

PROJETO DE PESQUISA

SISTEMÁTICA DE *MOURIRI* E *VOTOMITA* (OLISBEOIDEAE, MELASTOMATACEAE)

Projeto de pesquisa apresentado ao Instituto Água e Terra, como requisito para a obtenção de autorização para pesquisa na Estação Ecológica do Caiuá.

Rafael Rosenstock Völtz, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Orientador: Renato Goldenberg, professor do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Professor do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2021

RESUMO

Mouriri e *Votomita* são gêneros exclusivamente Neotropicais da família Melastomataceae com, respectivamente, 86 e 10 espécies. No Brasil ocorrem 53 espécies de *Mouriri*, das quais 25 são endêmicas, e cinco espécies de *Votomita*, sendo duas endêmicas. Estudos filogenéticos apontam certa controvérsia em relação à posição desses gêneros na ordem Myrtales, sendo que alguns autores entendem que fazem parte de Melastomataceae, subfamília Olisbeoideae, enquanto outros entendem que estes gêneros devem ser segregados em uma família própria, Memecylaceae. Esse projeto visa elaborar uma hipótese filogenética para a linhagem de *Mouriri* e *Votomita*, baseada em marcadores moleculares nucleares e plastidiais, e, com base nesta hipótese, testar o monofiletismo da linhagem e investigar aspectos relativos à biogeografia e evolução morfológica no grupo. Na região compreendida pela Estação Ecológica do Caiuá ocorre uma espécie de *Mouriri*. A existência comprovada dessas espécies na área do parque permite a coleta de material vegetal em sílica-gel para a extração do DNA, assim como auxilia no entendimento da distribuição dessa espécie e dos fatores ecológicos envolvidos. Serão coletados de três a cinco ramos contendo flores ou frutos dos indivíduos dessa espécie para depósito nos herbários, e amostras de tecido vegetal serão coletados em sílica-gel para posterior extração do material genômico, necessário para assegurar o sucesso e qualidade da extração, e permitirá inferir sobre as relações filogenéticas e aspectos evolutivas dos dois gêneros.

Palavra-chave: Mata Atlântica, Evolução, Biogeografia.

EQUIPE EXECUTORA

Rafael Rosenstock Völtz, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Renato Goldenberg, orientador, docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), e professor titular da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

OBJETIVOS

Elaborar uma hipótese filogenética para a linhagem de *Mouriri* e *Votomita*, baseada em marcadores moleculares nucleares e plastidiais, e, com base nesta hipótese, testar o monofiletismo da linhagem e investigar aspectos relativos à biogeografia e evolução morfológica no grupo. Especificamente, essa proposta visa:

- Coletar material de tecido vegetal em sílica-gel para extração de DNA, realizar o sequenciamento dos marcadores moleculares de espécies de *Mouriri* e *Votomita* que serão utilizados para inferências filogenéticas e evolutivas.
- Coleta de novas amostras e análise de materiais disponíveis nos herbários regionais a fim de solucionar os problemas taxonômicos que vierem a ser averiguados.
- Testar o monofiletismo da linhagem *Mouriri/Votomita*.
- Investigar a evolução de caracteres morfológicos no grupo.
- Investigar a história biogeográfica do grupo.
- Finalização do tratamento taxonômico de *Mouriri* e *Votomita*.

JUSTIFICATIVA

Pesquisas realizadas no banco de dados dos herbários virtuais na página do SpeciesLink (CRIA, 2021) demonstraram a ocorrência de uma espécie de *Mouriri* na região compreendida pela Estação Ecológica do Caiuá. A existência comprovada dessa espécie na área da Estação permite a coleta de material vegetal em sílica-gel para a extração do DNA, assim como auxilia no entendimento da distribuição dessas espécies e dos fatores ecológicos envolvidos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mouriri Aubl. e *Votomita* Aubl. são gêneros exclusivamente Neotropicais da família Melastomataceae com, respectivamente, 86 e 10 espécies (Morley 1976, 1985, 1989, 1993a, 1993b, 1998, Goldenberg *et al.* 2013). No Brasil ocorrem 53 espécies de *Mouriri*, das quais 25 espécies são endêmicas, e cinco espécies de

Votomita, sendo duas endêmicas. *Mouriri* ocorre em todos os domínios fitogeográficos brasileiros, porém apresenta uma maior riqueza no bioma Amazônia e Mata Atlântica. *Votomita* tem uma distribuição menos abrangente, ocorrendo principalmente no bioma Amazônia (BFG 2018).

Estudos filogenéticos baseados na morfologia e em dados moleculares apontam certa controvérsia em relação à posição desses gêneros na ordem Myrtales: (1) alguns autores entendem que fazem parte de Melastomataceae, juntamente com outros gêneros Paleotropicais, na subfamília Olisbeoideae Burnett (Stone 2006); (2) outros entendem que estes gêneros devem ser segregados em uma família própria, Memecylaceae (Renner 1993, Clausen and Renner 2001). Como ambas alternativas são filogeneticamente corretas, adota-se aqui a proposta de APG IV (2016), de que *Mouriri* e *Votomita* pertencem à subfamília Olisbeoideae, família Melastomataceae, visão que também é adotada pela maioria dos pesquisadores que atualmente trabalham com a família.

Olisbeoideae Burnett é uma subfamília Pantropical, com seis gêneros (Stone 2006). A relação entre os gêneros dentro da subfamília foi investigada por Stone (2006), baseada em apenas um marcador molecular nuclear, o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GapC). Esse autor sugere que os gêneros neotropicais *Mouriri* e *Votomita* formam uma linhagem única, irmã dos gêneros paleotropicais *Memecylon* L. e *Spathandra* Guil. & Perr. No entanto, a amostragem apresentada por Stone (2006) para os representantes neotropicais de Olisbeoideae é bastante limitada, com apenas duas espécies de *Mouriri* e uma de *Votomita*.

Trabalhos recentes baseados em filogenias moleculares vêm sendo extremamente úteis como apoio a trabalhos sobre taxonomia, e inclusive baseando a redefinição de tribos e gêneros (Penneys et al. 2010, Michelangeli et al. 2013, Gamba & Almeida 2014, Majure et al. 2015, Rocha et al. 2018, Reginato & Michelangeli 2016a, Goldenberg et al. 2018, Bacci et al. 2019, Bochorny et al. 2019), além de auxiliar na compreensão da evolução, tanto do ponto de vista biogeográfico (Renner et al. 2001) quanto morfológico (Kriebel et al. 2015, Reginato & Michelangeli 2016c). No entanto, estudos desse tipo ainda não foram realizados para *Mouriri* e *Votomita*, ocasionando um “vácuo” no conhecimento sobre evolução e biogeografia destes gêneros.

A última revisão taxonômica do grupo foi realizada em 1976 (Morley 1976). Nesse estudo o autor classificou *Mouriri* em dois subgêneros, cada qual dividido em

seções: (1) *Taphoxylon* Morley, com três seções; e (2) *Mouriri*, com 13 seções. *Votomita* não apresenta subdivisões nas suas espécies. Essa classificação, baseada principalmente em caracteres anatômicos da folha, é aceita até hoje. Em vista das novas ferramentas moleculares e técnicas de análise dos dados é possível testar se os subgêneros e seções propostas por Morley são monofiléticos, ou se uma nova abordagem sobre o grupo é necessária.

Com base no exposto acima, a coleta de tecido vegetal (folha) em sílica-gel para extração de DNA, necessário para assegurar o sucesso e qualidade da extração, permitirá inferir sobre as relações filogenéticas e aspectos evolutivos dos dois gêneros.

MATERIAL E MÉTODOS

Parte desse estudo será conduzido na Estação Ecológica do Caiuá, administrada pelo Instituto Água e Terra.

O material a ser estudado corresponde a partes dos ramos das espécies de *Mouriri* que possam ser encontrados na área da Estação.

Serão realizados caminhamentos pelas trilhas da Estação e quando indivíduos da espécie de *Mouriri* encontrada nesses caminhamentos possuírem material com fruto ou flores, será realizada a coleta utilizando uma tesoura de poda acoplada a uma vara telescópica (podão). Serão coletados de três a cinco ramos, quando possível, de um mesmo indivíduo a fim de obter duplicadas a serem distribuídas para diferentes herbários. Além da coleta dos ramos para depósito nas coleções de herbários, serão coletadas de três a cinco amostras de tecido vegetal (folhas) para os estudos moleculares. A amostra do tecido vegetal será armazenada em um envelope de papel medindo 6 x 4 cm, e colocado em uma embalagem de plástico “Zip lock” com fecho hermético contendo sílica-gel.

O material coletado será herborizado segundo especificações de Fidalgo & Bonnoni (1984). Nestas excursões, também serão observados e anotados dados morfológicos de tronco e casca, hábito, habitat preferencial, período reprodutivo e localização geográfica, que permitiram complementar a caracterização da espécie.

O material testemunho será depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB), e duplicatas serão distribuídas a diferentes herbários nacionais.

A extração de DNA genômico seguirá protocolos já estabelecidos para a família, a partir de material desidratado em sílica-gel, e disponíveis em bibliografia recente (Michelangeli et al 2013, Reginato & Michelangeli 2016a, Goldenberg et al. 2012, 2018, Bacci et al. 2019, Bochorny et al. 2019). Regiões ribossomais que são largamente utilizadas em estudos filogenéticos na família, como ITS (*internal transcribed sequence*) e ETS (*external transcribed sequence*), devem ser utilizadas, embora tenham se mostrado pouco informativas para análises em *Olisbeoideae* (Stone 2006). Este último autor utilizou um gene nuclear (GapC) pouco usual em estudos feitos para a família, mas que se mostrou informativo para o grupo aqui estudado, e será também utilizado. Para regiões marcadoras plastidiais, as regiões selecionadas também seguem as referências citadas acima, e incluem os espaçadores intergênicos *accD-psaI*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnS-trnG*. Marcadores nucleares “low-copy” (*ADH*, *At5g10780*, *PCRF1*, *SOS4*, *UFP*, *UNC50*, *waxy*, *ZBADH*, ver Reginato & Michelangeli 2016b) serão testados, e sua utilização em *Mouriri* e *Votomita* será avaliada posteriormente. A sequência dos iniciadores, protocolos da reação da polimerase em cadeia (PCR) e purificação do fragmento de PCR amplificado seguirão o descrito pelos trabalhos acima.

O alinhamento das sequências de DNA ocorrerá no programa Geneious 9.1.7 (Kearse et al., 2012). Os modelos evolutivos para cada marcador molecular serão selecionados utilizando o jModeltest v.2.1.3 (Darriba et al., 2012). As análises filogenéticas serão conduzidas usando inferência bayesiana, implementada no Beast v.1.8.4 (Drummond et al., 2012), e máxima verossimilhança, implementada no RAxML v.8.2.4 (Stamatakis, 2006). As árvores serão visualizadas e editadas no FigTree v1.4.3 (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

REFERÊNCIA

- APG – Angiosperm Phylogeny Group. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20
- Bacci, L.F., Michelangeli, F.A. & Goldenberg, R. 2019. Revisiting the classification of *Melastomataceae*: implications for habit and fruit evolution. *Bot. J. Linnean Soc.*, v. 190, p. 1-24.

- BFG - The Brazil Flora Group 2018. Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). *Rodriguesia*, v. 69, p. 1513-1527.
- Bisewski, G.C.A. 2017. Morfometria de estames em *Mouriri* (Melastomataceae). Monografia de Bacharelado. Universidade Federal do Paraná.
- Bochorny, T., Michelangeli, F.A., Almeda, F. & Goldenberg, R. 2019. Phylogenetics, morphology and circumscription of Cambessedesieae: a new Neotropical tribe of Melastomataceae. *Bot. J. Linnean Soc.*, v. 190, p.281-302.
- Buchmann, S.L. 1987. Ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecol. Syst.* 18: 343-369.
- Buchmann, S.L. & Buchmann, M. D. Anthecology of *Mouriri myrtilloides* (Melastomataceae: Memecyleae), an oil flower in Panama. *Biotropica* 13 (Supl.): 7-24.
- Clausing, G. & Renner, S.S. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *Am. J. Bot.* 88: 486-498.
- CRIA - Centro de Referência em Informação Ambiental (2021) SpeciesLink. Disponível em: <<http://slink.cria.org.br>>. Acesso: 15 jun. 2021.
- Darriba, D., Taboada G.L., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Met.* 9: 772.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molec. Biol. Evol.* 29: 1969-1973.
- Fidalgo, O. & Bononi, V.L. 1984. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico (Manual n.4). Instituto de Botânica, São Paulo, 61 pp.
- Gamba, D. & Almeda, F. 2014. Systematics of the Octopleura Clade of *Miconia* (Melastomataceae: Miconieae) in Tropical America. *Phytotaxa* 179: 1--174.
- Goldenberg, R. 2009. 21. *Mouriri* Aubl. In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M. & Martins, S.E. (eds.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. FAPESP, São Paulo 6: 108-110.
- Goldenberg, R. 2010. *Mouriri* Aubl. In: Forzza, R.C. et al. (eds.). *Lista de Plantas e Fungos do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1267-1268.
- Goldenberg, R. & Martins, A.B.. 2009. *Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Memecylaceae*. *Bol. Bot. USP* 27: 97-98.

- Goldenberg, R., Penneys, D., Almeda, F., Judd, W. S. & Michelangeli, F.A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. *Int. J. Plant Sci.* 169: 963–979.
- Goldenberg, R., Fraga, C.N., Fontana, A.P., Nicolas, A. & Michelangeli, F.A. 2012. Taxonomy and Phylogeny of *Merianthera* (Melastomataceae). *Taxon* 65: 1040-1056.
- Goldenberg, R., Meirelles, J. & Amano, E. 2013. *Mouriri morleyana* sp. nov. (Melastomataceae) from Brazil, with notes on its foliar stomatal crypts. *Nordic J. Bot.* 30: 321-325
- Goldenberg, R., Reginato, M. & Michelangeli, F.A. 2018 Disentangling the infrageneric classification of megadiverse taxa from Mata Atlantica: phylogeny of *Miconia* section *Chaenantha* (Melastomataceae. Miconieae). *Taxon* 67: 537-551.
- Goldenberg, R. & Völtz, R.R. *Mouriri* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9814>>. Acesso em: 17 jun. 2020
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Kriebel, R., Michelangeli, F.A. & Kelly, L.M. 2015. Discovery of unusual anatomical and continuous characters in the evolutionary history of *Conostegia* (Miconieae: Melastomataceae). *Molec. Phylog. Evol* 82: 289-313.
- Majure, L.C., Neubig, K.M., Slean, J.D., Bécquer, E.R. & Judd, W. 2015. Evolution of the Sandpaper Clade (Miconieae, Melastomataceae). *Int. J. Plant Sci.* 176: 607--626.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Michelangeli, F.A., Guimarães, P.J., Penneys, D.S., Almeda, F. & Kriebel, R. 2013. Phylogenetic relationships and distribution of New World Melastomeae (Melastomataceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 38-60.
- Morley, T. 1976. Memecyleae (Melastomataceae). *Fl. Neotrop. Monogr.* 15: 1-295.

- Morley, T. 1985. Five new taxa of New World Memecyleae (Melastomataceae). *Ann Missouri Bot. Gard.* 72: 548-557.
- Morley, T. 1989. New species and other taxonomic matters in the New World Memecyleae (Melastomataceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76: 430-443.
- Morley, T. 1993a. Five new taxa and one rediscovered species of *Mouriri* (Melastomataceae). *Novon* 3: 164-175.
- Morley, T. 1993b. A new *Mouriri* (Melastomataceae) from the Dominican Republic. *Novon* 3: 274-277
- Morley, T. 1998. A new and an emended species of *Mouriri* (Melastomataceae). *Novon* 8: 41-44.
- Penneys, D.S., Michelangeli, F.A., Judd W.S. & Almeda F. 2010. Henrietteae (Melastomataceae): a new neotropical berry-fruited tribe. *Syst. Bot.* 35: 783-800.
- Reginato, M. & Michelangeli, F.A. 2016a. Untangling the phylogeny of *Leandra* s.str. (Melastomataceae, Miconieae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 96: 17--32.
- Reginato, M. & Michelangeli, F.A. 2016b. Primers for low-copy nuclear genes in the Melastomataceae. *Appl. Plant Sci.* 4: 1500092.
- Reginato, M. & Michelangeli, F.A. 2016c. Diversity and constraints in the floral morphological evolution of *Leandra* s.str. (Melastomataceae). *Ann Bot.* 118:445-458.
- Renner S.S. 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic J. Bot.* 13: 519-540
- Renner, S. S., Clausen, G., & Meyer, K. 2001. Historical biogeography of Melastomataceae: the roles of Tertiary migration and long-distance dispersal. *Am. J. Bot.* 88: 1290-1300.
- Ribeiro, J.E.L. da S., Hopkins, M.J.G., Vicentini, A., Sothers, C.A., Costa, M.A. da S., Brito, J.M. de, Souza, M.A.D. de, Martins, L.H.P., Lohmann, L.G., Assunção, P.A.C.L., Pereira, E.C., Silva, C.F. da, Mesquita, M.R. & Procópio, L.C. 1999 *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.* INPA, Manaus, Amazonas, 816 pp.
- Rocha M.J.R, Guimarães, P.J.F, Michelangeli F.A., Batista J.A.N. 2018. Taxonomy of Marcetieae: a new neotropical tribe of Melastomataceae. *Int. J. Plant Sci.* 179: 50-74.

Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.

Stehmann, J.R.; Forzza, R.C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D.P. & Kamino, L.H.Y. 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Stone, R. D. 2006. Phylogeny of major lineages in Melastomataceae, subfamily Olinbeoideae: utility of nuclear Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (*GapC*) gene sequences. *Syst. Bot.* 31: 107–121.

CRONOGRAMA

Na Tabela 01 é informado o cronograma do projeto da tese de doutorado do proponente dessa proposta, que irá elaborar uma hipótese filogenética para a linhagem de *Mouriri* e *Votomita*, e investigar aspectos relativos à biogeografia e evolução morfológica no grupo.

Tabela 01: Cronograma do projeto da tese de doutorado.

Etapas por Ano/Semestre	2021/2	2022/1	2022/2	2023/1
- Revisão bibliográfica	X	X	X	X
-Coleta e visita aos herbários	X	X	X	
-Extração, amplificação, sequenciamento de DNA		X	X	
-Análises preliminares		X	X	
-Base de dados para análises morfológica e biogeográfica		X	X	
-Análises definitivas			X	X
-Redação dos artigos			X	X

As visitas à Estação Ecológica do Caiuá, para a coleta de material de *Mouriri* segue duas datas distintas, que visam encontrar as espécies em um momento com flores, e em outro com frutos. Assim, as visitas estão previstas para:

- Entre setembro e outubro de 2021;
- E entre os meses de maio e julho de 2022.