

Duane Fernandes de Souza Lima

Estudos taxonômicos e biossistemáticos sobre o complexo *Myrcia*

***laruotteana* Cambess. (Myrtaceae)**

Projeto submetido ao Instituto Ambiental do Paraná para emissão de autorização de coleta em Unidades de Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Renato Goldenberg
Coorientadores: Prof. Dr. Marcos Sobral e
Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt

Curitiba

2011

RESUMO

O gênero *Myrcia* é um dos maiores gêneros da família Myrtaceae, amplamente distribuído pelo Brasil e outros países da América do Sul e Central. São árvores ou arbustos distintos das outras mirtáceas principalmente pela inflorescência paniculada e cálice aberto no botão floral. A última revisão do gênero foi feita há 52 anos, e hoje, com um considerável incremento no número de espécies, *Myrcia* apresenta alguns complexos de espécies mal delimitados, necessitando de estudos mais detalhados de sua morfologia, aliados a dados moleculares. Um destes complexos é o que inclui *M. laruotteana*, *M. selloi*, *M. lajeana* e *M. tomentosa*. Estas espécies apresentam características morfológicas com considerável variabilidade, fazendo com que suas identificações se tornem difíceis. Além disso, em alguns casos, elas ocorrem em simpatria, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre as espécies. Dessa forma, o objetivo deste projeto é fazer a revisão taxonômica do complexo, juntamente com estudos de genética de populações, a fim de tentar esclarecer as delimitações entre os táxons. A revisão taxonômica será realizada a partir da análise morfológica de exsiccatas e de material coletado em campo. Os estudos biosistemáticos serão realizados com o marcador molecular ISSR, para estimar a diversidade genética das populações trabalhadas. Com a união dos dados morfológicos e moleculares, será proposta uma classificação para o complexo, incluindo chave de identificação, breves descrições, e ilustrações.

1. INTRODUÇÃO

Myrtaceae é uma família claramente monofilética, que apresenta o maior número de espécie da ordem Myrtales (Judd *et al.* 2009). Conta com aproximadamente 132 gêneros e mais de 5600 espécies (Govaerts *et al.* 2008), sendo a quarta maior família no Brasil (Giulietti *et al.* 2005). A família teve provável origem na Gondwana (Wilson *et al.* 2001; Systma *et al.* 2004), e atualmente ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo a Austrália, Sudeste da Ásia e América do Sul como centros de diversidade (Wilson *et al.* 2001).

Tradicionalmente, a família era dividida em duas subfamílias, de acordo principalmente com a morfologia do fruto: Leptospermoideae apresentava frutos secos e folhas alternas ou opostas, enquanto Myrtoideae apresentava

frutos carnosos e folhas sempre opostas (Legrand & Klein 1978). A primeira tinha como centro de dispersão a Oceania enquanto a segunda era distribuída principalmente na América do Sul (Barroso *et al.* 1991; Legrand & Klein 1978; Sobral 2003).

Após estudos moleculares (Wilson 2001, 2005), a família foi reorganizada, já que os dados mostraram o não monofiletismo das subfamílias. Desde então, Myrtaceae tem sido dividida nas subfamílias Psiloxylodeae, caracterizada principalmente pelas flores unissexuadas e número cromossômico básico $n=12$, e Myrtoideae, com flores bissexuadas e número cromossômico básico $n=11$. A primeira inclui dois gêneros ocorrentes na África (*Psiloxylon* Thouars ex Tul. e *Heteropyxis* Harv.), enquanto que a segunda é representada por todas as outras Myrtaceae conhecidas.

A subfamília Myrtoideae é composta por 15 tribos, sendo que a mais rica é Myrteae (Wilson 2005; Lucas 2007), distribuída em regiões tropicais, subtropicais e marítimas. Myrteae compreende todas as mirtáceas americanas, com exceção do gênero andino *Tepualia* Griseb. (Landrum 1986; Landrum & Kawasaki 1997).

Antes dos trabalhos de Lucas *et al.* (2005, 2007), Myrteae era dividida em três subtribos caracterizadas principalmente pela morfologia do embrião: Myrtinae com hipocótilo desenvolvido e cotilédones pequenos ou vestigiais; Eugeniinae com hipocótilo vestigial ou ausente e cotilédones carnosos; e Myrciinae com hipocótilo desenvolvido e cotilédones foliáceos (McVaugh 1968). Atualmente, dados moleculares mostram que Eugeniinae e Myrtinae não são monofiléticos (Lucas *et al.* 2007), e os autores propõem uma classificação

baseada em grupos informais de espécies em torno dos gêneros *Plinia* L., *Myrcia* DC., *Myrceugenia* O.Berg, *Myrteola* O.Berg, *Pimenta* Lindl. e *Eugenia* L.

A antiga subtribo Myrciinae era composta pelos gêneros *Myrcia* DC., *Gomidesia* Berg., *Marlierea* Cambess., *Calyptranthes* Sw. e *Myrceugenia* Berg. Segundo Lucas *et al.* (2005, 2007), *Myrceugenia* não deve permanecer no grupo, então apenas *Myrcia*, *Gomidesia*, *Marlierea* e *Calyptranthes* formam o grupo que representa Myrciinae s.s. Recentemente Proença *et al.* (2006) descreveram o gênero *Algrizea* Proença & NicLugh, posicionando-o em Myrciinae.

O gênero *Myrcia* foi descrito por De Candolle (1826), totalizando 108 espécies. Ao final do tratamento de Cabessèdes (1829), o total de espécies do gênero aumentou para 152. Berg (1857-1859) reconheceu gêneros que hoje são sinônimos de *Myrcia*: *Aulomyrcia* O.Berg, *Calyptromyrcia* O.Berg, *Calycampe* O.Berg e *Gomidesia* O.Berg. Grisebach (1861) e Niedenzu (1893) propuseram *Aulomyrcia* como seção e subgênero de *Myrcia*, respectivamente. McVaugh (1968) dividiu *Myrcia* em três seções: *Myrcia*, *Aulomyrcia* e *Armeriela*. Os estudos de Lucas *et al.* (2005), mostram *Armeriela* como um grupo não natural e é reconhecido juntamente com a seção *Aulomyrcia*.

Bentham (1868) e Kiaerskou (1893) foram os primeiros autores a propor *Gomidesia* como sinônimo de *Myrcia*, já que os gêneros são separados apenas pela morfologia da antera. Entretanto, Legrand (1958) revalidou o gênero, e foi seguido por McVaugh (1968). Landrum & Kawasaki (1997) e Sobral (2003) aceitam *Gomidesia* como sinônimo de *Myrcia*. Atualmente, estudos moleculares e filogenéticos (Lucas *et al.* 2007) mostraram que *Gomidesia* está inserido no grupo informal de *Myrcia*, compondo um grupo monofilético bem

resolvido. Dessa forma, autores (Govaerts *et al.* 2008, Sobral *et al.* 2010) têm proposto a reunificação de *Gomidesia* e *Myrcia*, deixando o gênero com três seções: *Myrcia*, *Aulomyrcia* e *Gomidesia*.

Myrcia apresenta cerca de 360 espécies (Govaerts *et al.* 2008) e ocorre desde o México e Caribe até o norte da Argentina (Landrum & Kawasaki 1997). São árvores ou arbustos, com tricomas simples ou dibráquiados. Geralmente apresentam inflorescências paniculadas, flores 5-meras, e cálice aberto no botão floral. O hipanto pode ser prolongado ou não acima do ovário. O ovário é 2-4-locular, cada lóculo com 2 óvulos e placentação axilar. O fruto é globoso, coroado pelos lobos do cálice, encerrando 1-2 sementes com testa membranácea ou crustácea. O embrião é do tipo mircióide (Landrum & Kawasaki 1997; Legrand & Klein 1969).

Após o trabalho de Berg (1857-1859), não foi realizada nenhuma revisão do gênero. Trabalhos taxonômicos recentes (De-Carvalho 2007; Legrand & Klein 1969; Nic Lughadha 1995; Mazine & Souza 2008; McVaugh 1958; Morais & Lombardi 2006; Soares-Silva 2000; Sobral 2003; Souza 2007) incluem tratamentos do gênero apenas em pequenas escalas geográficas. Um complexo de espécies mal delimitadas é constituído por *Myrcia laruotteana* Cambess. – *M. selloi* (Spreng.) N.Silveira – *M. lajeana* D.Legrand – *M. tomentosa* (Aubl.) DC., aqui denominado de complexo *M. laruotteana*.

Segundo Sobral *et al.* (2010), *M. laruotteana* ocorre de Santa Catarina ao Maranhão, *M. tomentosa* tem distribuição desde o Paraná até o Amazonas e Paraíba, e *M. lajeana* e *M. selloi* ocorrem do Rio Grande do Sul ao Paraná. Fora do Brasil, *M. laruotteana* ainda ocorre na Argentina e Paraguai (Legrand &

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

Segundo Legrand & Klein (1969), *M. laruotteana*, *M. lajeana* e *M. selloi* (como *M. ramulosa*) são distintas principalmente pela morfologia e tamanho das folhas, pubescência geral da planta e persistência do tubo do hipanto no fruto. Neste mesmo trabalho, os autores destacaram diversas vezes a dificuldade de separar essas três espécies, chegando a citar a presença de prováveis híbridos com características bem intermediárias. *Myrcia tomentosa* é incluída neste complexo porque, em alguns casos, ela se aproxima muito morfológicamente de algumas formas de *M. laruotteana* (M. Sobral, com. pessoal). Os caracteres usados na distinção das espécies apresentam grande variabilidade, especialmente em áreas de simpatria, sugerindo ocorrência de fluxo gênico entre estes táxons. Dessa forma é de fundamental importância um estudo detalhado, tanto morfológico quanto molecular, para ajudar na delimitação clara entre este complexo de espécies.

2. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivos gerais a revisão taxonômica das espécies do complexo *M. laruotteana*, juntamente com estudos biosistemáticos utilizando marcador ISSR, a fim de esclarecer a delimitação entre as espécies.

Os objetivos específicos são: revisar morfológicamente as espécies *M. laruotteana*, *M. selloi*, *M. lajeana* e *M. tomentosa*; estimar a diversidade genética de populações com um marcador molecular altamente variável (ISSR)

no complexo *M. laruotteana* para auxiliar da delimitação dos táxons nos níveis específico e infraespecífico.

3. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

	MAR/ MAI	JUN/ AGO	SET/ NOV	DEZ/ FEV	MAR/ MAI	JUN/ AGO	SET/ NOV	DEZ/ FEV
Créditos	X	X	X	X				
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	
Coletas e observações de campo	X	X	X	X	X	X	X	
Levantamento e análise de caracteres moleculares		X	X	X	X	X	X	
Visita a herbários		X	X	X	X	X		
Revisão taxonômica das espécies		X	X	X	X	X	X	
Análise e interpretação dos resultados					X	X	X	
Redação da dissertação						X	X	
Defesa da dissertação								X

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM

Serão amostradas cerca de dez populações por espécie, sempre dando prioridade àquelas populações que apresentem maior variação geográfica, ambiental e altitudinal, com 15-20 indivíduos por população.

Todos os indivíduos serão coletados e herborizados segundo os procedimentos citados em Vaz *et al.* (1992) e depositados no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB, acrônimo segundo The New York Botanical Garden 2011). As duplicatas serão enviadas para os principais herbários brasileiros.

De cada indivíduo também serão coletadas amostras foliares, que serão devidamente acondicionadas em sílica-gel, para posterior extração do DNA.

4.2. ESTUDOS BIOSISTEMÁTICOS

Os estudos biosistemáticos serão realizados no Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, do departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná.

4.2.1. Extração de DNA

O DNA total do material coletado será extraído seguindo protocolo de Doyle & Doyle (1987).

4.2.2. Reações de PCR e eletroforese

Serão testados diferentes *primers* de marcadores dominantes altamente variáveis ISSR (*Intersimple sequence repeats*), para investigar a variabilidade e a estrutura genética das populações. As reações de PCR e eletroforese serão feitas conforme Brandão (2008). Os géis serão fotodocumentados em aparelho apropriado para futura análise de bandas.

4.2.3. Análises do marcador ISSR

Os perfis eletroforéticos obtidos nas amplificações com *primers* ISSR serão codificados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda e uma matriz de fenótipos de ISSR será construída. Bandas com fraca intensidade ou baixa definição serão descartadas da análise. Os marcadores obtidos serão analisados com auxílio do programa GENES (Cruz 2001), para estimativa da similaridade genética entre as populações.

A partir da matriz de fenótipos ISSR, será construída uma matriz de distâncias euclidianas quadradas e realizada a análise de variância molecular

(AMOVA), com auxílio do programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 1992). A AMOVA será utilizada para descrever a estrutura genética e a variabilidade entre as populações.

A construção do dendograma será feita com auxílio do programa NTSYS 2.11 (Rohlf 2000), usando o método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*).

4.3. REVISÃO TAXONÔMICA

Esta parte do trabalho será realizada no Laboratório de Sistemática de Fanerógamas, departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná.

Para os estudos taxonômicos serão procedidas coletas de material botânico, visitas a herbários que apresentem coleções importantes do grupo, empréstimo de materiais, incluindo tipos e coleções históricas, e consulta à bibliografia. Nas exsicatas selecionadas, serão observados e anotados em tabela os caracteres mais relevantes em relação a ramos, folhas, flores, frutos e botões, para futura descrição das espécies e elaboração da chave de identificação. As ilustrações serão efetuadas com auxílio de câmera clara.

4.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A partir da comparação dos dados moleculares e morfológicos obtidos, será proposta uma classificação para o complexo de espécies, incluindo chaves de identificação, breves diagnoses e ilustrações dos táxons reconhecidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROSO, G. M. *et al.* **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 2. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. 365 p.
- BENTHAM, G. Notes on Myrtaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 10, p. 101-166, 1868.
- BERG, O. Myrtaceae. In: MARTIUS, C. F. P. **Flora Brasiliensis**, v. 14, n. 1, p. 1-656, 1857-1859.
- BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais**. 88 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.
- CAMBÈSSEDES, J. Myrtaceae. **Flora Brasiliae Meridionalis**, v. 2, p. 277-371, 1829.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: versão Windows**. Aplicativo computacional na área de genética e estatística experimental. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001.
Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/genes/Genes_Br.htm>. Acesso em: 21/01/2011.
- DE CANDOLLE, A. P. **Dictionnaire classique d'histoire naturelle**, v. 11. 1826.
- DE-CARVALHO, P. L. ***Myrcia* DC. ex Guill. (seção *Myrcia*, Myrtaceae) no Distrito Federal, Brasil**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.
- DOYLE, J. J. & DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v. 12, p. 13-15, 1987.
- EXCOFFIER, L. *et al.* **Arlequin: a software for population data analysis**. Version 3.1. Geneva: Universidade de Geneva, 2007. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>>. Acesso em: 21/01/2011.
- GIULIETTI, A. M. *et al.* Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005.
- GOVAERTS, R., M. *et al.* **World checklist of Myrtaceae**. Local: Royal Botanic Gardens, Kew, 2008. 455 p. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/>>. Acesso em 10/01/2011.
- GRISEBACH, A. H. R. Myrtaceae. **Flora of the British West Indians Islands**. 234 p. 1861.
- JUDD, W. S., *et al.* **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2009. 612 p.
- KAWASAKI, M. L. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 121-170, 1989.
- KIAERSKOU, H. F. C. Enumeratio Myrtacearum Brasiliensium. In: WARMING, E. **Symbolarum ad Floram Brasiliae Centralis Cognoscedam**, 200 p, 1893.
- LANDRUM, L. R. ***Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae)**. New York: New York Botanical Garden, 1986. 78 p. (Flora Neotropica Monograph, n. 45).
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LEGRAND, C.D. Las especies tropicales del género *Gomidesia*. **Comunicacines Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v. 3, n. 40, p. 1-39, 1958.
- LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas – *Myrcia*. In: REITZ, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1969. p. 218-330.
- _____. Mirtáceas – *Myrciaria, Pseudocaryophyllus, Blepharocalyx*, espécies suplementares, espécies cultivadas, generalidades. In: REITZ, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. 1978. p. 733-876.
- LUCAS, E. V. *et al.* Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 35-51, 2005.
- LUCAS, E. V. *et al.* Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, v. 56, n. 4, p. 1105-1128, 2007.
- MAZINE, F. F. & SOUZA, V. C. Myrtaceae dos campos de altitude do Parque Nacional do Caparaó – Espírito Santo/Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 57-74, 2008.
- McVAUGH, R. Myrtaceae. **Flora of Peru**, v. 13, n. 4, p. 569-818.
- McVAUGH, R. The genera of american Myrtaceae: an interim report. **Taxon**, v. 17, n. 4, p.354-418, 1968.
- MORAIS, P. O. & LOMBARDI, J. A. A família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 7, n. 2, p. 3-32, 2006.

- NIC LUGHADHA, E. Myrtaceae. In: STANNARD, B. L. **Flora of the Pico das Almas**, p. 492-517, 1995.
- NIEDENZU, F. Myrtaceae. In: ENGLER, H. G. A.; PRANTIL, K. A. E. **Die natürliehen Pflanzenfamilienn**, v. 3, n. 7, p. 57-105, 1893.
- PROENÇA, C. E. B. *et al.* **Algrizea** (Myrteae, Myrtaceae): a new genus from the highlands of Brazil. **Systematic Botany**, v. 31, n. 2, p. 320-326, 2006.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.11. New York: Applied Biostatistics, 2000.
- ROTMAN, A. D. Myrtaceae. In: BURKART, A. **Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina)**, Buenos Aires, 1969.
- SOARES-SILVA, L. H. **A família Myrtaceae – subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do Rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil**. 478 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 2003. 215 p.
- SOBRAL, M. *et al.* Myrtaceae in **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Acesso em: 10/01/2011.
- SOUZA, M. C. *et al.* Subtribo Myrciinae O.Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 49-63, 2007.
- SYSTMA, K. J. *et al.* Clades, clocks, and continents: historical and biogeographical analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and relatives in the southern hemisphere. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. 4, p. 85-105, 2004.
- THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN. **Index Herbariorum**. Disponível em: <<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>>. Acesso em: 10/01/2011.
- VAZ, A. M. S. F.; LIMA, M. P. M. de; MARQUETE, R. Técnicas e manejo de coleções botânicas. In: IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: Divisão de Editoração Gráfica, 1992. p. 56-64.
- WILSON, P. G. *et al.* Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.
- WILSON, P. G. *et al.* Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.