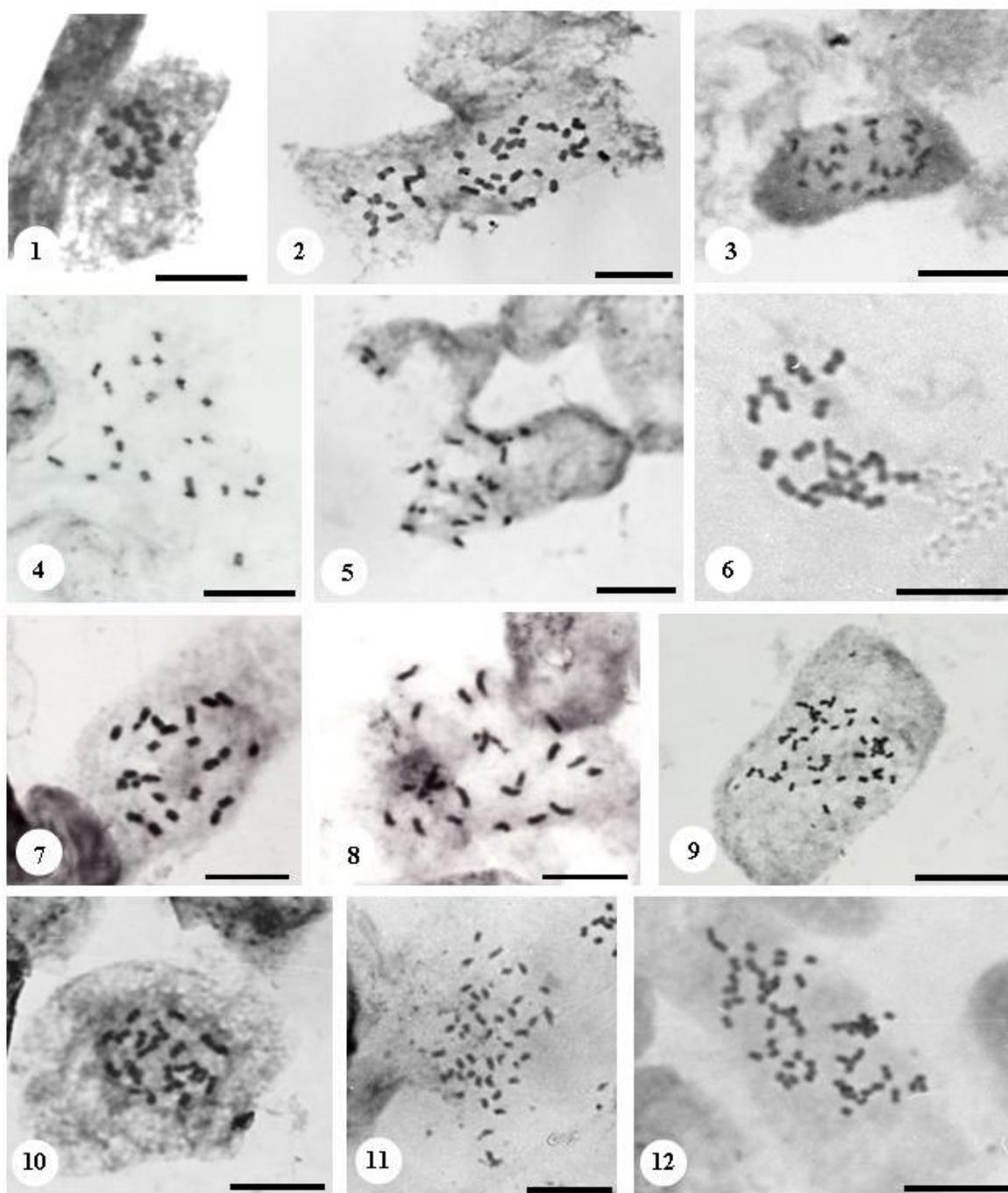
Figs. 1-12 Mitotic metaphases in species of Myrteae. Subtribe Eugeniinae: 1 – *Eugenia bracteata*, 2 – *E. hyemalis*, 3 – *E. uniflora*, 4 – *Myrciaria delicatula*, 5 – *M. tenella*, 6 – *Plinia cauliflora*, Subtribe Myrciinae: 7 – *Gomidesia* sp, 8 – *Marlierea tomentosa*, 9 – *Myrcia* sp, Subtribe Myrtinae: 10 – *Campomanesia pubescens*, 11 – *Psidium cattleianum*, 12 – *P. cinereum* (Bars: 5 μ m).

Fig. 13 Idiograms of Eugeniinae species. Metacentric chromosomes in white and submetacentric chromosome in black (Bar: 1 μ m).

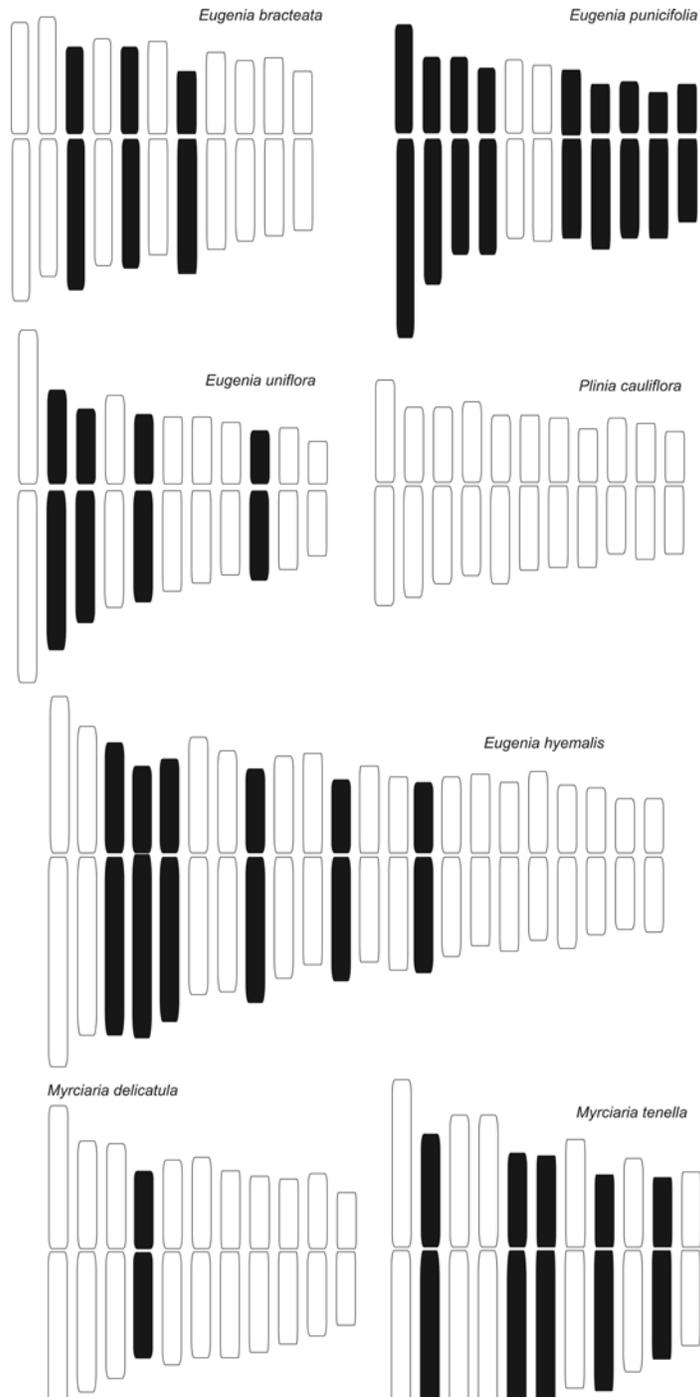
Fig. 14 Idiograms of Myrciinae species. Metacentric chromosomes in white and submetacentric chromosome in black (Bar: 1 μ m).

Fig. 15 Idiograms of Myrtinae species. Metacentric chromosomes in white and submetacentric chromosome in black (Bar: 1 μ m).

Fig. 16 Symmetry Indexes dispersion. Intrachromosome (A1) and interchromosome symmetry (A2) (Zarco 1986). Code number in the Table 1 indicated the species.



Figs. 1- 12.



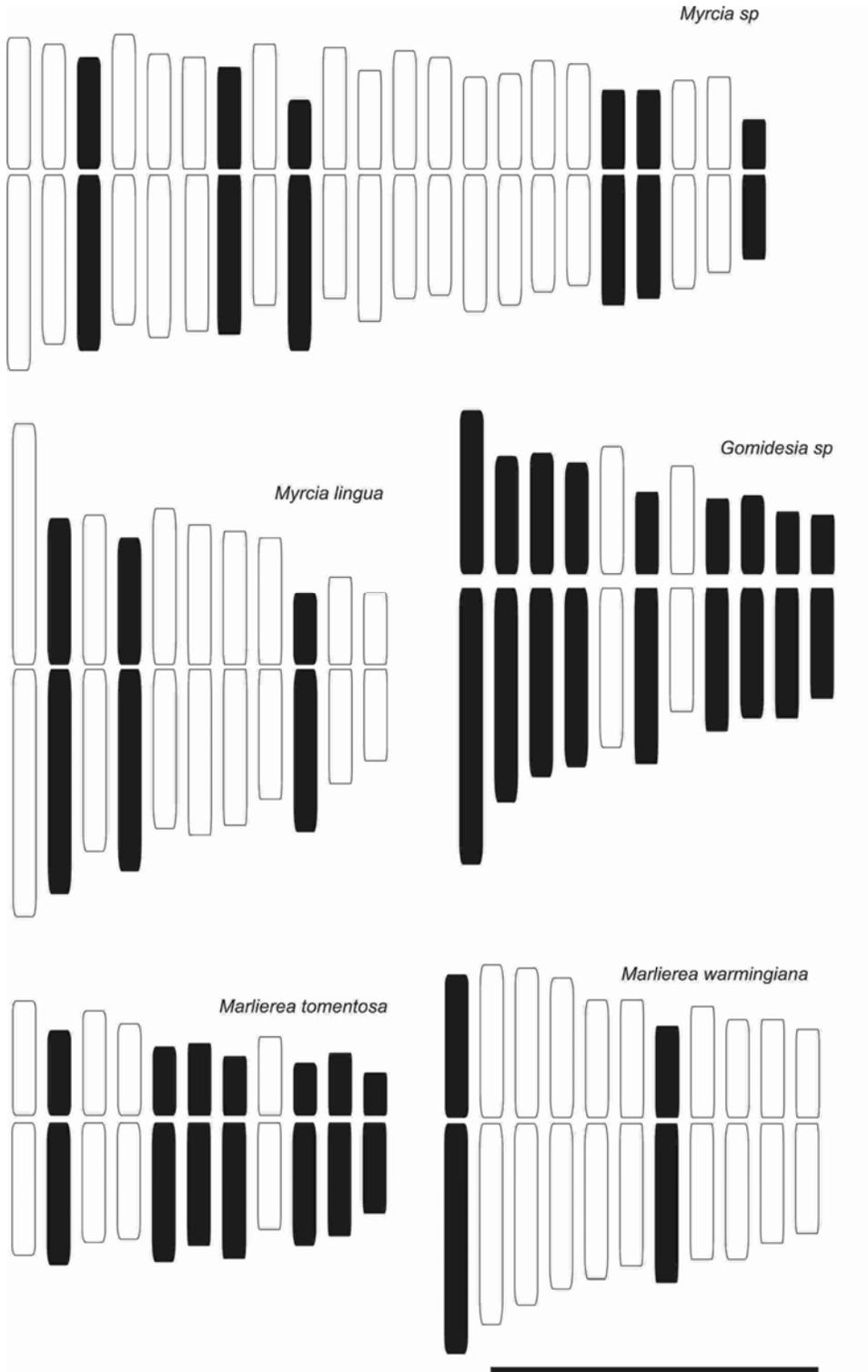


Fig 14

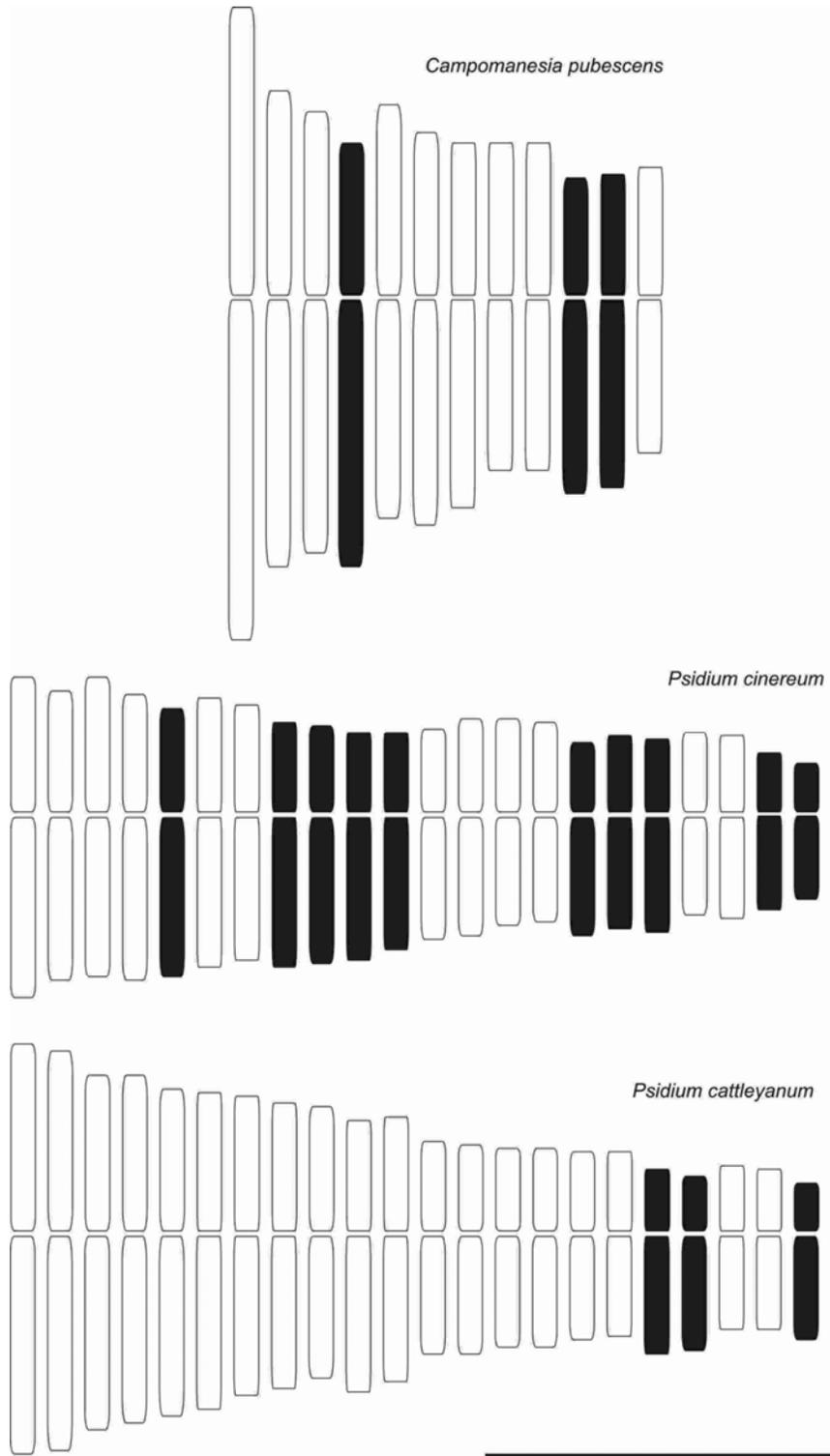


Fig 15

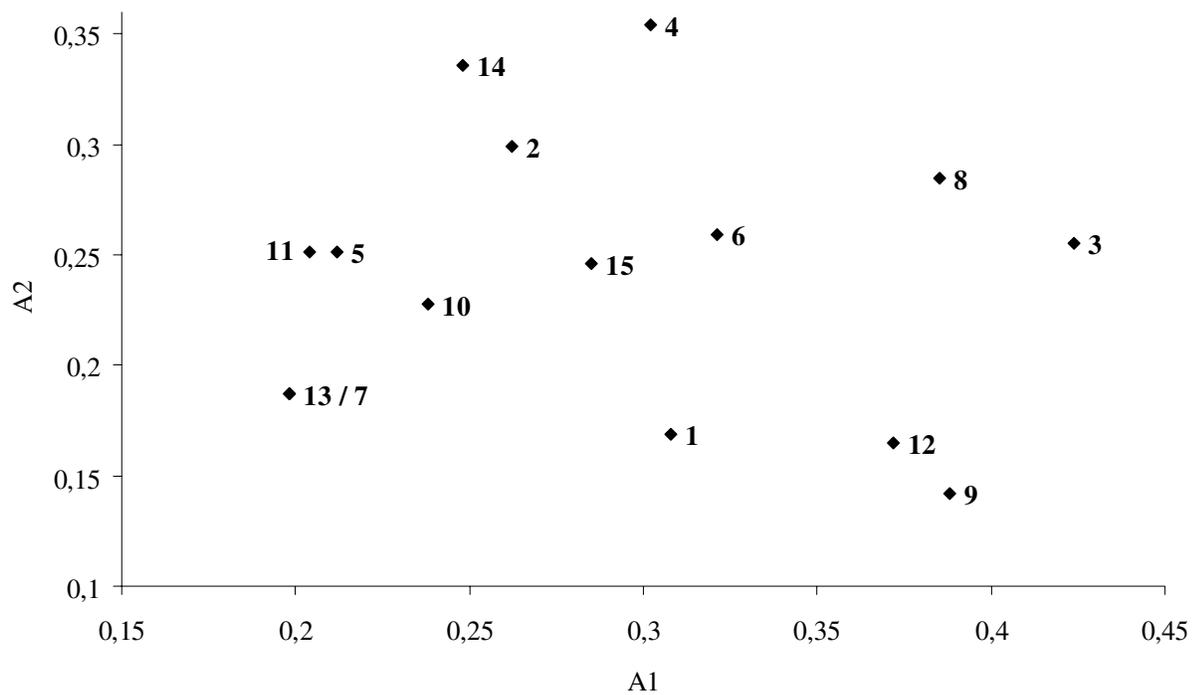


Fig 16

Table 1 Karyotypic parameters of Myrtaceae. $2n$: diploid chromosome number, KF: karyotypic formula (m = metacentric, sm = submetacentric), RMCL, range in mean chromosome length (μm); TCL: Total Chromatin Length (μm), TF%: symmetry index (Huziwara, 1972), A1 and A2: Asymmetry Indexes (Zarco, 1986). Habitat: CLT – cultivated at UNICAMP, CRP – Campo rupestre vegetation, CER – Cerrado vegetation, ROC – rocky outcrop, TRF – Tropical Rain Forest Vegetation. Code numbers indicates species in the Fig. 5.

Code	Subtribe / Species	Collector number - Habitat	$2n$	KF	TCL	RMLC	TF %	A1	A2
Eugeniinae									
1	<i>Eugenia bracteata</i> Vell.	I. R. Costa, 434 - CLT	22	8m + 3sm	17.00	1.02 - 0.57	39.38	0.308	0.169
2	<i>Eugenia hyemalis</i> DC.	I. R. Costa <i>et al.</i> , 442 - CRP	44	16m + 6sm	34.10	1.36 - 0.38	41.84	0.262	0.299
3	<i>Eugenia puniceifolia</i> (H. B. K.) DC.	I. R. Costa. <i>et al.</i> , 492 - CRP	22	2m + 9sm	14.75	1.13 - 0.49	35.80	0.424	0.255
4	<i>Eugenia uniflora</i> L.	I. R. Costa, 420 - CLT	22	7m + 4sm	15.20	1.28 - 0.40	40.70	0.302	0.354
5	<i>Myrciaria delicatula</i> (DC.) O. Berg	I. R. Costa <i>et al.</i> , 425 - ROC	22	10m + 1sm	16.40	1.18 - 0.48	43.81	0.212	0.254
6	<i>Myrciaria tenella</i> L.	I. R. Costa <i>et al.</i> , 494 - CER	22	6m + 5sm	21.90	1.34 - 0.63	38.92	0.321	0.359
7	<i>Plinia cauliflora</i> L.	I. R. Costa, 421 - CLT	22	11m	12.84	0.82 - 0.44	44.23	0.198	0.187
Myrciinae									
8	<i>Gomidesia</i> sp	I. R. Costa <i>et al.</i> , 481 - TRF	22	2m + 9sm	18.02	1.35 - 0.52	37.50	0.385	0.285
9	<i>Marlierea tomentosa</i> Cambess.	K. Matsumoto, 800 - TRF	22	4m + 7sm	13.50	0.77 - 0.46	37.62	0.388	0.142
10	<i>Marlierea warmingiana</i> Kiaerskou	K. Matsumoto, 836 - TRF	22	9m + 2sm	18.70	1.09 - 0.76	42.70	0.238	0.228
11	<i>Myrcia lingua</i> O. Berg	I. R. Costa <i>et al.</i> , 430 - CER	22	8m + 3sm	19.60	1.23 - 0.50	45.37	0.204	0.251
12	<i>Myrcia</i> sp	K. Matsumoto, 833 - TRF	44	16m + 6sm	32.57	1.00 - 0.50	42.39	0.372	0.165
Myrtinae									
13	<i>Campomanesia pubescens</i> (DC.) O. Berg	I. R. Costa <i>et al.</i> , 428 - CER	22	8m + 3sm	22.25	1.61 - 0.56	42.68	0.198	0.187
14	<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	I. R. Costa, 486 - CER	44	19m + 3sm	31.90	1.09 - 0.45	43.18	0.248	0.336
15	<i>Psidium cinereum</i> Mart. ex DC.	I. R. Costa <i>et al.</i> , 509 - CLT	44	12m + 10sm	28.25	0.91 - 0.38	41.53	0.285	0.246

CAPITULO 4

Distribuição de sequências de DNAr 45S por meio de FISH em espécies de *Psidium* e gêneros próximos (Myrtaceae)

RESUMO - Em Myrteae o número cromossômico básico $x = 11$ ocorre em todos os gêneros. Em *Psidium* são relatados a maioria dos casos de poliploidia em Myrteae, onde ocorrem espécies com $2n = 22, 33, 44, 55, 66, 77$ e 88 , além de citótipos poliplóides. O pequeno tamanho dos cromossomos dificulta o uso taxonômico de caracteres cariotípicos obtidos por meio de técnicas de coloração convencional. Este estudo apresenta os primeiros resultados com a técnica de FISH em Myrtaceae. O número de sítios de DNAr 45S variou de dois (*Campomanesia pubescens* e *Pimenta dioica* com $2n = 22$, e *Psidium rufum* com $2n = 55$) a dez (citótipo hexaplóide de *Psidium cattleianum*). É sugerida uma possível origem alopólíploide no citótipo hexaplóide de *P. cattleianum*. Em *Psidium grandifolium* foram observados dois números cromossômicos ($2n = 44$ e 66), sendo que nas populações tetraplóides, o número de sítios de DNAr 45S divergiu entre quatro e oito enquanto que a população hexaplóide apresentou oito sítios. Essa variação de números cromossômicos e de número de sítios em *P. grandifolium* não apóia as recentes sinonimizagens processadas na criação do complexo *P. grandifolium*.

Introdução

A tribo Myrteae (Myrtaceae) (*sensu* Wilson *et al.* 2005) é um grupo perfeitamente monofilético (Lucas *et al.* 2005, 2007). A clássica divisão de Myrteae em três subtribos (Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae), baseada em caracteres morfológicos dos embriões, proposta por Berg (1855-56, 1857-59), provavelmente deverá ser abandonada. Segundo estudos de Lucas *et al.* (2005, 2007), os gêneros tradicionalmente circunscritos na subtribo Myrtinae não formam um grupo monofilético. De acordo com Lucas *et al.* (2007), alguns destes gêneros (*Acca*, *Campomanesia*, *Pimenta* e *Psidium*) formam um grupo

monofilético denominado de grupo *Pimenta*. Neste grupo, *Psidium* mostra-se monofilético, no entanto as relações entre as espécies ou a delimitação das mesmas ainda é confusa.

Em Myrtaceae, grande parte dos estudos cromossômicos encontra-se restrita a táxons com frutos secos (Atchinson 1947, Rye 1979, Matsumoto *et al.* 2000). Os primeiros estudos de números cromossômicos em Myrtaceae neotropicais (Myrteae, com frutos carnosos) foram realizados por Forni-Martins *et al.* (1995), Andrade & Forni-Martins (1998), Pedrosa *et al.* (1999) e Forni-Martins & Martins (2000), Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, b, 2007a), totalizando aproximadamente 50 espécies.

O número básico da família é $x = 11$ (Atchinson 1947), sendo registrado na maioria dos gêneros pertencentes a diferentes subfamílias e tribos (Rye 1979; Costa 2004; Costa & Forni-Martins 2006a, b, 2007a). Costa (2004) e Costa & Forni-Martins (2006a, b, 2007a) ressaltaram a importância da poliploidia como um importante processo evolutivo no grupo na tribo Myrteae, registrando a ocorrência de $2n = 33$ e 44 em 21% das espécies de *Eugenia* e $2n = 33, 44, 55, 66, 77$ e 88 distribuídos em várias das espécies de *Psidium* até então analisadas. Costa & Forni-Martins (Capítulo 1) também verificaram a ocorrência frequente de citótipos diferenciados pelo nível de ploidia em várias espécies de *Psidium*, com $2n$ variando de 22, 33, 44, 55, 66, 77 e 88 cromossomos. Porém, não realizaram estudos mais aprofundados para determinar a natureza destes poliplóides.

A dificuldade de identificação das mirtáceas brasileiras (Barroso 1991) pode ser atribuída à especiação decorrente de hibridação e poliploidia (Costa 2004), com aparecimento de tipos recombinantes, com características intermediárias entre os taxa originais, sendo o fluxo gênico interrompido por diferenciação cromossômica, especialmente por poliploidia.

Dispõe-se de poucas informações sobre a morfologia dos cromossomos de

espécies de Myrteae, pois os mesmos são pequenos, raramente atingindo 2,0 μ m de comprimento (Costa & Forni-Martins 2007b). Cariótipos de algumas espécies de *Psidium* foram descritos como assimétricos, pela presença de alguns cromossomos com o centrômero próximo à região terminal (Viajayakumar & Subramanian 1985), enquanto em outras, como *Psidium acutangulum*, foram descritos como simétricos pelo predomínio de cromossomos metacêntricos (Forni-Martins & Martins 2000). De maneira geral, os cariótipos de espécies com frutos carnosos (Myrteae) são mais assimétricos que os de espécies com frutos capsulares e secos (Eucalypteae *sensu* Wilson *et al.* 2005) (Costa & Forni-Martins 2007b).

A aplicação de técnicas convencionais não tem sido suficiente para caracterizar as espécies de Myrtaceae neotropicais do ponto de vista cromossômico e para elucidar as relações cromossômicas entre elas, devido à uniformidade dos números cromossômicos (Costa & Forni-Martins 2006a, b, 2007a) e ao pequeno tamanho dos mesmos, além da pequena variação em sua morfologia (Costa & Forni-Martins 2007b).

A utilização de técnicas de citogenética molecular, como a de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), tem ampliado em muito os horizontes da caracterização cariotípica, permitindo localizar seqüências específicas de DNA/RNA tanto ao longo dos cromossomos quanto no núcleo interfásico (Heslop-Harrison *et al.* 1991, Maluszynska & Heslop-Harrison 1993). Esta técnica tem sido aplicada a diferentes grupos taxonômicos, possibilitando a distinção entre espécies, bem como a caracterização de citótipos, de possíveis híbridos e de seus parentais (Guerra 1988, Cerbah *et al.* 1998, Schwarzacher *et al.* 1989, Schweizer 1976, Stace 2000, Snodow *et al.* 2002). Há vários estudos exemplificando a diferenciação cariotípica de espécies afins mediante a identificação de seqüências de DNAr com a técnica de FISH, especialmente para DNAr 45S, também denominado DNAr 18-5.8-28S.

Carvalho & Guerra (2002) encontraram números de sítios variados e específicos para diferenciar duas espécies do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae): *M. dichotoma* (seis sítios) e *Manihot* sp1 (quatro sítios). Em *Passiflora* (Passifloraceae), Melo & Guerra (2003) caracterizaram o cariótipo de algumas espécies, encontrando diferenças no número de sítios associados a diferenças nos números cromossômicos básicos e ao nível de ploidia das espécies. Espécies com $x = 6$ apresentaram quatro (nos diplóides), dez (nos tetraplóides) ou 12 (nos hexaplóides) sítios de hibridização 45S. As espécies com $x = 9$ apresentaram quatro e seis sítios; nas espécies com $x = 10$ e $x = 12$, foram encontrados seis e quatro sítios, respectivamente.

Em Asteraceae, vários estudos desta natureza foram realizados, fornecendo subsídios a discussões taxonômicas e evolutivas. No gênero *Lychnophora*, Mansanares (2004) encontrou variado número de sítios (2-10) distribuídos entre várias espécies, ressaltando a importância dos mesmos na caracterização de algumas espécies com problemas de delimitação taxonômica. Em *Chaptalia nutans* (L.) Poir., Fregonezzi *et al.* (2004) caracterizaram citótipos (não diferenciados morfologicamente) com $2n = 50$ e $2n = 100$, encontrando, respectivamente, quatro e oito sítios de DNAr 45S. Para *Hypochoeris*, vários estudos com a aplicação desta técnica vêm sendo realizados, o que possibilitou traçar uma evolução cariotípica neste gênero (Cerbah *et al.* 1998, Ruas *et al.* 2005, Weiss-Scheeweiss *et al.* 2003).

Com a utilização desta técnica de hibridação *in situ*, iniciando pelo marcador de DNAr 45S, espera-se que seja possível diferenciar espécies morfologicamente próximas, situação observada em vários complexos de *Psidium* (Landrum 2003, 2005) e outros gêneros, como *Campomanesia* e *Pimenta* (Landrum 1986). Espera-se também que essas técnicas identifiquem as alterações cromossômicas ocorrentes nas espécies de *Psidium* e gêneros próximos,

fornecendo subsídio para traçar uma evolução cariotípica em parte da subtribo Myrtinae.

Materiais e métodos

1. Material utilizado

1a - Mitose – Sementes de 12 populações de nove espécies, foram coletadas nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Tabela 1) e colocadas para germinar à temperatura ambiente em placas de petri com papel de filtro úmido. O tempo de germinação variou de espécie para espécie. Dentro de Myrtinae, e principalmente do gênero *Psidium*, a germinação das sementes é lenta, devido à textura óssea da testa de suas sementes. Para acelerar o processo de germinação, as sementes foram embebidas em água destilada e posteriormente submetida a vácuo por 15 minutos. Os meristemas radiculares foram pré-tratados com 8-hydroxiquinoleína 2mM por um período de 5h a 14°C e 24h a 8°C. Após o pré-tratamento, as raízes foram fixadas em Farmer (3:1, álcool etílico absoluto: ácido acético glacial) por 24h e mantidos na mesma solução no freezer (-20°C) até a preparação das lâminas.

1b - Meiose – Para algumas espécies de *Psidium*, os ensaios de FISH foram realizados a partir de cromossomos meióticos. Foram utilizadas anteras extraídas de botões florais jovens fixados em Farmer (3:1, álcool etílico absoluto: ácido acético glacial) por 24h e mantidos na mesma solução no freezer (-20°C) até a preparação das lâminas.

2. Preparação das lâminas (esmagamento)

2a – Mitose – As pontas de raízes foram previamente lavadas por duas vezes de 10min cada em tampão citrato (1:10) para a remoção do fixador e submetidas ao tratamento com diferentes tipos de enzimas. Após a digestão enzimática, os meristemas foram mantidos por cerca de 15min em uma solução de ácido acético a 60% para então serem esmagadas sob lamínula. A lamínula foi retirada por congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas deixadas secar por pelo menos duas horas antes da etapa seguinte.

Devido à resistência oferecida pela parede celular das células da raiz, houve dificuldade em obter espalhamento adequado dos cromossomos. Assim, foram realizados testes com diferentes enzimas que promovem a digestão da parede celular, como celulase, pectinase, driselase, entre outras. Com base nos resultados prévios, apresentados abaixo, no protocolo final foi utilizada a digestão enzimática com a Cellulase Onosuka RS 2%, pectinase 20% e Macerozyme R-10 1%, por cerca de 2h a 37°C.

Solução enzimática / tempo	Resultado
Cellulase 2% (1 h, 2 h ou 3 h a 37°C)	Médio, a parede era rompida, mas o espalhamento dos cromossomos não foi adequado.
Cellulase 2% + Pectinase 20% (1 h, 2 h ou 3 h a 37°C)	Insatisfatório
Driselase 5% (1 h, 2 h ou 3 h a 37°C)	Insatisfatório
Cellulase 3%: pectinase 6% (2 - 3 h a 37°C)	Satisfatório, dependendo da espécie. A parede celular foi rompida e foi obtido espalhamento dos cromossomos.
Cellulase Onosuka RS 2% (2h a 37°C)	
Cellulase Onosuka RS 2%, pectinase 20%, Macerozyme R-10 1% (2h a 37°C)	Satisfatório. A parede celular foi rompida e foi obtido espalhamento dos cromossomos

Para o clareamento do denso citoplasma apresentado pelas espécies, também foram realizados ensaios com a aplicação de proteases, como a pronase-E, proteinase-K e pepsina, além de ácido acético a 60%, conforme protocolos correntes em citogenética molecular. Na Figura 1 estão representadas algumas das metáfases obtidas cuja presença do denso citoplasma (em verde) dificultou a visualização dos sítios de DNAr 45S. No entanto, estas diferentes proteases foram eficientes em poucas espécies.

As pontas de raízes foram esmagadas em uma gota de ácido acético 45%, entre lâmina e lamínula. Posteriormente, a lamínula foi retirada após congelamento em nitrogênio líquido.

2 b – Meiose – As anteras jovens foram previamente lavadas por duas vezes de 10min cada em tampão citrato (1:10) para a remoção do fixador e submetidas ao tratamento com celulase 3% - pectinase 6%. Foram esmagadas em lâmina para a liberação das células-mãe-de-pólen e cobertas com lamínula, para finalizar o esmagamento. A lamínula foi posteriormente retirada após congelamento em nitrogênio líquido.

3. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente - FISH

3.1. Preparação da sonda de DNAr 45S

Anteriormente à aplicação da técnica de hibridação *in situ*, foram desenvolvidas algumas etapas visando à obtenção e preparação da sonda pTa71, com a seqüência de DNAr 45S. Foram feitas a extração e a quantificação do DNA plasmidial contendo essa seqüência, seguido da marcação da sonda, de acordo com o protocolo a seguir.

a) Extração de DNA plasmidial de *E. coli* - Miniprep (Birnboim & Doly 1979).

Primeiramente, as bactérias (*E. coli*) transformadas contendo a sonda p*Ta71* de trigo referente à seqüência de DNAr 45S (18S-5,8S-26S) foram inoculadas em meio LB líquido e mantidas por cerca de 12 horas (overnight) em câmara incubadora com agitação constante a 37°C. No dia seguinte, foi iniciado o processo de extração do DNA plasmidial, de acordo com os passos a seguir:

1. 1,5ml da cultura foram centrifugados por 5min a 2.000rpm, e o sobrenadante posteriormente descartado;
2. O precipitado foi suspenso em 200ul de GTE, agitado em vortex por 2min e incubado no gelo durante 10 min;
3. Foram adicionados 400ul de uma solução 0.2M NaOH / 1% SDS (preparada na hora), misturado por inversão (5 vezes) e colocado novamente no gelo durante 5 min;
4. Em seguida, foram adicionados 300ul de acetato de potássio (3M, pH 5), misturado por inversão e colocado em gelo durante 15 min;
5. Após esta etapa, o material (lisado) foi centrifugado durante 10 min a 12.000 rpm, neste ponto transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo;
6. Foi adicionado clorofane (fenol: clorofórmio: al. isoamílico, 25: 24: 1) (na proporção 1:1) e misturado suavemente por inversão cinco vezes;
7. Foi realizada nova centrifugação durante 10 min. a 12.000 rpm;
8. O sobrenadante foi transferido e a ele foi adicionado 2ul de RNase (10mg/ml), e incubado a 37°C por 20 min;
9. O DNA foi então precipitado em 2 volumes de etanol gelado, permanecendo pelo menos 2h no freezer;
10. Após esse tempo, foi centrifugado por 10 min. a 12.000 rpm e o sobrenadante novamente descartado;

11. O precipitado foi lavado com 1ml de etanol a 70% e centrifugado por 10 min. a 12.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado;
12. Após esta última etapa, o precipitado foi seco e depois suspenso em 50 ul de TE (10 mM Tris 1 mM EDTA, pH 8.0) ou água ultrapura.

Para a quantificação, foram acumuladas em um tubo eppendorf, todas as alíquotas obtidas nesta etapa.

b) Quantificação do DNA plasmidial isolado

O DNA obtido foi quantificado por medição direta da absorbância a 260nm em espectrofotômetro digital. A qualidade do DNA foi posteriormente checada por meio de eletroforese em gel de agarose. Para tanto, o DNA foi diluído (1:5) em água e então aplicado em gel de agarose a 1% juntamente com amostras de DNA com peso molecular conhecido como marcadores (*lambda* – 25ng/ul). O gel foi corado com Cyber FASTGreen (Promega Labs.) a 0,5 µg/ml e submetido a luz UV.

c) Marcação da sonda (Nick translation)

Nesta etapa foi utilizado o protocolo do Kit BioNick (Gibco).

1. As alíquotas de DNA obtidas na primeira etapa foram, primeiramente, diluídas a uma concentração final equivalente a 1000ng /ul.
2. Foi preparada uma solução (no gelo) contendo: 5ul 10x dNTP, 35ul do DNA isolado, 5ul 10x mix da enzima. Esta foi então centrifugada por cerca de 5 segundos (spin), e incubada a 16°C por 90min. no termociclador.
3. Foi realizada uma precipitação com acetato de sódio 3M 1:10 e adicionado 2 volumes (100ul) de etanol 100% gelado. Esta solução foi

homogeneizada levemente e colocada no gelo. A precipitação foi realizada por 2h a -20 °C no freezer.

4. Foi realizada uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi deixado secar à temperatura ambiente, por pelo menos 2h.

5. Foi adicionado 50ul de TE (ou água ultrapura) e deixado na geladeira overnight.

Em alguns casos, as passos 3 e 4 foram repetidos, visando um aproveitamento maior do DNA isolado.

3.2. Aplicação da técnica

A aplicação desta técnica seguiu a metodologia descrita por Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado & Jouve (1994), com algumas modificações propostas por Fregonezzi *et al.* (2004). Algumas adaptações foram feitas para o material em estudo. De maneira geral, a utilização desta técnica, foi realizada em 4 etapas distintas e conduzida conforme os seguintes passos:

1ª etapa – Tratamento das lâminas e hibridação in situ

1. As lâminas para análise de cromossomos mitóticos (preparadas com digestão enzimática) e meióticos (como descrito no item 2), foram armazenadas em freezer por pelo menos dois dias;

2. As lâminas foram mantidas em uma solução de ácido acético 60% a 40°C para o clareamento do denso citoplasma e posteriormente coradas com DAPI por 20 min para a seleção das melhores metáfases;

3. As lâminas foram lavadas em 4xSCC / Tween 2% para remoção do DAPI

e posteriormente fixadas em Farmer (álcool etílico absoluto: ácido acético, 3:1) durante cerca de 12 horas (overnight). A seguir foram submetidas a desidratação alcoólica por pelo menos 2h (álcool 70% por 5min posteriormente em álcool 100% por mais 5min) à temperatura ambiente. Este passo ajuda a diminuir a perda de células durante as lavagens;

4. As lâminas foram tratadas com uma solução de RNase 1% pH 7,0, a 37°C por 1h e posteriormente lavadas em 2xSSC por 10min sob agitação;

5. Após o primeiro banho, as lâminas foram mergulhadas em solução de paraformaldeído 4% por 10min e, posteriormente, lavadas em 2xSSC;

6. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (álcool 70% por 5 min posteriormente em álcool 100% por mais 5min) e deixadas secar por pelo menos 2h à temperatura ambiente.

7. Enquanto as lâminas secavam, foi preparada a mescla de hibridação, composta por formamida 100%, polietileno-glicol ou dextrano sulfato a 50%, 20xSSC, sonda marcada, DNA de salmão como DNA de bloqueio, SDS 10% e água, e posteriormente aplicada sobre as lâminas, que foram cobertas com lamínulas plásticas.

8. As lâminas foram colocadas no termociclador em ciclos de 10min a 90°C, 50°C e 38°C. A seguir, as s lâminas foram mantidas em estufa a 37°C, em câmara úmida e no escuro por uma noite.

2ª etapa – Banhos pós-hibridação:

No dia seguinte, foram realizados os banhos pós-hibridação:

- 2xSSC por 5 min a 42°C no agitador, para a retirada das lamínulas;
- formamida 20% em 0,1xSSC, a 42°C por 10 min, no agitador;
- 0,1xSSC, a 42°C por 5 min, no agitador;
- 2xSSC, a 42°C por 5 min, no agitador;

- 4xSSC / Tween 20 0,2% a 42°C por 5min, no agitador;
- 4xSSC / Tween 20 0,2% à temperatura ambiente, no agitador.

Devido ao pequeno tamanho do sinal, foram necessários ajustes nesta etapa visando diminuir a extringência das lavagens. Nesse teste, algumas lâminas foram submetidas a banhos em 2xSSC (no segundo banho) seguidas por dois banhos consecutivos em 6xSSC à temperatura ambiente.

3ª etapa – Detecção da hibridação

3. As lâminas foram primeiramente tratadas com 50µl de BSA 5% por 5min, cobertas com lamínulas de plástico. As lamínulas foram retiradas sacolejando para baixo, ou com o auxílio de uma pinça.
4. Foram adicionados 50ul da solução de detecção por lâmina (1ul de avidina-FITC + 49ul de BSA 5%) e cobertos com lamínulas plásticas. As lâminas foram incubadas por 1h a 37°C em câmara úmida (no escuro).
5. As lâminas foram lavadas por duas vezes com 4xSSC por 20 min (no escuro).

4ª etapa – Coloração:

Foi aplicada sobre as lâminas 25ul de solução de iodeto de propídio (24 de Vectashid, Vector Labs. + 1ul de iodeto de propídio), no escuro. Em algumas espécies foi realizada uma contra-coloração com 2ug/ul DAPI em Vectashid.

As lâminas foram mantidas por, no mínimo, um dia na geladeira (no escuro) para a estabilização da fluorescência e então fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51), com um sistema de captura de imagens digital.

Resultados e Discussão

Os resultados com a aplicação da técnica de hibridação *in situ* em espécies de Myrtaceae são aqui apresentados de maneira preliminar. Este parece ser o primeiro estudo com a aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para espécies de Myrtaceae. As espécies aqui analisadas tiveram seus números cromossômicos previamente determinados por Costa & Forni-Martins (Capítulo 1) e Costa & Forni-Martins (2006b). Para *P. cattleianum* (pop1) e *P. cinereum* também já são disponíveis cariótipos com coloração convencional (Capítulo 3).

Em *Campomanesia*, as duas espécies analisadas, *C. laurifolia* e *C. pubescens*, apresentaram respectivamente 4 e 2 sítios de DNAr 45S (Tabela 1). No entanto é necessária a repetição dos testes, devido à presença de alguns sítios inespecíficos. No gênero *Pimenta*, *P. dioica*, com $2n = 22$, apresentou dois sítios (Tabela 1).

No gênero *Psidium*, foi observada variação no número de sítios de DNAr 45S (2 a 10 em seis espécies) (Tabela 1). Em geral, o número de sítios aumentou com a elevação do nível de ploidia. A maioria dos sítios são terminais, com exceção de alguns sítios no hexaplóide de *P. cattleianum*, que são intercalares (Figura 2).

Entre as espécies tetraplóides ($2n = 4x = 44$), o número de sítios de DNAr 45S variou de 4 a 8. Duas espécies, *P. acutangulum* e uma população de *P. grandifolium*, apresentaram quatro sítios, enquanto que em uma população de *P. cattleianum* foram observados seis sítios. O número máximo de sítios foi observado em uma das populações de *P. grandifolium*, com $2n = 44$ (oito sítios).

As duas espécies pentaplóides ($2n = 5x = 55$) também apresentaram diferentes números de sítios de DNAr 45S, 6 em *P. australe* e apenas dois em *P.*

rufum. Para esta última espécie, são necessárias repetições na amostragem devido à presença de sinais inespecíficos, como aconteceu para *Campomanesia*. No nível hexaplóide ($2n = 6x = 66$) a população de *P. grandifolium* ($n = 33$) apresentou oito sítios, enquanto na de *P. cattleianum* foram observados 10 sítios, sendo oito terminais e dois intercalares. A única espécie octaplóide ($2n = 8x = 88$) analisada, *P. myrtoides*, apresentou apenas quatro sítios, que foram detectados apenas em núcleos interfásicos, pois não foi obtido um bom espalhamento dos cromossomos e limpeza do citoplasma nesta espécie.

O número de sítios de DNAr 45S variou entre as populações estudadas de *P. cattleianum* e de *P. grandifolium* (Tabela 1).

Em *P. cattleianum*, foram encontrados dois números cromossômicos distintos, $2n = 44$ e $2n = 66$. A única diferença morfológica evidente entre estes dois citótipos é a cor dos frutos. O citótipo tetraplóide apresenta frutos amarelos, enquanto o hexaplóide, frutos vermelhos. O número de sítios foi de seis terminais no tetraplóide a 10 no hexaplóide, este com dois dos sítios intercalares e os demais terminais. Dada a semelhança morfológica entre os citótipos, poder-se-ia sugerir a origem do hexaplóide ($2n = 6x = 66$) por autopoliploidia em relação ao tetraplóide ($2n = 4x = 44$). Isso implicaria que o número esperado de sítios de DNAr 45S do hexaplóide fosse nove, com acréscimo da metade dos sítios observados no tetraplóide. Entretanto, isso não ocorre, o que poderia ser devido à reorganização do genoma após a poliploidização, com provável amplificação de um sítio (Wendel 2000, Levy & Feldman 2004).

Outra hipótese poderia supor que *P. cattleianum*, com $2n = 44$, tenha sido originado por hibridação de duas espécies, com $2n = 22$, porém com genomas diferenciados, uma com quatro sítios e outra com dois sítios. Na poliploidização posterior (de $2n = 44$ para $2n = 66$), poderia ter havido o retrocruzamento com a espécie de quatro sítios, incorporando os mesmos no genoma do hexaplóide, o

que explicaria o número 10. No Capítulo 6, foi estimado o tamanho do genoma nestas duas populações, sendo que o citótipo 6x tem comparativamente um tamanho do genoma muito superior ao 4x, fornecendo um indício adicional para a origem alopoliplóide do hexaplóide. Eventos de alopoliploidização como este são relatados para outros grupos como Leguminosas (Li *et al.* 2001) e Poaceae (Vaio *et al.* 2005).

Em *Vicia* (Leguminosas), o poli-plóide *V. antena* var. *antena* ($2n = 4x = 24$) era tido como autopoliplóide em relação a *V. antena* var. *sereia* ($2n = 2x = 12$). Entretanto, após análise dos sítios de DNAr 45S e 5S, foi verificado que o número de sítios no tetraplóide não era o dobro do observado no diplóide. Existem três pares cromossômicos em comum, porém *V. antena* var. *antena* possui as seqüências de DNAr em vários outros cromossomos diferentes, indicando a contribuição de outro genoma na formação desse alo tetraplóide (Li *et al.* 2001).

Indícios de formação alopoliplóide também foram detectados por Vaio *et al.* (2005) em *Paspalum quadrifarium* (Poaceae). O número e a posição dos sítios de DNAr 45S no citótipo tetraplóide ($2n = 4x = 40$, 7 sítios) são menores do que o dobro de sítios do citótipo diplóide ($2n = 2x = 20$, 5 sítios). Além da discordância numérica, a localização dos sinais de hibridação (região terminal ou centromérica dos cromossomos) era diferente entre a população diplóide e a tetraplóide. A perda de genes ribossomais após alopoliploidização é relatada não só em citótipos de *Paspalum quadrifarium*, como em outros grupos de plantas (Vaughan *et al.* 1993, Thomas *et al.* 1996, Mishima *et al.* 2002). Por outro lado, Vaio *et al.* (2005) também analisaram a distribuição do DNAr 5S, que se mostrou conservado, guardando correspondência no número e posição dos sítios entre os dois citótipos: dois na região proximal do 1º par no diplóide e quatro na região proximal do 1º par cromossômico do tetraplóide.

As três populações analisadas de *Psidium grandifolium* representaram duas

variedades. A variedade *cinereum* apresentou $2n = 44$ e quatro sítios. A variedade *argenteum* apresentou diferentes números cromossômicos entre as duas populações, $2n = 44$ e $2n = 66$, no entanto com o mesmo número de sítios, oito. Landrum (2005) descreveu o complexo *Psidium grandifolium*, onde reduziu distintas espécies à categoria de variedades. Assim, *P. cinereum* e *P. incanescens* foram sinonimizadas como *P. grandifolium* var. *cinereum* e *P. grandifolium* var. *argenteum*, respectivamente. No entanto, estas variedades diferem tanto no número cromossômico quanto no número de sítios de DNAr 45S. Estes dados não apóiam as sinonimizações propostas por Landrum (2005) para estas duas espécies, nem tão pouco as afinidades com *P. australe*, que possui $2n = 55$ e seis sítios.

Costa & Forni-Martins (2007b, Capítulo 3) apresentam uma descrição detalhada dos cariótipos das populações tetraplóides de *P. cattleianum* e *P. grandifolium* (como *P. cinereum*). Seus cariótipos também apresentam diferenças no que se refere à morfologia cromossômica, com um número maior de cromossomos submetacêntricos em *P. grandifolium* (Capítulo 3). Apesar disso, não é possível, até o momento, indicar o posicionamento dos sítios de DNAr 45S nos cromossomos de cada uma das espécies, principalmente em função do tamanho reduzido dos cromossomos. Mais repetições são necessárias para chegar a conclusões mais precisas sobre a variação de número de sítios apresentada para estas espécies.

Certamente, a ampliação do número de espécies estudadas com a técnica de FISH para a seqüência de DNAr 45S subsidiará a taxonomia dos gêneros de Myrtinae, principalmente em *Psidium*. Além disso, a aplicação de outros marcadores (como a seqüência ribossomal 5S) e bandamento por fluorocromos dará maior robustez à caracterização cariotípica e à discussão taxonômica do grupo.

Referências Bibliográficas

- Andrade FG & Forni-Martins ER. 1998. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae. *Genetics and Molecular Biology* 21(3 – suppl.): 166.
- Atchinson E. 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany* 34: 159-164.
- Berg O. 1855-56. *Revisio Myrtacearum Americae*. *Linnaea* 27: 1-472
- Berg O. 1857-59. *Myrtaceae*. In: von Martius C. F. P. (ed.). *Flora Brasiliensis* 14: 1 - 655.
- Birnboim HC & Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7: 1513-1523.
- Carvalho R & Guerra M. 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136: 159-168.
- Cerbah M, Couland J & Siljak-Yakovlev S. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the *Hypochaeris* (Asteraceae). *J. Heredity* 89: 312-318.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006a. Chromosome studies in *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54: 409-415.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2006b. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia* 59: 7-13.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2007a. Chromosome studies in species of *Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* and *Myrcia* (Myrtaceae, subtribe Myrciinae). *Kew Bulletin* 62: 113-118.
- Costa IR & Forni-Martins ER. 2007b. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 571-580.
- Costa IR. 2004. *Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
- Cuadrado A & Jouve N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-*Triticale*. *Chromosome Research* 2: 231-238.
- Forni-Martins ER & Martins FR. 2000. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 947-955.

- Forni-Martins ER, Pinto-Maglio CAP & Cruz ND. 1995. Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. *Revista Brasileira de Genética* 18: 281-288.
- Fregonezi JN, Torezan JMD & Vanzela ALL. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using *in situ* hybridization with a 45rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genetics and Molecular Biology* 27 (2): 223-227.
- Guerra M. 1988. Introdução a citogenética geral. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Guerra M. 2004. FISH (Fluorescent In situ Hybridization) – conceitos e aplicações. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto.
- Heslop-Harrison JS, Schwarcher T, Anamthawat-Jonsson K, Leitch ASR, Shi M & Leitch IJ. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 106-109.
- Landrum LR. 1986. Flora Neotropica. Monograph 45. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhynium* and *Luma* (Myrtaceae). The New York Botanical Garden Publishers
- Landrum LR. 2003. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae). *Sida* 20(4): 1149-1469.
- Landrum LR. 2005. A revision of the *Psidium grandifolium* complex (Myrtaceae). *Sida* 21(3): 1335-1354.
- Levy AA & Feldman M. 2004. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological journal of the Linnean Society* 82: 607-613.
- Li R, Taylor S & Jenkins G. 2001. Unravelling the phylogeny of tetraploid *Vicia amoena* (Fabaceae) and its relatives using chromosomal landmarks. *Hereditas* 134: 219-224.
- Lucas E, Belsham S, Nic Lughada E, Orlovich D, Sakuragui C, Chase M & Wilson P. 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251: 35-51.
- Lucas EJ, Harris AS, Mazine FF, Belsham SR, NicLughadha EM, Telford A, Gasson PE, Chase MW. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128.
- Maluszynska J & Heslop-Harrison JS. 1993. Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: *in situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. *Annals of Botany*: 479-484.
- Mansanares ME. 2004. Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora*

- Mart. (Asteraceae: Vernoniae: Lychnophorinae). Tese de Doutorado em biologia Vegetal. Instituto de Biologia. UNICAMP.
- Matsumoto ST, Marin-Morales MA, Ruas CF & Ruas PM. 2000. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L`Her. (Myrtaceae). *Caryologia* 53(3-4): 205-212.
- Melo NF & Guerra M. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92: 309-316.
- Mishima M, Ohmido N, Fukui K & Yahara T. 2002. Trends in site-number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma* 110: 550-558.
- Niedenzu F. 1893. Myrtaceae: In: Egler, A . & Prantl, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien 3: 57-105.
- Pedrosa A, Gitaí J, Barros e Silva AE, Felix LP & Guerra M. (1999). Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta botânica brasílica* 13(1): 49-60
- Ruas CF, Vanzela ALL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas PM, Matzenbacher NI & Aguiar-Perecin MLR. 2005. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 28(1): 129-139.
- Rye B. 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. *Australian Journal of Botany* 27: 547-573.
- Schwarzacher T & Heslop-Harrison JS. 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific, Oxford.
- Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D. & Heslop-Harrison, J. S. 1989. *In situ* localization of Parental Genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany* 64: 315-324.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- Snowdon, R., Kusterer, B. & Horn, R. 2002. Structural genome analysis using molecular cytogenetics techniques. *Progress in Botany* 63: 55-79.
- Speranza P, Vaio M & Mazzella C. 2003. Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. *Genetics and Molecular Biology* 26: 499-503.
- Stace CA. 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon* 49: 451-477.

- Thomas HM, Harper JA, Meredith MR, Morgan WG, Thomas ID, Timms E & King IP. 1996. Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinaceae* and related species by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* 40: 406-410.
- Vaio M, Speranza P, Valls JF, Guerra M & Mazzela C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany* 96: 191-200.
- Vaughan HE, Jamilena M, Ruiz Rejón C, Parker JS & Garrido-Ramos MA. 1993. Loss of nucleolar-organizer regions during polyploid evolution in *Scilla autumnalis*. *Heredity* 71: 547-580.
- Vijayakumar N & Subramanian D. 1985. Cytotaxonomical studies in South Indian Myrtaceae. *Cytologia* 50: 513-520.
- Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Siljak-Yakolev S, Baeza CM & Parker J. 2003. Karyotype evolution in south American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Pl. Syst. Evolution* 241: 171-184.
- Wendel JF. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant molecular Biology* 42: 225-249.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM & Quinn CJ. 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251, 3-19.

Tabela 1. Espécies de *Psidium* utilizadas nos ensaios com a técnica de hibridação *in situ* (rDNA 45S), com respectivos número cromossômico e número de sítios de hibridação com rDNA 45S. * representam sítios intercalares, # número de sítios em células somáticas. As espécies seguidas por (***) necessitam de repetição para conclusões mais precisas, devido à presença de sítios inespecíficos.

Espécies	Procedência	Nº crom.	Sítios 45S
<i>Campomanesia laurifolia</i>	RJ, Rio de Janeiro	2n = 22	4**
<i>C. pubescens</i>	SP, Itirapina	2n = 22	2***
<i>Pimenta dioica</i>	RJ, Rio de Janeiro, cultivo	2n = 22	2
<i>Psidium acutangulum</i>	SP, Campinas (cultivo)	2n = 44	4
<i>P. australe</i>	MG, Carrancas (IRC587)	2n = 55	6**
<i>P. cattleianum (pop1)</i>	SP, Campinas (IRC 477)	2n = 44	6
<i>P. cattleianum (pop2)</i>	RJ, Itatiaia (IRC 606)	2n = 66	8 + 2*
<i>P. grandifolium var. cinereum (pop1)</i>	DF, Brasília	2n = 44	4
<i>P. grandifolium var. argenteum (pop2)</i>	MG, Santa Cruz de Minas (IRC543)	n ~ 33	4 (8#)
<i>P. grandifolium var. argenteum (pop3)</i>	SP, Itirapina	2n = 44	8
<i>P. myrtoides</i>	DF, Brasília	2n = 88	4
<i>P. rufum</i>	DF, Brasília	2n = 55	2

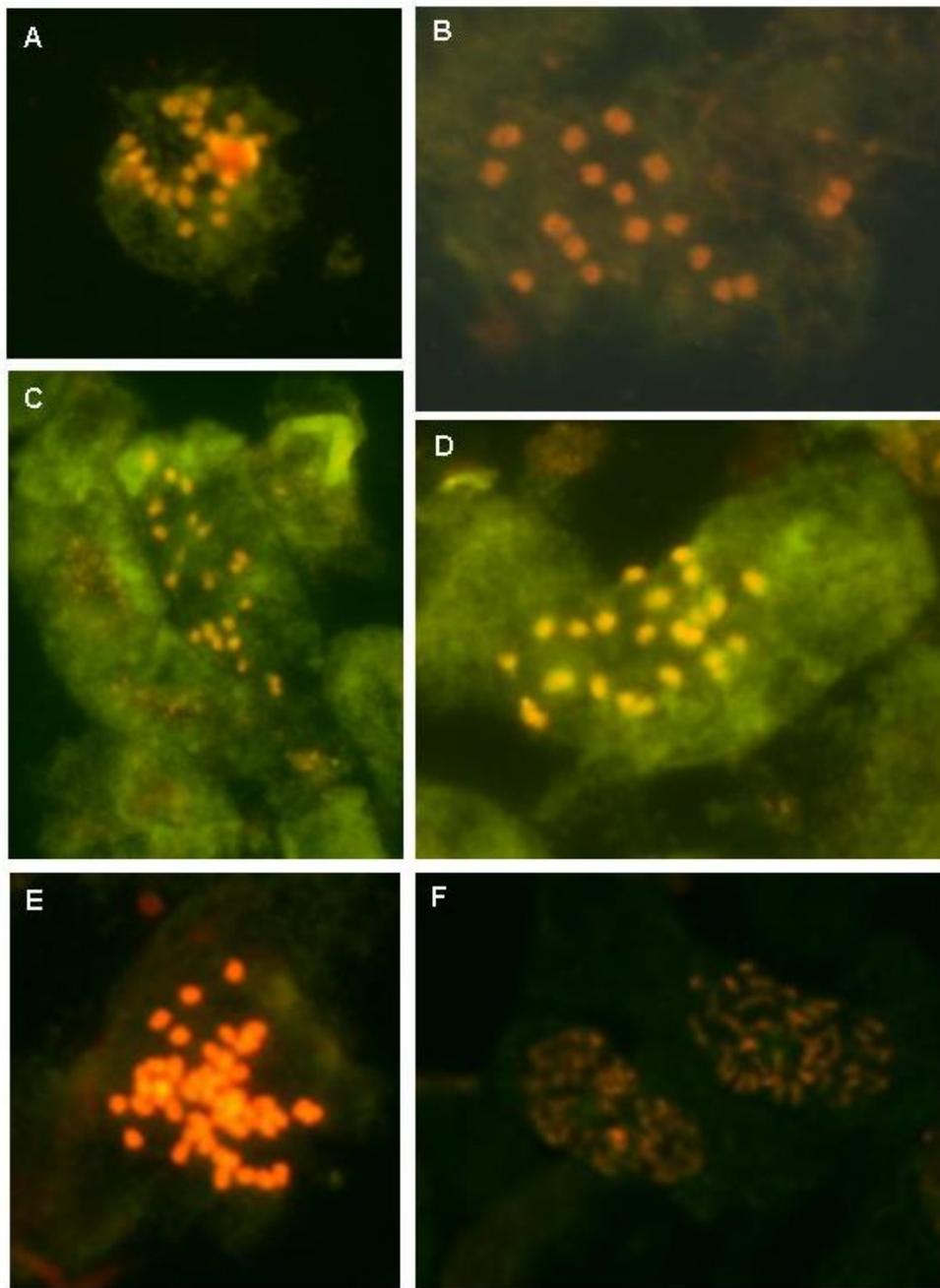


Figura 1. Fotos ilustrando alguns dos principais problemas encontrados com a aplicação da técnica de FISH em espécies de Myrtaceae, não levando a resultados satisfatórios: denso citoplasma sobre os cromossomos dificultando a visualização dos sítios (A-F), sinal muito pequeno (A e B), espalhamento dos cromossomos pouco adequado (E). pequeno. A e B – *Pimenta dioica* ($2n=22$), C e D – *P. pseudocaryophyllus* ($2n=22$), E e F – *Psidium acutangulum* ($2n=44$).

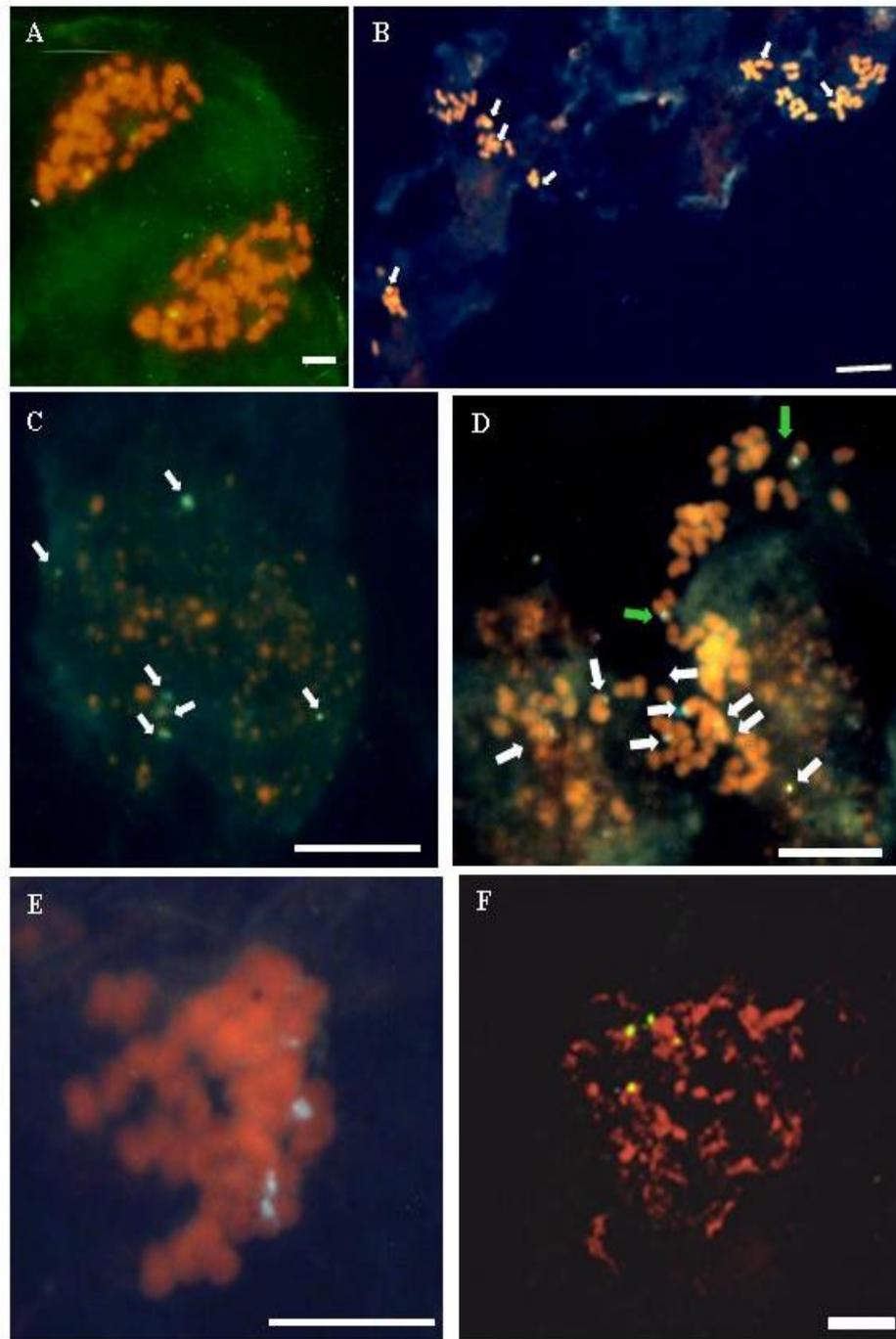


Figura 2. Distribuição do número de sítios de rDNA 45S em algumas espécies de *Psidium*. A – *Psidium* sp ($n \sim 33$), anáfase evidenciando 4 sítios; B – *P. australe*, metáfase com 6 sítios; C – *P. cattleianum* (pop1, $2n=44$), núcleo interfásico evidenciando 6 sítios; D – *P. cattleianum* (pop2, $2n \sim 66$), 10 sítios, sendo 8 terminais (setas brancas) e 2 intercalares (setas verdes); E – *P. cinereum* ($2n=44$), metáfase com 4 sítios, confirmada em no núcleo interfásico em F. As setas indicam os sítios muito pequenos de hibridação com a sonda de rDNA 45S (pTa71). Barra: $1\mu\text{m}$.

CAPÍTULO 5

Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae

Artigo apresentado na íntegra na forma no qual foi publicado no periódico

Plant Systematics and Evolution, 276: 209-217 (2008)

DOI: 10.1007/s00606-008-0088-x

www.springer.com

Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae

Itayguara Ribeiro da Costa^{1*}, Marcelo Carnier Dornelas², Eliana Regina Forni-Martins¹

¹ Department of Botany, Institute of Biology (IB), University of Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Fax: ++ 55 19 35216168

² Department of Plant Physiology, IB, UNICAMP

*For correspondence: e-mail: itayguara@gmail.com

Received: 19 December 2007 / Accepted: 12 August 2008 / Published online: 3 October 2008

Running title: Genome size in Myrtaceae.

Abstract. In Myrtaceae, reports regarding the nuclear DNA content are scarce. The aim of this study is to present genome size data for fleshy-fruited Myrteae, and to test their relation with chromosome number and ploidy, the available data for cytoevolutionary studies in Myrtaceae. 30 species out of ten genera were investigated for chromosome number and genome size using flow cytometry. 28 species were diploid with $2n = 2x = 22$, two species were tetraploid with $2n = 4x = 44$. All genome sizes measured are new. Among the diploid species a gradual and small variation in 2C-values (0.486 pg in *Gomidesia schaueriana* to 0.636 pg in *Eugenia multcostata*) was observed, whereas the tetraploid genomes of *Psidium acutangulum* and *P. cattleianum* had about twice as much DNA (1.053 and 1.167 pg, respectively). The total interspecific variation of C-values was 2.45-fold. The fleshy-fruited Myrteae have smaller holoploid genomes than the capsular-fruited Eucalypteae and Melaleuceae.

Keywords: Chromosome number; DNA 2C-value; evolution; flow cytometry; genome size; Myrtaceae; Myrteae; polyploidy.

Introduction

Throughout the last four decades there has been an increase in the number of studies aiming the determination of genome sizes (2C-value) in plants, specially in Angiosperms, where ca. 5150 species have been studied (Bennett and Smith, 1976; Bennett and Leitch 2004, 2005). Among Angiosperms, there is a great variation in genome sizes, ranging from 0.1 pg to 125 pg (Leitch et al., 1998). Leitch et al. (1998) and Soltis et al. (2003) proposed a classification for genome sizes: very small ($1C \leq 1.4$ pg), small ($1C \leq 3.5$ pg), intermediate ($1C$ ranging 3.51 pg – 13.99 pg), large ($1C \geq 14$ pg) and very large ($1C \geq 35$ pg). In a phylogenetic context, Leitch et al. (1998) affirmed that ancestral groups in Angiosperms have smaller genome sizes when compared to more derived groups.

Myrtaceae have been traditionally divided in two subfamilies: Myrtoideae, with baccoid fruits and opposite leaves and Leptospermoideae, with capsular fruits and alternate leaves (Niedenzu, 1893). Recent phylogenetic studies performed by Wilson et al. (2005) proposed the inclusion of all capsular genera (traditional Leptospermoideae) in Myrtoideae. In this group, the fleshy-fruited tribe Myrteae is one the most derived groups and a sister group of capsular-fruited tribe Eucalypteae (Wilson et al., 2001, 2005). The capsular-fruited tribe Melaleuceae is more basal in Myrtoideae (Wilson et al., 2001, 2005).

The basic chromosome number for Myrtaceae is $x = 11$ (Atchison, 1947). Usually dysploid variations ($x = 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12$ and 14) occur in capsular-fruited taxa against polyploid variations in fleshy-fruited taxa (Rye, 1979) which evolved mainly by polyploidy, with various cytotypes (Costa and Forni-Martins, 2006a, b, 2007a). In many cases, the ploidy levels of an organism have been estimated by morphological characters (cell volume or organism size – ‘gigantism’) or by chromosome counts (Dart et al., 2004). Costa and Forni-Martins (2006a, b) studied cytotypes of *Eugenia hyemalis* DC. ($2n = 22$ and 44)

and *Psidium cattleianum* Afzel ex. Sabine ($2n = 44, 66, 77$ and 88), respectively, and have not found a very expressive morphological variation among them.

Chromosome counts associated with 2C-value have been applied to evolutionary studies in several groups. In *Sorghum* (Poaceae), species with $2n = 10$ present large genomes while species with $2n = 20$ and 40 have a small genome holoploid (Price et al., 2005). In Asteraceae, the conjunction of karyotype data, genome size and GC proportion in the genome corroborate the infra-generic classification and distribution pattern of part of the genus *Hypochoeris* (Cerbah et al., 1999).

If monoploid genome size (1Cx-value) was constant, it would be possible to estimate the ploidy level of species, with arithmetic progressions, as related by several authors (Sgorbati et al., 1989; Baird et al., 1994; Brummer et al., 1999). However, this correlation is not always possible because of structural adaptations in the genome (Das et al., 1998; Vogel et al., 1999).

In Myrtaceae, reports regarding the nuclear DNA content are scarce. Few species of capsular taxa (genera *Callistemon*, *Eucalyptus* and *Melaleuca*) have had the genome size estimated (Ohri and Kumar, 1986; Azmi et al., 1997; Rani and Raina, 1998; Bennett and Leitch, 2004, 2005). The first species of fleshy-fruited Myrteae investigated was *Psidium guajava* L., where the authors found different 2C-values, estimated by Feulgen microdensitometry: 0.7 pg (Bennett and Leitch, 2004) and 1.3 pg (D Ohri, pers. comm.), both samples with $2n = 22$. The value of Ohri is two-fold higher than the value of Bennet and Smith's (1991) sampling. M Dornelas (our unpublished data) estimated the genome size for ca. 20 species of fleshy-fruited Myrteae (traditional Myrtoideae) and verified that the genome sizes of this group was smaller when compared with capsular-fruited species (traditional Leptospermoideae).

The aim of the present work was to estimate the nuclear DNA amount in several species of Myrteae, by flow cytometry and to test the relation between

chromosome number and genome size, the available data for cytotaxonomic evolution studies in Myrtaceae.

Material and Methods

Plant Material. The material for analysis was collected from plants maintained in greenhouses or from plants found in natural populations distributed in Brazilian Atlantic Rain Forest, *campo rupestre* and Cerrado vegetation. Vouchers of all species were deposited in the UEC (University of Campinas) Herbarium (Table 1).

Chromosome counts. To obtain mitotic metaphases, seeds from all species studied were germinated in wet paper in Petri dishes kept at 28 ° - 30 °C. The root tips were pre-treated with 2mM 8-hydroxyquinoline for 24 h, at 8 °C and fixed in Farmer's solution. Mitotic and meiotic preparations in microscopic slides were frozen (-20 °C) and stained with the HCl-Giemsa technique (Guerra, 1983). The slides were examined under light microscopy and meiotic and mitotic cells with a good chromosome condensation and spreading were recorded with a photomicroscope.

Preparation of plant nuclei suspensions for flow cytometry. The chopping procedure was done in the field and for some of the material was also cultivated. Young fresh leaves from *A. thaliana* or from the sampled species were chopped with a scalpel in 0.5 mL of ice-cold 'OttoI' solution [0.1 M citric acid monohydrate, 0.5 % (v/v) Tween 20; Otto, 1990] in a plastic Petri dish. A large preparation of *Arabidopsis* nuclei was made available and maintained frozen. Immediately before running the samples in the cytometer, both *Arabidopsis* and the Myrtaceae samples were defrost and mixed in equal volumes. Sub-samples of the same *Arabidopsis* nuclei population were used in all analyzed Myrtaceae samples. The obtained suspension was filtered through 42 μ M nylon mesh, and kept on ice during the collecting process in the field and stored frozen at -20 °C

until further use. Two volumes of 'Otto II' solution (0.4 M Na₂HP0₄.12H₂O containing 2 μ L mL⁻¹ β -mercaptoethanol; Otto, 1990) containing propidium iodide and RNase (each at a final concentration of 50 μ g mL⁻¹) were added to the thawed samples (at 23 – 25 °C) just before being analysed. Samples were run on a Becton-Dickinson FACSCalibur flow cytometer with an argon laser exciting at 488 nm. Pulse area was detected using FL2-A (585 mean/42 bandwidth) with a threshold at FLS 35.. The genome size of each sample was calculated using the mean diploid (2C) genome size estimate for the *Arabidopsis* Landsberg ecotype estimated to be 0.32 pg (Bennett and Leitch, 2005) and considering an estimate of 1 pg equal to 0.978 x 10⁹ bp (Dolezel et al., 2003).

Settings of flow cytometer and calculations. Integral fluorescence together with fluorescence pulse height and width emitted from nuclei were collected through a 645-dichroic long-pass filter and a 620-band-pass filter and converted on 1,024 ADC channels. Prior to analysis, the instrument was checked for linearity and the amplification was adjusted so that the peak corresponding to 2C *Arabidopsis* nuclei was positioned approximately at channel 200. This setting varied according to the mean DNA content of the species analysed. In some cases we have set 4C or 8C *Arabidopsis* nuclei at channel 200 in order to accommodate the peak mean of the test-species with larger genomes within the graphic frames. In these cases, we performed additional cross-tests with other large-genome species (i.e. *Caesalpinia echinata* and *Solanum lycocarpum*), to check for the consistency of the results. The results were obtained in the form of three graphics: linear-fluorescence light intensity (FL), forward angle (FS) - versus side angle (SS) - light scatter and FL pulse integral versus FL pulse height. This last cytogram was used to eliminate partial nuclei and other debris, nuclei with associated cytoplasm and doublets (Price and Johnston, 1996). A gate area was defined such that only single intact nuclei were included in the FL histogram (Brown *et al.*, 1991). We compared the position of the G₀/G₁ peak of the sample

on a histogram with that of the internal reference plant with known nuclear DNA content (*Arabidopsis*). **For each sample at least 10,000 nuclei were analysed.** The holoploid genome size (Greilhuber et al., 2005) of each sample was calculated according to the following formula (Dolezel and Bartos, 2005):

Sample 2C DNA content =
 [(sample G₁ peak mean) / (standard G₁ peak mean)] X standard 2C DNA content
 (pg DNA).

and the monoploid genome size (Cx-value; Greilhuber et al., 2005) of all species was also calculated in mass (pg) and Mpb. The mean c.v. (%) for three biological replicates (three different samples and at least two different runs with minimum of ten thousand counts per run) for each sample is presented for each species.

Results

Chromosome numbers. We presented the chromosome counts for 30 species grouped in ten genera. Almost all analysed species are diploids with showed $2n = 2x = 22$ chromosomes. The exceptions were two polyploid species of *Psidium*, with $2n = 4x = 44$: *P. acutangulum* and *P. cattleianum* (Table 2).

Nuclear DNA content estimations. We estimated by flow cytometry the holoploid genome size of 30 Neotropical species of Myrtaceae (fleshy-fruited tribe Myrteae), belonging to ten genera, as following: subtribe Eugeniinae: *Eugenia* (seven species) and *Myrciaria* (one); subtribe Myrciinae: *Calypttranthes* (four) and *Gomidesia* (two); subtribe Myrtinae: *Acca*, *Accara*, *Blepharocalyx* (one), *Campomanesia* (seven), *Pimenta* (two) and *Psidium* (three and two varieties). DNA contents were presented as picogramas of DNA and megabase pairs (Table 2).

The total range of the nuclear DNA content variation observed was 2.45 - fold (0.478 pg DNA in *Myrciaria glazioviana* to 1.167 pg in *Psidium*

acutangulum), being less expressive in Myrciinae (ca. 1.15 -fold) and Eugeniinae (ca. 1.33 -fold) than in Myrtinae species (2.35 -fold) (Table 2, Fig. 1). Between diploids, the mean of holoploid genome size was 0.529 ± 0.046 pg DNA (variation of 1.33 -fold) and from tetraploids, was 1.110 ± 0.081 pg DNA (variation of 1.11 -fold). It was not possible to recognize groups of large, intermediate or small genomes. The tetraploids species of *Psidium*, *P. acutangulum* and *P. cattleianum* had the largest 2C-values (1.167 and 1.053 pg DNA, respectively).

Discussion

Chromosome numbers. Several species had their chromosome numbers previously reported (Costa & Forni-Martins, 2006a, b, 2007a) but for other species, this is the first report (Table 2). We obtained new chromosome counts for 16 species of Myrtaceae (Table 2). The counts of *Calypttranthes* are new for the genus. Costa and Forni-Martins (2007a) did not sample this genus in a work of subtribe Myrciinae. For some species as *Campomanesia guaviroba*, *C. phaea*, *C. pubescens*, *Eugenia hyemalis*, *E. puniceifolia*, *E. uniflora*, *Psidium cattleianum* and *P. guajava* we registered the same chromosome numbers sampled by Costa and Forni Martins (2006a, b) for other populations (Table 2).

Nuclear DNA content estimations. All data obtained of genome size estimation are novel for Myrtaceae, except for *P. guajava*, where were found different 2C-values, estimated by Feulgen microdensitometry: 0.7 pg (Bennett and Leitch, 2004) and 1.3 pg (D. Orhi, pers. comm.), both samples with $2n = 22$. Following the classification proposed by Leitch (1998) and Soltis *et al.* (2003), all of the species analysed present very small genomes (Table 2).

Diploid species with capsular fruits (tribes Eucalypteae and Melaleuceae *sensu* Wilson *et al.*, 2005) present holoploid genome sizes ranging between 1.13 (*Eucalyptus globulus* - Eucalypteae, Azmi *et al.*, 1997) to 3.12 pg of DNA

(*Callistemon rigidus* - Melaleuceae, Bennett and Leitch, 2004) (Fig. 1). According to recent phylogenetic relationships proposed for Myrtaceae (Wilson *et al.*, 2001, 2005), the Melaleuceae tribe is considered basal in Myrtoideae and Eucalypteae are a sister group of fleshy-fruited Myrteae. For Angiosperms, Leitch *et al.* (1998) and Soltis *et al.* (2003) affirmed that basal groups generally have smaller genomes when compared to more derived groups. On the opposite, our findings in Myrtaceae (Myrtoideae) - from 0.48 pg DNA in *Myrciaria glomerata* (this work) to 3.12 pg DNA in *Callistemon rigidus* (Bennet & Leitch, 2004) - do not conform to these reports, being *Callistemon* derived in relation to *Myrciaria*, corroborating the findings by M Dornelas (our unpublished data). It seems to us premature to assume that genome size reduction has occurred in this group.

For discussion, we followed the classification of Myrteae *sensu* Berg (1855-56, 1857-59), who circumscribe three subtribes in Myrteae, based mainly on embryo morphology: Eugeniinae, Myrciinae and Myrtinae.

Subtribe Eugeniinae - In this group, the 2C-value variation was 1.33 - fold, from 0.478 pg in *Myrciaria glazioviana* to 0.636 pg of DNA for *Eugenia multcostata* (Table 2, Fig. 2). For *Eugenia*, the 2C-value varied from 0.487 pg (*E. crenata*) to 0.636 pg (*E. multcosta*). Costa & Forni-Martins (2007b) provided the karyotype analysis in some species of Myrtaceae, including four species of *Eugenia*. These authors found a little gradual variation in the total chromosome length in this genus. These authors sampled only *E. puniceifolia*, however using a different population than the one used here and thus it was not possible to establish relations between chromosome lengths and genome sizes.

Costa & Forni-Martins (2006a) accessed the chromosome numbers of 31 species founding several polyploidy cytotypes in *Eugenia*, including *E. uniflora* ($2n = 22$ and $2n = 33$), *E. hyemalis* and *E. puniceifolia* ($2n = 22$ and $2n = 44$). We found only diploid populations for these species, all with $2n = 22$.

Lucas *et al.* (2007) based on plastid and DNA sequences carried out the

most recent phylogenetic analysis of Myrteae. They found the traditional Eugeniinae to be a paraphyletic group, with *Myrciaria* (into *Plinia* group) being derived in relation to *Eugenia* with large genomes (*Eugenia* group). However, the *Plinia* group was not supported in a Bayesian analysis. It seems to us premature to assume that genome size reduction has occurred in this group.

Subtribe Myrciinae. According to Lucas et al. (2005, 2007) the Myrciinae appears as a monophyletic group, while other genera such as *Marlierea* and *Myrcia* do not form a natural group. *Calypttranthes* and *Gomidesia* are monophyletic genera, both with bootstrap values (*b.s.*) of 100 %. We analysed samples from both genera.

For *Calypttranthes*, the 2C-values varied 1.15 -fold, ranging from 0.487 pg DNA in *C. lucida* to 0.559 pg DNA in *C. brasiliensis*, and all species showed $2n = 22$. The chromosome numbers are novel for the genus (Table 2).

For *Gomidesia*, the 2C-value variation was not expressive (1.01 -fold), from 0.486 pg in *G. schaueriana* to 0.492 pg DNA for *G. affinis* (Table 2). These two sampled species appears as a monophyletic clade in the *Myrcia* group (*b.s.* 89 %) (Lucas et al., 2007). These chromosome counts for these species also represent novel data for the genus and no polyploid material was found (Table 2).

The genus *Myrcia* form a paraphyletic group with *Marlierea* (into *Myrcia* group) and *Myrceugenia* is monophyletic within the *Myrceugenia* group (Lucas et al., 2007). Unfortunately, we did not analyze material for the remaining genera belonging to this group. The extension of this study for other genera and more species of the *Myrcia* group is desirable.

Subtribe Myrtinae. The largest variation in nuclear DNA content (2.35 -fold) was observed among species of this group. We observed 0.503 pg DNA for *Acca sellowiana* and *Campomanesia guazumifolia* to 1.167 pg DNA to *Psidium acutangulum* (Table 2). This variation was due to the polyploid species of *Psidium*, with $2n = 44$ (Table 2).

The genus *Acca* comprises three species, of which only *A. sellowiana* occurs in Southern Brazil (Landrum and Kawasaki, 1997). The chromosome numbers we have observed for the genus, $2n = 22$, agrees with previous reports (Vijayakumar and Subramanian, 1985 - as *Feijoa sellowiana*). *Accara* is a monotypic genus endemic to ‘campos rupestres’ vegetation from Brazil (Minas Gerais state) (Landrum, 1990) and the chromosome number $2n = 22$ was also unreported for the genus. According to Landrum (1990), these two genera are closely related. The 2C-value variation between them was inexpressive (0.505 pg in *Accara elegans* to 0.503 pg for *Acca sellowiana*) (Table 2). *Acca sellowiana* appears in a more basal position in relation to *Campomanesia* and *Psidium* genera in their monophyletic group (Lucas et al., 2007). Additional studies are necessary to elucidate the relationships between these genera.

Blepharocalyx comprises three species (Landrum and Kawasaki, 1997), with only *B. salicifolius* and *B. eggersii* occurring in Brazil. We sampled only *B. salicifolius*, to which we have obtained $2n = 22$ and $2C = 0.512$ pg DNA (Table 2). The taxonomic delimitation of this species is controversial, due to great phenotypic plasticity (Landrum, 1986). Lucas et al. (2007) considered *Blepharocalyx salicifolius* the most basal species among South American Myrtaceae.

The essentially Caribbean genus *Pimenta*, has a single species, *P. pseudocaryophyllus* to whom three varieties have been reported to occur in Brazil (Landrum, 1986). We observed $2n = 22$ for both *Pimenta pseudocaryophyllus* and *P. dioica* and $2C = 0.523$ and 0.556 pg DNA, respectively (Table 2). More studies are necessary for a better characterization of *P. pseudocaryophyllus* varieties from Brazil. This genus is monophyletic and is a sister-group to a clade containing *Acca*, *Campomanesia* and *Psidium* genera, forming the *Pimenta* group (Lucas et al., 2007).

The nuclear DNA content of species of *Campomanesia* varied 1.23 -fold,

ranging from 0.503 pg (*C. guazumifolia*) to 0.612 pg DNA (*C. laurifolia*). All species analyzed have $2n = 22$ (Table 2). Our group have sampled three additional *Campomanesia* species with 2C-values ranging from 0.600 to 0.640 pg DNA, and all showing $2n = 22$ (M Dornelas, our unpublished data). Costa & Forni-Martins (2006b) reported $2n = 22$ to other four species and polyploid species were not observed. The chromosome counts obtained for *C. guazumifolia*, *C. laurifolia* and *C. schlehtendaliana* are novel for these species. In this genus, the only karyotype published previously was the one reported for *C. pubescens* (Costa & Forni-Martins, 2007b).

The largest variation in nuclear DNA content within this group was observed to occur in *Psidium* (2.3 -fold), due to the occurrence of two polyploid species, *P. acutangulum* and *P. cattleianum*, showing $2n = 4x = 44$ (Table 2). The only diploid species analysed, *P. guajava* (common guava; $2n = 2x = 22$), showed little variation in the nuclear DNA content when we compared two cultivated varieties (red and white guavas) (Table 2). Between polyploid species ($2n = 4x = 44$) the variation in the nuclear DNA content was also only 1.1 -fold. In this genus occurs a direct relationship between base chromosome number ($x = 11$) and 2C-values. The often well-expressed relation between ploidy level and C-values is now increasingly used for indirect ploidy determination, e.g. in *Pilosella*, Asteraceae (Suda et al., 2007).

The authors thank Fernanda Gonçalves Pereira and Irene Lorand-Metze (Unicamp, Brazil) for the use of the flow cytometer. IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), IF-SP (Instituto Florestal – São Paulo), and IEF-MG (Instituto Estadual de Florestas – Minas Gerais) for permission to material collecting. Julie Dutilh for improvements to English. This work was part of PhD Thesis of IRC at *Programa de Pós-graduação*

em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). IRC was supported by a scholarship from CNPq; MCD and ERFM are recipients of research fellowships from CNPq. This work was provided by Brazilian agencies *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) (01/13169-6, 04/13041-8) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) (471065/2004-8) to ERFM.

References

- Atchinson E (1947) Chromosome numbers in the Myrtaceae. *Am J Bot* 34: 159-164
- Azmi A, Noin M, Landré P, Prouteau M, Boudet AM, Chriqui D (1997) High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. Hypocotyls: Ontogenesis and ploidy level of the regenerants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 51: 9-16
- Baird WV, Estagier AS, Wells JK (1994) Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *J Am Soc Hortic Sci* 119: 1312-1316
- Bennett MD, Leitch IJ (2004) Angiosperm DNA C-values database (release 5.0, Dec. 2004) <http://www.rbgkew.org.uk/cvalues/homepage.html> (12 Nov. 2007)
- Bennett MD, Leitch IJ (2005) Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Ann Bot* 95: 45-90
- Bennett MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 274: 227-274
- Berg O (1855-1856) *Revisio Myrtacearum Americae*. *Linnaea* 27: 1-472
- Berg O. (1857-1859) Myrtaceae. In: von Martius CFP, ed. *Flora Brasiliensis*. v. 14, 1 - 655
- Brown S, Bergounioux C, Tallet S, Marie D (1991) Flow cytometry of nuclei for ploidy and cell cycle analysis. In: Negrutiu I, Gharti-Chherti G (eds.) *A laboratory guide for cellular and molecular plant biology*. Bihuser, Basel, 326–345

- Brummer EC, Cazcarro PM, Luth D (1999) Plant genetic resources: Ploidy determination of alfafa germplasm acessions using flow cytometry. *Crop Sci* 39: 1202-1207
- Cerbah M, Couland J, Brown SC, Sijak-Yakolev S (1999) Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochoeris*. *Heredity* 82: 261-266
- Costa IR, Forni-Martins ER (2006a) Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. *Aust J Bot* 54: 409-415
- Costa IR, Forni-Martins ER (2006b) Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz et Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia* 59: 7-13
- Costa IR, Forni-Martins ER (2007a) Chromosome studies in *Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* and *Myrcia* (Myrtaceae, subtribe Myrciinae). *Kew Bull* 62: 113-118
- Costa IR, Forni-Martins ER (2007b) Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Bot J Linn Soc* 155: 571–580
- Dart S, Kron P, Mable BK (2004) Characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flow cytometry. *Can J Bot* 82: 185-197
- Das AB, Mohanty S, Das P (1998) New report on chromosome number, karyotype and 4C DNA content in three species of *Pachypodium* Lindley. *Caryologia* 51: 245.252
- Dolezel J, Bartos J (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Ann Bot* 95: 99-110
- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and humam. *Cytometry* 51A: 127-128
- Greilhuber J, Dolezel J, Lysak MA, Bennett MD (2005) The Origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘Genome Size’ and ‘C-Value’ to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* 95: 255–260
- Guerra M (1983) O uso do Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Cienc Cult* 35: 190-193
- Landrum LR (1986) *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium* and *Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropica* 45: 1-178
- Landrum LR (1990) *Accara*: A new genus of Myrtaceae, Myrtinae from Brazil. *Syst Bot* 15: 221-225
- Landrum LR, Kawasaki ML (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536

- Leitch IJ, Chase MW, Bennett MD (1998) Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann Bot* 82 (suppl. A): 85-94
- Lucas EJ, Belsham SR, NicLughadha EM, Orlovich DA, Sakuragui CM, Chase MW, Wilson PG (2005) Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. *Pl Syst Evol* 251: 35–51
- Lucas EJ, Harris AS, Mazine FF, Belsham SR, NicLughadha EM, Telford A, Gasson PE, Chase MW (2007) Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128
- Nieden zu F (1893) Myrtaceae. In: Engler A. and Prantl K. eds., *Die Natürlichen Pflanzenfamilien III*, 57-107
- Ohri D, Kumar A (1986) Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods. *Caryologia* 39: 303-307
- Otto FJ (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewickz Z, Crissman HA, eds. *Methods in cell biology*, v. 33. San Diego: Academic Press, 105-110
- Price HJ, Dillon SL, Hodnett G, Rooney WL, Ross L, Johnston JS (2005) Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). *Ann Bot* 95: 219–227
- Price HJ, Johnston JS (1996) Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: Jauhar P, ed. *Methods of genome analysis in plants*. Boca Raton: CRC Press, 115–131
- Rani V, Raina SN (1998) Genetic analysis of enhanced-axillary-branching-derived *Eucalyptus tereticornis* Smith and *E. camaldulencis* Dehn. plants. *Plant Cell Reports* 17: 236-242
- Rye B (1979) Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. *Aust J Bot* 27: 547-573
- Sgorbati S, Masci SM, Soler V, Marchi P (1989) Rapid cytofluorimetric determination of leaf nuclear DNA content in the polyploid series *Ranunculus marsicus* (*R. auricomus* agg. Ranunculaceae). *Pl Syst Evol* 167: 219-226
- Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD, Leitch IJ (2003) Evolution of genome size in the Angiosperms. *Am J Bot* 90: 1596-1603
- Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Rosenbaumová R, Peckert T, Krahulec F (2007.) Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. *Ann Bot* 100: 1323-1335
- Vijayakumar N, Subramanian D (1985) Cytotaxonomical studies in south Indian Myrtaceae. *Cytologia (Tokyo)* 50: 513—520

- Vogel KP, Arumuganathan KI, Jensen KB (1999) Nuclear DNA content of perennial grasses of the Triticeae. *Crop Sci* 39: 661-667
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ (2001) Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. *Am J Bot* 88: 2013–2025
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM, Quinn CJ (2005) Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a *matK* phylogeny. *Pl Syst Evol* 251: 3-19

LIST OF FIGURES

Figure 1. Box-plots distribution of 2C-values (pg DNA) in species of Myrtaceae, according the intrafamilial classification proposed by Wilson *et al.* (2005). The data were obtained from the literature as following: tribe Eucalypteae: Azmi *et al.* (1997), Bennett and Leitch (2004), Rani and Raina (1998); tribe Melaleuceae: Ohri and Kumar (1986), Bennett and Leitch (2004) and tribe Myrteae: Bennett and Leitch (2004, and this work). The values inside the boxes represent 50% of sampling (two quarters) and the external lines the other two quarters of sampling. The vertical lines inside the boxes represent the median values. All the values that are less than the min. value, and the ones that are greater than the max. value are treated as the outliers (o and/or *).

Figure 2. Distribution of 2C-values (pg DNA) and 2n chromosome number (diamond) in fleshy-fruited Myrteae species. The bars above columns represent standard deviations.

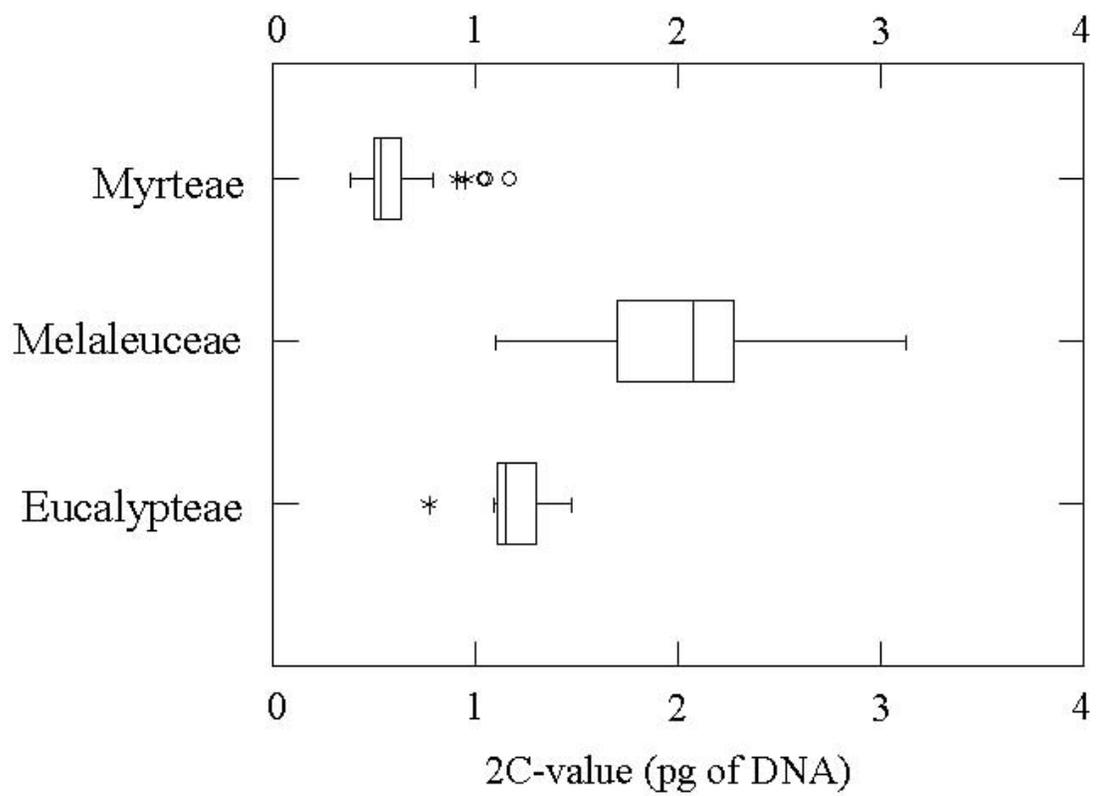


Figure 1

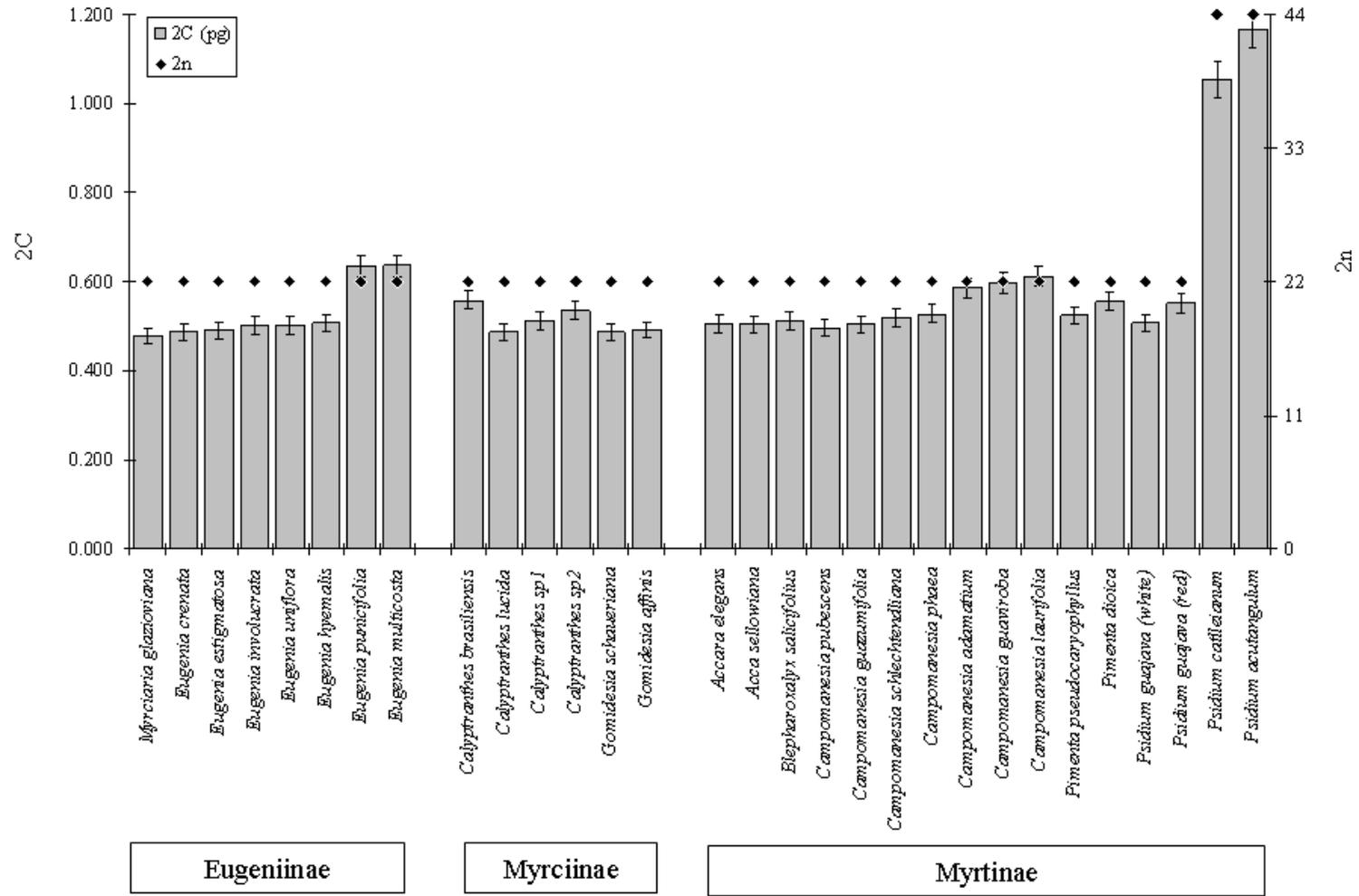


Figure 2

Table 1. Fleshy-fruited Myrteae analyzed species and vouchers details. Habitat of origin: AMRF: Amazonian Rain Forest, ATRF: Atlantic Tropical Rain Forest., CERR: cerrado, CRUP: campo rupestre, MAFR: Middle-Center American Forest. Brazilian states: Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) and Distrito Federal (DF). IRC: collector number of Itayguara Ribeiro da Costa.

Subtribe / Species	Habitat	Voucher details: State, City, Locality, <i>Collector number</i>
Eugeniinae		
<i>Eugenia crenata</i> Vell.	ATRF	RJ, Rio de Janeiro, RJ' Botanic Garden, <i>IRC s/n</i>
<i>Eugenia hyemalis</i> Cambess.	CRUP	MG, Cardeal Mota, Serra do Cipó, <i>IRC 693</i>
<i>Eugenia involucrata</i> DC.	ATRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC 434</i>
<i>Eugenia multicostata</i> D. Legrand	ATRF	SP, Ubatuba, Núcleo Picinguaba, <i>Agostini s/n</i>
<i>Eugenia puniceifolia</i> (Kunth) DC.	CERR	MG, Cardeal Mota, Serra do Cipó, <i>IRC 687</i>
<i>Eugenia stigmatica</i> DC.	ATRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC 782</i>
<i>Eugenia uniflora</i> L.	ATRF	RJ, Rio de Janeiro, Restinga de Marica, <i>IRC 603</i>
<i>Myrciaria glazioviana</i> (Kiaersk.) G.M.Barroso ex Sobral	ATRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC 462</i>
Myrciinae		
<i>Calyptanthes brasiliensis</i> Spreng.	ATRF	MG, Carrancas, <i>IRC 659</i>
<i>Calyptanthes lucida</i> Mart. ex DC.	ATRF	MG, Serra do Caraça, <i>IRC 684</i>
<i>Calyptanthes sp1</i>	ATRF	PR, Jaguariaíva, Road to Senges, <i>IRC 620</i>
<i>Calyptanthes sp2</i>	ATRF	MG, São Roque de Minas, Serra da Canastra, <i>IRC 737</i>
<i>Gomidesia affinis</i> (Cambess.) D. Legrand	ATRF	SP, Iguape, Road to Pariqueraçu, <i>IRC 608</i>
<i>Gomidesia schaueriana</i> O. Berg	ATRF	SP, Ubatuba, Farm's Beach, <i>IRC 719</i>

Myrtinae

<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret	ATRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC s/n</i>
<i>Accara elegans</i> (DC.) Landrum	CRUP	MG, Cardeal Mota, Serra do Cipó, <i>IRC 692</i>
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	CRUP	MG, Ouro Branco, Serra do Ouro Branco, <i>IRC 560</i>
<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg	CERR	DF, Brasília, UnB, <i>IRC 621</i>
<i>Campomanesia guaviroba</i> (DC.) Kiaesrkou	ATRF	RJ, Rio de Janeiro, RJ' Botanic Garden, <i>IRC s/n</i>
<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg	ATRF	RS, Porto Alegre, PUC, cultivated, <i>IRC 780</i>
<i>Campomanesia laurifolia</i> Gardner	ATRF	RJ, Rio de Janeiro, RJ' Botanic Garden, <i>IRC s/n</i>
<i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg) Landrum	ATRF	RJ, Rio de Janeiro, RJ' Botanic Garden, <i>IRC 645</i>
<i>Campomanesia pubescens</i> (O. Berg) DC.	ATRF	MG, Cardeal Mota, Serra do Cipó, <i>IRC 691</i>
<i>Campomanesia schlechtendaliana</i> (O. Berg) Niedenzu	ATRF	RJ, Rio de Janeiro, RJ' Botanic Garden, <i>IRC s/n</i>
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merrill	MAFR	RJ, Rio de Janeiro, RJ' Botanic Garden, cultivated, <i>IRC 643</i>
<i>Pimenta pseudocariophyllus</i> (Gomes) Landrum	CRUP	MG, Carrancas, Cachoeira da Zilda, <i>IRC 656</i>
<i>Psidium acutangulum</i> DC.	AMRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC 490</i>
<i>Psidium cattleianum</i> Afzel. ex Sabine	ATRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC 489</i>
<i>Psidium guajava</i> L. (white cultivar)	ATRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC s/n</i>
<i>Psidium guajava</i> L. (red cultivar)	ATRF	SP, Campinas, UNICAMP, cultivated, <i>IRC s/n</i>

Table 2. Chromosome numbers (2n) and genome size estimations for fleshy-fruited Myrteae species in this work^a.

Subtribe / Species	2n	Ploidy Level	Nuclear DNA content				c.v. (%)	
			2C (pg)	2C range		1Cx (pg)		1Cx (Mpb) ^b
				Min.	Max			
Eugeniinae								
<i>Eugenia crenata</i>	22*	2 x	0.487 ± 0.018	0.469	0.505	0.244	238.14	4.65
<i>E. hyemalis</i>	22##	2 x	0.507 ± 0.019	0.488	0.526	0.254	247.92	3.89
<i>E. involucrata</i>	22 ^c	2 x	0.501 ± 0.019	0.482	0.520	0.251	244.99	4.45
<i>E. multcostata</i>	22*	2 x	0.636 ± 0.024	0.612	0.660	0.318	311.00	4.38
<i>E. puniceifolia</i>	22 ^e	2 x	0.634 ± 0.024	0.610	0.658	0.317	310.03	4.69
<i>E. stigmatorosa</i>	22*	2 x	0.489 ± 0.019	0.470	0.508	0.245	239.12	3.46
<i>E. uniflora</i>	22 ^e	2 x	0.501 ± 0.019	0.482	0.520	0.251	244.99	4.29
<i>Myrciaria glazioviana</i>	22#	2 x	0.478 ± 0.018	0.460	0.496	0.239	233.74	3.79
Myrciinae								
<i>Calyptranthes brasiliensis</i>	22**	2 x	0.559 ± 0.021	0.538	0.580	0.280	273.35	3.12
<i>C. lucida</i>	22**	2 x	0.487 ± 0.018	0.469	0.505	0.244	238.14	4.21
<i>Calyptranthes sp1</i>	22**	2 x	0.512 ± 0.019	0.493	0.531	0.256	250.37	3.52
<i>Calyptranthes sp2</i>	22**	2 x	0.535 ± 0.020	0.515	0.555	0.268	261.62	4.20
<i>Gomidesia affinis</i>	22*	2 x	0.492 ± 0.019	0.473	0.511	0.246	240.59	3.64
<i>G. schaueriana</i>	22*	2 x	0.486 ± 0.018	0.468	0.504	0.243	237.65	3.78
Myrtinae								
<i>Acca sellowiana</i>	22 ^f	2 x	0.503 ± 0.019	0.484	0.522	0.252	245.97	3.89
<i>Accara elegans</i>	22*	2 x	0.505 ± 0.019	0.486	0.524	0.253	246.95	5.45
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	22*	2 x	0.512 ± 0.019	0.493	0.531	0.256	250.37	4.52
<i>Campomanesia adamantium</i>	22 ^d	2 x	0.586 ± 0.022	0.564	0.608	0.293	286.55	4.90
<i>C. guaviroba</i>	22 ^g	2 x	0.596 ± 0.023	0.573	0.619	0.298	291.44	4.49
<i>C. guazumifolia</i>	22*	2 x	0.503 ± 0.019	0.484	0.522	0.252	245.97	3.89
<i>C. laurifolia</i>	22*	2 x	0.612 ± 0.023	0.589	0.635	0.306	299.27	4.65
<i>C. phaea</i>	22 ^g	2 x	0.528 ± 0.020	0.508	0.548	0.264	258.19	4.83

<i>C. pubescens</i>	22 ^g	2 x	0.497 ± 0.019	0.478	0.516	0.249	243.03	3.26
<i>C. schlechtendaliana</i>	22*	2 x	0.519 ± 0.020	0.499	0.539	0.260	253.79	4.06
<i>Pimenta dioica</i>	22*	2 x	0.556 ± 0.021	0.535	0.577	0.278	271.88	5.75
<i>P. pseudocariophyllus</i>	22*	2 x	0.523 ± 0.020	0.503	0.543	0.262	255.75	5.24
<i>Psidium acutangulum</i>	44 ^d	4 x	1.167 ± 0.044	1.123	1.211	0.584	572.32	3.27
<i>P. cattleianum</i>	44 ^g	4 x	1.053 ± 0.040	1.013	1.093	0.526	515.48	3.89
<i>P. guajava</i> (white cultivar)	22 ^g	2 x	0.507 ± 0.019	0.488	0.526	0.254	247.92	4.32
<i>P. guajava</i> (red cultivar)	22 ^g	2 x	0.551 ± 0.021	0.530	0.572	0.276	269.44	5.03

^a The values are given as mean (at least 10.000 nuclei) and standard deviation of the mean of the holoploid nuclear DNA content (2C, pg DNA) of each species. The 2C range is presented by the minimum (Min.) and maximum (Max.) value obtained for each species. The monoploid nuclear DNA content (1Cx) in mass values (pg) and Mpb and the mean sample coefficient of variation of G0/G1 DNA peak (c.v., %) are also provided for each species.

^b 1 pg DNA = 978 Mpb (Dolezel *et al.* 2003)

^c Reference of Costa and Forni-Martins 2006a

^d Reference of Costa and Forni-Martins 2006b

^e Also found by Costa and Forni-Martins (2006a) in other population

^f Determined by Bowden (1945) as *Feijoa sellowiana*

^g Also found by Costa and Forni-Martins (2006b) in other population

(*) indicate novel chromosome number for specie

(**) indicate novel chromosome number for the genus

(#) determined by Costa and Forni-Martins (2006a) as *Plinia glomerata*

(##) determined by Costa and Forni-Martins (2006a) as *Eugenia bracteata*

CAPÍTULO 6

Variação no tamanho do genoma em espécies de *Psidium* (Myrtaceae) estimadas por citometria de fluxo

Resumo – *Psidium* (Myrteae) é o gênero com maior proporção de espécies poliplóides em Myrtaceae. Visando fornecer subsídios para o entendimento da evolução da poliploidia neste gênero, este trabalho analisou o conteúdo de DNA nuclear estimado através de citometria de fluxo em núcleos isolados e corados com iodeto de propídeo. Os núcleos foram obtidos de folhas jovens de indivíduos mantidos em casa de vegetação ou de populações naturais, num total de 10 espécies, quatro delas com número cromossômico conhecido (previamente determinado). A variação intra-específica do 2C foi da ordem de $9x$, com $2n = 22$ observado em somente duas populações de *P. guajava*, com as demais apresentando variações no nível de ploidia em relação a $x = 11$. Em algumas espécies, a variação inter-específica de 2C apresentou relação direta com o nível de ploidia, à exceção de duas espécies, *P. cattleianum* ($2n = 44$ e 66) e *P. grandifolium* ($2n = 44$). Os dados obtidos mostraram-se úteis na caracterização cariotípica das espécies de *Psidium*.

Introdução

A família Myrtaceae tem sido tradicionalmente dividida em duas grandes subfamílias: Myrtoideae, com frutos carnosos e filotaxia oposta; e Leptospermoideae com frutos capsulares secos e filotaxia alterna (Niedenzu 1893). Recentemente teve sua circunscrição reavaliada por Wilson *et al.* (2005), onde todos os gêneros da antiga subfamília Leptospermoideae foram incluídos em Myrtoideae. Estudos filogenéticos recentes (Lucas *et al.* 2005, 2007; Wilson *et al.* 2001, 2005) enfatizam que a tribo Myrteae é monofilética, no entanto a sua tradicional circunscrição em três subtribos (Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae, senso Berg 1855-56, 1856-57) não é sustentada por estes estudos. As tradicionais Myrtinae e Eugeniinae formam grupos polifiléticos enquanto Myrciinae (excluindo-se *Myrceugenia*) é monofilética (Lucas *et al.* 2005, 2007).

Dentre alguns dos gêneros anteriormente circunscritos em Myrtinae, *Acca*, *Campomanesia*, *Pimenta* e *Psidium* formam um grupo monofilético, constituindo o *Pimenta* group (Lucas *et al.* 2007). O gênero *Psidium* é uma dos mais amplamente distribuídos em Myrteae, ocorrendo em praticamente todos os biomas no Brasil, desde os campos sulinos até a Amazônia. *Psidium* apresenta posição mais derivada no *Pimenta* group e é essencialmente poliplóide, sendo o gênero com a maior proporção de espécies poliplóides, com os números cromossômicos variando de $2n = 22$ a 88 (Costa 2004, Costa & Forni-Martins 2006b, Capítulo 1).

A poliploidia é a mais importante variação numérica ocorrente nas plantas, onde as estimativas atingem cerca de 70% das angiospermas (Soltis & Soltis 2000). É conhecida como um mecanismo que favorece a colonização de novos habitats, ampliando a distribuição geográfica e favorecendo o isolamento reprodutivo entre espécies (Stebbins 1971). São relatados diversos casos de hibridização no gênero (Landrum 1995; Proença, Com. Pess.; Costa & Forni-Martins Capítulo 3). A hibridização e a poliploidia são reconhecidas como os principais fatores que promovem a diversidade genética e a especiação em plantas, sendo a poliploidia o mecanismo evolutivo responsável pela restauração da fertilidade dos híbridos (Stebbins 1950, Grant 1971, Rieseberg 1997).

A citometria de fluxo tem permitido discutir aspectos evolutivos em diversos grupos (Dolezel *et al.* 2007). Para Myrtaceae poucas espécies têm seu valor $2C$ estimado. A maioria das determinações foi realizada para poucas espécies de frutos secos, como *Callistemon rigidus* R. Br., *C. lanceolatus* Sweet, *Eucalyptus globosus* Labill, *Melaleuca leucadendra* L. (Bennet & Leitch 1997, Bennet & Leitch 2005; Ohri & Kumar 1986). Os primeiros registros para Myrteae (frutos carnosos) foram feitos para *Psidium guajava* L., com relatos de diferentes valores de $2C$ em indivíduos com $2n = 22$, como 0,7pg (Bennet & Smith 1991) e 1,3pg (Bennet & Leitch 1997. Dornelas (2005) estimou o tamanho do DNA em

cerca de 20 espécies de frutos carnosos (antiga subfamília Myrtoideae) e verificou que o genoma delas era menor que os de espécies com frutos secos (antiga subfamília Leptospermoideae). Costa *et al.* (2008, Capítulo 4) reforçaram estes resultados ampliando o número de espécies amostradas e fizeram sua análise à luz de estudos filogenéticos recentes que propõem uma nova classificação intrafamiliar em Myrtaceae (Wilson *et al.* 2005). No Capítulo 5, os autores relataram a relação direta entre o número cromossômico (nível de ploidia) e o conteúdo de DNA nuclear quando comparadas espécies diplóides ($2n = 22$) e tetraplóides ($2n = 44$).

No intuito de ampliar o número de caracteres potencialmente úteis para o entendimento das relações entre as espécies do gênero *Psidium*, este trabalho caracterizou o conteúdo de DNA nuclear de algumas espécies de *Psidium*, estimado por meio de citometria de fluxo, e analisou a relação entre o valor de $2C$, o número cromossômico e o nível de ploidia

Material e Métodos

Coleta de material

O material foi coletado a partir de plantas mantidas em cultivo ou a partir de populações naturais distribuídas na floresta atlântica e no cerrado, nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. Materiais-testemunho das espécies foram coletados e serão depositados no Herbário UEC (Unicamp) com duplicatas enviadas ao Herbário UB (Universidade de Brasília).

Contagens cromossômicas

Para obter as metáfases mitóticas, sementes de todas as espécies foram germinadas em caixas-gerbox com papel umedecido e mantidas à temperatura de

28 ° - 30 °C. Os ápices radiculares foram pré-tratados com 2mM 8-Hq por cerca de 24 h, a 8 °C e posteriormente fixadas em Farmer. As preparações mitóticas foram obtidas por esmagamento dos ápices radiculares de acordo com a técnica de Giemsa (Guerra 1983).

Preparação das suspensões nucleares para a citometria de fluxo

Amostras de cerca de 4cm² de folhas jovens das espécies foram imersas em aproximadamente 2ml de tampão Otto V (0,1M ácido cítrico monohidratado + 0,5% Tween 20, segundo o protocolo descrito por Otto 1990); a seguir, as amostras foram finamente seccionadas com bisturi, no mesmo tampão, numa placa de Petri descartável, sendo a solução mantida sobre gelo. As amostras de núcleos assim obtidas foram mantidas a -20°C. Uma alíquota de cada amostra foi posteriormente diluída em dois volumes de tampão Otto II (0,4M Na₂HPO₄.12H₂O e 2µl/ml de β-mercaptoetanol, Otto 1990), contendo iodeto de propídio e RNase (50µg/ml). As amostras foram então analisadas em citômetro de fluxo (FacScalibur, Becton Dickson). Os dados são apresentados em picograms (pg) de DNA e megapares de bases (Mpb). Foram utilizados como padrão os núcleos extraídos de *Arabidopsis thaliana*, onde 2C = 0,32pg de DNA, e 1pg = 978 x 10⁹pb (Bennet *et al.* 2000).

Resultados e Discussão

Os dados de tamanho do genoma são inéditos para a maioria das 10 espécies de *Psidium* estudadas (Tabela 1), com exceção de *P. acutangulum*, *P. cattleianum* and *P. guajava* (Bennett & Smith, 1991; Bennett & Leitch, 1997; Costa *et al.* 2008, Capítulo 5).

Os números cromossômicos foram previamente determinados, com 2n = 22

para *P. guajava* (em suas duas variedades), $2n = 44$ em *P. acutangulum*, em uma população de *P. cattleianum*, e em duas populações de *P. grandifolium*; e $2n = 66$ para outra população de *P. cattleianum* (Costa & Forni-Martins, Capítulo 1). Não foi possível determinar o número cromossômico de todas as espécies, devido às dificuldades de germinação de sementes, apesar de todas terem sido submetidas às mesmas condições. Sementes de algumas espécies demoram até sete meses desde a fase de embebição até a emissão dos ápices radiculares.

Seguindo a classificação proposta por Leitch *et al.* (1998) e Soltis *et al.* (2003), todas as espécies apresentam genomas muito pequenos (média de $2C = 1,4$ pg DNA) (Tabela 1), não sendo possível estabelecer classes de tamanho entre as espécies analisadas. A variação encontrada do valor $2C$ foi da ordem de $9x$ ($0,41$ pg em *Psidium* sp1 até $3,69$ pg em uma população de *P. larruotteanum*) (Tabela 1).

Para as angiospermas, Leitch *et al.* (1998) e Soltis *et al.* (2003) afirmaram que grupos mais basais têm menores genomas quando comparados com grupos mais derivados. Do ponto de vista cromossômico, se consideramos que espécies poliplóides derivam a partir de um ou mais estoques diplóides, por hibridização ou autoploidia, podemos considerar as espécies diplóides como uma linhagem ancestral. Nas espécies em que foi possível a determinação do número cromossômico, a espécie *P. guajava* ($2C = 0,507$ e $0,551$), com $2n = 22$ pode ser considerada mais basal, tendo os menores valores de $2C$ em relação aos poliplóides (Figura 1, Tabela 1).

Em geral, houve uma relação direta entre o número cromossômico, o nível de ploidia e o valor- $2C$. Os menores valores de $2C$ foram encontrados nas espécies diplóides ($2n = 22$), aumentando conforme o nível de ploidia (Figura 1, Tabela 2). Dentre as espécies tetraplóides ($2n = 44$) a variação foi da ordem de $1,56x$ ($0,82$ pg até $1,28$ nas duas variedades de *P. grandifolium*). Mesmo assim, os valores de $2C$ das espécies tetraplóides oscilaram de forma praticamente linear, sendo

aproximadamente o dobro de *P. guajava* ($2n = 22$) (Figura 1).

Em relação às duas populações de *P. cattleianum*, não houve uma correlação direta entre o número cromossômico ($2n = 44$ e 66) e o valor $2C$, pois a variação de tamanho do genoma entre as respectivas amostras foi de $2,76x$. Estes valores fornecem indícios de uma possível origem alopoliplóide do citótipo hexaplóide (entre espécies com tamanho de genoma bastante diferente), uma vez que, em condições de autoploidização em relação do tetraplóide, o valor $2C$ deveria ser da ordem de apenas $1,5pg$ de DNA. Costa & Forni-Martins (Capítulo 4) forneceram outros indícios de alopoliploidização nestas duas populações, com base na variação de sítios de DNAr 45S são apresentados. Nesta espécie, foram relatados $2n = 44, 66, 77, \text{ and } 88$, representando diferentes raças cromossômicas ou citótipos. É necessária a amostragem de conteúdo de DNA de um número maior de populações para determinar a natureza dos citótipos poliplóides em *P. cattleianum*. Dart *et al.* (2004) caracterizaram citótipos de *Arabidosis lyrata*, encontrando correlação entre o nível de ploidia e o valor $2C$. Leith e Bennett (2004) analisaram diferentes grupos como Poaceae, Fabaceae, Solanaceae e Asteraceae, não encontrando uma relação direta entre a poliploidia e o conteúdo de DNA nestes grupos.

Para *P. grandifolium*, *P. larruotleanum* e *P. pohlianum*, espécies em que foram analisadas mais de uma população, também foi observada variação no valor- $2C$. Porém, em, *P. larruotleanum* e *P. pohlianum* ainda não foi possível a determinação do número cromossômico e, em todas, a amostragem dos núcleos precisa ser refeita devido aos altos valores de coeficiente de variação (superiores a 5%), como sugerido por Dolezel *et al.* (2007). Isto também é aplicável a *P. grandifolium*, onde as duas variedades estudadas, *cinereum* e *argenteum*, apresentaram o mesmo número cromossômico ($2n = 44$ e variação no conteúdo de DNA da ordem de $1,5x$. Além disso, *P. grandifolium* e *P. larruotleanum* foram

recentemente re-circunscritas (Landrum 2003, 2005) agregando diversas outras espécies reduzidas a sinônimos destas (quatro espécies em *P. grandifolium* e cinco espécies em *P. larruotteanum*), evidenciando a complexidade taxonômica das mesmas. É necessário realizar a contagem cromossômica e estimar o tamanho do genoma nas demais variedades destas duas espécies para auxiliar na circunscrição das mesmas.

A aplicação das técnica de citometria de fluxo vem se mostrando promissora para os estudos citotaxonômicos em Myrtaceae, e pode, futuramente, possibilitar auxiliar no entendimento das relações entre as espécies de *Psidium*, bem como entre este e os gêneros relacionados (*Acca*, *Campomanesia*, *Mosiera*, *Myrrhinium* e *Pimenta*), fornecendo caracteres adicionais que permitam traçar a história evolutiva deste grupo tão complexo.

Os dados aqui apresentados são preliminares. Para parte das espécies, a amostragem realizada para a quantificação do genoma necessita ser refeita. As condições de extração dos núcleos em laboratório (estabilidade do tampão e congelamento imediato das amostras) dificilmente podem ser replicados em campo. Para isso, as plantas resultantes das sementes que conseguiram germinar estão sendo mantidas em cultivo, para posterior coleta e aplicação da técnica de citometria de fluxo. Com estas condições controladas, serão realizados testes definitivos com várias outras espécies, onde pretendemos determinar o tamanho do genoma completo (iodeto de propídeo) e a proporção de bases CG (DAPI) no genoma.

Referências

- Baird WV, Estagier AS, Wells JK. 1994. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *Journal of American Society of Horticultural Science* 119:

- 1312-1316.
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ. 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Annals of Botany* 86: 859-909.
- Bennett MD, Leitch IJ. 1995. Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Annals of Botany* 76: 113-176.
- Bennett MD, Leitch IJ. 1997. Nuclear DNA amounts in Angiosperms – 583 new estimates. *Annals of Botany* 80: 169-196.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2004. Angiosperm DNA C-values database (release 5.0, Dec. 2004) <http://www.rbgkew.org.uk/cvalues/homepage.html> (12 Nov. 2007).
- Bennett MD, Leitch IJ. 2005. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 95: 45-90.
- Bennett MD, Smith JB. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 274: 227-274.
- Bennett MD, Smith JB. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 334: 309-345.
- Berg O. 1855-1856. *Revisio Myrtacearum Americae*. *Linnaea* 27: 1-472
- Berg O. 1857-1859. *Myrtaceae*. In: von Martius CFP, ed. *Flora Brasiliensis*. v. 14, 1 - 655.
- Costa IR, Dornelas MC, Forni-Martins ER. 2008. Evolution of nuclear DNA amounts in Neotropical Myrtaceae (fleshy-fruited Myrteae). *Plant Systematics and Evolution* 276: 209-217.
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2006b. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz et Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia* 59: 7-13.
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2007a. Chromosome studies in *Gomidesia*, *Marlierea*, *Myrceugenia* and *Myrcia* (Myrtaceae, subtribe Myrciinae). *Kew Bulletin* 62: 113-118.
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2007b. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 571–580.
- Costa IR. 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J. 2007. Flow Cytometry with Plants: an Overview. In. *Flow Cytometry with Plant Cells - Analysis of Genes, Chromosomes and*

- Genomes. Dolezel, Greilhuber, Suda (eds.). 2007. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim
- Dornelas MC. 2005. In: Piveta M. Da quaresmeira ao jerivá – Tamanho do genoma de 100 árvores brasileiras varia até 20 vezes. *Revista FAPESP* 115: 42-44.
- Grant V. 1971. *Plant speciation*. New York, USA: Columbia University Press.
- Guerra M. 1983. O uso do Giemsa em citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.
- Landrum LR, Clark WD, Sharp WP & Brendecke J. 1995. Hybridization between *Psidium guajava* and *P. guineense* (Myrtaceae). *Economic Botany* 49: 153-161.
- Landrum LR. 2003. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae). *Sida* 20: 1149-1469.
- Landrum LR. 2005. A revision of the *Psidium grandifolium* complex (Myrtaceae). *Sida* 21: 1335-1354.
- Leitch IJ, Bennett MD. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651-663.
- Leitch IJ, Chase MW, Bennett MD. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* 82 (suppl. A): 85-94.
- Leitch IJ, Chase MW, Bennett MD. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* 82 (suppl. A): 85-94.
- Lucas EJ, Belsham SR, NicLughadha EM, Orlovich DA, Sakuragui CM, Chase MW, Wilson PG. 2005. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 251: 35–51.
- Lucas EJ, Harris AS, Mazine FF, Belsham SR, NicLughadha EM, Telford A, Gasson PE, Chase MW. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128.
- Niendenzu F. 1893. Myrtaceae. In: Engler A. and Prantl K. eds., *Die Natürlichen Pflanzenfamilien III*, 57-107.
- Ohri D, Kumar A. 1986. Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods. *Caryologia* 39: 303-307.
- Otto FJ. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewickz Z, Crissman HA, eds. *Methods in cell*

- biology, v. 33. San Diego: Academic Press, 105-110.
- Rieseberg LH. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359–389.
- Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD, Leitch IJ. 2003. Evolution of genome size in the Angiosperms. *American Journal of Botany* 90: 1596-1603.
- Soltis PE, Soltis DE. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *PNAS* 97: 7051–7057
- Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London, UK: Edward Arnold.
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. *American Journal of Botany* 88: 2013–2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM, Quinn CJ. 2005. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: 3-19.

Tabela 1. Espécies de *Psidium* analisadas. 2C: tamanho do genoma em pg de DNA, 1C: tamanho do genoma em megapares de bases (Mpb), c.v.: coeficiente de variação, 2n: número cromossômico somático. As espécies seguidas por (*) necessitam de uma nova amostragem devido aos valores de c.v. > 5%. Nas espécies com (-) precisam ser feitas as determinações do número cromossômico.

Species	2C (pg)	1C (Mpb)	c.v. (%)	2n	Procedência
<i>P. acutangulum</i> DC.	1,167	572,12	3,27	44	SP, Campinas
<i>P. cattleianum</i> Afzel ex Sabine (frutos vermelhos) (<i>pop1</i>)	2,910	1424,92	4,95	66	RJ, Rio de Janeiro
<i>P. cattleianum</i> Afzel ex Sabine (frutos amarelos) (<i>pop2</i>)	1,053	514,92	3,89	44	SP, Campinas
<i>P. grandifolium</i> (<i>pop 1</i>) var. <i>cinereum</i> *	1,280	625,37	8,27	44	DF, Brasília
<i>P. grandifolium</i> (<i>pop 2</i>) var. <i>argenteum</i> *	0,820	401,14	5,42	44	DF, Brasília
<i>P. guajava</i> L. (vermelha)	0,551	269,44	5,03	22	SP, Campinas
<i>P. guajava</i> L. (branca)	0,507	247,92	4,32	22	SP, Campinas
<i>P. larruoteanum</i> (<i>pop1</i> *)	3,690	1809,67	6,55	-	DF, Brasília
<i>P. larruoteanum</i> (<i>pop1</i> *)	2,020	991,26	5,64	-	DF, Brasília
<i>P. pohlianum</i> var. <i>luridum</i>	1,140	557,84	3,82	-	DF, Brasília
<i>P. pohlianum</i> var. <i>salutare</i> *	1,440	704,47	9,21	-	DF, Brasília
<i>P. ratterianum</i> (C. Proença)*	0,510	247,92	10,57	-	DF, Brasília
<i>Psidium sp1</i> *	0,410	202,13	8,59	-	SP, Assis
<i>Psidium sp2</i>	0,760	373,48	3,37	-	DF, Brasília
<i>Psidium sp3</i> *	2,430	1191,60	6,80	-	DF, Brasília

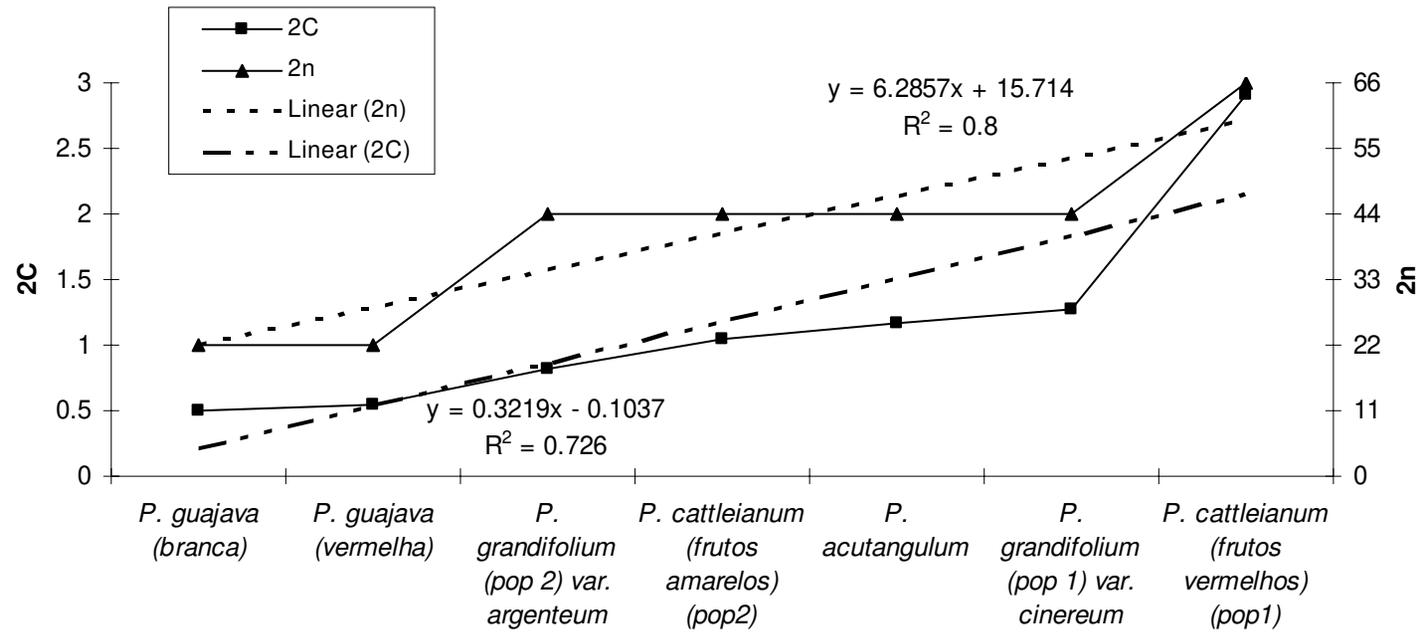


Figura 1. Distribuição dos valores de conteúdo de DNA nuclear (2C), em relação ao número cromossômico (2n) em espécies de *Psidium*

CAPÍTULO 7

Relações filogenéticas entre os gêneros de Myrteae (Myrtaceae) a partir de cinco marcadores moleculares

Resumo – Este trabalho objetiva realizar uma análise filogenética em Myrteae, visando definir as relações de parentesco entre os gêneros a partir de seqüências de DNA nuclear (ITS, ETS) e plastidial (*psbA-trnH*, *ndhF* e *matK*). Foram incluídas nesta análise 94 espécies de 38 gêneros da tribo Myrteae. O monofiletismo da tribo foi confirmado e foram reconhecidos seis grupos informais, correspondendo aos clados com melhores suportes nas análises de bootstrap e inferência bayesiana. São eles: grupo *Eugenia*, *Myrcia*, *Myrceugenia*, *Myrteola*, *Pimenta* e *Plinia*. Após a busca por caracteres macromorfológicos e biogeográficos e a inclusão de seqüências para os demais nove gêneros da tribo, espera-se que seja possível propor uma nova classificação para as subtribos de Myrteae.

Introdução

A família Myrtaceae é composta por cerca de 3600 espécies agrupadas em 150 gêneros (Govaerts *et al.* 2008), com uma ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo, bem como na região temperada da Austrália, sendo considerada uma das mais importantes famílias em diversidade de espécies nos neotrópicos. A grande maioria de suas espécies encontra-se distribuída ao longo do Cerrado (Castro *et al.* 1999) e Mata Atlântica (Oliveira-Filho & Fontes 2000), biomas estes considerados dentre os mais diversificados e ricos em endemismos na América do Sul (Myers *et al.* 2000).

A tribo Myrteae DC. (*sensu* Wilson *et al.* 2005), abrange cerca de 2500 espécies em 49 gêneros (Govaerts *et al.* 2008) e, por isso é considerada a tribo mais diversificada em gêneros na família (Lucas *et al.* 2007). A classificação intrafamiliar nesta tribo, que abrange todos os gêneros sul-americanos e alguns australasianos, tem sofrido severas mudanças (para detalhes consultar Lucas *et*

al. 2007).

Estudos filogenéticos a partir de dados macromoleculares, principalmente com seqüências de genes plastidiais (*matK* and *psbA-trnH*) e nucleares (ITS) tem indicado que esta tribo é perfeitamente monofilética, mas suas tradicionais subtribos *sensu* Berg (1855-56, 1857-59), à exceção de Myrciinae – com a exclusão de *Myrceugenia* (exclusivamente neotropical) são polifiléticas (Wilson *et al.* 2005, Lucas *et al.* 2005, 2007, Mazine 2006). O trabalho mais abrangente em Myrteae é o de Lucas *et al.* (2007) onde foi utilizada a maior amostragem em termos de gêneros, enfatizando principalmente as relações entre aqueles circunscritos na tradicional subtribo Myrciinae *sensu* Berg. Mazine (2006) enfatizou as relações entre os gêneros da tradicional subtribo Eugeniinae *sensu* Berg. Outro importante estudo foi realizado por Salywon (2003), onde o autor estabeleceu as relações infragenéricas no gênero *Mosiera*; e definiu *Psidium* como seu gênero-irmão e parafilético, porem seus estudos foram realizados com apenas um marcador molecular (ITS).

Os dados de seqüências de ITS, ETS, *psbA-trnH* e *matK* (Lucas *et al.* 2007), indicam que a tradicional divisão de Myrteae nas três subtribos propostas por Berg (1855-56, 1857-59) não é sustentada, pois são encontrados seis grupos informais: *Plinia*, *Eugenia*, *Myrcia*, *Myrceugenia*, *Myrteola* e *Pimenta*. No entanto, são obtidos baixos valores de bootstrap para o suporte dos ramos. No entanto alguns gêneros como *Blepharocalyx*, *Luma* e *Myrceugenia* ainda não têm posição filogenética definida (Lucas *et al.* 2005, 2007).

Diante desta perspectiva, o objetivo deste trabalho é analisar as relações entre os gêneros de Myrteae, visando fortalecer os nós dos ramos que receberam baixa sustentação estatística (*bootstrap* e probabilidade bayesiana) nas filogenias recentes. Também é objetivo deste trabalho, determinar o monofiletismo de *Psidium* e suas relações com os gêneros afins, incluindo vários outros gêneros não

amostrados nas filogenias recentes e enfatizando os gêneros anteriormente incluídos na subtribo Myrtinae *sensu* Berg (1855-56, 57-59) ou grupo *Pimenta sensu* Lucas *et al.* (2007).

Material e Métodos

Amostragem

A amostragem tentou abranger a maior parte da diversidade morfológica em Myrteae, sendo incluídos nove gêneros adicionais em relação ao trabalho de Lucas *et al.* (2007). Foram incluídas 94 espécies de 38 gêneros de Myrteae (Tabela 1). Como grupo-externo foram selecionados nove táxons dos utilizados por Lucas *et al.* (2007) pertencentes a outras seis tribos de Myrtaceae: Eucalypteae: *Eucalyptus perriniana* e *E. tetragona*; Lophostemoneae: *Lophostemon confertus*; Melaleuceae: *Callistemon comboynensis*; Metrosidereae: *Metrosideros perforata* e *Tepualia stipularis*; Tristanieae: *Xanthomyrtus compacta* e *X. montivaga* e Syzygieae: *Syzygium jambos*. Foram seqüenciadas as regiões ITS, ETS (nucleares), *psbA-trnH* e *ndhF* (plastidiais) para a maioria dos táxons amostrados e utilizadas as seqüências de *matK* de Lucas *et al.* (2007), conforme indicado na Tabela 1.

Extração, seqüenciamento e alinhamentos de DNA

Para algumas espécies foi realizada a extração de DNA genômico a partir de 0,3g de folhas desidratadas em sílica ou a partir de material de herbário segundo o método do CTAB (Doyle & Doyle 1987) com algumas modificações. Para o material desidratado em sílica, a precipitação final foi realizada com etanol 100% a -20°C, enquanto que para o material de herbário, o DNA foi

precipitado com Isopropanol 100% a -20°C . O DNA foi posteriormente purificado em gradiente de Cloreto de Césio e Brometo de Etídio (1,55mg/ml). O gradiente foi submetido a ultra-centrifugação (40000g) por cerca de 30h e a banda contendo o DNA foi extraída, sendo o Brometo de Etídio extraído com Butanol 100% e o restante do material submetido a diálise para extração do Cloreto de Césio.

As regiões escolhidas foram amplificadas por PCR. Os primers e condições foram os mesmos utilizados no trabalho de Lucas *et al.* (2007), com algumas adaptações para as espécies em estudo e encontram-se listados na Tabela 2. Os produtos de PCR foram purificados usando o QIAGEN®QIAquick™ Spin Columns, de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. As reações de seqüenciamento foram feitas com o TaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit™ (Applied Biosystems, Inc.). As seqüências foram editadas utilizando o software Sequencher v. 4.5 (Gene Codes Corporation). As seqüências foram alinhadas no olho seguindo as recomendações de Kelchner (2000).

Análise filogenética

Todos os caracteres foram tratados com pesos iguais e como caracteres não-ordenados (Fitch 1971) e foi conduzida a análise de parcimônia usando o PAUP v. 4.0 (Swofford 1998). Foram excluídas da análise as terminações das seqüências, bem como as regiões de alinhamento ambíguo. Alguns *gaps* potencialmente informativos para gêneros serão futuramente codificados.

Foram realizadas buscas heurísticas no PAUP a partir de 1000 replicações usando ordem aleatória de entrada de táxons, algoritmo TBR (Tree Bisection Reconnection; branch-swapping; MulTress) sendo salvas 10 árvores em cada replicação segundo recomendações de Maddison (1991). A árvore consenso resultante foi utilizada numa análise de pesagem sucessiva de caracteres (Farris

1969), onde os índices de consistência (CI) foram re-escalados das melhores árvores e, após cada re-pesagem dos caracteres, foram realizadas novas buscas heurísticas desta vez a partir de 10 replicações. A análise de *bootstrap* consistiu de 1000 réplicas. Os valores de *bootstrap* (bs) foram escalados de acordo com os critérios propostos por Chase *et al.* (2000): suporte fraco - 50-74%, moderado - 75-80% e forte - 85-100%.

Também foi conduzida uma análise bayesiana com os cinco marcadores juntos usando o programa MrBayes v3.0 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Os modelos de substituição nucleotídica foram selecionados usando o programa ModelTest 3.06 (Posada & Crandall 1998). As análises consistiram de 5.000.000 de réplicas com algoritmo de Monte Carlo. As árvores resultantes foram plotadas em Microsoft Excell para determinar o ponto de corte na curva de estabilização das árvores. Posteriormente foram excluídas as 50000 primeiras árvores e, o restante importadas para o PAUP para gerar a árvore consenso com as probabilidades posteriores (PP) de todos os nós. Foram considerados somente os nós com valores de PP > 95% conforme os critérios sugeridos por Lucas *et al.* (2007) e plotados na árvore consenso resultante busca heurística após a pesagem sucessiva dos caracteres.

Resultados

A árvore consenso aponta a tribo Myrteae como monofilética, assim como alguns clados a nível genérico bem delimitados, porem apresenta baixa resolução entre os gêneros. Apenas quatro clados receberam suporte estatístico de *bootstrap* superior a 50%: *Lenwebbia-Lophomyrtus-Neomyrtus* (56%), *Mosiera-Myrrhinium-Psidium* (70%), *Neomitranthes-Siphoneugena-Plinia-Myrciaria* (81%), *Pilidiostigma-Decaspermum-Octamyrtus-Rhodomyrtus* (53%). Os demais clados

surtem como uma politomia da árvore consenso anterior a pesagem sucessiva dos caracteres.

Uma das árvores mais parcimoniosas proveniente da análise combinada com os cinco marcadores (Figura 1) mostra a diferença marcante no comprimento dos ramos entre os taxa amostrados (tribo Myrteae) e os demais utilizados como grupo externo, fornecendo indícios que a diferenciação dos táxons sul-americanos foi muito rápida em relação ao restante da família.

A análise consenso resultante das pesagens sucessivas de caracteres (Figura 2) mostra seis clados com resolução em nível de gênero, a maioria deles congruente com as buscas heurísticas simples: *Mosiera-Myrrhinium-Psidium* (98%), *Eugenia-Myrcianthes* (67%), *Lenwebbia-Lophomyrtus-Neomyrtus* (62%), *Myrciaria-Neomithantes-Siphoneugena-Plinia* (93%), *Pilidiostigma-Decaspermum-Octamyrtus-Rhodomyrtus-Rhodamnia* (68%). Todos eles também receberam suporte de probabilidade bayesiana superior a 95% juntamente com outros clados não sustentados pelos *bootstrap*: *Amomyrtus-Legrandia*, *Myrcia sensu lato* (*Calyptranthes*, *Gomidesia*, *Marlierea* e *Myrcia*) e *Blepharocalyx cruckshankssii-Luma-Myrceugenia* (Figura 2).

A probabilidade bayesiana também sustenta os táxons sul-americanos como um grupo monofilético, a exceção de *Accara elegans* que surge como grupo irmão de *Myrtus communis*, juntamente com os táxons australasianos e *Blepharocalyx salicifolius*, como irmão dos demais gêneros de Myrteae (Figura 2). Também é possível reconhecer os seis grupos informais propostos por Lucas *et al.* (2007). Apesar de unir os dados de cinco marcadores moleculares, a espinha dorsal da árvore ainda carece de suporte estatístico a exceção da tribo Myrteae (98%) e do clado contendo dois dos grupos informais propostos por Lucas *et al.* (2007).

O gênero *Psidium* é monofilético e as relações de parentesco entre os

gêneros próximos foram esclarecidas, sendo *Myrrhinium* o seu gênero-irmão e estes dois gêneros num mesmo clado com o gênero *Mosiera* (Figura 2). A monofilia do grupo *Pimenta* de Lucas *et al.* (2007) foi sustentada após a inclusão dos gêneros *Mosiera* e *Myrrhinium* (anteriormente pertencentes à subtribo Myrtinae *sensu* Berg) e a ampliação da amostragem dos gêneros *Campomanesia*, *Pimenta* e *Psidium*. Este grupo recebeu suporte de probabilidade bayesiana, sendo dividido em dois clados principais: *Amomyrtus-Legrandia* e *Acca-Mosiera-Myrrhinium-Psidium-Pimenta-Campomanesia*.

Discussão

De maneira geral, a topologia da árvore consenso obtida ‘e similar a encontrada por Lucas *et al.* (2007), porém quatro principais exceções foram evidenciadas neste trabalho, sendo estas evidenciadas por setas na Figura 2.

O gênero-irmão dos táxons de Myrteae e a espécie australasiana *Myrtastrum rufupunctatum*, no entanto existem incongruências entre as análises de parcimônia e bayesiana. Nas análises bayesianas *M. rufupunctatum* emerge como grupo-irmão de todos os demais gêneros de Myrteae, enquanto que nas análises de parcimônia ele fica dentro do grupo Australasiano, porém sem suporte.

Neste trabalho, *M. communis* forma um clado bem sustentado (bs e PP) com *Accara elegans*, uma espécie endêmica das cadeias montanhosas do sudeste do Brasil (Cadeia do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, Landrum 1990). Esta é uma das mais significativas diferenças em relação aos trabalhos de Lucas *et al.* (2007), porém as análises de parcimônia e inferência bayesiana, separadamente, são incongruentes. A árvore *sensu stricto* anterior a pesagem sucessiva dos caracteres (não mostrada aqui) coloca *A. elegans* como grupo-irmão de

Campomanesia e *M. communis* como irmão do restante da tribo Myrteae, enquanto a análise bayesiana coloca as duas espécies como irmãs a *Gossia*, um gênero que pertence formalmente ao clado australasiano de Lucas *et al.* (2007). Ambos os arranjos tem suporte estatístico, mas a extrema diferença na posição pode ser devido a erros de leitura no seqüenciamento devido à partição dos dados pra análise bayesiana. Neste caso, a topologia apresentada pela parcimônia, parece mostrar o arranjo mais provável, especialmente porque *Accara* compartilha muitos caracteres morfológicos com *Acca* como flores tetrâmeras, vasos com perfurações simples, placenta bi-lamelar e testa das sementes membranosas (Landrum 1990).

Outra exceção ao trabalho de Lucas *et al.* (2007) refere-se à posição de *Blepharocalyx salicifolius*, que em suas análises surgia como grupo-irmão dos demais táxons sul-americanos, neste trabalho, *B. salicifolius* ainda surge na base de Myrteae em um clado com *Austromyrtus dulcis*, porém sem sustentação estatística de bootstrap e probabilidade bayesiana.

Os seis grupos informais propostos por Lucas *et al.* (2007) também são sustentados, no entanto as relações entre eles ainda permanecem obscuras, como a posição de *Algrizea* como grupo-irmão do grupo *Plinia*; as relações entre os grupos *Myrceugenia* e *Myrcia+Plinia* e entre os grupos *Eugenia* e *Pimenta*.

Os arranjos bayesianos sugerem que o grupo *Myrteola* é irmão do grupo *Pimenta* + grupo *Eugenia*, com *Campomanesia* irmão do clado contendo *Acca*, *Mosiera*, *Myrrhinium* e *Pimenta*. As análises de parcimônia colocam *Myrteola* como irmão de um clado composto por *Campomanesia* + *Accara*, sendo este clado irmão do restante do grupo *Myrteola* (*Lenwebbia*, *Lophomyrtus*, *Neomyrtus* e *Ugni*). O grupo *Myrteola* é fortemente sustentado pela sinapomorfia de perfurações escalariformes, e a análise de parcimônia retira *Lenwebbia* deste

grupo, o que pode ser sustentado pelo fato de *Lenwebbia* possuir placas de perfuração simples e escalariformes.

A adição de seqüências de outro marcador plastidial (*ndhF*) e de táxons extras em relação ao trabalho de Lucas *et al.* (2007) foi bem sucedida pois deu idéia de onde táxons previamente nunca amostrados foram colocados (como por exemplo, *Mosiera*, *Myrrhinium*, *Lenwebbia*) mas não teve muito sucesso em aumentar o suporte estatístico para a topologia. Mais tempo é necessário para interpretar e checar todos os dados obtidos. Uma análise de cada um dos conjuntos de dados em separado é necessária para checar as incongruências entre as análises de parcimônia e probabilidade bayesiana. Estudos futuros requerem a adição de mais marcadores plastidiais e talvez a remoção de uma das regiões nucleares que deram origem a resultados incongruentes.

Referências

- Berg O. 1855-56. *Revisio Myrtacearum Americae*. Linnaea 27: 1-472
- Berg O. 1857-59. *Myrtaceae*. In: von Martius C. F. P. (ed.). *Flora Brasiliensis* 14: 1 - 655.
- Castro AAJE, Martins FR, Tamashyro JY & Shepherd GJ. 1999. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86:192-225.
- Chase, M.W., De Bruijn, A.Y., Cox, A.V., Reeves, G., Rudall, P.J., Johnson, M.A.T. & Eguiarte, L.E. 2000. Phylogenetics of Asphodelaceae Asparagales: an analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. *Ann. Bot.* 86: 935–951.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Farris, J.S. 1969. A successive approximations approach to character weighting. *Syst. Zool.* 18: 274–385.

- Felsenstein, J. 1985. Confidence-limits on phylogenies—an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406–416.
- Govaerts R, Sobral M, Ashton P, Barrie F, Holst B, Landrum L, Lucas, E, Matsumoto K, Mazine F, Proença C, Soares-Silva L, Wilson P & NicLughdha E. 2008. World Checklist of selected plant families – Myrtaceae.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Kelchner, S.A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87: 482–498.
- Landrum LR. 1990. *Accara*: a new genus of Myrtaceae, Myrtinae from Brazil. *Systematic Botany* 15: 221-225.
- Lucas E, Harris AS, Mazine FF, Belsham SR, Nic Lughada EM, Telford A, Gasson PE & Chase M. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128.
- Maddison D.R. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Syst. Zool.* 40: 315–328.
- Mazine FF. 2006. Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Eugenia* L. (Myrtaceae), com ênfase em *Eugenia* sect. *Racemosae* O. Berg. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB & Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Oliveira-Filho A & Fontes MA. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Salywon AM. 2003. A monograph of *Mosiera* (Myrtaceae). PhD Thesis. Arizona State University, USA.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP*, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), v.4.0b2. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Wilson PG, Brien MM, Heslewood MM & Quinn CJ. 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: 3-19.

Tabela 1. Táxons amostrados, com respectiva origem, detalhes do voucher e tipos de seqüências utilizadas. As espécies marcadas com (x) foram amplificadas e seqüenciadas para este trabalho. Para algumas seqüências de *ndhF*, foram utilizadas as mesmas amostras de DNA dos trabalhos de Lucas *et al.* (2007) e incorporadas ao banco de DNA de Kew e estão marcadas com (*). (-) seqüências ausentes na matriz. Para as demais espécies foram utilizadas as seqüências geradas por Lucas *et al.* (2007) e submetidas ao GenBank.

Espécies	Origem	Voucher	ITS	ETS	<i>psbA-trnH</i>	<i>ndhF</i>	<i>matK</i>
<i>Acca sellowiana</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 205	AM234067	AM489807	AM480073	*	AM480073
<i>Accara elegans</i>	Brasil, Minas Gerais	I R Costa 670	x	x	x	x	-
<i>Algrizea macrochlamys1</i>	Brazil, Bahia	J Urdampilleta 404 Giulietti & Harley	x	x	x	x	-
<i>Algrizea macrochlamys2</i>	Brasil, Bahia	1648	AM234126	AM489890	AM489809	-	AM489975
<i>Amomyrtus luma</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1996-1065	AM234073	AM489892	AM489811	x	-
<i>Amomyrtus meli</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1996-1083	AM234069	AM489891	AM489810	x	AM489976
<i>Austromyrtus dulcis</i>	Cult. RBG Melbourne	Belsham M77	AM234133	AM489894	AM489813	x	AM489977
<i>Blepharocalyx cruckshanksii</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1998-073D	AM234070	AM489895	AM489814	x	AM489978
<i>Blepharocalyx salicifolius1</i>	Brasil, Minas Gerais	IR Costa 560	x	x	x	x	-
<i>Blepharocalyx salicifolius3</i>	Brasil	Lucas 78	AM234084	AM489896	AM489815	x	AM489979
<i>Callistemon comboynensis</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 206	AM234140	AM489897	AM489816	x	-
<i>Calyptanthus concinna</i>	Brasil	Lucas 74	AM234103	AM489898	AM4809817	x	AM489980
<i>Calyptanthus kiaerskovii</i>	British Virgin Islands	Pollard 1194	AM234105	AM489900	AM489819	x	AM489981
<i>Campomanesia aromatica</i>	Brasil, Bahia	M Ibraim 140	x	x	x	x	-
<i>Campomanesia dichotoma</i>	Brasil, Bahia	M Ibraim 123	x	x	x	x	-
<i>Campomanesia guaviroba</i>	Brasil, Paraná	I R Costa 613	x	x	x	x	-
<i>Campomanesia laurifolia</i>	Brasil, Cultivo	I R Costa, s.n Farinaccio & Costa	x	x		x	-
<i>Campomanesia pubescens</i>	Brasil	1669	AM234077	AM489903	AM489903	x	-
<i>Decaspermum humile</i>	Cult. RBG Melbourne	Bellsham M82	AM234128	AM489905	AM489824		-
<i>Eucalyptus perriniana</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 283	AM234139	AM489907	AM489825	x	AM489985
<i>Eucalyptus tetragona</i>	Australia, Victoria	Udovic 177	AF190364	AM489906	AF190381	x	AM489984
<i>Eugenia nitida</i>			x	x	x		x
<i>Eugenia puniceifolia</i>	French Guiana	Prevost 4724	AM234087	AM489909	x		x

<i>Eugenia stictosepala</i>	Brasil	Zappi 406	AM234086	AM489908	AM489827	x	
<i>Eugenia sulcata</i>	Brasil	Lucas 68	AM234089	AM489911	AM480829	x	AM489987
<i>Eugenia uniflora</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 207	AM234088	AM489910	AM489828	*	AM489986
<i>Gomidesia flagellaris</i>	Brasil	Lucas 83	AM234113	AM489918	AM4489836	x	AM489989
<i>Gomidesia schaueriana</i>	Brasil	Lucas 62	AM234112	AM489917	AM489835		AM489988
<i>Gomidesia tijuensis</i>	Brasil	Zappi 305	AM234110	AM489915	AM489833		
<i>Gossia hillii</i>	Cult. RBG Melbourne	Belsham M78	AM234132	AM489920	AM489838	x	
<i>Gossia inophloia</i>	Cult. RBG Melbourne	Belsham M79	AM234131	AM489929	AM489837	x	x
<i>Legrandia concinna</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1999-0656	AM234072	AM489921	AM489839	x	AM489990
<i>Lenwebbia prominens</i>			x	x		x	
<i>Lophomyrtus bullata</i>	Cult. Dunedin Botanic Gardens	Belsham M31	AM234145	AM489923	AM489841	x	AM489992
<i>Lophomyrtus obcordata</i>	Cult. Dunedin Botanic Gardens	Belsham M41	AM234146	AM489924	AM489842	x	AM489993
<i>Lophostemon confertus</i>	Australia, Victoria	Udovic 337	AF048897	AM489925	AF190368	x	AM489994
<i>Luma apiculata</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 208	AM234101	AM489926	AM489843	x	AM489995
<i>Luma chequen</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1998-0725G	AM234102	AM489927	AM489844	x	
<i>Marlierea acuminata</i>			x	x	x		x
<i>Marlierea eugeniopsoides</i>	Brasil	Lucas 61	AM234107	AM489928	AM489845	x	AM489996
<i>Marlierea obscura</i>	Brasil	Lucas 88	AM234109	AM489930	AM489847		AM489997
<i>Metrosideros perforata</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 209	AM234141	AM489931	AM489848	x	AM489998
<i>Mosiera contrerasii</i>	Mexico, Quintana Roo	Salywon & Puente	x	x			
<i>Mosiera cuspidatum</i>	Dominican Republic, Los Haitises	Salywon et al. 1350	x	x			
<i>Mosiera ehrenbergii</i>	Cult, ASU	Landrum et al. 7375	x	x			
<i>Mosiera gracilipes</i>	Dominican Republic, Cordillera Central	Salywon et al. 1300	x	x			
<i>Mosiera longipes</i>	U. S. A., Florida	Salywon 1183	x	x			
<i>Mosiera xerophytica</i>	Puerto Rico, Guanica	Salywon et al. 783	x	x	x		
<i>Myrceugenia alpigena</i>	Brasil	Lucas 167	AM234098	AM489937	AM489854	x	
<i>Myrceugenia lanceolata</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1998-0662	AM234074	AM489932	AM489849	x	
<i>Myrceugenia leptospermoides</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1989-1714C	AM234075	AM489933	AM480850	x	AM489999

<i>Myrceugenia myrcioides</i>	Brasil	Lucas 82	AM234097	AM489936	AM489853	x	AM490000
<i>Myrceugenia ovata</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1998-2353C	AM234096	AM489935	AM489852	x	-
<i>Myrceugenia planipes</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE 1998-1561B	AM234095	AM489934	AM489851	x	-
<i>Myrcia laruotteana</i>	Brasil	Mello Silva 1705	AM234115	AM489939	AM489856	-	AM490002
<i>Myrcia multiflora</i>	Brasil	Lucas 65	AM234117	AM489941	AM489858	-	AM490003
<i>Myrcia rostrata</i>	Brasil	Lucas 73	AM234122	AM489946	AM489863	-	-
<i>Myrcianthes pseudomato</i>	Bolivia	Beck 9667	AM234100	AM489951	AM489868	-	-
<i>Myrcianthes pungens</i>	Argentina	Tressens et al 5481	AM234099	AM489950	AM489867	-	-
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 210	AM234093	AM489952	AM489869	x	AM490007
<i>Myrciaria sppbra</i>			x	x	x	x	x
<i>Myrrhinium atropurpureum var atropurpureum</i>	Brasil, Rio de Janeiro		x	x	-	x	-
<i>Myrrhinium atropurpureum var octandrum</i>	Brasil, Paraná		x	x	x	x	
<i>Myrtastrum rufupunctatum</i>			x	x	x	x	x
<i>Myrteola nummularia</i>			x	x	x	x	x
			AM				
<i>Myrtus communis</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 211	234149	AM489955	AM489872	*	AM490009
<i>Neomitranthes cordifolia</i>	Cult. RBG Edinburgh Cult. Dunedin Botanic	RBGE 1996-1096	AM234068	AM489954	AM489871	x	AM490008
<i>Neomyrtus pedunculata</i>	Gardens	Belsham M42	AM234144	AM489956	AM490637	x	AM490010
<i>Octamyrtus pleiopetala</i>	Irian Jaya	Johns s.n.	AM234130	AM489957	AM489873	-	
<i>Pilidiostigma glabrum</i>	Cult. Australia	Cameron s. n.	x	x	-	x	-
<i>Pilidiostigma tropicum</i>	Cult. Australia	Snow 7760	x	x	-	x	-
<i>Pimenta dioica</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 212	AM234081	AM489958	AM489874	X	AM490011
<i>Pimenta haitiensis</i>	Cult. JBSD	Salywon s.n	x	x			
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	Brasil	Lucas 161	AM234083	AM489960	AM489876	X	AM490013
<i>Pimenta racemosa</i>	Cult.	Holst 8866	AM234082	AM489959	AM489875	*	AM490012
<i>Pimenta racemosa ozua</i>	Cult. JBSD	Salywon s.n	x	x		X	
<i>Plinia pauciflora</i>	Brasil	Mazine 957	AM489411	AM489414	AM489570	-	-
<i>Psidium acutangulum</i>	Brasil, Cultivo	I R Costa, s.n	x	x	x	x	-
<i>Psidium cattleianum</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 213	AM234980	AM489962	AM489878	x	AM490014

<i>Psidium friedrichstalianum</i>	Costa Rica, San Jose	C F Verola, s.n.	x	x	x	x	-
<i>Psidium grandifolium</i>	Brasil, Minas Gerais	I R Costa 654	x	x	x	x	-
<i>Psidium guajava</i>	Brasil, Cultivo	I R Costa, s.n	x	x	x	x	*
<i>Rhodamnia argentea</i>	Cult. RBG Melbourne	Belsham M81	AM234129	AM489964	AM489880	x	-
<i>Rhodamnia rubescens</i>	Cult. RBG Melbourne	Belsham M83	AM234127	AM489963	AM489879		AM490015
	Cult. Dunedin Botanic						
<i>Rhodymyrtus psidioides</i>	Gardens	Belsham M72	AM234134	AM489965	AM489881	-	-
<i>Siphoneugena densiflora</i>	Brasil	Mazine 1050	AM489412	AM489572	AM489571	-	-
<i>Siphoneugena guifolyleana</i>	Brasil	Lucas 70	AM234085	AM489966	AM490638	x	AM490016
<i>Syzygium jambos</i>	Cult. RBG Kew	Lucas 214	AM234135	AM489967	AM489882	x	AM490017
<i>Tepualia stipularis</i>	Cult. RBG Edinburgh	RBGE1995-2370A	AM234071	AM489969	AM489884	x	
<i>Ugni candollei</i>			x	x			
	Cult. Dunedin Botanic						
<i>Ugni mollinae</i>	Gardens	Belsham M69	AM234143	AM489970	AM489885	x	AM490018
<i>Ugni myricoides</i>	Cult. CAS Berkeley	Landrum 9372	x	x	-	x	
<i>Xanthomyrtus cf compacta</i>	Irian Jaya	Edwards 4213A	AM234148	AM489972	AM480987		
<i>Xanthomyrtus montivaga</i>	Irian Jaya	Lucas 16	AM234147	AM489971	AM489886		

Tabela 2. Primers e condições de PCR para amplificar as regiões nucleares (ITS e ETS) e plastidiais (*psbA-trnH* e *ndhF*).

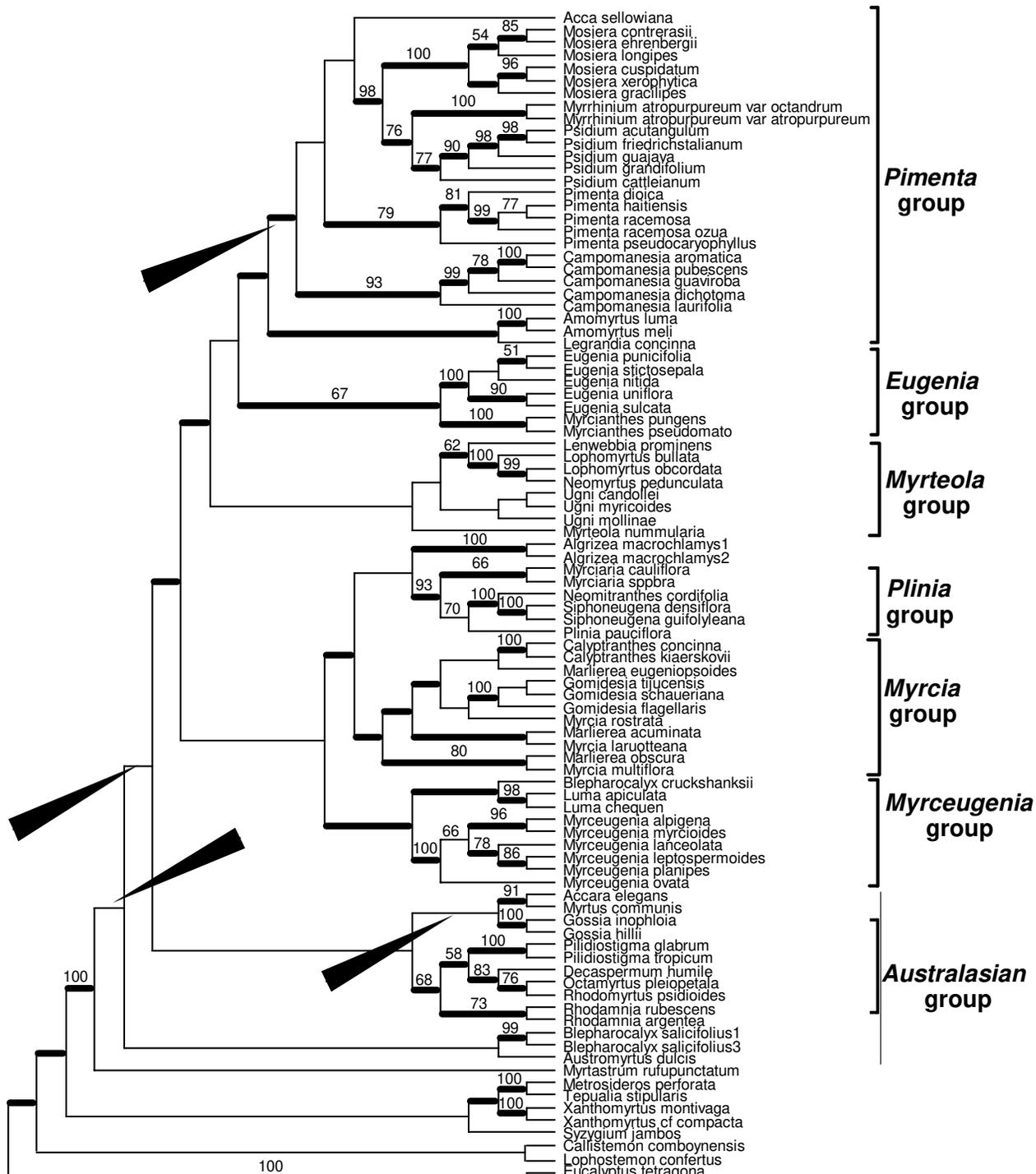
Região	Primers	Referencia	Condições de corrida
ITS	AB101 F AB102 R	Sun <i>et al.</i> (1994)	2 min / 94°C, 30-35 ciclos: 1 min / 94°C, 1 min / 52°C, 1 min / 72°C, 7 min / 72°C
ETS	Myrt F 18S R	Lucas <i>et al.</i> (2007) Wright <i>et al.</i> (2001)	1 min / 94°C, 30-35 ciclos: 1 min / 94°C, 1 min / 50°C, 1 min / 72°C, 7 min / 72°C
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA</i> <i>trnH</i>	Hamilton (1999)	2 min / 94°C, 30-35 ciclos: 1 min / 94°C, 1 min / 48°C, 1 min / 72°C, 7 min / 72°C
<i>ndhF</i>	1252F 2063R	Biffin <i>et al.</i> (2006)	4 min / 94°C, 30-35 ciclos: 1 min / 94°C, 1 min / 55°C, 1 min / 72°C, 7 min / 72°C

Tabela 3. Características das seqüências utilizadas.

	ITS	ETS	<i>psbA-trnH</i>	<i>nhdF</i>	<i>matK</i>	Combined
Total de Caracteres	889	431	729	878	859	3147
Caracteres constantes	509	134	385	425	682	1803
Caracteres não informativos	136	68	169	213	103	553
Caracteres informativos (%)	244 (27,5%)	229 (53,1%)	175 (24,0%)	240 (27,3%)	74 (8,6%)	791 (25,1%)

Figura 1. Uma árvore simples das 1350 árvores mais parcimoniosas com comprimentos de ramos gerados pela busca heurística dos dados combinados de ITS, ETS, *psbA-trnH*, *ndhF* e *matK*.





CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após compilar dados cromossômicos de cerca de 900 registros de literatura correspondendo a 568 binômios, os dados discutidos à luz das novas classificações intrafamiliares em Myrtaceae puderam ser interpretados de maneira mais completa. Em várias linhagens terminais, a poliploidia surgiu de maneira independente (16% das espécies). Apesar de menos comum, espécies displóides são relatadas em quatro tribos (Chamelaucieae, Melaleuceae, Myrteae e Syzygiae). É observada uma redução drástica de números cromossômicos em relação a $x = 11$, chegando a $x = 5$ e $x = 6$ na tribo Chamelaucieae (australasiana), clado que também concentra metade dos registros poliplóides em Myrtaceae.

Apesar da alta frequência do número cromossômico $x = 11$, a ocorrência de 26% de poliploidia, incluindo 14% de espécies com citótipos ressaltam a importância da poliploidia na evolução de Myrtaceae, principalmente na tribo Myrteae. Em dois dos principais gêneros distribuídos nos neotrópicos, *Eugenia* e *Psidium* e em *Decaspermum*, essencialmente australasiano, são registradas a maior parte das variações poliplóides de Myrteae, podendo este ser um dos fatores que favoreceu a distribuição geográfica de *Eugenia* e *Psidium*, em relação aos demais gêneros de Myrteae. Poucos registros de poliplóides são observados em *Myrteola* e *Myrcia*. A abrangência deste estudo representa pouco mais de 100 espécies (4,1% do total) e metade dos gêneros da tribo Myrteae (25 de 47 no total).

Em termos de morfologia, os cromossomos em Myrteae são pequenos ($<2\mu\text{m}$). No entanto, é observado certo grau de assimetria nos cariótipos de Myrteae quando comparadas com alguns táxons de frutos secos (*Eucalyptus*), onde predominam cariótipos altamente simétricos com todos os cromossomos

metacêntricos.

Apesar do tamanho pequeno dos cromossomos e das dificuldades metodológicas enfrentadas, a aplicação da técnica de FISH com a seqüência de rDNA 45S forneceu subsídios para a diferenciação de espécies em alguns complexos do gênero *Psidium*, bem como indicou a possível origem alopoliplóide em um par de citótipos de *Psidium cattleianum*. A variação no número de sítios de hibridação pode ser utilizada como caráter adicional em discussões taxonômicas e evolutivas futuras, principalmente após a aplicação desta técnica em outras espécies, bem como a utilização de outros marcadores moleculares, como rDNA 5S e seqüências teloméricas. Vale ressaltar que este é o primeiro trabalho com a aplicação de técnicas de citogenética molecular em Myrteaceae.

Quanto à variação no tamanho do genoma, os dados obtidos também representam abordagens inéditas para estudos evolutivos na família. O tamanho do genoma em Myrteae é pequeno (da ordem de 0,5pg de DNA por núcleo haplóide) e apresenta uma pequena variação entre as 30 espécies analisadas, sendo cerca de 2,5x superior nas espécies tetraplóides. Em termos gerais, táxons de frutos secos, como Eucalypteae e Melaleuceae, apresentam genoma 2-6 vezes maior em relação à Myrteae. Dentro de Myrteae, a variação no tamanho do genoma foi da ordem de 9x em *Psidium*, tamanho este muitas vezes associado ao nível de ploidia. Os resultados obtidos para espécies do complexo *Psidium grandifolium* podem ser utilizados na discussão taxonômica das espécies deste complexo. Para os citótipos de *P. cattleianum*, a variação no tamanho do genoma também forneceu indícios sobre a evolução alopoliplóide entre as populações tetra- e hexaplóide desta espécie.

A análise filogenética em Myrteae, utilizando-se de seqüências de DNA nuclear (ITS, ETS) e plastidial (*psbA-trnH*, *ndhF* e *matK*) para 94 espécies de 38 gêneros confirmou o monofiletismo da tribo. Este estudo, embora preliminar, mostrou que a tribo Myrteae é composta por sete clados principais, com suporte

de bootstrap ($> 50\%$) ou probabilidade bayesiana $> 95\%$. Nesta análise foram reconhecidos sete grupos informais, que equivalem aos clados evidenciados pelas análises macromoleculares, sendo eles: grupo *Eugenia*, grupo *Myrceugenia*, grupo *Myrcia*, grupo *Myrteola*, grupo *Pimenta*, grupo *Plinia* e grupo Australasiano, que possivelmente venham a receber *status* de subtribo. Futuramente, será realizada a busca por caracteres macromorfológicos e biogeográficos que sustentem uma nova proposta de classificação para os gêneros desta tribo.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados.**

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 2006/05), intitulado **Estudo citotaxonômico em plantas, utilizando a técnica de hibridização de DNA *in situ*;**

() tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____

Itayguara Ribeiro da Costa

Aluno: Itayguara Ribeiro da Costa

Eliana Regina Forni Martins

Orientador: Profa. Dra. Eliana Regina Forni-Martins

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido

Helena Coutinho de Oliveira

Nome:

Função: Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente

Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP