

**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

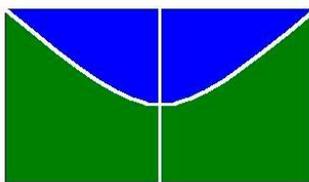
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**Ecologia e relações filogenéticas de *Blepharocalyx salicifolius*  
(Kunth) O. Berg (MYRTACEAE).**

**Plauto Simão de Carvalho**

Brasília

Fevereiro, 2013.



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**Ecologia e relações filogenéticas de *Blepharocalyx salicifolius*  
(Kunth) O. Berg (MYRTACEAE).**

**Plauto Simão de Carvalho**

Orientador: John Du Vall Hay (Ecologia/UnB)

Co-orientadora: Carolyn Proença (Botânica/UnB)

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia  
da Universidade de Brasília para a obtenção  
do título de Doutor em Ecologia.

Brasília

Fevereiro, 2013.



Tese de Doutorado

**PLAUTO SIMÃO DE CARVALHO**

Título:

“Ecologia e relações filogenéticas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (MYRTACEAE)”.

**Banca Examinadora:**

*Prof. Dr. John Du Vall Hay*  
Presidente / Orientador  
ECL/UnB

*Prof. Dr. Mário Almeida Neto*  
Membro Titular  
UFG

*Prof. Dr. Manoel Cláudio Silva Júnior*  
Membro Titular  
EFL/UnB

*Prof. Dr. Marcelo Fragomeni Simon*  
Membro Titular  
Embrapa/Cenargen

*Profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti*  
Membro Titular  
UFG

*Prof. Dr. Raimundo Paulo Barros Henriques*  
Suplente  
ECL/UnB

Brasília, 06 de março de 2013.

## CERTEZA

Descrição do que é a certeza  
à luz das nossas atitudes,  
no dia-a-dia do nosso comportamento,  
nas sutilezas da nossa existência.

Se plantas ventos fortes, maldade,  
com certeza colherás infortúnios, tempestade.  
contudo, porém, se plantas amor, bondade,  
com certeza colherás paz, felicidade...

Haroldo

## Dedicatória

Esta obra dedico à minha família, meu porto  
seguro. Obrigado por serem  
meu apoio nesta longa caminhada.

Clarice, Haroldo, Livia e Sabrina, amo vocês.

## **Agradecimentos**

Ao **CNPq** e **CAPES** pelas bolsas concedidas durante meu doutoramento.

Ao Departamento de Ecologia da **Universidade de Brasília** pelo apoio. Agradeço imensamente ao **LGBio** (coord. Rosane Collevatti) pelo tempo que passei gerando parte dos resultados obtidos nesta tese. Obrigado ao **Department of Plant Science** da **Universidade de Oxford** por ter me recebido como aluno visitante. Muito obrigado ao laboratório **Jodrell** do **Royal Botanic Garden (KEW)**, maravilhosos anfitriões (Eve Lucas, Felix Forest, Dion, Lola).

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de algum modo participaram direta ou indiretamente deste importante período acadêmico.

Obrigado à minha querida família, Haroldo, Clarice e Lívia. Obrigado Sabrina, Manoel, Hay, Carol, Stephen, Eve, Daniele, Rosane, Magda, Karolina... a injusta lista para os não citados, não menos importantes.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
O GÊNERO BLEPHAROCALYX .....	15
ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DE <i>BLEPHAROCALYX SALICIFOLIUS</i> .....	16
<i>BLEPHAROCALYX SALICIFOLIUS</i> E A HISTÓRIA BIOGEOGRÁFICA DE MYRTACEAE NA AMÉRICA DO SUL .....	19
PROPOSTA DE INVESTIGAÇÃO DA VARIAÇÃO MORFOMÉTRICA, GENÉTICA E DE ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>BLEPHAROCALYX SALICIFOLIUS</i> .....	22
<b>CAPÍTULO 2 - VARIAÇÃO MORFOMÉTRICA FOLIAR DE <i>BLEPHAROCALYX SALICIFOLIUS</i> (KUNTH) O. BERG (MYRTACEAE) .....</b>	<b>24</b>
INTRODUÇÃO .....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
<i>Amostras botânicas</i> .....	25
<i>Amplitude da distribuição biogeográfica da plasticidade foliar</i> .....	26
<i>Seleção de variáveis morfométricas</i> .....	26
<i>Análises morfométricas</i> .....	27
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO .....	36
CONCLUSÃO .....	38
<b>CAPÍTULO 3 - BIOGEOGRAFIA DE <i>BLEPHAROCALYX SALICIFOLIUS</i> (KUNTH) O. BERG E AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE ESPÉCIES MYRTACEAE DA AMÉRICA DO SUL.....</b>	<b>39</b>
INTRODUÇÃO .....	39
MATERIAL E MÉTODOS .....	41
<i>Populações amostradas e extração de DNA</i> .....	41
<i>Dados genéticos para análise filogenética</i> .....	43
<i>Seleção de primers, amplificação e sequenciamento do DNA</i> .....	43
<i>Geração dos haplótipos</i> .....	44
<i>Análise dos dados</i> .....	45
<i>Calibrações de fósseis</i> .....	46
RESULTADOS.....	47
<i>Análise descritiva das regiões avaliadas</i> .....	47
<i>Rede de haplótipos</i> .....	50
<i>Inferências filogenéticas</i> .....	51
DISCUSSÃO.....	58

CONCLUSÃO .....	60
<b>CAPÍTULO 4 - ESTRUTURA E DINÂMICA POPULACIONAL DE <i>BLEPHAROCALYX SALICIFOLIUS</i> (KUNTH) O. BERG EM CERRADO SENTIDO RESTRITO NO BRASIL CENTRAL.....</b>	<b>62</b>
INTRODUÇÃO .....	62
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
<i>Local de estudo</i> .....	63
<i>Coleta de dados</i> .....	66
<i>Análise dos dados</i> .....	66
RESULTADOS.....	67
<i>Dados populacionais CO e CV-JBB</i> .....	67
<i>Dinâmica Populacional</i> .....	71
DISCUSSÃO.....	73
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>92</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-1:** *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg – (A) hábito, (B) inflorescência e (C) tronco.....18
- Figura 2-1:** Distribuição dos *vouchers* selecionados para estudo morfométrico de *Blepharocalyx salicifolius* por biomas brasileiros. Onde: Floresta Amazônica (verde claro), Cerrado (verde escuro), Caatinga (bege), Floresta Atlântica (amarelo) e Pampa (Campos Sulinos) (amarelo escuro). Escala 1:5.000.000.....28
- Figura 2-2:** Análise de componentes principais (PCA) das variáveis morfométricas foliares dos *vouchers* e tipos de *Blepharocalyx salicifolius*. .....29
- Figura 2-3:** Reconstrução das formas foliares médias (D.P.=desvio padrão) da análise de contorno de folhas de *Blepharocalyx salicifolius*.....30
- Figura 2-4:** Análise de componentes principais (PCA) de caracteres morfométricos foliares de *Blepharocalyx salicifolius*: (A) ordenação de todas as variáveis analisadas e distribuição em categorias morfométricas (nomes em vermelho), (B) ordenação de variáveis representativas da variação morfométrica de *B. salicifolius* agrupados por biomas e respectivas formas foliares (tamanhos relativos).....33
- Figura 3-1:** Sequências de *psbA-trnH* de espécies de Myrtaceae incluindo região de inversão de 21bp (retângulo vertical) flanqueadas por inversões repetidas de 10bp. Grupos conspecíficos estão destacados por retângulos horizontais. Sinais positivos no topo indicam sítios conservados. ....49
- Figura 3-2:** Rede de haplótipos baseado em *psbA-trnH* de *Blepharocalyx salicifolius*. .....50
- Figura 3-3:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana de cloroplasto e DNA nuclear: cpDNA (*psbA-trnH*, *matK*) + nDNA (ETS + ITS) com valores de probabilidade posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *B. salicifolius*. .....54
- Figura 3-4:** Relação filogenéticas de Myrteae Sul-Americanas e haplótipos de *B. salicifolius* com tempos de divergência calibrados com registro fóssil por modelo de relógio relaxado provenientes de matriz de dados de cloroplasto *psbA-trnH* e *matK* e nucleares ITS e ETS. Probabilidades posteriores (em cima) e estimativa média (Ma, embaixo), barras azuis representam intervalo de 95% de credibilidade das estimativas de tempo de divergência. ....57
- Figura 3-5:** Gráfico das estimativas de distribuição posteriores dos tempos do ancestral comum mais recente de dados de cloroplasto (*psbA-trnH*) e nuclear (ETS e ITS) de espécies de Myrtaceae e linhagens de *Blepharocalyx salicifolius* baseado em inferência bayesiana. ....57
- Figura 3-6:** Árvore de tempo de divergência entre linhagens de *B. salicifolius* calibrados com registro fóssil por modelo de relógio relaxado provenientes de

matriz de dados de cloroplasto (psbA-trnH) e ETS. Números próximos aos nós são valores de suporte das probabilidades posteriores. ....58

**Figura 4-1:** Áreas de cerrado sentido restrito onde as populações de *B. salicifolius* foram amostradas. (A) população Centro Olímpico (CO); (B) população Centro de Visitação do Jardim Botânico de Brasília (VC-JBB); (C) população do Interflúvio. Fonte: Google Earth. ....65

**Figura 4-2:** Distribuição diamétrica dos indivíduos lenhosos de duas populações de *B. salicifolius* amostradas em cerrado sentido restrito no Brasil Central. Onde: barras branca=CO, barras cinza=CV-JBB. ....69

**Figura 4-3:** Distribuição das alturas dos indivíduos lenhosos de duas populações de *B. salicifolius* amostradas em duas áreas de cerrado sentido restrito no Brasil Central. Barras branca=CO; barras cinza=CV-JBB. ....70

**Figura 4-4:** Distribuição diamétrica comparativa dos indivíduos lenhosos de *B. salicifolius* amostrados em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília. Barras - branca (1997); cinza (2003); preta (2009). ....72

**Figura 4-5:** Distribuição temporal das alturas dos indivíduos lenhosos de *B. salicifolius* amostradas em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília. Barras - branca (1997); cinza (2003); preta (2009). ....73

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2-1:</b> Estatística descritiva das variáveis morfométricas de folhas de <i>vouchers</i> e tipos de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> .....	29
<b>Tabela 2-2:</b> Matriz de correlação entre variáveis morfométricas foliares de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> .....	31
<b>Tabela 2-3:</b> Comparação dos valores de explicação, inflação e significância dos eixos da análise de componentes principais com as diferentes combinações de variáveis morfométricas de folhas de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> .....	32
<b>Tabela 2-4:</b> Comparação das variáveis morfométricas* de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> em diferentes Biomas. Valores Médios $\pm$ Desvio Padrão (Coeficiente de Variação %). .....	34
<b>Tabela 3-1:</b> Origem e número de indivíduos coletados de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg. ....	42
<b>Tabela 3-2:</b> Marcadores e <i>primers</i> utilizados e respectivos protocolos de amplificação de DNA. ....	43
<b>Tabela 3-3:</b> Condições otimizadas de amplificação das regiões selecionadas neste estudo.....	44
<b>Tabela 3-4:</b> Lista dos 14 indivíduos de <i>B. salicifolius</i> selecionados com base na rede de haplótipos da região <i>psbA-trnH</i> .....	45
<b>Tabela 3-5:</b> Calibrações utilizadas para datar análises moleculares com espécies de Myrtaceae (Ma = milhões de anos); Fonte: (Biffin et al. 2010). ....	47
<b>Tabela 3-6:</b> Composição de nucleotídeos das regiões cloroplastidiais e nucleares avaliadas neste estudo (gaps e sítios ambíguos excluídos) de espécies de Myrtaceae.....	48
<b>Tabela 4-1:</b> Parâmetros biométricos médios de duas populações de <i>B. salicifolius</i> amostradas em cerrado sentido restrito no Brasil Central. Entre parênteses valores de coeficiente de variação (%). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam médias significativamente diferentes ( $p=0,0001$ ).....	68
<b>Tabela 4-2:</b> Valores de quocientes 'q' de Licourt de duas populações de <i>B. salicifolius</i> amostradas em cerrado sentido restrito no Brasil Central. (*) sem dados para a classe diamétrica. ....	69
<b>Tabela 4-3:</b> Número de indivíduos com bifurcações no caule, medidas a 30 cm do solo (BAS), em indivíduos de duas populações de <i>B. salicifolius</i> amostradas em duas áreas de cerrado sentido restrito no Brasil Central (CO e CV-JBB). ....	70
<b>Tabela 4-4:</b> Variação temporal nos parâmetros estruturais de <i>B. salicifolius</i> amostrada em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília. Entre parênteses valores de coeficiente de variação (%). ....	71
<b>Tabela 4-5:</b> Variação temporal nos valores de quocientes 'q' de Licourt de <i>B. salicifolius</i> em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília. ....	72

## LISTA DE MATERIAL COMPLEMENTAR

- Material Suplementar 1:** Lista dos 97 vouchers de coletas de *Blepharocalyx salicifolius* e 28 tipos utilizados para estudos de morfometria foliar e inferência biogeográfica.....92
- Material Suplementar 2:** Sequências utilizadas nos estudos filogenéticos com seus respectivos acessos no Genbank; itens marcados com (\*) são sequências geradas neste estudo para indivíduos (haplótipos) de *Blepharocalyx salicifolius*. .....95
- Material Suplementar 3:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de *psbA-trnH* com valores de probabilidades posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*. .....99
- Material Suplementar 4:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de *matK* com valores de probabilidades posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*. ..... 100
- Material Suplementar 5:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de ETS com valores de probabilidade posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *B. salicifolius*. ..... 101
- Material Suplementar 6:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de ITS com valores de probabilidades posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*. ..... 102
- Material Suplementar 7:** Árvore consenso resultante da Análise Bayesiana (BA) de cpDNA + ITS com valores de probabilidade posteriores de espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*. ..... 103
- Material Suplementar 8:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de cpDNA (*psbA-trnH* e *matK*) com valores de probabilidade posteriores para espécies de Myrtaceae e *Blepharocalyx salicifolius*. ..... 104

## RESUMO

*Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg apresenta ampla distribuição latitudinal na América do Sul, principalmente em território brasileiro, e ocorre tanto em Cerrado quanto em Floresta Atlântica. O objetivo desta tese foi estudar esta espécie levantando dados sobre variações na morfologia foliar em diferentes biomas, variação genética de diferentes populações em escala regional utilizando quatro marcadores genéticos (psbA-trnH, matK, ETS e ITS) e aspectos locais de estrutura populacional e dinâmica populacional da espécie em áreas de cerrado sentido restrito (preservados do fogo e perturbadas com fogo frequente) no Planalto Central. A espécie apresentou alta plasticidade foliar evidenciada pelas análises morfométricas. A variação morfológica das folhas mostrou consistente relação com biomas. A plasticidade foliar de formas e tamanhos de *B. salicifolius* corresponde a ampla distribuição geográfica da espécie e condições bioclimáticas específicas contribuem para formas de folha mais particulares. As formas foliares mais plásticas foram encontradas em Floresta Atlântica. Os resultados das diferentes combinações dos marcadores avaliados neste estudo mostraram que *B. salicifolius* é monofilético. O gênero, contudo se mostrou parafilético. *B. salicifolius* apareceu como grupo irmão do grupo *Pimenta*. A história evolutiva desta espécie parece estar mais relacionada a interações em escala maior entre Floresta Atlântica e Cerrado e uma possível migração Sul-Norte. A análise comparativa da estrutura populacional de *B. salicifolius* mostrou que a densidade dos seus indivíduos foi maior na área protegida de queimadas. A espécie parece ser competidora por altura, uma vez que a presença ou ausência de distúrbio não modificou a distribuição por altura. Em ambientes protegidos do fogo sua densidade foi alta o que afetou a estrutura populacional de modo que a maior parte dos indivíduos da população são constituídos por indivíduos altos e de diâmetro pequeno.

**Palavras-chave:** morfometria, filogeografia, cpDNA, nDNA, estrutura populacional, Cerrado, Floresta Atlântica.

## ABSTRACT

*Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg presents broad latitudinal distribution in South America, especially in Brazil, and occurs in both Cerrado and in the Atlantic Forest. The aim of this thesis was to study the variation on leaf morphometry from different biomes, the genetic variation from different populations on a regional scale using four genetic markers (psbA-trnH, matK, ETS and ITS), and local aspects of population structure and dynamics population of the species in areas of cerrado *sensu stricto* (preserved from the fire and disturbed by frequent fire) in the core area of the tropical savanna. The species had high leaf plasticity evidenced by morphometric analysis. The morphological variation of leaves showed consistent relationship with biomes. The plasticity of leaf shapes and sizes of *B. salicifolius* match the wide geographic distribution of the species and wide bioclimatic conditions of occurrence. The more plastic leaf shapes were found in the Atlantic Forest. The results of different combinations of genetic markers showed that *B. salicifolius* is monophyletic. The genus however proved to be paraphyletic. *B. salicifolius* appeared as sister group to the group *Pimenta*. The evolutionary history of this species seems to be more related to larger-scale interactions between the Atlantic Forest and Cerrado and a possible South-North migration. A comparative analysis of population structure of *B. salicifolius* showed that the density was higher in protected when compared with frequent burned are. This species seems to be height competitor, since the presence or absence of disturbance does not modify the height distribution on populations. In the fire protected area the density was high which affected the population structure so that the majority of individuals in the were constituted by high and small diameter individuals.

**Keywords:** morphometry, phylogeography, cpDNA, nDNA, population structure, Cerrado, Atlantic Forest.

## Capítulo 1 - Introdução Geral

### O gênero *Blepharocalyx*

*Blepharocalyx* O. Berg (Linnaea 27: 412, 1856) é um gênero sul-americano atualmente representado por quatro espécies e ocorre desde o Caribe até o sul do Chile (Landrum 1986, Morais & Lombardi 2006, World Checklist of Myrtaceae 2006): *B. cruckshanksii* (Hook. & Arn.) Nied. (endêmica do Chile), *B. eggertii* (Kiaersk.) Landrum (Amazônia e Caribe), *B. myriophyllus* (Casar.) Morais & Sobral, recentemente transferido para o gênero (Morais & Lombardi 2006), endêmica da Cadeia do Espinhaço no Brasil Central e *B. salicifolius* (Kunth) O. Berg (Brasil, Bolívia, Argentina, Uruguai e Equador).

O gênero é composto por arbustos ou árvores com até 30 metros de altura, apresentam indumento com tricomas amarelados ou de coloração cobre, unicelulares. As folhas são persistentes, subcoriáceas à submembranosas e com venação do tipo broquidódroma. A inflorescência é do tipo dicásio com 3 a 14 flores, panícula com aproximadamente 30 flores em subunidades dicasiais, ou com flores isoladas (*B. myriophyllus*); as flores são tetrâmeras, com cálice tetralobado persistentes até o fruto maduro (*B. cruckshanksii*), caducos durante a antese (*B. salicifolius*) ou completamente fechados em botão que se rasga em quatro lobos senescentes durante a antese (*B. eggertii*); pétalas brancas, suborbiculares; o ovário é bilocular; 4-17 óvulos por lóculo. O fruto é do tipo baga globosa. Apresentam 1-15 sementes por fruto, reniformes, com testa membranácea ou cartilaginosa. O embrião é reniforme do tipo mirtóide, em formato de C, espiral, ou levemente curvado, e os cotilédones são relativamente pequenos (Landrum 1986, Morais & Lombardi 2006).

Landrum (1986) realizou revisão do gênero e sinonimizou vários nomes em *Blepharocalyx salicifolius*, e muitas destas espécies sinonímias, variantes morfológicas sem valor taxonômico, foram descritas no século XIX. Por outro lado, a circunscrição excessivamente ampla de *B. salicifolius* foi alvo de crítica, e vários

taxonomistas manifestaram a opinião que podem existir algumas espécies verdadeiras entre elas (comunicação pessoal: Carolyn Proença, Marcos Sobral).

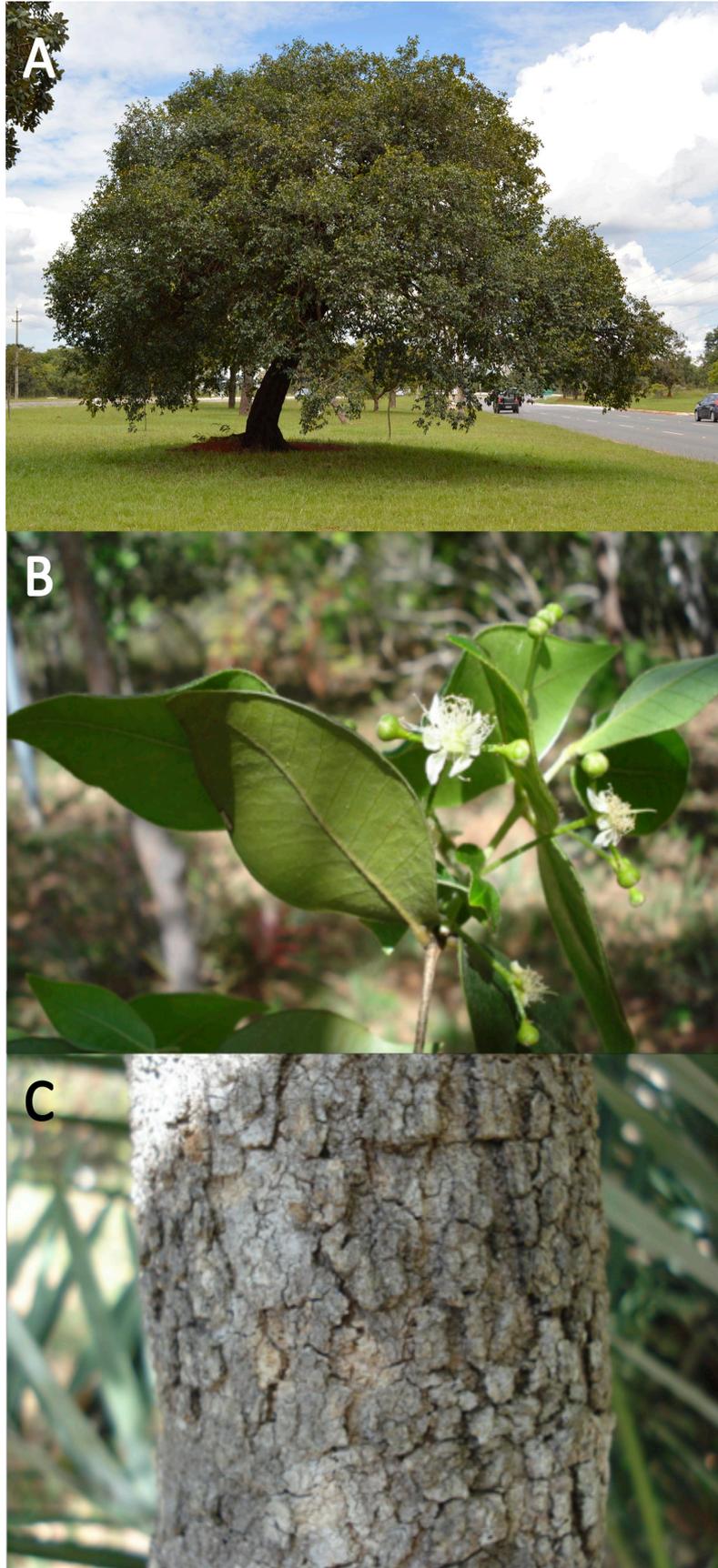
### **Aspectos biológicos e ecológicos de *Blepharocalyx salicifolius***

Popularmente conhecida como Maria-preta, Murta ou Guaramirin. Pode ser encontrada em vários países do Cone Sul como Paraguai, Uruguai, Argentina (Misiones a Jujuy), Bolívia e no Equador. No Brasil, sua distribuição é ampla e ocorre nos estados da Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SpeciesLink 2012). Esta espécie pode ser encontrada nas Florestas Estacional Decidual, Estacional Semidecidual, Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, em Vegetação com Influência Marinha (Restinga), no Cerrado e Cerradão, e em Estepes ou Campos (Rego et al. 2009), contudo de ocorrência restrita (Nunes et al. 2002, Bridgewater & Ratter 2004).

Esta espécie apresenta grande variação de tamanho (2 a 30m), e pode ser encontrada com hábito arbustivo ou arbóreo (Figura 1-1), dependendo do ecossistema de ocorrência. O fuste é geralmente reto e pode apresentar até 40 cm de diâmetro na altura do peito (Silva Júnior 2012). Trata-se de uma espécie secundária tardia ou clímax exigente de luz (Carvalho, 2006), perenifólia, seletiva higrófila e desenvolve-se desde campos abertos até sub-bosques desenvolvidos. Contudo, é considerada brevidecídua no Cerrado por outros autores (Bucci et al. 2008). *Blepharocalyx salicifolius* pode ser encontrada em Matas de Galeria e em solos úmidos no interior de florestas com Araucária (Florestas Estacionais Semidecíduais Mistas), ambiente onde a espécie pode alcançar os maiores estágios de desenvolvimento (Legrand & Klein 1978).

Os frutos são do tipo baga globosa de 3 a 5 mm, de coloração alaranjada a avermelhada, glabros, com uma cicatriz quadrangular e possuem até quatro sementes que são reniformes e medem de 4 a 5 mm de comprimento cujos embriões possuem forma espiralada (Rego et al. 2009). O período de maturação dos

frutos é geralmente de janeiro a março e a dispersão dos frutos e sementes é zoocórica, realizada principalmente por aves (Silva Júnior 2012).



**Figura 1-1:** *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg – (A) hábito, (B) inflorescência e (C) tronco.

## ***Blepharocalyx salicifolius* e a história biogeográfica de Myrtaceae na América do Sul**

Estudos mostram que Myrtaceae é uma das mais ricas famílias neotropicais, e contribui com expressivo número de espécies em importantes ecossistemas no continente Sul-americano, cerca de 10 a 15 por cento de todas as espécies arbóreas de florestas úmidas e cerrados do Brasil (Oliveira-Filho & Fontes 2000). A maior diversidade global de Myrtaceae ocorre na América do Sul (McVaugh 1968) e, diante da importância biológica desta família neste continente, estudos são necessários para investigar possíveis fatores históricos que podem ter influenciado a distribuição moderna da família na América do Sul.

O padrão disjunto da distribuição de espécies de Myrtaceae alimenta debates sobre a história filogeográfica desta família e muitos estudos tratam a temática da história evolutiva de Myrtaceae (Lucas et al. 2007, Berry 1916, Raven & Axelrod 1974, Johnson & Briggs 1984b, Pigg et al. 1993, Wilson et al. 2001a, Sytsma et al. 2004). As teorias mais atuais foram propostas com base em dados filogenéticos, morfológicos (Briggs & Johnson 1979, Johnson & Briggs 1984b) e dados genéticos que sugerem a origem de Myrtaceae em Gondwana, e que Myrteae, tribo que corresponde às mirtáceas subtropicais, originou e diversificou na Australásia a 77-56 milhões de anos (MA), quando a Austrália ainda era conectada à América do Sul via pontes continentais de florestas temperadas (Wilson et al. 2001a, Sytsma et al. 2004, Biffin et al. 2010, Lucas et al. 2007).

Testes de hipóteses de modelos de centro de origem, colonização e diversificação podem fornecer informações importantes acerca de processos evolutivos e da distribuição da diversidade biológica no tempo e no espaço com base em táxons existentes remanescentes (Lohmann et al. 2013, Simon et al. 2009). Neste sentido, a calibração dos tempos evolutivos em árvores filogenéticas pode ser uma importante abordagem da investigação de padrões biogeográficos na distribuição da diversidade de espécies de Myrtaceae na América do Sul, a exemplo do que foi feito para a tribo Bignonieae (Bignoniaceae) (Lohmann et al. 2013) e para espécies dos gêneros *Mimosa* e *Andira* (Simon et al. 2009).

Um exemplo desta abordagem está relacionado com estudos interessados em reconstruir a história evolutiva de ecossistemas Sul-americanos. Entender a histórica evolutiva de espécies que ocorrem em ecossistemas tropicais com alta diversidade biológica ainda é um desafio, especialmente no que se refere a quando, quão rapidamente, e de onde as espécies e linhagens que compõem diferentes biomas foram recrutadas e se, ou como posteriormente evoluíram *in situ* (Simon et al. 2009). Neste caso, estudos filogeográficos em nível intraespecífico de espécies compartilhadas podem indicar padrões ou derrubar certos paradigmas relacionados ao estudo biogeográfico na região Neotropical.

Isto é especialmente verdadeiro para o bioma Cerrado, uma vez que ainda não foi possível formular uma teoria consistente e robusta quanto à origem e diversificação da sua flora. As hipóteses sobre as origens do Cerrado remontam desde o início do Cretáceo (Ratter et al. 1997) e mudanças climáticas do Holoceno podem ter influenciado os padrões de distribuição e diversidade de importantes grupos de plantas (Bignoniaceae, por exemplo) (Lohmann et al. 2013). Linhagens de grupos ocorrentes em Cerrado podem estar fortemente associadas com adaptações ao fogo, além disso, muitas destas linhagens podem apresentar grupos irmãos em ecótonos com outros biomas, em florestas úmidas, florestas sazonalmente secas, pastagens subtropicais e pantanal (Simon et al. 2009). A correspondência entre aparecimento de linhagens de Cerrado formadas *in situ* através de recentes e frequentes mudanças adaptativas para resistir ao fogo, que teria se tornado um efeito constante neste tipo de vegetação, parece ser uma hipótese razoável e dados de diferentes grupos podem fortalecer esta hipótese (Simon et al. 2009).

Apesar dos avanços no inventário de espécies e o reconhecimento de padrões de distribuição da diversidade biológica em gradientes, o entendimento das causas e consequências destes padrões ainda é um desafio e resultados obtidos até o momento são fragmentados (Donoghue 2008). Forças bioclimáticas e seletivas podem definir tanto indícios de processos evolutivos alopátricos (Donoghue 2008) como forças evolutivas *in situ* decorrentes de processos evolutivos simpátricos (Simon et al. 2009). O reconhecimento destes padrões não é trivial e a escolha de organismos modelos pode ser definitiva para que determinados padrões sejam mais

evidentes. O conhecimento da biologia do organismo estudado é absolutamente útil, uma vez que se podem testar hipóteses adequadas além de possibilitar avaliações mais assertivas da viabilidade de processos como dispersão, adaptação e migração.

Alguns estudos sugerem que espécies tendem a migrar para áreas com nichos semelhantes do que evoluírem adaptações para um nicho diferenciado (Donoghue 2008). Esta conclusão parece estar condicionada à existência de pontes conectoras ou corredores geográficos/ambientais durante um período de mudança climática. Nestas circunstâncias, organismos vegetais poderiam se dispersar relativamente rápido (Donoghue 2008). De modo geral, não parece ser o caso para fitofisionomias savânicas do Cerrado, já que existem indícios baseados em inferências filogenéticas de grupos amplamente distribuídos de que a diversificação tenha ocorrido *in situ* (Simon et al. 2009). Neste caso forças adicionais teriam influenciado a diversificação de grupos vegetacionais como o fogo e a sazonalidade climática (Simon et al. 2009, Pennington et al. 2009).

Apesar das muitas hipóteses para explicar a biogeografia da diversidade de plantas na região Neotropical, somente estudos recentes puderam explicitar modelos baseados em testes de hipóteses biogeográficos via inferência filogenética (Lohmann et al. 2013, Pennington & Dick 2004, Särkinen et al. 2007, Simon et al. 2009). Estes padrões biogeográficos podem ser conflitantes em função do grupo escolhido e esta diferença pode estar relacionada a como estes grupos respondem aos fatores ambientais (Lohmann et al. 2013, Simon et al. 2009, Collevatti et al. 2012). Portanto, a seleção do grupo de estudo é fundamental para a investigação de determinado processo biogeográfico e pode ser um fator complicador na busca de padrões regiões de diversidade biológica.

Neste contexto, táxons que apresentam ampla distribuição e que possuem altos níveis de diversidade morfológica podem ser organismos de interesse investigativo em estudos evolutivos e biogeográficos (Lohmann et al. 2013). A espécie *Blepharocalyx salicifolius* apresenta ampla distribuição e possui alta plasticidade morfológica nos diferentes ecossistemas que ocorre, características que nos incentivaram a aprofundar o conhecimento ecológico e biogeográfico desta espécie.

Análises filogenéticas recentes (Lucas et al. 2007) apontam *Blepharocalyx salicifolius* como espécie irmã de todas as mirtáceas da América do Sul, representadas pela tribo Myrteae. Estudos taxonômicos incluem esta espécie como uma forte candidata a ser basal em Myrteae (Landrum 1986). Indubitavelmente, *Blepharocalyx* é um gênero de interesse no que se refere à investigação das relações filogenéticas em nível de subtribo e na consolidação de caracteres morfológicos plesiomórficos de Myrteae. Acreditamos que a investigação da história evolutiva destas linhagens podem oferecer indícios dos processos evolutivos envolvidos na diversificação de Myrtaceae no continente Sul Americano.

### **Proposta de investigação da variação morfométrica, genética e de estrutura populacional de *Blepharocalyx salicifolius***

O objetivo desta tese foi estudar a espécie *B. salicifolius* levantando dados sobre variações na morfologia foliar, variação genética de diferentes populações em escala regional e aspectos locais de estrutura populacional e dinâmica populacional desta espécie em área de cerrado sentido restrito no Planalto Central. Nossa expectativa foi de que os dados gerados pudessem oferecer observações e conclusões a respeito de processos ecológicos e biogeográficos envolvidos na sua distribuição geográfica, a plasticidade morfológica nos diferentes ecossistemas de ocorrência desta espécie. Nossa expectativa também foi no sentido de entender a relação evolutiva de *B. salicifolius* com as demais espécies de Myrtaceae na América do Sul e, com sorte, sugerir extrapolações para clarear processos importantes no entendimento da história evolutiva de Myrtaceae para o continente Sul Americano.

Para tanto, realizamos um extenso levantamento em vários herbários brasileiros em busca de dados úteis na investigação de processos biogeográficos no gradiente ecológico de distribuição desta espécie. Ampla coleta de material biológico também foi conduzida com o objetivo de explorar um possível padrão biogeográfico da distribuição de linhagens genealógicas para *B. salicifolius* e entender a relação desta espécie dentro da tribo Myrteae. Mais de 1300 indivíduos desta espécie foram

medidos objetivando-se avaliar processos ecológicos e adaptativos de populações submetidas a diferentes condições de regime de fogo.

Neste sentido, conduzimos a formulação de quatro capítulos sendo o primeiro é composto por esta introdução e outros três capítulos de dados empíricos e análise de dados citados a seguir:

- O capítulo dois é intitulado “Variação Morfométrica Foliar de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (MYRTACEAE)”. Nele avaliamos aspectos biogeográficos da distribuição da variação morfométrica foliar desta espécie no gradiente ecológico de distribuição em escala regional.
- O terceiro capítulo é “Biogeografia de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg e as relações filogenéticas de espécies Myrtaceae da América do Sul”. Neste capítulo continuamos a investigação do padrão de distribuição e estrutura geográfica baseado em filogenias desta espécie. Procuramos entender a relação de linhagens genealógicas de *B. salicifolius* e a relação desta com os demais grupos de espécies de Myrtaceae na América do Sul.
- No quarto capítulo, chamado “Estrutura e dinâmica populacional de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg em cerrado sentido restrito no Brasil Central”, estudamos as estratégias populacionais em áreas de cerrado sentido restrito no Brasil Central com diferentes históricos de fogo e distúrbios antrópicos. Foram obtidos resultados que puderam fornecer melhor entendimento de estratégias adaptativas desta espécie.

Ao final da apresentação dos capítulos citados acima, são apresentadas as Conclusões Finais e a possível conectividade entre os resultados gerados. Materiais suplementares, citados durante o texto, estão reunidos ao final deste manuscrito, bem como as referências citadas nesta obra.

## Capítulo 2 - Variação Morfométrica Foliar de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (MYRTACEAE)<sup>1</sup>

### Introdução

Táxons amplamente distribuídos e com altos níveis de diversidade morfológica são excelentes modelos para estudos evolutivos e biogeográficos (Lohmann et al. 2013). *Blepharocalyx salicifolius* pode representar uma espécie de interesse para estudos biogeográficos de espécies de Myrtaceae na América do Sul, pois além de apresentar ampla distribuição, tem alta plasticidade morfológica e ocorre em diferentes ecossistemas. Além disso, combina duas características ecológicas dominantes na região Neotropical: polinização por abelhas e dispersão por aves (Proença 1992).

Trata-se de uma espécie de interesse filogenético uma vez que é candidata a ser grupo irmão de todas as espécies de Myrtaceae da América do Sul (Lucas et al. 2007). A maior diversidade desta família ocorre na América do Sul (McVaugh 1968) e sua representatividade nos diferentes domínios vegetais é variável e igualmente interessante (Oliveira-Filho & Fontes 2000). A julgar pela importância ecológica desta família em ambientes de Floresta Atlântica, onde apresenta a maior diversidade de espécies lenhosas, e para Cerrado uma das mais importantes famílias em número de espécie (Mori et al. 1983, Oliveira-Filho & Fontes 2000), estudos são necessários para investigar possíveis padrões adaptativos que podem ter influenciado a distribuição moderna de Myrtaceae na região Neotropical.

A investigação da estrutura morfométrica de folhas de diferentes ambientes pode revelar descontinuidades e correspondência com gradientes ecológicos (Stenström et al. 2002, Borazan & Babaç 2003, Royer et al. 2005, Danquah et al. 2011). As variáveis mais citadas e amplamente empregadas para a análise morfométricas são:

---

<sup>1</sup> Manuscrito submetido à revista *Biotropica* com o título “*Leaf morphometric variation and biogeographic inferences of a Neotropical species*”.

o tamanho da folha, forma (ou contorno), e principalmente margem foliar (presença de dentes), sendo esta última a que apresenta os resultados mais significativos para o reconhecimento de linhagens e reconstrução de cenários passados (Gregory-Wodzicki 2000, Royer et al. 2005, Wiemann et al. 1998, Wolfe 1995). Espécies de Myrtaceae, no entanto, não têm arestas da folha com dentes, portanto, apenas variações de tamanho e forma, ou seus derivados, estão disponíveis para morfometria neste grupo. Estas duas variáveis, contudo, são muitas vezes correlacionadas com ambientes onde há variações de temperatura e umidade. Assim, os resultados do estudo morfométrico podem ser apropriados para uma série de questões biogeográficas (Borazan & Babaç 2003, Danquah et al. 2011, Dilcher 1973, Stenström et al. 2002, Wilf et al. 2003, Wolfe 1995).

Coleções botânicas digitalizadas representam uma fonte importante de dados de distribuição e diversidade biológica e podem ser utilizadas para obter dados morfométricos. Realizamos um estudo morfométrico de coleções de *B. salicifolius* depositadas em importantes herbários brasileiros para investigar o padrão de variação morfológica de folha de diferentes biomas. Nosso objetivo foi aplicar métodos morfométricos para testar a hipótese biogeográfica de diferença significativa em variáveis morfométricas foliares de *B. salicifolius* de diferentes biomas neotropicais.

## **Material e Métodos**

### *Amostras botânicas*

Realizamos levantamento em importantes herbários brasileiros que possuíam coleções significativas de *B. salicifolius* com base em informações contidas no site SpeciesLink (<http://slink.cria.org.br>). Em cada herbário toda a coleção de *B. salicifolius* foi fotografada para compor uma coleção digital da espécie. A partir destas imagens, 97 *vouchers* foram selecionados como representativos da amplitude de ocorrência da espécie. Outras 28 imagens de tipo de *B. salicifolius* (sensu Landrum 1986) foram também obtidas para a comparação (Material Suplementar 1). Pelo menos cinco folhas expandidas e bem preservadas de cada *voucher* foram aleatoriamente selecionadas para análise. Não foram feitas distinções entre nós, uma

vez que uma análise preliminar indicou não haver diferença significativa entre folhas de diferentes nós para esta espécie.

#### *Amplitude da distribuição biogeográfica da plasticidade foliar*

Os *vouchers* foram agrupados segundo os domínios biogeográficos (bioma) de ocorrência, projetando-se as coordenadas do local de coleta em *shape file* de biomas (IBGE 2004) usando software ArcGIS 9.3. As coordenadas foram obtidas a partir das etiquetas das exsicatas ou estimadas com base na cidade mais próxima e as projeções indicaram coletas nos biomas Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa (Campos Sulinos) (Figura 2-1). Com base em levantamento de herbário, sabe-se que *B. salicifolius* não ocorre nos tipos de vegetação da Caatinga, mas em fragmentos de Cerrado representados por fisionomias rochosas (campo rupestre). O mesmo acontece para os Pampas, onde esta espécie ocorre em manchas de Florestas Ombrófilas Semidecíduais Mistas (Floresta Atlântica) (Figura 2-1). Por esta razão, as coleções que ocorrem em áreas de domínio da Caatinga foram consideradas como manchas ou ecótonos entre biomas e foram nomeadas como Cerrado/Caatinga e nos Pampas, como a Floresta Atlântica/Pampas.

#### *Seleção de variáveis morfométricas*

As variáveis analisadas foram: os valores médios de área, comprimento, largura, razão foliar (comprimento / largura), e ângulos da base e ápice, calculados a partir de cada *voucher* e imagens de tipos. Todos os cálculos foram feitos utilizando o programa ImageJ ([http://http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html](http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html)). O contorno foliar também foi analisado, representado pelos descritores de componentes principais (PCA): PC1 e PC2. Foi realizada análise de contorno (*outline*) de folhas usando programa SHAPE (Yoshioka *et al.* 2004) que utiliza o método da Análise Elíptica de Fourier. Obtivemos as matrizes dos escores dos dois componentes mais importantes para contorno (PC1 e PC2) para cada *voucher*. Em seguida calculamos os valores médios de cada matriz como descritores de contorno de cada *voucher*.

### *Análises morfométricas*

Os descritores de contorno (PC1 e PC2) foram usados para reconstruir a variação de contorno foliar de *B. salicifolius* utilizando uma ferramenta do programa SHAPE que calcula a forma média virtual e desvio padrão (Yoshioka et al. 2004). Foram comparados os valores médios de *vouchers* e tipos pela análise de componentes principais (PCA), utilizando o programa PC - ORD 5.12 (McCune & Mefford 2006). As diferenças entre biomas foram testadas usando ANOVA com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e subsequente Student-Newman-Keuls (SNK) ( $\alpha = 0,05$ ).

Uma combinação de descritores morfométricos foi usada para reduzir a autocorrelação entre as variáveis. Várias combinações (modelos) foram testadas por PCA. Os modelos que tiveram vetores mais espaçados e baixos valores de correlação entre descritores foram: “PC1, razão, área, e PC2”, “ápice, comprimento, razão e PC2”, “PC1, razão, comprimento, e PC2”, e “ápice, área, razão e PC2”. O melhor modelo de variação da folha, para avaliação de gradiente biogeográfico, foi selecionado pelos resultados da PCA e matriz de correlação entre variáveis.

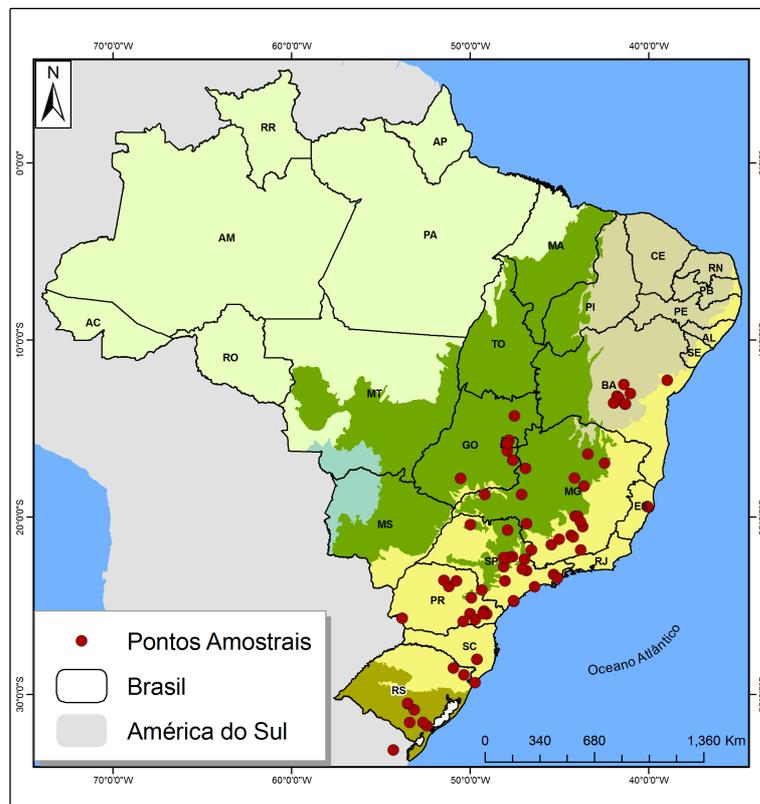
A PCA e matriz de correlação nos permitiu testar quatro diferentes combinações de variáveis morfométricas com o intuito de reduzir a autocorrelação entre as variáveis selecionadas (Tabela 2-3). Os critérios para escolha foram maior variância foliar explicada pelos dois primeiros eixos, significância baseada em teste de aleatorização e menor fator de inflação (Tabela 2-3). Levando em consideração a possibilidade de explorar maior significado biológico das combinações morfométricas, escolhemos o modelo: ângulo do ápice, área, razão e PC2 (Tabela 3) e estas variáveis foram utilizadas para explorar a existência de gradientes biogeográficos.

## **Resultados**

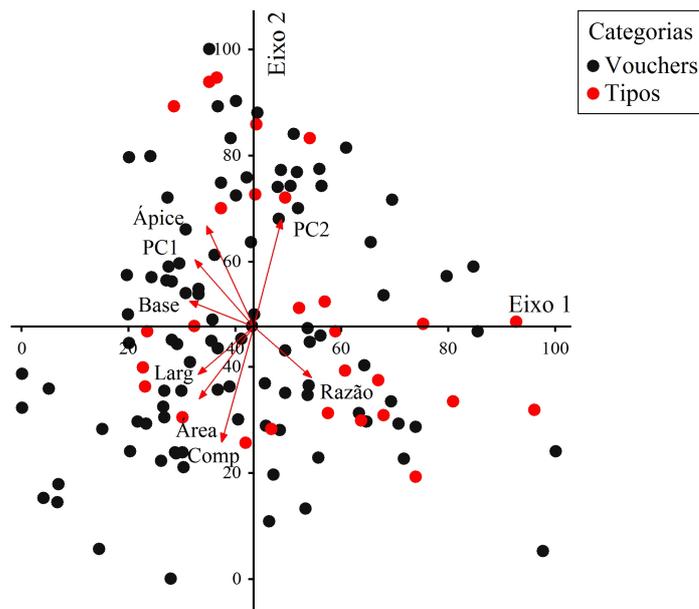
As folhas de *B. salicifolius* são essencialmente elípticas, mas podem variar desde muito-estrito-elípticas, com relações acima de 6, à estreito-ovadas e razão em torno de 1,7. O ápice pode ser acuminado ou atenuado com ângulos agudos a arredondados entre 10,0 e 77,4 graus. A base pode variar entre atenuada, aguda e

obtusa, com ângulos entre 13,3 e 103,9 graus. A variável área foliar apresentou o maior coeficiente de variação (70,5%) (Tabela 2-1).

A variação foliar expressiva de *B. salicifolius* observada correspondeu à amplitude esperada de plasticidade foliar uma vez que houve a sobreposição de pontos de *vouchers* e tipos na PCA (Figura 2-1). Isto indica que a distribuição geográfica do material escolhido corresponde à amplitude de variação desta espécie (Figura 2-3). As variáveis morfométricas analisadas apresentaram altos coeficientes de variação ( $\geq 29\%$ ) (Tabela 2-1). A alta plasticidade foliar relatada para esta espécie (Landrum 1986) foi corroborado pelos valores de coeficiente de variação das variáveis selecionadas neste estudo.



**Figura 2-1:** Distribuição dos *vouchers* selecionados para estudo morfométrico de *Blepharocalyx salicifolius* por biomas brasileiros. Onde: Floresta Amazônica (verde claro), Cerrado (verde escuro), Caatinga (bege), Floresta Atlântica (amarelo) e Pampa (Campos Sulinos) (amarelo escuro). Escala 1:5.000.000.

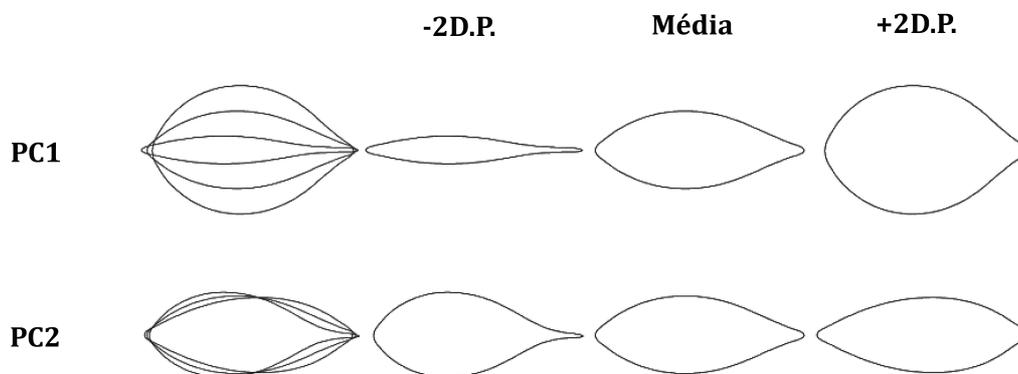


**Figura 2-2:** Análise de componentes principais (PCA) das variáveis morfométricas foliares dos *vouchers* e tipos de *Blepharocalyx salicifolius*.

**Tabela 2-1:** Estatística descritiva das variáveis morfométricas de folhas de *vouchers* e tipos de *Blepharocalyx salicifolius*.

	Área (cm <sup>2</sup> )	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Razão (C/L)	Ângulo Ápice	Ângulo Base
<b>Mínimo</b>	0,3	1,8	0,3	1,7	10,0	13,3
<b>Máximo</b>	14,7	7,0	3,3	10,9	77,4	103,9
<b>Média Aritmética</b>	4,4	4,0	1,5	3,1	44,8	61,3
<b>Desvio Padrão</b>	3,1	1,2	0,7	1,5	16,3	17,9
<b>Erro Padrão</b>	0,3	0,1	0,1	0,1	1,5	1,6
<b>Coefficiente de Variação (CV) (%)</b>	70,5	30,9	44,9	48,2	36,3	29,3

A análise de contorno, que capta a variação de formas, resultou em duas componentes principais, juntas foram responsáveis por 94,4% da variação, 87,8% de PC1 e PC2 com 6,6% (ambos significativos,  $p < 0,05$ ). A primeira componente de contorno (PC1) capturou variação nas formas ovais para elípticas (Figura 2-5), e compreendeu a maioria das variáveis analisadas, independentes do tamanho (ignorado nesta análise). Esse fato foi corroborado pelos valores relativamente elevados de correlação positiva entre PC1 e outras variáveis (Tabela 2-3). A componente de contorno PC2 capturou variações na base e ápice (Figura 2-5), importantes no estudo de variação morfométrica, pois apresentou baixas ou negativas correlações com a maioria das outras variáveis (Tabela 2-3). A forma média reconstruída é elíptica com ápice ligeiramente acuminado (Figura 2-5), forma foliar genérica e mais amplamente distribuída de *B. salicifolius*.



**Figura 2-3:** Reconstrução das formas foliares médias (D.P.=desvio padrão) da análise de contorno de folhas de *Blepharocalyx salicifolius*.

**Tabela 2-2:** Matriz de correlação entre variáveis morfométricas foliares de *Blepharocalyx salicifolius*.

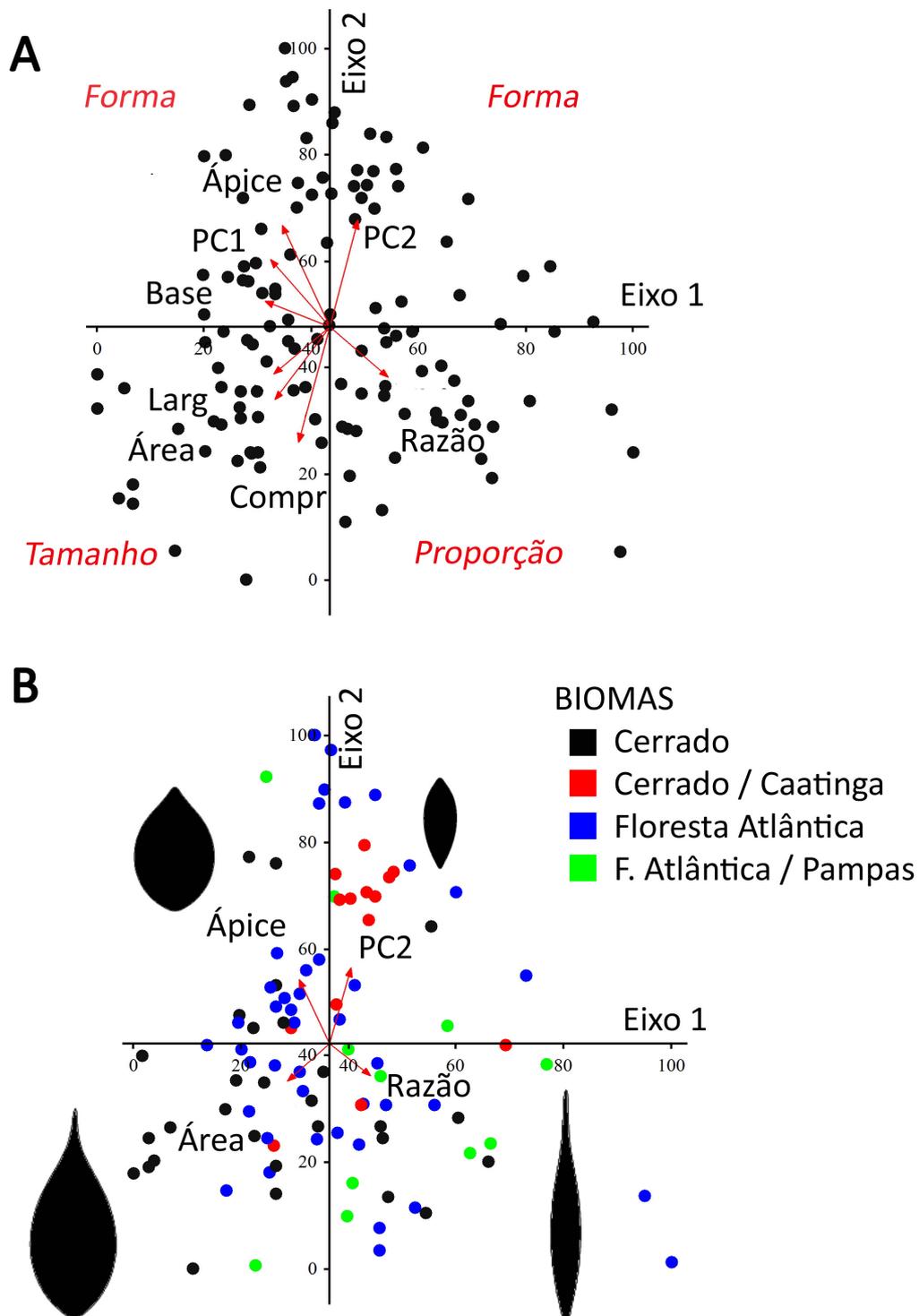
	Área média	Comprimento médio	Largura média	Ângulo do ápice médio	Ângulo da base médio	Contorno PC1 médio	Razão média	Contorno PC2 médio
<b>Área média</b>	1,000							
<b>Comprimento médio</b>	0,824	1,000						
<b>Largura média</b>	0,832	0,533	1,000					
<b>Ângulo do ápice médio</b>	0,286	-0,107	0,325	1,000				
<b>Ângulo da base médio</b>	0,624	0,274	0,635	0,743	1,000			
<b>Contorno PC1 médio</b>	0,483	0,094	0,514	0,914	0,918	1,000		
<b>Razão média</b>	-0,449	-0,065	-0,615	-0,741	-0,834	-0,842	1,000	
<b>Contorno PC2 médio</b>	-0,485	-0,560	-0,449	0,289	-0,386	-0,065	0,174	1,000

Os descritores de contorno PC1 e PC2 normalmente absorvem boa parte da variação muito em função da sensibilidade da análise de contorno pela análise Elíptica de Fourier. Contudo, estas variáveis têm menor valor biológico e normalmente autocorrelacionadas com outras variáveis morfométricas (Tabela 2-3). Dentre as combinações de variáveis morfométricas testadas, a combinação área, ápice, razão foliar e PC2 (Tabela 2-3) apresentaram a segunda maior porcentagem de explicação da variação dos dados foliares, baixo valor de inflação e significância dos eixos da PCA, portanto, foi a melhor combinação testada para as análises biogeográficas.

**Tabela 2-3:** Comparação dos valores de explicação, inflação e significância dos eixos da análise de componentes principais com as diferentes combinações de variáveis morfométricas de folhas de *Blepharocalyx salicifolius*.

Combinação de variáveis morfométricas	% de explicação	Inflação	Eixos significativos (p<0,001)
PC1+área+razão+PC2	86,1	2,42	Eixo 1
Ápice+comprimento+razão+PC2	86,1	1,00	Eixo 1 e 2
PC1+comprimento+razão+PC2	86,8	1,00	Eixo 1 e 2
Área+ápice+razão+PC2	86,4	1,00	Eixo 1 e 2

O resultado da PCA com as oito variáveis avaliadas parece distribuir as formas foliares em categorias morfométricas básicas: forma, tamanho e proporção (Figura 2-7A). O ápice, a base e PC1 explicaram variações no ângulo (Figura 2-7A) e apresentaram correlações maiores que 0,74 (Tabela 2-3). A PC2 explicou principalmente a variação no ápice da folha (Figura 2-7A) e mostrou uma baixa correlação ou correlação inversa com todas as outras variáveis (Tabela 2-3). A razão foliar explicou variação de proporção (Figura 2-7A) e apresentou fortes relações inversas com a maioria das variáveis (Tabela 2-3). O comprimento, largura e área foliar mostraram variações de tamanho (Figura 2-7A) com correlações acima de 0,82 (exceto largura/comprimento, com 0,53 de correlação, Tabela 2-3).



**Figura 2-4:** Análise de componentes principais (PCA) de caracteres morfométricos foliares de *Blepharocalyx salicifolius*: (A) ordenação de todas as variáveis analisadas e distribuição em categorias morfométricas (nomes em vermelho), (B) ordenação de variáveis representativas da variação morfométrica de *B. salicifolius* agrupados por biomas e respectivas formas foliares (tamanhos relativos).

A análise individual das variáveis biométricas (exceto PC1 e PC2) mostrou diferenças significativas na maioria das comparações entre os biomas (Tabela 2-6). Coletas de *B. salicifolius* em Cerrado diferiram significativamente dos demais por terem folhas com os maiores valores médios de área, comprimento, largura e ângulo da base (Tabela 2-6). Os maiores valores para essas variáveis apresentaram distribuição semelhante na PCA (Figura 2-7B). Considerando a variação morfométrica foliar total em *B. salicifolius*, não houve diferenças evidentes entre os biomas (Figura 2-7B). As amostras de Cerrado mostraram uma distribuição ampla (Figura 2-7B) e representada por uma densidade maior de observações influenciadas por valores superiores em tamanho (área) (Figura 2-7B). As formas foliares mais plásticas foram encontradas para Floresta Atlântica, cujos pontos foram mais dispersos no diagrama de ordenação (Figura 2-7B). As variações morfométricas em folhas de *B. salicifolius* coletadas neste bioma sobrepuseram todos os outros e foram distribuídas em todos os quadrantes da análise (Figura 2-7B).

**Tabela 2-4:** Comparação das variáveis morfométricas\* de *Blepharocalyx salicifolius* em diferentes Biomas. Valores Médios  $\pm$  Desvio Padrão (Coeficiente de Variação %).

	Cerrado	Cerrado/ Caatinga	Floresta Atlântica	Floresta Atlântica/ Pampas
<b>Área (cm<sup>2</sup>)</b>	6,71 $\pm$ 3,86 (57,5) A	2,49 $\pm$ 1,10 (44,3) B	4,42 $\pm$ 2,73 (61,7) C	3,96 $\pm$ 2,71 (68,5) BC
<b>Comprimento (cm)</b>	4,77 $\pm$ 1,04 (21,8) A	2,95 $\pm$ 0,81 (27,4) B	4,09 $\pm$ 1,29 (31,4) C	4,36 $\pm$ 1,40 (32,1) AC
<b>Largura (cm)</b>	2,04 $\pm$ 0,78 (38,2) A	1,15 $\pm$ 0,35 (31,0) B	1,56 $\pm$ 0,63 (40,3) C	1,34 $\pm$ 0,63 (47,0) BC
<b>Razão (C/L)</b>	2,66 $\pm$ 1,02 (38,3) A	2,74 $\pm$ 0,81 (29,4) AB	3,02 $\pm$ 1,73 (57,3) AB	3,68 $\pm$ 1,36 (37,0) C

<b>Ângulo do Ápice</b> <sup>NS</sup>	47,86±14,65 (30,6)	50,19±8,56 (17,0)	46,16±15,86 (34,4)	35,27±17,76 (50,3)
<b>Ângulo da Base</b>	71,21±18,36 (25,8) A	60,82±14,36 (23,6) B	60,81±15,68 (25,8) BC	50,49±14,76 (29,2) BC

\*Letras distintas entre colunas, indicam diferenças significativas (SNK  $p < 0,05$ ), NS=não significativo.

Indivíduos amostrados na transição Cerrado/Caatinga, possivelmente o "extremo ambiental" de *B. salicifolius*, se diferenciaram dos demais por apresentarem menores valores médios de área foliar, largura, e significativamente menores valores de comprimento (Tabela 2-6). Coletas deste ambiente mostraram uma tendência a se agrupar, explicado principalmente por maiores valores de PC2 (Figura 2-5). Definitivamente elas representam as formas mais diferentes de folhas de *B. salicifolius*. Embora esta componente represente apenas 6,6% da variação total de contorno da folha, esta foi importante na estruturação da forma foliar. Este padrão é corroborado por diferenças significativas entre Cerrado/Caatinga e outros biomas, principalmente pelos menores valores de área foliar e comprimento (Tabela 2-6).

As folhas de coletas em áreas do sul do Brasil (Floresta Atlântica/Pampas) representam o "extremo austral" de distribuição da espécie. Estes ambientes apresentaram valores intermediários para largura, área e comprimento, no entanto, eles também apresentaram a maior razão e diferiram significativamente de amostras coletadas em outros biomas (Tabela 2-6). Isso ficou claro a partir da distribuição PCA e a maioria das coletas deste bioma foi explicada pelo vetor razão foliar (Figura 2-7B). Estes ambientes extremos de distribuição foram estruturadas por valores positivos no eixo 1 da ordenação (Figura 2-7).

## Discussão

As amostras selecionadas para análise foram eficazes para investigar a variação de caracteres foliares de *B. salicifolius*. A variação morfológica das folhas desta espécie mostrou consistente relação com biomas. A análise individual dos caracteres morfológicos foliares foi importante para a interpretação da ordenação de distribuição permitindo o reconhecimento de preferências de formas foliares para determinados biomas, apesar da ausência de clara estrutura. As formas foliares básicas encontradas para *B. salicifolius* permitiu uma avaliação dos possíveis padrões bioclimáticos responsáveis pela distribuição de padrões morfológicos da espécie e sugere que processos biogeográficos podem estar envolvidos nesta distribuição.

A plasticidade foliar de formas e tamanhos de *B. salicifolius* corresponde a ampla distribuição geográfica da espécie e condições bioclimáticas específicas contribuem para formas mais particulares de folha. Esta plasticidade foi evidenciada pelos altos valores dos coeficientes de variação, especialmente para área (> 70%) e razão foliar (> 48%). Estas duas variáveis parecem estar associadas com os "ambientes extremos" na distribuição geográfica de *B. salicifolius*.

Valores positivos no eixo 1 da PCA estão provavelmente relacionados com temperatura e umidade. O primeiro ambiente extremo parece estar associado a altas temperaturas e baixa umidade. As coletas de Cerrado/Caatinga estão relacionadas com o vetor PC2 que explica menores áreas foliares. As coletas de Floresta Atlântica que também estão associadas com o vetor PC2 são de regiões costeiras (restingas), ambientes com alta salinidade e temperatura. Nestes ambientes, os dias são extremamente quentes, pois a areia branca reflete a luz. Indivíduos de *B. salicifolius* nestes ambientes são arbustos e, geralmente, não ultrapassam 1,5 m de altura.

No outro extremo, têm-se áreas com temperaturas mais baixas e alta umidade. Estas coleções são da região Floresta Atlântica/Pampas e estão relacionados com altos valores da razão foliar. Esta região do sul, na fronteira Brasil/Argentina as geadas são frequentes. Folhas com a forma muito-estrito-elíptica é predominante. É possível que seja uma adaptação para reduzir os efeitos negativos de congelamento. Além disso, este formato é semelhante às folhas de espécies de *B. salicifolius* encontrados no

Uruguai (tipos *B. angustissimus* e *B. angustifolius*, ver Apêndice). Nesta região *B. salicifolius* é uma árvore e pode atingir até 20 metros de altura.

Valores negativos do Eixo 1 estão relacionados com coletas de Cerrado e Floresta Atlântica. Amostras destes biomas apresentam maiores valores de área e largura foliar geralmente associadas à formas foliares ovadas. É razoável pensar que estas características morfológicas podem estar relacionadas com maiores valores de precipitação anual. Na Caatinga a precipitação anual média é de 300 a 800 mm, enquanto que no Cerrado e Floresta Atlântica os valores podem variar de 750 a 2.000 mm e 1.000 a 4.500 mm, respectivamente (Eiten 1972). A forte correlação entre precipitação e área foliar foi observada por outros autores em estudos com outras espécies de planta (Dolph & Dilcher 1980, Wiemann *et al.* 1998).

As formas foliares mais plásticas foram encontradas em Floresta Atlântica. Em um sentido amplo, as coletas deste ecossistema apresentaram todos os tipos morfométricos básicos de *B. salicifolius*. As formas variantes de *B. salicifolius* em diferentes tipos de ambiente sugerem uma adaptação extremamente impressionante para diferentes condições ambientais (Bucci *et al.* 2008), mas é possível que linhagens genealógicas desta espécie possam estar estruturadas geograficamente em função dos diferentes processos bioclimáticos nos biomas de ocorrência. A área de distribuição de *B. salicifolius* corresponde às regiões mais ricas de espécies de Myrtaceae na América do Sul e talvez os mesmos processos responsáveis pela distribuição de linhagens de espécies podem ser responsáveis pela colonização e diversificação de outros grupos de espécies, especialmente aqueles compartilhados entre florestas e savanas tropicais.

Este padrão é intrigante devido à origem Floresta Tropical Sul hipotético desta espécie (Lucas *et al.* 2007). Sugerimos que esta espécie tenha uma aptidão morfológica e fisiológica para se adaptar a diferentes condições ambientais, combinados com caracteres florais e de frutos uniformes (Landrum 1986). Devido à origem hipotética do sul de Myrtaceae da América do Sul, sugerimos testar o monofiletismo de *B. salicifolius* com base em dados genéticos e a investigação de processos biogeográficos envolvidos nessa ampla distribuição geográfica. A ampla variação morfológica das folhas representa uma linha interessante para estudos filogenéticos e filogeográficos futuros.

## Conclusão

Com base em nossos resultados, confirmamos morfometricamente a plasticidade foliar elevada de *B salicifolius* e apresentamos um modelo de variação foliar para a espécie. Este trabalho foi um passo adiante para esclarecer os aspectos taxonômicos e biogeográficos de uma espécie chave na compreensão da história de Myrtaceae na América do Sul, um dos grupos de plantas mais importantes da região Neotropical. Sugere-se que o estudo ecológico de espécies de ampla distribuição geográfica e basais pode fornecer informações valiosas sobre adaptação em gradientes ambientais em larga escala quando a variação foliar é notória. Coleções botânicas podem fornecer dados valiosos para os estudos que vão além da investigação taxonômica. Além disso, a morfometria foliar pode ser a maneira mais prática de se obter dados morfológicos oriundas de imagens digitalizadas das coleções de herbários.

## Capítulo 3 - Biogeografia de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg e as relações filogenéticas de espécies Myrtaceae da América do Sul.

### Introdução

Estimativas de tempo de divergência em inferências filogenéticas são ferramentas imprescindíveis no estudo da história evolutiva de grupos de organismos nas mais diversas escalas de tempo e espaço. Na investigação da história evolutiva de Myrtaceae, dados de calibração são fundamentais para inferir estimativas evolutivas e a aplicação de métodos de relógio relaxado e distribuições de probabilidade *a priori* permitem flexibilização de pontos de calibração de modo ajustá-los de acordo com a interpretação biogeográfica dos dados fósseis de Myrtaceae (Drummond et al. 2006, Biffin et al. 2010, Thornhill & Crisp 2012). Do mesmo modo que a flexibilização de ajustes dos pontos de calibração por meio de diferentes modelos de distribuição de probabilidades, a seleção de calibrações adequadas e fundamentação teórica destas calibrações são fatores determinantes na precisão destas estimativas (Thornhill et al. 2012). Definitivamente, trata-se de uma ferramenta valiosa para testar hipóteses evolutivas e padrões biogeográficos.

O padrão disjunto em escala continental da família Myrtaceae mais restrito ao hemisfério sul, há tempos alimenta debates sobre sua biogeografia (Biffin et al. 2010). Baseado em morfologia e indícios biogeográficos, foi proposto que Myrtaceae teria se originado na antiga Gondwana (Briggs & Johnson 1979, Johnson & Briggs 1984a). Análises filogenéticas recentes sustentam a origem de Myrtaceae em Gondwana, e apontam ainda que as mirtáceas neotropicais (Tribo Myrteae) originaram e diversificaram na Australásia quando a Austrália ainda era conectada à América do Sul via pontes continentais de florestas temperadas (Sytsma et al., 2004; Wilson, et al., 2001; Wilson et al., 2004). A implementação de pontos de calibração fósseis em reconstruções do tempo do ancestral comum mais recente baseado em relógio molecular relaxado possibilitaram um passo na interpretação de processos evolutivos envolvidos especialmente em relação a alta taxa de diversificação de determinados grupos de Myrtaceae (Biffin et al. 2010).

Várias especulações têm sido feitas a respeito desta evolução e a utilização de calibrações de diferentes fontes têm gerado resultados distintos (Biffin et al. 2010, Thornhill et al. 2012, Lucas et al. 2007). Resoluções em nível supragenérico têm sido obtidas apenas com a combinação de

regiões plastidiais e regiões nucleares como ITS e ETS, e calibrações destas filogenias com fósseis de folhas e partes de frutos (Biffin et al. 2010, Lucas et al. 2007, Murillo-A et al. 2012) e mais recentemente implementado calibrações baseadas em fósseis de pólen (Thornhill & Crisp 2012), mas há certas limitações já que a estrutura externa do pólen pode não ser muito variável em alguns grupos (Thornhill et al. 2012).

Myrtaceae contempla hoje cerca de 10 a 15 % de todas as espécies arbóreas registradas na Floresta Atlântica e no Cerrado do Brasil (Oliveira-Filho & Fontes 2000), *hotspots* de biodiversidade, ou seja, regiões com elevado endemismo de espécies e ameaças à conservação (Myers & Mittermeier 2000). No entanto, os dados de distribuição da biodiversidade dentro de *hotspots* são muito escassos para a conservação efetiva em face da mudança ambiental rápida (Parmesan & Yohe 2003, Carnaval et al. 2009). Portanto, a representatividade desta família contribui para a alta diversidade de espécies na América do Sul (McVaugh 1968) e faz dela um importante tema de estudos em biodiversidade, biogeografia, taxonomia e história evolutiva dos ecossistemas que comportam espécies desta família.

A espécie *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, objeto de nossa pesquisa, é grupo irmão de todas as mirtáceas neotropicais (Lucas et al. 2007), correspondente à tribo Myrteae, e apesar do suporte intermediário, é um dos táxons candidatos para a posição basal do grupo. De ampla distribuição na América do Sul, seu limite austral é na província de Buenos Aires, na Argentina. Pela rota leste, ocorre no Uruguai, leste do Paraguai e por toda a Floresta Atlântica até a Cadeia do Espinhaço e Chapada Diamantina (Lughadha 1994) e tem seu ponto boreal no Pico das Almas, Bahia. No Planalto Central, passa por São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás, com ponto boreal na Chapada dos Veadeiros. Pela rota Oeste, a espécie se distribui de Tucumán passando pela Floresta Tucumana-Boliviana (Yungas) a ca. 1500-3000 m, contornando a margem leste dos Andes e chegando até o Equador (Landrum, 1986).

Ecologicamente, *B. salicifolius* pode ser um bom modelo por ser uma espécie auto incompatível (o que potencialmente aumenta a variabilidade genética) e polinizada por abelhas generalistas (Proença & Gibbs, 1994), sendo dispersa por aves generalistas (Proença & Lughadha, 1996), que são as estratégias dominantes em espécies lenhosas no Cerrado (Proença & Gibbs, 1994) e na Floresta Atlântica. Além disso, a alta plasticidade foliar corresponde a quase toda a variabilidade encontrada para a maioria das espécies mirtáceas mesófilas. Estes motivos fortalecem a hipótese de que *B. salicifolius* pode fornecer dados importantes quanto à história evolutiva da adaptação das Myrtaceae a diferentes ambientes (Lucas et al. 2007). Assim, este trabalho propõe o estudo filogeográfico de populações de *B. salicifolius*, além de abordagens

morfométricas das folhas, aparentemente com padrão geográfico. Nossa hipótese é que as linhagens tiveram uma rota latitudinal de colonização no continente na direção norte, testada via análise filogeográfica de *B. salicifolius*.

A espécie em questão apresenta populações amplamente distribuídas, contudo não é uma espécie frequente nos ecossistemas onde ocorre. O reconhecimento de linhagens genealógicas, com a seleção de marcadores corretos, podem evidenciar possíveis descontinuidades na estrutura genética de populações de *B. salicifolius*. É provável que os padrões de distribuição e diversificação de linhagens de *B. salicifolius* podem fornecer informações importantes sobre a origem e diversificação da família Myrtaceae na região Neotropical. *B. salicifolius* é um organismo de interesse ecológico devido a distribuição geográfica, aspectos da biologia floral e características ecológicas comuns a maioria das espécies compartilhadas entre Cerrado e Floresta Atlântica. Além disto, a soma destes fatores nos motivou a investigar linhagens de *B. salicifolius* e reavaliar os testes de Lucas et al. (2007) analisando as relações filogenéticas destas linhagens entre as espécies utilizadas por estes autores. Nosso objetivo foi avaliar a relações filogenéticas de linhagens de *B. salicifolius* com espécies de Myrtaceae Sul Americanas. Além disto, reconhecer e interpretar padrões biogeográficos de *B. salicifolius* em sua amplitude de distribuição via análises filogeográficas.

## **Material e métodos**

### *Populações amostradas e extração de DNA*

A partir do levantamento prévio das áreas de ocorrência de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae) foi realizada coletas botânicas de 138 indivíduos em 16 localidades (Tabela 3-1). As amostras de folhas destes indivíduos foram preservadas em sílica gel (Chase & Hills 1991) para estudos moleculares. No total, 16 populações foram coletadas ao longo de sua distribuição geográfica. Em cada uma destas populações 5 a 30 indivíduos foram aleatoriamente selecionados para coleta de folhas expandidas que foram estocadas a -80°C. A extração do DNA genômico seguiu protocolo padrão com CTAB (*hexadecyltrimethyl ammonium bromide*) (Doyle & Doyle, 1987).

**Tabela 3-1:** Origem e número de indivíduos coletados de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg.

Local	Indivíduos	Ambiente	Bioma
Araguari (MG)	2	Mata Seca	Cerrado
Caxias do Sul (RS)	9	Floresta Estacional Semidecidual Mista	Floresta Atlântica
Conselheiro Mata (MG)	4	Cerrado sentido restrito	Cerrado
Brasília (DF)	16	Cerrado sentido restrito	Cerrado
Cristalina (GO)	12	Cerrado sentido restrito	Cerrado
Diamantina (MG)	6	Cerrado rupestre	Cerrado
Jaquirana (RS)	5	Floresta Estacional Semidecidual Mista/Mata de Galeria	Floresta Atlântica
Lençóis (BA)	4	Transição Cerradão/Mata de Encosta	Cerrado/Floresta Atlântica
Paracatu (MG)	12	Cerrado sentido restrito	Cerrado
João Pinheiro (MG)	8	Cerrado sentido restrito	Cerrado
Alto Paraíso/Pouso Alto (GO)	12	Cerrado sentido restrito/Cerrado rupestre	Cerrado
Santana da Boa Vista (RS)	1	Floresta Estacional Semidecidual Mista	Floresta Atlântica
Rio de Janeiro/Floresta da Tijuca (RJ)	15	Floresta Estacional Semidecidual/Floresta de Encosta	Floresta Atlântica
Urubici (SC)	18	Floresta Estacional Semidecidual/Mata de Galeria	Floresta Atlântica
Vacaria (RS)	1	Floresta Estacional Semidecidual Mista	Floresta Atlântica
La Yunga/ <i>Departamiento de Santa Cruz de La Sierra</i> (Bolívia)	13	Floresta Estacional Subtropical Andina (Floresta Tucumana)	Floresta Subtropical

### *Dados genéticos para análise filogenética*

As análises filogenéticas foram realizadas com haplótipos de *B. salicifolius* (obtidos neste estudo) e acessos de espécies de Myrtaceae obtidas no GenBank (Material Suplementar 2). A rede haplotípica foi gerada para 138 indivíduos de *B. salicifolius*. Filogenias com modelos de relógio molecular para cálculo de tempo de diversificação foram construídas para a matriz de haplótipos de *B. salicifolius* com espécies de Myrtaceae, e para os 138 indivíduos da espécie estudada representada por 16 populações (Tabela 3-1).

### *Seleção de primers, amplificação e sequenciamento do DNA*

Para os estudos filogenéticos de Myrteae utilizamos os mesmos marcadores selecionados por Lucas et al. (2007): *psbA-trnH* e *matK-xf5R* (ambos cloroplastidiais), e *ETSMyrF-18S* e *ITS101-ITS102* (nucleares) (Tabela 3-2). Para os estudos populacionais utilizamos *psbA-trnH* e *ETSMyrF-18S*.

**Tabela 3-2:** Marcadores e *primers* utilizados e respectivos protocolos de amplificação de DNA.

<b>Marcador Molecular</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência de DNA 5' – 3'</b>	<b>Referência</b>
<i>psbA-trnH</i>	psbA	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	Hamilton (1999)
espaçador intergênico	trnH (GUG)	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	
Gene <i>matK</i>	390 (F)	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	Cuénoud et al. (2002)
	1326 (R)	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	
ITS	AB101	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	Sun et al. (1994)
	AB102	GAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	

ETS + flanking 18S MyrtF	MyrtF	CTCCGTGCTGGTGCATCGAACTGC	Lucas et al. (2007)
gene	ETS-18S	GAGCCATTCGCAGTTTCACAG	Wright et al. (2001)

**Tabela 3-3:** Condições otimizadas de amplificação das regiões selecionadas neste estudo.

<i>Primers</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>	<i>ETS</i>	<i>ITS</i>
<b>Condições otimizadas de amplificação (PCR)</b>	4 min à 94°C; 30 ciclos de 1 min à 94°C, 1 min à 48°C, 2 min e 30 segundos à 72°C.	2 min à 94° C; 30 ciclos de 1 min à 94° C, 30 segundos à 50°C, 1 min à 72° C.	4 min à 94°C; 30 ciclos de 1 min à 94°C, 1 min à 50°C, 1 min à 72°C.	2 min à 94°C, 30 ciclos de 1 min à 94°C, 1 min à 52°C, 1 min à 72°C.

As regiões alvo foram amplificadas com *primers* selecionados (Tabela 3-2) em termocicladores Applied Biosystems Inc. (ABI) Gene Amp 9700 PCD system utilizando-se protocolos otimizados (Tabela 3-3). Os produtos de PCR (*polymerase chain reaction*) foram purificados usando método de coluna com QIAGEN® QIAquick™ Spin Columns, de acordo com instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram conduzidas com o kit Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit™ (Applied Biosystems, Inc). As sequências geradas foram lidas em ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc). Eletroferogramas foram analisados e sequências consenso foram obtidas utilizando o Geneious™ versão 6.0.5. Para o alinhamento utilizou-se o *plugin* do MUSCLE implementado no software Geneious™.

#### *Geração dos haplótipos*

A rede de haplótipos foi construída com o auxílio dos programas DNAsp, para montagem da matriz haplotípica (Librado & Rozas 2009), e o programa Network 4.2.0.1 para construção da filogenia intra-específica via *median-joining network analysis* baseadas em critério de parcimônia (Bandelt et al. 1999). Os haplótipos do grupo teste de *B. salicifolius* foram gerados a partir da região *psbA-trnH*. Este recurso

foi utilizado para entender a distribuição geográfica e relações filogenéticas entre haplótipos de *B. salicifolius* com base apenas em psbA-trnH e permitiu reconhecer combinações únicas de estados alélicos na referida região.

Um representante de cada haplótipo foi incluído na matriz para inferências filogenéticas. Foram obtidos 14 haplótipos para esta espécie (ver Resultados – Rede de haplótipos), portanto 14 indivíduos foram selecionados como representantes destes haplótipos para compor a matriz de análise filogenética (Material Suplementar 2).

**Tabela 3-4:** Lista dos 14 indivíduos de *B. salicifolius* selecionados com base na rede de haplótipos da região psbA-trnH.

Indivíduos ( <i>B. salicifolius</i> )	No. Haplótipo	Localidade de Coleta
BSARAMG659_H1	1	Araguari (MG)
BSPOUGO648_H2	2	Alto Paraíso / Pouso Alto (GO)
BSCRIGO450_H3	3	Cristalina (GO)
BSDIAMG785_H4	4	Diamantina (MG)
BSLENBA656_H5	5	Lençóis (BA)
BSPARMG539_H6	6	Paracatu (MG)
BSTIJRJ807_H7	7	Rio de Janeiro / Floresta da Tijuca (RJ)
BSURUSC615_H8	8	Urubici (SC)
BSYUNBO669_H9	9	La Yunga / Bolívia
BSCAXRS579_H10	10	Caxias do Sul (RS)
BSJAQRS573_H11	11	Jaquirana (RS)
BSSANRS558_H12	12	Santana da Boa Vista (RS)
BSURU625_H13	13	Urubici (RS)
BSVACRS634_H14	14	Vacaria (RS)

#### *Análise dos dados*

As sequências obtidas foram alinhadas com o software **CLUSTALX** (Thompson et al., 1997). Foi realizada análise de filogenética por estimativa Bayesiana. Para tanto, foi utilizado o programa **MrBayes** (Ronquist & Huelsenbeck 2003) e as frequências nucleotídicas, bem como o modelo evolutivo que melhor se ajustou na base de dados utilizado no MrBayes foram obtidos pelo programa **JModelTest** (Darriba et al. 2012). Os melhores modelos foram TVM+G (psbA-trnH/Myrtaceae), TVM+G (matK/Myrtaceae), TrN+G (ETS/Myrtaceae), TIM2+I+G (ITS/Myrtaceae), TPM2uf+G (psbA-trnH/*B. salicifolius*) e K80+I (ETS/*B. salicifolius*).

O tempo para o ancestral mais recente ( $T_{MRCA}$ ) foi estimado baseada em análise de filogenia Bayesiana implementada no software **BEAST** 1.4.7 (Drummond & Rambaut 2007). A taxa de variação entre ramos foi obtida utilizando-se o modelo *uncorrelated lognormal relaxed clock* (Drummond et al. 2006), método utilizado em outros estudos recentes que obtiveram resolução melhorada (Biffin et al. 2010, Thornhill et al. 2012). A convergência das análises de filogenia Bayesiana foi checada utilizando-se o software **Tracer 1.4** (Rambaut & Drummond 2007). Para estimar o  $T_{MRCA}$  em anos, taxas de mutação foram estimadas *a priori* para as regiões amplificadas tendo como referência métodos e taxas de mutações citadas por Biffin et al. (2010).

#### *Calibrações de fósseis*

Utilizamos três dados fósseis para calcular os tempos de divergência do grupo de estudo. *Paleomyrtinaea princetonensis*, datada do Paleoceno (56 Milhões de anos atrás - Ma; Crane et al. 1990, Pigg et al. 1993) até o Eoceno recente (53 Ma; Manchester, 1999) da América do Norte, apresenta frutos e sementes bem preservadas e alguns autores sugerem relação com o grupo das goiabas (*Psidium*) e *Mosiera* (Biffin et al. 2010, Pigg et al. 1993), ou relacionado de forma mais abrangente com a subtribo Myrtineae (McVaugh 1968, Landrum & Kawasaki 1997). O segundo fóssil é de folhas e frutos de *Metrosideros* do Eoceno recente (aproximadamente 20 Ma), coletado na Nova Zelândia, considerado parente do gênero *Metrosideros* ainda vivo (Pole et al. 2008). O terceiro fóssil são frutos eucaliptóides do leste da Austrália datado de 48 Ma (Eoceno recente) (Rozefelds 1996) utilizado em outros estudos como parente do grupo Eucalypteae (Tabela 3-5).

**Tabela 3-5:** Calibrações utilizadas para datar análises moleculares com espécies de Myrtaceae (Ma = milhões de anos); Fonte: (Biffin et al. 2010).

Grupo calibrado	Fóssil	Distribuição a priori	Calibração (média)
Myrteae	<i>Paleomyrtinaea princetonensis</i>	log-normal	56 Ma
Metrosidereae	<i>Metrosideros</i>	log-normal	20 Ma
Eucalypteae	<i>Eucalyptus</i>	normal	48 Ma

## Resultados

### *Análise descritiva das regiões avaliadas*

A matriz de *psbA-trnH* (matriz Myrtaceae) apresentou 544 sítios (*gaps* e ambiguidades desconsideradas). Já as matrizes das regiões avaliadas para inferência filogenética variaram entre 527pb (pb=pares de bases) e 826pb (Tabela 3-6). Foram obtidas sequências para todos os 70 acessos, exceto para *matK* com 48 sequências (Tabela 3-6). A composição nucleotídica das regiões testadas está de acordo com o esperado para estes marcadores: regiões cloroplastidiais apresentaram maior conteúdo AT e regiões nucleares apresentaram maior conteúdo CG (Tabela 3-6). A diversidade nucleotídica foi mais baixa para *matK* e mais alta para ETS (Tabela 3-6), uma vez que *matK* é uma região codificante e mais conservada (Shaw et al. 2005) e ETS é o mais diverso em variação nucleotídica entre táxons de Myrteae (Lucas et al. 2007, Murillo-A et al. 2012). A região *psbA-trnH* apresentou a segunda menor diversidade nucleotídica.

**Tabela 3-6:** Composição de nucleotídeos das regiões cloroplastidiais e nucleares avaliadas neste estudo (gaps e sítios ambíguos excluídos) de espécies de Myrtaceae.

	<i>psbA</i>	<i>matK</i>	ETS	ITS
<b>Pares de base total/sítios avaliados</b>	691/77	826	527	798
<b>Número de táxons</b>	70	48	70	71
<b>A (%)</b>	33,7	36,7	19,3	22,7
<b>T (%)</b>	38,9	29,5	31,7	21,1
<b>G (%)</b>	15,5	18,4	25,7	28,8
<b>C (%)</b>	11,9	15,4	23,3	28,8
<b>GC (%)</b>	27,4	33,8	49,0	56,2
<b>Diversidade nucleotídica</b>	0,058	0,024	0,107	0,065

A matriz de *psbA-trnH* para Myrtaceae e haplótipos de *B. salicifolius* resultou em 691pb. O alinhamento é fácil no início da região próxima de anelamento do *primer psbA*, porém em direção à ponta 3' (*trnH*) o alinhamento é dificultado em virtude de *indels* (inserção/deleção ou gaps) de diferentes comprimentos entre os táxons.

Foi observada uma inversão de 21pb entre a posição 100 e 121 (Figura 3-1). Esta região de inversão é flanqueada por sequências palíndromes conservadas 5' CAATAACCAA [inversão] TTGGTTATTG 3' entre os sítios 90 e 131. Sequências palíndromes normalmente flanqueiam potenciais regiões susceptíveis a inversão (Whitlock et al. 2010, Catalano et al. 2009).

	região de inversão																															
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																						
Ugni molinae	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G				
Xanthomyrtus compacta	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Blepharocalyx cruckshanksii	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Myrceugenia lanceolata	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Blepharocalyx salicifolius	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 807_H7	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 785_H5	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 656_H6	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Campomanesia guazumifolia	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Campomanesia pubescens	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Lophomyrtus obcordata	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Neomyrtus pedunculata	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Luma apiculata	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	C	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Luma chequen	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	C	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Myrceugenia alpigena	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Myrceugenia myrcioides	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 539_H1	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 648_H3	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 450_H4	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Pimenta dioica	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Pimenta pseudocaryophyllus	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
Pimenta racemosa	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 615_H8	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 669_H11	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	
B. salicifolius 579_H2	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
B. salicifolius 625_H9	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
B. salicifolius 634_H10	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	A	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Marlierea obscura	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Marlierea suaveolens	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Myrcianthes pseudomato	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Myrcianthes pungens	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Eugenia florida	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Eugenia puniceifolia	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Eugenia sulcata	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Eugenia uniflora	CAA	TAA	C	CA	T	-	T	T	C	T	T	A	T	T	C	T	A	T	C	A	A	G	A	G	T	G	T	T	G	T	T	G
Algrizea macrochlamys	CAA	TAA	C	CA	C	T	C	T	T	G	A	T	A	G	A	A	-	A	T	T	G	G	T	T	A	T	T	G	T	T	G	

**Figura 3-1:** Sequências de *psbA-trnH* de espécies de Myrtaceae incluindo região de inversão de 21bp (retângulo vertical) flanqueadas por inversões repetidas de 10bp. Grupos conspecíficos estão destacados por retângulos horizontais. Sinais positivos no topo indicam sítios conservados.

A inversão foi observada para haplótipos de *B. salicifolius* de Floresta Atlântica da região sul do Brasil (haplótipos 2, 9 e 10), bem com para *Xanthomyrtus compacta*, *Marlierea obscura* e *M. suaveolens*, *Myrcianthes pseudomato* e *M. pungens*, *Eugenia florida*, *E. puniceifolia*, *E. sulcata* e *E. uniflora*. Esta inversão não foi observada em haplótipos de *B. salicifolius* de Floresta Atlântica na Tijuca (RJ) e de Cerrado coletados em Lençóis (BA) e Diamantina (MG).

Obtivemos uma matriz para região *matK* (matriz Myrtaceae) composta por 826pb (Tabela 3-6). O alinhamento é simples e polimorfismos são basicamente transições e transversões. Observamos apenas dois eventos de *indel*: a duplicação 5' ATTGATTAC 3' (sítio 560-570) compartilhado por *Lophomyrtus obcordata* e *Neomyrtus pedunculata*, e a autapomorfia 5' TCTA 3' observada para *Rhodomyrtus argentea*.

O gene *matK* apresentou razão transições/transversões em 1,1, estimativas corroboradas por outros estudos (Olmstead & Palmer 2013, Hilu et al. 2003, Hilu & Liang 1997). As taxas de substituição de 1ª, 2ª posição de códons observados são aproximadamente as encontradas para a 3ª posição de códons, o que eleva a taxa de substituições não sinônimas (Hilu et al. 2003), característica normalmente apresentada por esta região (Johnson & Soltis 1994).

### Rede de haplótipos

A análise de network, baseada nas 138 seqüências de *psbA-trnH* de *B. salicifolius*, resultou em 14 haplótipos que apresentaram estrutura geográfica distribuída em pelo menos quatro grupos: Floresta Atlântica sul (H8, H10, H11, H12, H13 e H14), Floresta Tucumana boliviana (H9), Floresta Atlântica norte/Cerrado (H4, H5, H7) e Cerrado (H1, H2, H3 e H6) (Figura 3-2).

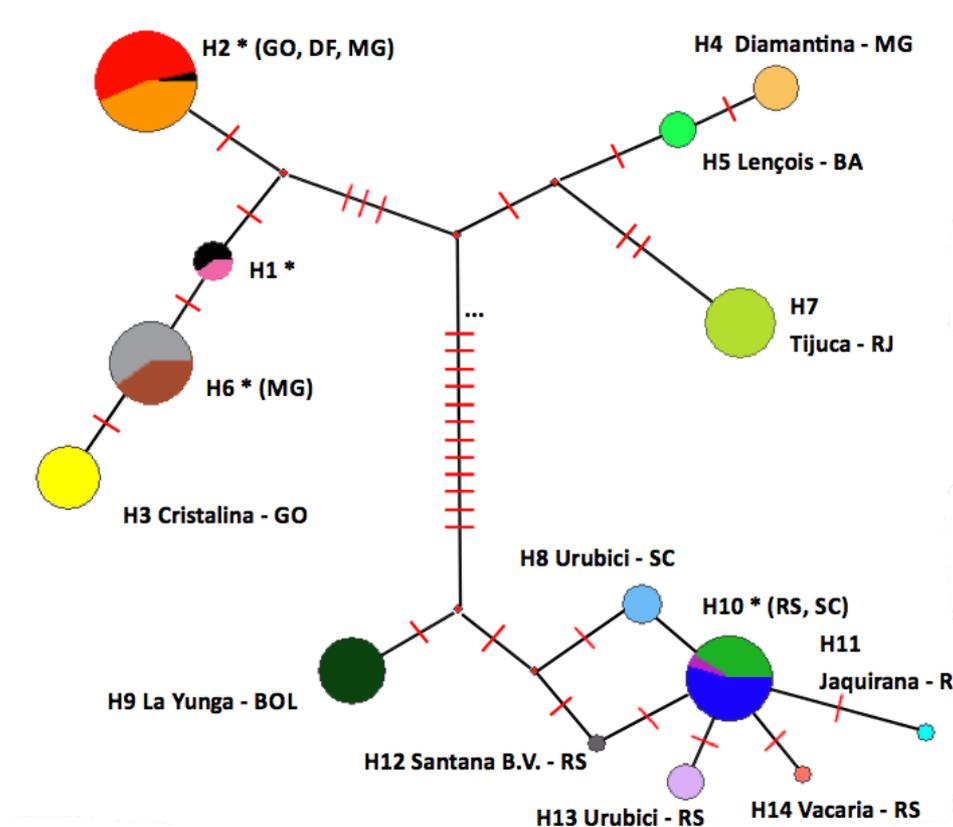


Figura 3-2: Rede de haplótipos baseado em *psbA-trnH* de *Blepharocalyx salicifolius*.

### *Inferências filogenéticas*

Baseado em inferência Bayesiana, *psbA-trnH* agrupou a tribo Myrteae com suporte razoável, mas com baixa resolução entre os subgrupos *sensu* Lucas et al. (2007). A exceção foi para o grupo *Myrcia* + *Plinia* que obteve boa resolução, porém *Marlierea obscura* e *M. suaveolens*, esperadas no grupo *Myrcia*, apareceram no grupo *Eugenia*. O grupo externo Australiano manteve sua posição basal em relação à Myrteae, bem como a posição de *Myrtus communis* como grupo irmão deste conjunto (Material Suplementar 3). A região *psbA-trnH* ofereceu resolução para estruturar a relação entre os haplótipos de *B. salicifolius*. Contudo, os altos valores de suportes em grupos congêneros (a exemplo de *Siphoneugena*, *Campomanesia*, *Eugenia*, etc.) corresponderam ao alto suporte dos grupos de haplótipos desta espécie (Material Suplementar 3).

A região *matK* mostrou alto suporte para grupos de Myrteae, contudo com baixa resolução interna (Material Suplementar 4). Foram obtidas boas resoluções para o grupo *Myrceugenia*, composto pelo próprio gênero, *Luma* e *Blepharocalyx cruckshanksii* e para o grupo *Pimenta* + *Eugenia*. Este marcador apresentou padrão semelhante a *psbA-trnH* ao agrupar linhagens de Cerrado e linhagens de Floresta Atlântica do sul, contudo não foi capaz de relacioná-los. Além disto, o acesso de *B. salicifolius*, utilizado por Lucas et al. (2007), ficou fora de Myrteae e próximo a *Austromyrtus dulcis* (Material Suplementar 4).

Os resultados para ETS foram inferiores, uma vez que não foi capaz agrupar Myrteae como grupo monofilético e nem ao menos conseguiu resolução para os grupos externos da tribo (Material Suplementar 5). ETS não gerou suporte para subtribos de Myrteae ou mesmo grupos propostos por Lucas et al. (2007), exceto para *Myrcia* + *Plinia*, desconsiderando *P. pauciflora*. Por outro lado, foi eficiente em reunir vários clados congêneros com altos valores de suporte, por exemplo, para *Myrceugenia*, *Luma*, *Eugenia* e *Gossia* (Material Suplementar 5).

A região de DNA ribossomal ITS conseguiu agrupar as linhagens de *B. salicifolius* em um clado monofilético com razoável suporte (Material Suplementar 6). A estrutura das linhagens de *B. salicifolius* correspondeu à distribuição geográfica das populações avaliadas. As linhagens correspondentes às populações desta espécie ocorrentes em

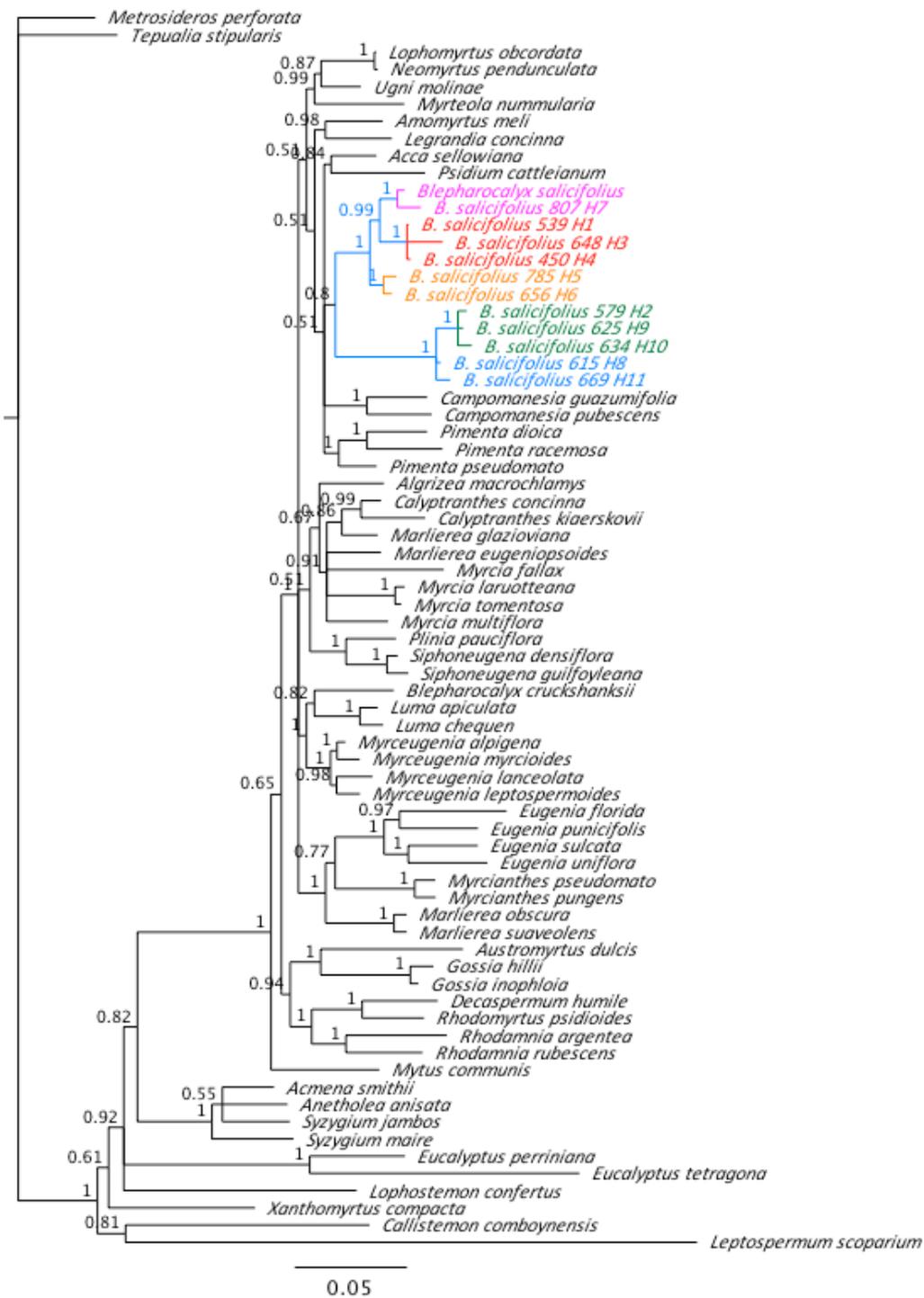
Floresta Atlântica do Sul e Floresta Tucumana ocorrente na base oriental dos Andes Bolivianos são grupos irmãos das linhagens de Cerrado e Floresta Atlântica do sudeste e norte brasileiros baseados em ITS. Além disso, ITS foi eficiente ao gerar suporte para clados congêneros, a exemplo de *Eugenia*, *Gossia* e *Luma*, entre outros. Contudo, a exemplo de ETS, não apresentou resolução para tribo (Material Suplementar 6).

A maioria das combinações de marcadores mostrou *B. salicifolius* como grupo monofilético, exceto 'cpDNA + ETS' e 'nDNA' (não apresentados neste trabalho). O nível de resolução entre as diferentes combinações, contudo, foi variável. O resultados mais significativos foram cpDNA+nDNA (todas as regiões), cpDNA + ITS, e cpDNA (*psbA-trnH* e *matK*). A combinação cpDNA + ITS apresentou alto suporte para Myrteae e boa resolução para os grupos externos desta tribo (Material Suplementar 7). Esta combinação apresentou suporte interno para grupos de Myrteae (*sensu* Lucas et al. 2007): *Myrceugenia* + *Luma/B. cruckshanksii*, *Myrcia* + *Plinia*, e *Pimenta* + *Myrteola*, mas não foi capaz de relacioná-los (Material Suplementar 7).

Linhagens de Floresta Atlântica/Floresta Tucumana boliviana parecem ser basais e a proximidade interessante entre linhagens da Chapada Diamantina (linhagens Diamantina - MG e Lençóis - BA) de Cerrado e da Floresta da Tijuca (Floresta Atlântica) foram obtidas na maioria dos testes realizados. As regiões de cloroplasto (cpDNA) apresentaram alto suporte para a tribo Myrteae, boa resolução para os grupos externos à tribo Myrteae correspondente ao encontrado por Lucas et al. (2007) (Material Suplementar 8). Esta região apresentou a melhor resolução interna para subgrupos de Myrteae aproximando o grupo *Eugenia* do grupo *Pimenta* e *Myrteola* (Material Suplementar 8). Esta combinação plastidial aproximou também com boa resolução o grupo *Myrcia* do grupo *Plinia*, bem como o grupo *Myrceugenia* de *Luma* e *Blepharocalyx cruckshanksii* (Material Suplementar 8). Estas interações são esperadas e sugeridas por Lucas et al. (2007) como propostas para subtribo de Myrteae, contudo não foi capaz de relacioná-las.

A matriz cpDNA+nDNA agrupou a tribo Myrteae com alto suporte, estruturou os grupos externos sendo que o grupo Australiano teve suporte razoável, seguido de *Myrtus communis* (Figura 3-3). Os clados internos de Myrteae apresentaram tendência de melhoria na resolução de subgrupos (*sensu* Lucas et al. 2007) a exemplo de

*Myrceugenia* + *Luma/Blepharocalyx cruckshanksii*; o grupo *Myrcia* + *Plinia*, exceto *Marlierea obscura* e *M. suaveolens* no grupo *Eugenia*, uma vez que fazem parte de subtribos distintas; e o grupo *Pimenta* + *Myrteola* (Figura 3-3). *B. salicifolius* permaneceu monofilético e com a mesma estrutura encontrada em ITS, mas agora dentro do grupo *Pimenta* (Figura 3-3). Realmente fazem parte da mesma subtribo Myrtineae, contudo este posicionamento não se repete em outras combinações de marcadores avaliadas. As linhagens de *B. salicifolius* obtiveram suporte para grupo monofilético e para os grupos de linhagens da espécie, porém com pouca resolução entre os grupos (Figura 3-3).

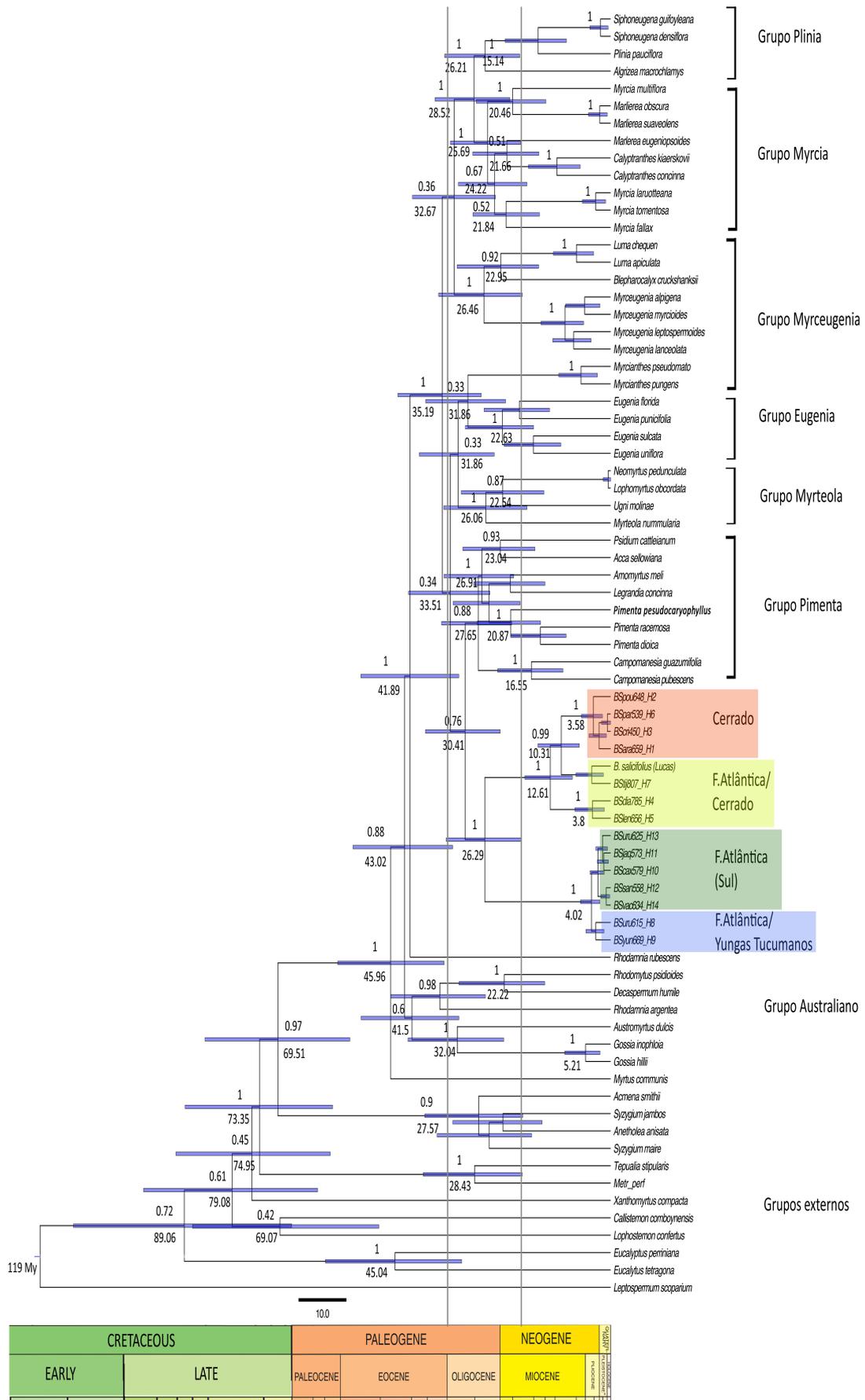


**Figura 3-3:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana de cloroplasto e DNA nuclear: cpDNA (*psbA-trnH*, *matK*) + nDNA (ETS + ITS) com valores de probabilidade posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *B. salicifolius*.

As linhagens de *B. salicifolius* ficaram distribuídas em quatro grupos sem resolução entre si, contudo com alto suporte interno. Estes grupos correspondem basicamente a separação da rede de haplótipos (representados em diferentes cores, Figura 3-3). Os haplótipos H1, H2, H3 e H6, que correspondem a linhagens de Cerrado, formaram clado com alto suporte, bem como os haplótipos correspondentes a linhagens de Floresta Atlântica do Sul e Floresta Tucumana boliviana (Figura 3-3). As linhagens de Diamantina e Lençóis (Bahia) ficaram juntas, e o acesso de *B. salicifolius* obtido do Genbank (Lucas et al. 2007) ficou agrupado com alto suporte com o haplótipo da Floresta da Tijuca (H7) do Rio de Janeiro (Figura 3-3).

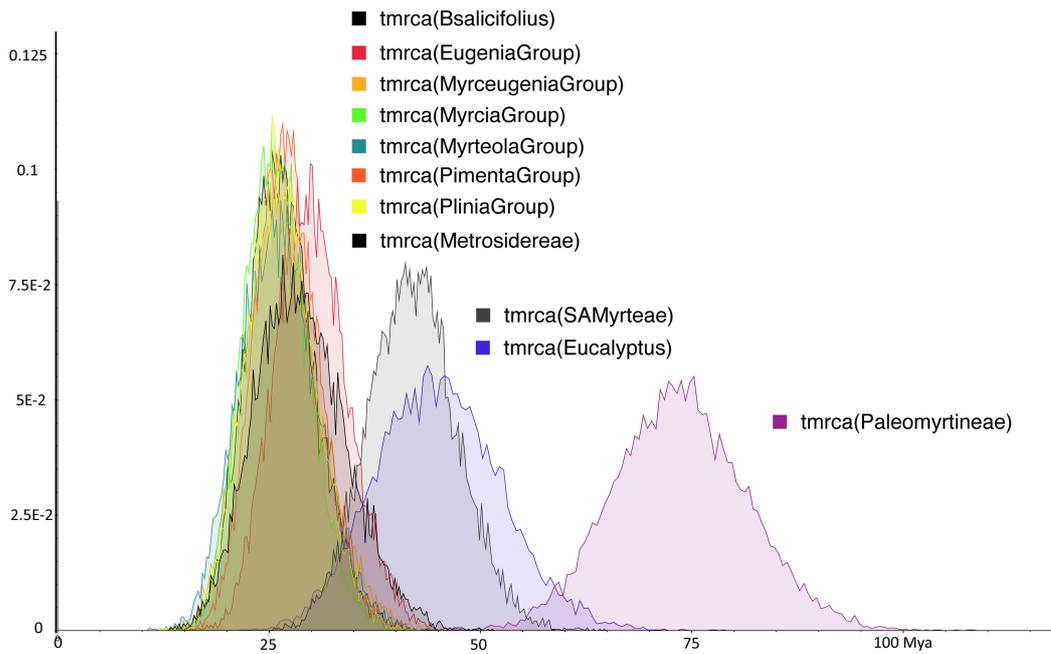
Os tempos de divergência baseados em modelo de relógio molecular relaxado calibrado por registros fósseis mostrou que Myrteae surgiu durante o Eoceno (aproximadamente a 43 Ma) (Figura 3-4). A formação dos principais grupos das espécies de Myrtaceae na América do Sul parece este ocorrido no final do Eoceno e durante o Oligoceno (entre 37 e 23 Ma) (Figura 3-4), contudo mais estudos são necessários, haja vista a baixa resolução encontrada para subtribos de Myrteae. Porém, nas subdivisões que se seguem, de acordo com os grupos propostos por Lucas et al. (2007) obtivemos boa resolução e alto suporte interno nestes grupos (Figura 3-4).

A relação entre linhagens genealógicas baseadas em cloroplasto de *B. salicifolius* obteve alto suporte e linhagens de transição Floresta Atlântica/Cerrado e Cerrado surgiram primeiro durante o Mioceno, em torno de 23 Ma, e a diversificação nestes ambientes ocorreu em torno de 3,8 Ma. Altos valores de suporte relacionam linhagens de Floresta Estacionais do Sul do Brasil e Florestas Tucumanas na base dos Andes Bolivianos cujo ancestral comum teria surgido em torno a 4 Ma durante o final do Mioceno e início do Plioceno. Esta espécie pode ter se diversificado há muito tempo, em torno de 26 Ma, durante o Oligoceno (Figura 3-4), talvez tempo demais para ser somente uma espécie. As estimativas do tempo do ancestral comum mais recentes para *B. salicifolius* coincide com as estimativas de divergência dos principais grupos *sensu* Lucas et al. (2007), durante o Oligoceno com alto suporte (Figura 3-4 e Figura 3-5) e comportamento das distribuições posteriores semelhantes (Figura 3-5).

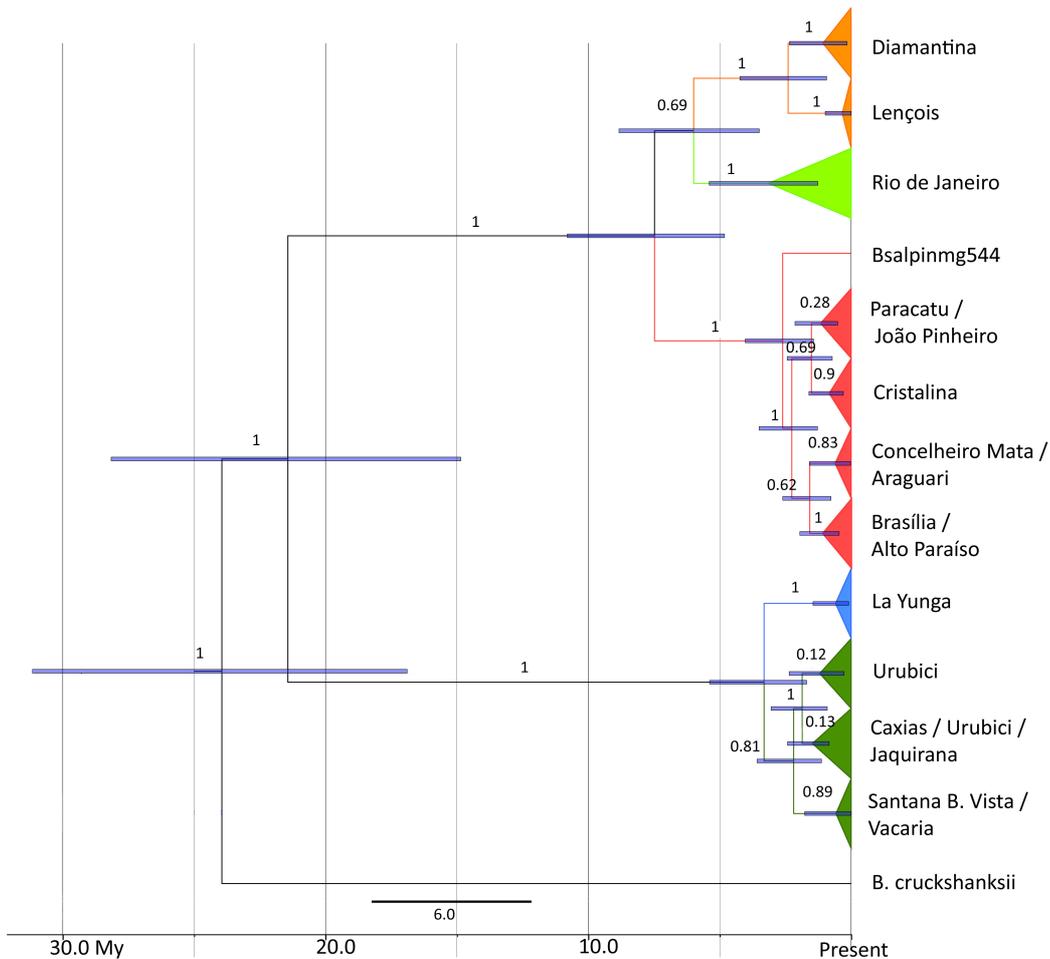


(legenda da figura na próxima página)

**Figura 3-4:** Relação filogenéticas de Myrteae Sul-Americanas e haplótipos de *B. salicifolius* com tempos de divergência calibrados com registro fóssil por modelo de relógio relaxado provenientes de matriz de dados de cloroplasto *psbA-trnH* e *matK* e nucleares ITS e ETS. Probabilidades posteriores (em cima) e estimativa média (Ma, embaixo), barras azuis representam intervalo de 95% de credibilidade das estimativas de tempo de divergência.



**Figura 3-5:** Gráfico das estimativas de distribuição posteriores dos tempos do ancestral comum mais recente de dados de cloroplasto (*psbA-trnH*) e nuclear (ETS e ITS) de espécies de Myrtaceae e linhagens de *Blepharocalyx salicifolius* baseado em inferência bayesiana.



**Figura 3-6:** Árvore de tempo de divergência entre linhagens de *B. salicifolius* calibrados com registro fóssil por modelo de relógio relaxado provenientes de matriz de dados de cloroplasto (psbA-trnH) e ETS. Números próximos aos nós são valores de suporte das probabilidades posteriores.

## Discussão

Os resultados das diferentes combinações dos marcadores avaliados neste estudo mostraram que *Blepharocalyx salicifolius* é monofilético. O gênero, contudo se mostrou parafilético, pois *B. cruckshanksii* apareceu distante de *B. salicifolius* em todas as análises, corroborando os resultados obtidos por Lucas et al. (2007). *B. salicifolius* apareceu como grupo irmão do grupo *Pimenta* (*sensu* Lucas et al. 2007) e reforça a interpretação de Landrum (1986), que postulou *Pimenta* como grupo mais próximo de *Blepharocalyx* e apenas características crípticas separariam estes grupos (posição dos óvulos no septo locular e possíveis diferentes fitoquímicas).

A espécie *B. cruckshanksii*, por sua vez, parece estar mais próxima de *Luma* (Lucas et al. 2007) endêmica do Chile, ou ser grupo irmão de *Myrceugenia* (Murillo-A et al. 2012), também com espécies endêmicas chilenas. *B. cruckshanksii* está mais próximo de *Luma* (Lucas et al. 2007), fato indiretamente corroborado por Murillo-A et al. (2012), que utilizando quatro marcadores plastidiais e dois nucleares, encontraram esta espécie como grupo irmão de *Myrceugenia*, gênero fortemente relacionado com *B. cruckshanksii* na maioria dos resultados encontrados em nosso estudo. Estes resultados fortalecem a discussão levantada por Lucas et al. (2007) quanto a necessidade de revisão do gênero *Blepharocalyx* e a possibilidade de revalidação de *Temu cruckshanksii* (Hook. & Arn.) O. Berg (Linnaea 30: 711. 1861).

O marcador psbA-trnH foi eficiente em construir a estrutura da rede haplotípica de *B. salicifolius* e apresentou um padrão consistente pois não mostrou conflito com outras regiões uma vez que o incremento de mais marcadores aumentou a convergência entre nós e valores de suporte dentro e entre grupos foi fortalecido. As linhagens de Floresta Atlântica do Rio de Janeiro e Bahia são mais próximas das linhagens de Cerrado e as linhagens de Floresta Atlântica do sul do Brasil e os Yungas Tucumanos bolivianos estão próximos entre si. A estrutura encontrada para linhagens desta espécie apresentou boa resolução e alto suporte e pode estar relacionada com a dinâmica biogeográfica entre Floresta Atlântica e Cerrado.

*B. salicifolius* é uma espécie de interesse na investigação de processos envolvidos na diversificação e padrões de riqueza biológica entre Cerrado e Floresta Atlântica. A distribuição posterior das probabilidades de tempo de divergência das linhagens de Cerrado e Floresta Atlântica de *B. salicifolius* é correspondente a formação dos principais grupos de espécies de Myrtaceae. Portanto, os processos de determinaram a distribuição atual das linhagens genealógicas desta espécie podem ser os mesmos que definiram os principais grupos de diversificação das espécies de Myrtaceae da América do Sul.

A história evolutiva desta espécie parece estar mais relacionada a interações em escala maior entre Floresta Atlântica e Cerrado e uma possível migração Sul-Norte. Existe a hipótese de que *B. salicifolius* tenha origem florestal (Landrum 1986). O estudo prévio de aspectos biogeográficos da variação morfométrica foliar desta

espécie mostrou que a grande plasticidade foliar é de Floresta Atlântica (Capítulo 2 ). As populações neste bioma apresentou variação foliar abrangendo quase todas as formas foliares de *B. salicifolius* (Capítulo 2 ). Isto nos leva a crer que descendentes de linhagens essencialmente florestais não teriam tantos problemas em colonizar ambientes mais restritivos.

Os resultados deste estudo corroboram com os encontrados por Lucas et al. (2007) no que diz respeito a necessidade da inclusão de mais regiões para se obter melhor resolução das relações evolutivas das espécies de Myrtaceae da América do Sul. A contribuição deste trabalho em incluir linhagens de *B. salicifolius* permitiu, contudo, acrescenta mais discussão quanto aos processos biogeográficos responsáveis pelos padrões de diversidade de Myrteae via interpretações de diversificação em nível intra-específico.

## **Conclusão**

Aparentemente existe uma correspondência entre o aumento de resolução entre os subgrupos de Myrteae e as linhagens encontradas para *B. salicifolius*. Quanto melhor o suporte das relações entre as linhagens desta espécie, melhor a resolução de grupos internos da tribo. A convergência entre as linhagens desta espécie é profunda e o sinal filogenético para o entendimento das relações parece estar no mesmo nível necessário para solucionar relações de gênero e subgrupos da tribo. Este fato reforça a utilização desta espécie como modelo na investigação de processos históricos envolvidos na evolução da tribo na América do Sul.

O baixo suporte para clados de subtribo de Myrtaceae prejudicaram o esclarecimento das relações evolutivas para espécies desta família na América do Sul ou sugerem que outros processos, ainda desconhecidos, estejam relacionados com a evolução histórica do grupo. A relação entre linhagens de *B. salicifolius* baseada na rede de haplótipos de *psbA* é corroborada por outros marcadores e sugere uma estrutura geográfica interessante e que merece um investigação mais aprofundada. A posição basal de *B. salicifolius* não reforçada nem refutada. Estudos para seleção de marcadores que possam ser mais informativos quanto às relações evolutivas das

espécies de Myrtaceae da América do Sul são primordiais. Partindo-se da premissa de que *B. salicifolius* seja basal em Myrteae e que trabalhos recentes corroboram estas suspeitas (Lucas et al. 2007, Murillo-A et al. 2012, Biffin et al. 2010), o investimento no entedimento das relações do gênero *Blepharocalyx* pode estar atrelado ao esclarecimento da história evolutiva e biogeografia de Myrtaceae na região Neotropical.

## Capítulo 4 - Estrutura e dinâmica populacional de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg em cerrado sentido restrito no Brasil Central.<sup>2</sup>

### Introdução

O gênero *Blepharocalyx* (Myrtaceae) é composto por apenas quatro espécies: *B. cruckshanksii* (Hook. & Arn.) Nied., *B. eggertii* (Kiaersk.) Landrum, *B. myriophyllus* (Casar.) Morais & Sobral (Morais & Lombardi 2006) e *B. salicifolius* (Kunth) O. Berg (Landrum 1986). Diferente das demais espécies do gênero, *B. salicifolius* apresenta ampla distribuição geográfica sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Equador, Paraguai, Uruguai e Brasil nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Bahia, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (Landrum 1986, Lughadha 1994, Silva Júnior 2012).

Portanto, *B. salicifolius* ocorre nos biomas Floresta Atlântica e Cerrado. Neste último, habita fitofisionomias florestais (cerradão e mata de galeria), savânicas (cerrado sentido restrito e vereda) e campestres (campo sujo e campo rupestre) (Mendonça et al. 2008, Silva Júnior et al. 2001, Silva Júnior 2012). Apesar de sua ampla distribuição latitudinal, nas províncias fitogeográficas definidas por Bridgewater & Ratter (2004) para o Cerrado, esta espécie ocorreu somente nas províncias central e sudeste, região de conexão com biomas litorâneos e da porção sul do Brasil.

Trata-se de uma espécie arbórea brevidecídua, zoocórica e com taxa de germinação de até 90% (Lenza & Klink 2006, Silva Júnior 2012). Seus frutos carnosos são apreciados pela avifauna (Kuhlmann 2012, Silva Júnior 2012). Portanto, *B. salicifolius* tem uso potencial na recuperação de áreas de Cerrado degradadas. Assim, são necessários estudos que visem gerar informações que poderão subsidiar planos de

---

<sup>2</sup> Manuscrito em vias de submissão à revista *Austral Ecology* com o título "Population strategy of a Neotropical Savanna woody species to different disturbance conditions: fire and density limitations".

manejo da espécie, bem como auxiliar na compreensão de fatores que influenciam sua ampla distribuição geográfica.

Este trabalho objetivou analisar a estrutura de populações de *B. salicifolius* em áreas de cerrado sentido restrito submetidas a diferentes situações de distúrbio. Avaliamos, com base em dados empíricos, como a presença de distúrbios diversos (queimadas e antropização) ou a ausência dos mesmos influenciam a estrutura populacional de *B. salicifolius* em cerrado sentido restrito. Além disso, analisamos a dinâmica populacional da espécie ao longo de 12 anos em uma área de cerrado no Brasil Central.

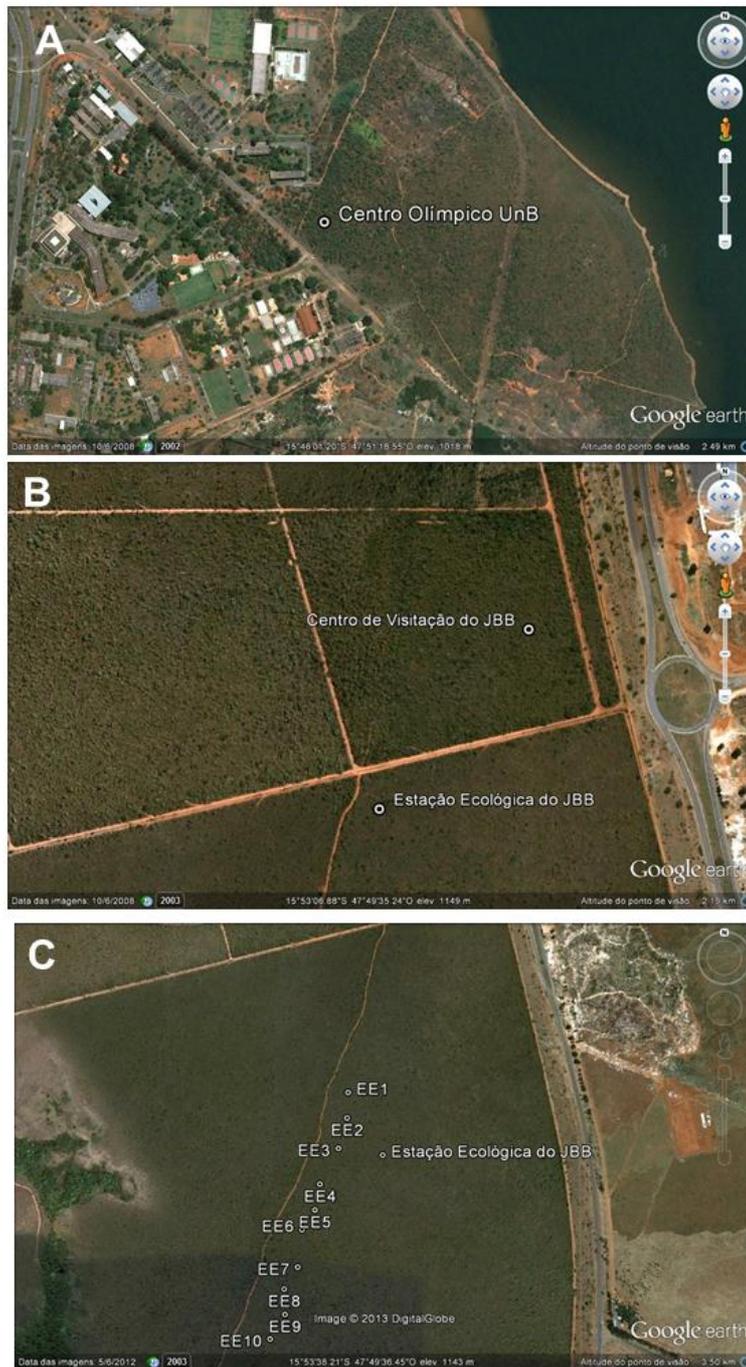
## **Material e Métodos**

### *Local de estudo*

Foram amostradas populações de *B. salicifolius* em três áreas de cerrado sentido restrito no Distrito Federal com diferentes históricos de perturbação. A primeira população foi coletada em um fragmento de cerrado perturbado no Centro Olímpico da Universidade de Brasília (15°46'S e 47°50'W) (Figura 1A). Esta área tem passado atualmente por várias ações de degradação antrópica, tais como despejos ilegais de lixo e entulho, queimadas anuais, e gramíneas exóticas, principalmente *Melinis minutiflora* Beauv (capim gordura) (Assunção & Felfili 2004, Fank-de-Carvalho et al. 2009).

Outras duas populações foram amostradas no Jardim Botânico de Brasília (JBB) na Área de Visitação (CV-JBB) e Estação Ecológica (EE-JBB). O Centro de Visitação, está protegido do fogo por mais de 20 anos. Na Estação Ecológica, a frequência de fogo é quadrienal (Libano & Felfili 2007). O JBB é uma importante área de conservação no DF e abriga várias fitofisionomias de Cerrado, dentre estas cerrado sentido restrito (Azevedo et al. 1990). Da área total do JBB, 526 ha compõem o Centro de Visitação e aproximadamente 4.500 ha pertencem à Estação Ecológica (EE). A área de visitação é formada por talhões de vegetação circundados por estradas que funcionam como aceiros. O cerrado sentido restrito, foco deste estudo, encontra-se em um talhão

paralelo à EEJBB (Figura 4-1B) e está protegido do fogo a mais de 20 anos. Na EEJBB, o estudo foi conduzido no cerrado de interflúvio (Figura 4-1C), em área plana, distante da borda da mata de galeria do córrego Cabeça de Veado (Silva Júnior & Sarmento 2009). O cerrado de interflúvio não é protegido do fogo e os registros indicam que grandes incêndios ocorreram na área em intervalo de aproximadamente seis anos.



**Figura 4-1:** Áreas de cerrado sentido restrito onde as populações de *B. salicifolius* foram amostradas. (A) população Centro Olímpico (CO); (B) população Centro de Visitação do Jardim Botânico de Brasília (VC-JBB); (C) população do Interflúvio. Fonte: Google Earth.

### *Coleta de dados*

A população do CO foi amostrada em uma área de 30,8 ha e a população do CV-JBB em 16,7 ha. Já no cerrado de interflúvio na EEJBB os dados populacionais foram coletados em 10 parcelas permanentes de 20 x 50 m totalizando um hectare amostrado.

Nas três áreas estudadas foram incluídos indivíduos lenhosos com diâmetro da base (Db), medido a 30 cm do solo,  $\geq 5$  cm. No CO e CV-JBB, para todos os indivíduos incluídos na amostragem foram mensurados o Db; diâmetro a altura do peito (DAP), medido a 1,30 m do solo; altura total, considerada da base do tronco até o ramo mais alto ou folhagem; altura do fuste, medida do solo até a primeira ramificação do caule; e o número de bifurcações do caule observadas a altura do solo, ou seja, até 30 cm (BAS). No interflúvio os indivíduos incluídos na amostragem tiveram o Db e altura total mensurados. Neste local foi possível acompanhar a dinâmica da população ao longo de 12 anos com os dados populacionais de *B. salicifolius* obtidos de mensurações que foram realizadas em estudos anteriores nos anos de 1997, 2003 e 2009 (Fonseca & Silva Júnior 2004, Júnior & Sarmiento 2009).

Indivíduos com bifurcações na base foram incluídos quando pelo menos um dos caules apresentasse o diâmetro mínimo de inclusão. Nestes casos, os caules foram mensurados separadamente e calculada a média quadrática dos diâmetros para utilização de um diâmetro único (Scolforo 1994).

### *Análise dos dados*

Para identificar a estrutura de tamanho das populações os indivíduos foram divididos em classes de diâmetro com intervalo de 5 cm e de altura com intervalo de 1 m. A fixação dos intervalos facilitou a comparação entre populações. Os coeficientes 'q' de Liocourt foram calculados para analisar a relação mortalidade/sobrevivência dos indivíduos por meio de classes diamétricas (Meyer 1952).

A análise de normalidade dos dados foi feita pela aplicação do teste D'Agostino-Pearson. Como a distribuição dos dados não foi normal aplicou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney para testar se houve diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ )

entre os parâmetros biométricos avaliados para as duas populações (CO e CV-JBB). As análises estatísticas foram feitas com o programa JMP 9.0.2 (SAS Institute Inc.) e BioEstat 5.0.

A análise da distribuição espacial da população foi realizada com os dados provenientes da mensuração realizada em 2009 no cerrado de interflúvio. Para tanto, foi utilizado o índice de dispersão de Morisita ( $I_d$ ) (Brower & Zar 1984):  $I_d = n [\sum xi^2 - \sum xi / (\sum xi)^2 - \sum xi]$ , onde  $n$  é o número de parcelas e  $xi$  o número de indivíduos em cada parcela. A significância do índice de dispersão foi testada através do teste F ( $gl = n-1$ ;  $p < 0,05$ ) (Poole 1974):  $F = [I_d (N-1) + n - N / n - 1]$ , onde  $I_d$  é valor do índice de dispersão de Morisita,  $n$  o número de parcelas e  $N$  o número total de indivíduos em todas as parcelas. O valor calculado de F foi comparado com o valor da tabela de F, com  $n-1$  graus de liberdade para o numerador e infinito para o denominador.

## Resultados

### *Dados populacionais CO e CV-JBB*

No total foram amostrados 1.242 indivíduos, destes 330 no CO onde a densidade foi estimada em 11 ind.ha<sup>-1</sup> e 912 indivíduos no CV-JBB, com densidade estimada em 55 ind.ha<sup>-1</sup>. Com relação aos parâmetros biométricos comparados (Tabela 4-1), os indivíduos amostrados no CO apresentaram diâmetros, tanto  $D_b$  quanto  $DAP$ , significativamente maiores em comparação ao CV-JBB.

As populações comparadas também se diferenciaram significativamente com relação à altura do fuste (Tabela 4-1). No CO os indivíduos apresentaram menor fuste em comparação àqueles amostrados no CV-JBB. Quanto à altura total, as duas populações não se diferenciaram e são representadas por indivíduos com altura média de 4,54 m (Tabela 4-1).

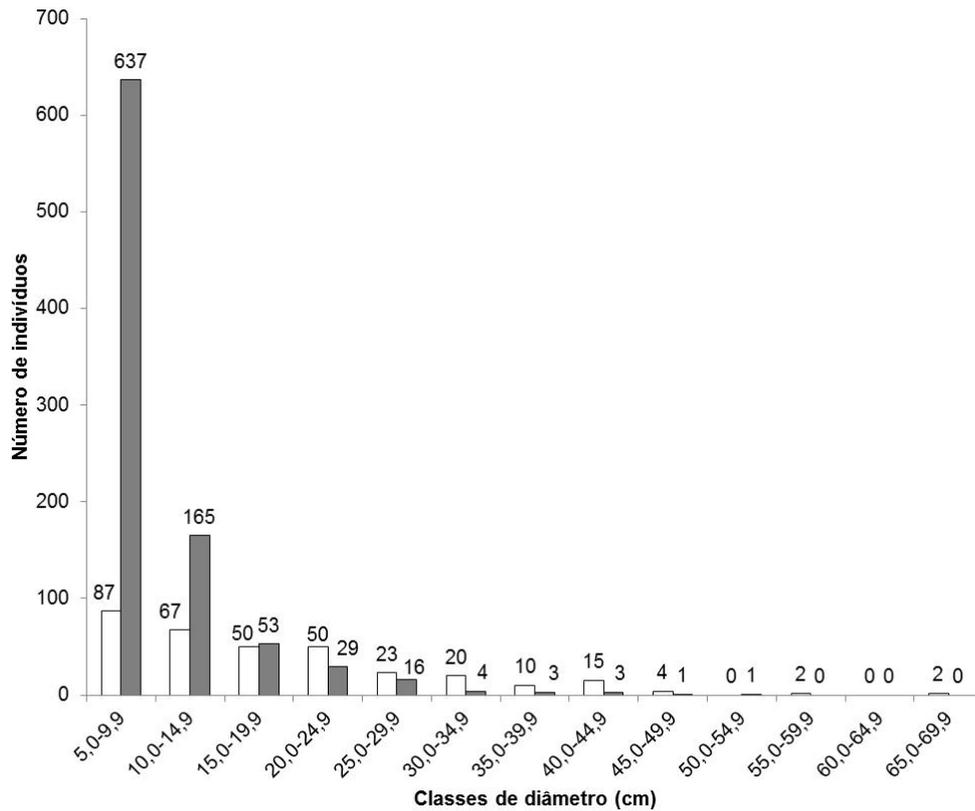
**Tabela 4-1:** Parâmetros biométricos médios de duas populações de *B. salicifolius* amostradas em cerrado sentido restrito no Brasil Central. Entre parênteses valores de coeficiente de variação (%). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam médias significativamente diferentes ( $p=0,0001$ ).

	<b>Db (cm)</b>	<b>DAP (cm)</b>	<b>Altura total (m)</b>	<b>Altura do fuste (m)</b>
<b>CO</b>	18,62a (61,4)	15,77a (65,5)	4,62a (34,6)	1,30a (70,6)
<b>CV-JBB</b>	9,66b (59,1)	7,97b (66,5)	4,45a (28,6)	1,68b (47,4)

A distribuição diamétrica dos indivíduos lenhosos das duas populações apresentou aspecto *J-reverso* (Figura 4-2). Na população do CO o histograma apresentou flutuações e ausência de indivíduos nas maiores classes de diâmetro,  $\geq 35$  cm (Figura 4-2). Do total de indivíduos amostrados na população do CV-JBB, 69,8% ocuparam a primeira classe com diâmetro  $< 10$  cm (Figura 4-2).

O quociente 'q' de Liocourt expressa o percentual de indivíduos que são recrutados de uma classe para a imediatamente superior. A população na área preservada do fogo (CV-JBB) apresentou proporções de recrutamento mais ou menos constantes ao longo da distribuição diamétrica (Tabela 4-2). Além disso, foi expressivo o baixo recrutamento dos indivíduos da primeira classe diamétrica para a segunda (Tabela 4-2). No ambiente perturbado (CO) a população apresentou altos valores de recrutamento nas menores classes de diâmetro,  $< 20$  cm (Tabela 4-2), porém baixo recrutamento nas maiores classes, acima de 45 cm (Tabela 4-2).

As duas populações analisadas apresentaram distribuições de altura com padrões semelhantes (Figura 4-3). No CV-JBB 61,2% dos indivíduos amostrados apresentaram altura entre 3,0 e 4,9 m (Figura 4-3). No CO estas mesmas classes abrigaram 47,3% dos indivíduos (Figura 4-3). Do total de indivíduos amostrados no CO, 3% possuem altura  $\geq 8,0$  m (Figura 4-3), percentual superior à população do CV-JBB com 1,6% dos indivíduos (Figura 4-3).



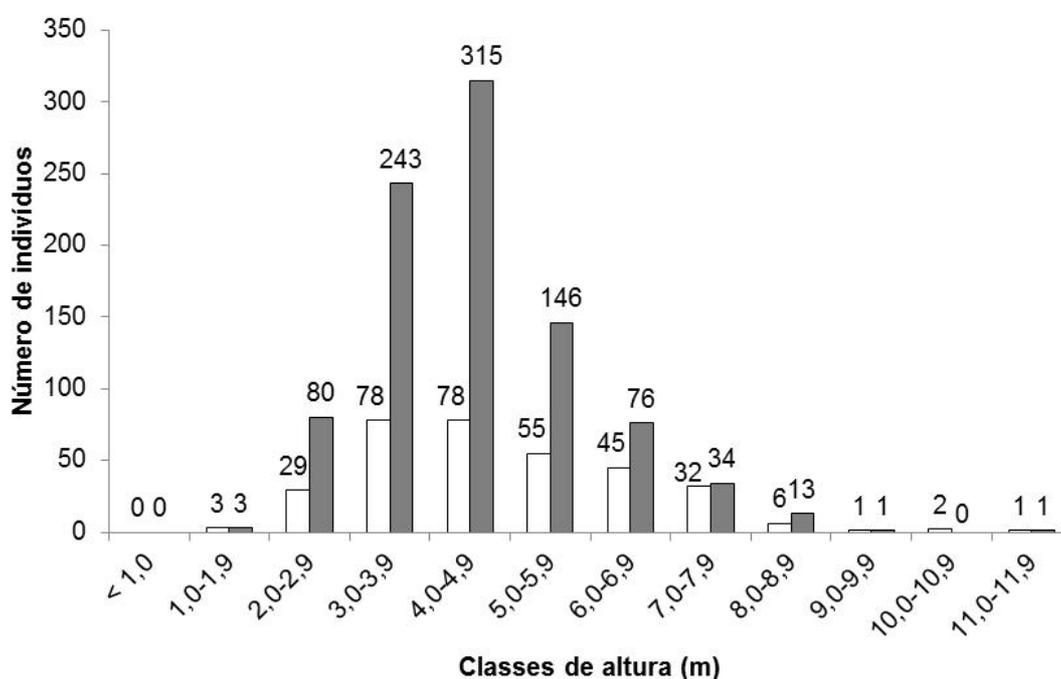
**Figura 4-2:** Distribuição diamétrica dos indivíduos lenhosos de duas populações de *B. salicifolius* amostradas em cerrado sentido restrito no Brasil Central. Onde: barras branca=CO, barras cinza=CV-JBB.

**Tabela 4-2:** Valores de quocientes 'q' de Licourt de duas populações de *B. salicifolius* amostradas em cerrado sentido restrito no Brasil Central. (\*) sem dados para a classe diamétrica.

Quociente	Áreas	
	CO	CV-JBB
q_1	0,77	0,26
q_2	0,75	0,32
q_3	1,00	0,55
q_4	0,46	0,55
q_5	0,87	0,25
q_6	0,50	0,75
q_7	1,50	1,00
q_8	0,27	0,33
q_9	0,00	1,00
q_10	-	*

q_11	0,00	*
q_12	-	*
Média	0,61	0,56

Quanto ao número de bifurcações na base do caule (BAS), estas foram mais frequentes na população do CO onde 21% dos indivíduos apresentaram uma ou mais BAS (Tabela 4-3). No CV-JBB 93% dos indivíduos não apresentaram bifurcações (Tabela 4-3).



**Figura 4-3:** Distribuição das alturas dos indivíduos lenhosos de duas populações de *B. salicifolius* amostradas em duas áreas de cerrado sentido restrito no Brasil Central. Barras branca=CO; barras cinza=CV-JBB.

**Tabela 4-3:** Número de indivíduos com bifurcações no caule, medidas a 30 cm do solo (BAS), em indivíduos de duas populações de *B. salicifolius* amostradas em duas áreas de cerrado sentido restrito no Brasil Central (CO e CV-JBB).

Número de BAS	Populações	
	CO (%)	CV-JBB (%)
0	79,39	92,76
1	17,27	6,47
2	2,73	0,66
3	0,30	0,11

4	0,30	0,00
Soma	100	100

### *Dinâmica Populacional*

Em 12 anos, *B. salicifolius* apresentou no cerrado de interflúvio densidade média de 44 ind.ha<sup>-1</sup>, com a maior densidade registrada em 2003 (Tabela 4-4). O índice de dispersão de Morisita foi Id=2 (F= 6; p < 0,05), o que indica que a espécie apresenta padrão de distribuição agregado (Id > 1; Brower & Zar, 1984).

Os indivíduos lenhosos apresentaram em média 12,6 cm de Db e este parâmetro não variou muito ao longo do tempo (Tabela 4-4). Porém, para a altura total percebe-se incremento de cerca de 0,25 m por ano (Tabela 4-4). A população apresentou em média 3,85 m de altura.

**Tabela 4-4:** Variação temporal nos parâmetros estruturais de *B. salicifolius* amostrada em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília. Entre parênteses valores de coeficiente de variação (%).

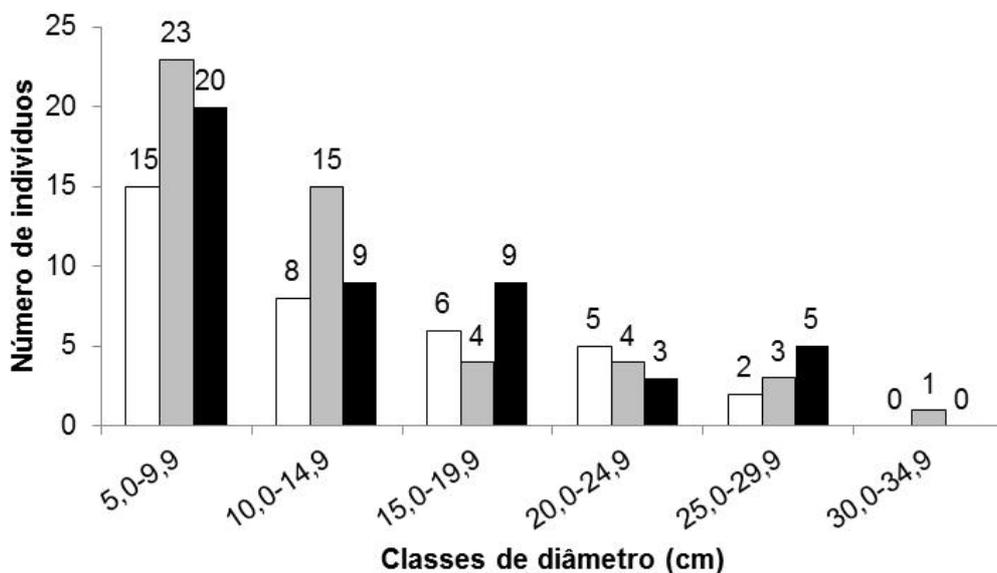
Ano	Densidade (ind.ha <sup>-1</sup> )	Médias	
		Db (cm)	Altura (m)
1997	36	12,5 (55,4)	3,59 (48,1)
2003	50	12,2 (55,6)	3,87 (36,1)
2009	46	13,1 (51,2)	4,10 (34,4)

De modo geral, a distribuição diamétrica dos indivíduos lenhosos de *B. salicifolius* apresentou aspecto *J*-invertido (Figura 4-4). Ou seja, ao longo do tempo o recrutamento foi maior que a mortalidade. Contudo, o quociente 'q' de Liocourt mostrou variação nas taxas de sobrevivência das diferentes classes diamétricas entre as amostragens. Em 2009 a sobrevivência dos indivíduos da menor classe diamétrica foi de 45%, a menor taxa comparativamente entre os anos (Tabela 4-5). Em 2003, somente 27% dos indivíduos foram recrutados da segunda para a terceira classe de

diâmetro (Tabela 4-5). Além disso, verificou-se que apenas um indivíduo, coletado em 2003 alcançou diâmetro acima de 29,9 cm (Figura 4-4).

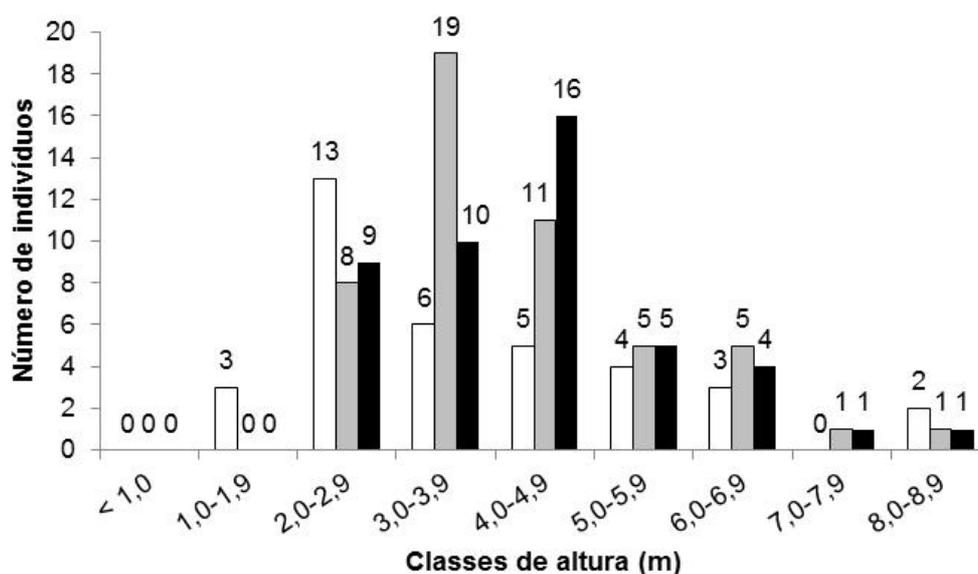
**Tabela 4-5:** Variação temporal nos valores de quocientes 'q' de Licourt de *B. salicifolius* em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília.

Quociente	Anos		
	1997	2003	2009
q_1	0,53	0,65	0,45
q_2	0,75	0,27	1,00
q_3	0,83	1,00	0,33
q_4	0,40	0,75	1,67
q_5	0,00	0,33	0,00
Médias	0,50	0,60	0,69



**Figura 4-4:** Distribuição diamétrica comparativa dos indivíduos lenhosos de *B. salicifolius* amostrados em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília. Barras - branca (1997); cinza (2003); preta (2009).

A análise das distribuições de altura mostrou que, de modo geral, os indivíduos de *B. salicifolius* possuem mais de 1,9 m (Figura 4-6). Em 1997, 52,8% dos indivíduos apresentaram altura entre 2,0 e 3,9 m, em 2003 e 2009 verificou-se maior percentual de indivíduos na classe entre 3,0 e 4,9 m de altura, 60% e 56,5%, respectivamente (Figura 4-6).



**Figura 4-5:** Distribuição temporal das alturas dos indivíduos lenhosos de *B. salicifolius* amostradas em cerrado sentido restrito de interflúvio no Jardim Botânico de Brasília. Barras - branca (1997); cinza (2003); preta (2009).

## Discussão

A análise comparativa da estrutura populacional de *B. salicifolius* no CO e CV-JBB mostrou que a densidade dos seus indivíduos foi maior na área protegida de queimadas, despejo de entulhos e degradação antrópica. De acordo com Nunes et al. (2002), no DF esta espécie foi considerada “muito pouco abundante”, pois apresentou densidade  $\leq 35,0 \text{ ind. ha}^{-1}$  em dez áreas estudadas. Os dados encontrados no CO corroboram esta classificação. No entanto, a densidade estimada para o CV-JBB

classificaria *B. salicifolius* dentre as espécies com densidade entre 35,1 e 70,0 ind.ha<sup>-1</sup>, consideradas “pouco abundantes” (Nunes et al. 2002). A população no CV-JBB foi principalmente representada por indivíduos jovens (diâmetro < 10 cm). Aparentemente, a ausência de distúrbios no CV-JBB possibilitou alto recrutamento de indivíduos nas menores classes de diâmetro.

A análise dos efeitos de queimadas em regime bienal em populações de *B. salicifolius* mostrou taxas de mortalidade de 90% para plântulas e de 50% para juvenis (Matos 1994). De acordo com esta autora, o tamanho crítico para sobrevivência seria de 50 cm de altura com 0,6 cm de diâmetro basal. No CO, área com histórico de fogo e outros distúrbios, a mortalidade para a primeira classe de diâmetro foi de 23%, taxa menor que a reportada por Matos (1994) para plântulas e juvenis. Os indivíduos nesta classe de diâmetro apresentaram altura média de 3,3 m, portanto suficiente para escapar dos efeitos negativos de queimadas.

Por outro lado, no CV-JBB protegido do fogo por mais de 20 anos a mortalidade dos indivíduos com até 9,9 cm de diâmetro da base e altura média de 3,9 m foi de 74%, taxa maior que a encontrada por Matos (1994) para juvenis em cerrado com regime bienal de queimadas na RECOR-IBGE. Assim, no CV-JBB outros fatores, exceto o fogo, estão ocasionando a mortalidade dos indivíduos nas menores classes de diâmetro. Atribui-se esta elevada mortalidade à competição resultante da alta densidade de 2.193 ind.ha<sup>-1</sup> reportada para a comunidade CV-JBB (Miranda et al. 2009). Este valor de densidade foi superior à média encontrada por Solórzano et al. (2012) para 15 áreas de cerradão amostradas com o mesmo limite de inclusão da vegetação lenhosa. Assim, ratifica-se a alta densidade reportada para o cerrado no CV-JBB.

Constatou-se também que na área preservada (CV-JBB) os indivíduos de *B. salicifolius* apresentaram fustes mais altos (1,7m em média) e uma porcentagem significativamente menor de indivíduos ramificados na base. Já na área perturbada (CO), os indivíduos exibiram fuste com altura média de 1,3 m e mais de 21% apresentaram um ou mais bifurcações no tronco na altura do solo. É importante mencionar que na área perturbada a comunidade lenhosa é menos densa com 882 ind.ha<sup>-1</sup> (Assunção & Felfili 2004). Portanto, as diferenças encontradas na estrutura

populacional de *B. salicifolius* submetidas à diferentes condições de perturbação nos levaram a concluir que o maior crescimento vertical pode ser estratégia eficiente para aumentar a sobrevivência em áreas com vegetação densa, como relatado para área preservada do fogo (CV-JBB).

A população de *B. salicifolius* na área preservada do fogo apresentou menor diâmetro médio em relação à população em área perturbada (18,6 cm na área perturbada contra apenas 9,7 cm na área preservada). Estes dados refletem a situação de que a população desta espécie em área preservada é composta basicamente de indivíduos de pequeno diâmetro, uma vez que cerca de 70% de toda a população lenhosa possui diâmetro da base entre 5,0 e 9,9 cm. Estes resultados sugerem que a estratégia populacional de *B. salicifolius* em cerrado sentido restrito é diferenciada dependendo das condições de fogo e densidade da comunidade. Deste modo, o pequeno diâmetro de *B. salicifolius* em áreas preservadas do fogo, e conseqüentemente mais densas, pode ser reflexo da competição devido à alta densidade. É possível que os níveis de mortalidade de recrutas não lenhosos desta espécie seja semelhante em áreas com perturbação por fogo, uma vez que os tempos de recrutamento e seleção de indivíduos das primeiras classes diamétricas possivelmente são maiores. Por outro lado, áreas menos densas possibilitam maior investimento em área basal e maior exploração de solo e outros recursos abióticos.

As populações estudadas podem ser consideradas auto-regenerativas com base nas curvas de distribuição diamétrica. Isto significa que a mortalidade é menor que o recrutamento. Contudo, na população do CO falhas no histograma foram observadas. A falta de indivíduos nas maiores classes de diâmetro ratifica a presença de distúrbio na área (Felfili & Silva-Júnior 1988, Silva Júnior & Silva 1988, Roig 2000).

As populações de *B. salicifolius* estudadas apresentaram padrão de distribuição agregado, tipo comum de distribuição espacial em espécies arbóreas das savanas tropicais (San Jose et al. 1991). Este tipo de distribuição também é característico de plantas com dispersão barocórica (diásporos dispersos pela gravidade) ou zoocórica, que é o caso da espécie estudada já que os frutos de *B. salicifolius* são carnosos do tipo bacóide, vermelhos quando maduros, dispersos principalmente por aves (Kuhlmann

2012, Silva Júnior 2012). Seus frutos produzem muitas sementes pequenas com até 0,3 cm de diâmetro (Silva Júnior 2012).

A análise da dinâmica populacional de *B. salicifolius*, ao longo de 12 anos, mostrou que queimadas em intervalos de aproximadamente seis anos não comprometeram a manutenção da espécie no cerrado de interflúvio na EEJBB. Contudo, este tipo de distúrbio causou variações nas taxas de sobrevivência, principalmente nas menores classes de diâmetro, e eliminou da população indivíduos lenhosos mais baixos, com altura inferior a 2,0 m.

Estes resultados corroboram os encontrados por Libano & Felfili (2007) para amostragens, em intervalos de três anos, no cerrado sentido restrito da Fazenda Água Limpa, Brasília-DF. Segundo estas autoras, entre 1985 e 2003 queimadas ocorreram na área em intervalo de aproximadamente cinco anos. Neste período, *B. salicifolius* apresentou incremento em IVI (índice de valor de importância), densidade, dominância e frequência (Libano & Felfili 2007).

A espécie *B. salicifolius* é compartilhada por Cerrado e Floresta Atlântica. Características morfológicas do caule (casca), ramos (gemas) e folhas desta espécie são mais relacionadas ao ambiente florestal do que savânico, sendo classificada como espécie sensível ao fogo (Moreira 2000). Apesar disso, esta espécie consegue colonizar e se manter em áreas de cerrado sentido restrito com frequência moderada de queimadas. Atribui-se tal habilidade ao expressivo investimento em crescimento vertical. Esta característica possibilita que indivíduos lenhosos escapem da linha de fogo em caso de queimadas, distúrbio comum em ambientes savânicos. Bem como, sobrevivência em áreas com alta densidade de indivíduos como em cerrado denso e ambientes florestais.

## Considerações Finais

Os resultados das diferentes combinações dos marcadores avaliados neste estudo mostraram que *Blepharocalyx salicifolius* é monofilético. O gênero, contudo mostrou-se parafilético, pois *B. cruckshanksii* apareceu distante de *B. salicifolius* em todas as análises, corroborando os resultados obtidos por Lucas et al. (2007). A investigação de aspectos morfológicos, filogenéticos e populacionais desenvolvidas nesta tese possibilitou reunir dados e resultados que se complementam na interpretação de processos evolutivos e adaptativos de uma espécie neotropical de importante interesse biogeográfico.

As características biológicas e ecológicas de *B. salicifolius*, somado ao fato de ser um táxon amplamente distribuído em importantes ecossistemas Neotropicais permitiu testar hipóteses biogeográficas e contribuiu para fortalecer discussões acerca dos processos evolutivos de Myrtaceae na América do Sul. Pelos resultados aqui mostrados concluímos que *B. salicifolius* apresenta características de distribuição geográfica e aspectos biológicos e ecológicos intrigantes. A comparação de populações de áreas preservadas do fogo e áreas perturbadas com alta frequência de fogo produziu resultados que corroboram a hipótese desta espécie estar adaptada para ter uma ampla distribuição em ambientes savânicos e florestais. Estudos mais detalhados de estrutura genética populacional poderão acrescentar indícios de processos biogeográficos desta espécie e que podem trazer à tona padrões ecológicos e evolutivos que poderão ser estendidos para outros táxons que apresentem distribuição geográfica e aspectos ecológicos semelhantes.

Com base em dados morfométricos mostramos a elevada plasticidade foliar de *B. salicifolius* e o modelo biogeográfico de variação foliar apresentado para a espécie é replicável para outras, e de estudos comparativos podem emergir processos adaptativos compartilhados. Os resultados apresentados possibilitaram ampliar os questionamentos quanto aos aspectos morfológicos e biogeográficos de uma espécie que pode contribuir na compreensão da história evolutiva de Myrtaceae na América do Sul, um dos grupos de plantas mais importantes para a região Neotropical. Estudos

ecológicos de espécies de ampla distribuição geográfica e supostamente basais, como o que foi apresentado nesta tese, podem fornecer informações importantes quanto a processos adaptativos em gradientes ambientais em larga escala quando a variação foliar é notória. É imprescindível que mais dados genéticos sejam incorporados aos dados obtidos nesta tese para corroborar ou refutar a posição filogenética de *B. salicifolius* em relação às outras espécies de Myrtaceae na América do Sul. Por outro lado, esta intrigante dificuldade em estabelecer as relações filogenéticas entre os grupos supragenéricos desta família pode ser resultado de outros processos ainda desconhecidos acerca da história evolutiva desta família.

Portanto, um incremento de regiões de DNA utilizadas na filogenia é necessário para se obter melhor resolução das relações evolutivas de espécies de Myrtaceae na América do Sul em nível de subtribo. O impacto da obtenção de resolução neste nível hierárquico é importante no estudo taxonômico e filogenético desta família, uma vez que a circunscrição de subtribo determina relacionamentos importantes não só em nível de taxonomia, mas aspectos biogeográficos da distribuição dos caracteres morfológicos e a formulação de hipóteses biogeográficas para o grupo na região Neotropical. O baixo suporte para clados de subtribo de Myrtaceae prejudicou o esclarecimento das relações evolutivas para espécies desta família da América do Sul ou sugerem que outros processos, ainda desconhecidos, estejam relacionados com a evolução histórica do grupo. A hipótese de mais de um evento de colonização de Myrtaceae no continente é argumentada por autores e o entendimento destes processos permitirá esclarecer padrões de diversidade genética de grupo de plantas neotropicais.

Aparentemente existe uma correspondência entre o aumento de resolução entre os subgrupos de Myrteae e as linhagens encontradas para *B. salicifolius*. Quanto melhor o suporte das relações entre as linhagens desta espécie, melhor a resolução de grupos internos da tribo. Os resultados apresentados aqui podem servir de estratégias de investigação de regiões de interesse para estudos de diversificação de Myrtaceae na América do Sul utilizando populações de *B. salicifolius* como modelo evolutivo de assembleias de Cerrado e Floresta Atlântica e processos de compartilhamento de espécies entre estes importantes biomas. Isto porque a convergência entre as

linhagens desta espécie é profunda e o sinal filogenético para o entendimento das relações parece estar no mesmo nível necessário para solucionar relações de gênero e subgrupos da tribo.

Este fato reforça a utilização desta espécie como modelo na investigação de processos históricos envolvidos na evolução da tribo na América do Sul, pois além de apresentar ampla distribuição, tem alta plasticidade morfológica e ocorre em diferentes ecossistemas. Além disso, é grupo irmão de todas as Myrtaceae Neotropicais (Lucas et al. 2007) e combina duas características ecológicas dominantes na região Neotropical: polinização por abelhas e dispersão por aves (Proença 1992). Ferramentas filogeográficas podem ser eficientes nos testes de hipóteses biogeográficas para a colonização e diversificação de espécie de Myrtaceae na região Neotropical, bem como, o *trade off* de espécies entre Floresta Atlântica e Cerrado.

A relação entre linhagens de *B. salicifolius* baseada na rede de haplótipos de *psbA* é corroborada por outros marcadores e sugere uma estrutura geográfica interessante e que merece investigação mais aprofundada. Somando-se o senso comum de que *B. salicifolius* seja basal em Myrteae e que trabalhos recentes corroboram estas suspeitas (Lucas et al. 2007, Murillo-A et al. 2012, Biffin et al. 2010), estudos mais aprofundados podem fornecer informações importantes sobre os possíveis marcadores a serem sugeridos para testes filogenéticos das espécies de Myrtaceae da América do Sul e aspectos histórico-evolutivos envolvidos na biogeografia deste grupo na região Neotropical. Não foi possível concluir a topologia basal de *B. salicifolius* em relação a Myrteae. Para tanto, mais regiões são necessárias para aumentar a resolução das relações filogenéticas.

Os resultados obtidos a partir da análise populacional em áreas de cerrado submetidas a diferentes históricos de distúrbios possibilitou entender aspectos ecológicos de *B. salicifolius* especialmente em relação ao fogo, importante elemento na estruturação de comunidades no Cerrado. Além disto, os resultados encontrados mostram uma estratégia importante de uma espécie que se acredita ter origem florestal. A espécie estudada apresentou padrão de distribuição agregado, comum em espécies tropicais arbóreas (San Jose et al. 1991) e característico de plantas com dispersão zoocórica ou barocórica (diásporos dispersos pela gravidade). Além disso,

está relacionado com a quantidade de sementes produzidas e a duração do período de frutificação (Janzen 1976).

É importante destacar que *B. salicifolius* possui frutos carnosos do tipo bacóide, vermelhos quando maduros, dispersos principalmente por aves (Kuhlmann 2012, Silva Júnior 2012). Os frutos produzem muitas sementes pequenas com até 0,3 cm de diâmetro (Silva Júnior 2012). Estudos comparativos podem relacionar outras espécies compartilhadas entre Cerrado e Floresta Atlântica e avaliar se o somatório destas características ecológicas são aspectos adaptativos que permitem que espécies florestais colonizem áreas mesotróficas e com o fogo historicamente envolvido na diversificação de assembleias vegetais no Cerrado (Simon et al. 2009).

O fogo é reconhecidamente um fator determinante de estruturação de comunidades vegetais. O impacto deste distúrbio na estrutura população de espécies no cerrado sentido restrito parece depender fortemente da frequência e intensidade. Este padrão foi evidente em nossos resultados, pois a análise da dinâmica populacional de *B. salicifolius*, ao longo de 12 anos, mostrou que queimadas em intervalos de aproximadamente seis anos não comprometeram a manutenção da espécie no cerrado de interflúvio na EEJBB. Contudo, este tipo de distúrbio causou variações nas taxas de sobrevivência, principalmente nas menores classes de diâmetro, e eliminou da população indivíduos lenhosos mais baixos, com altura inferior a 2,0 m. Estes resultados corroboram os encontrados por Libano & Felfili (2007) para amostragens, em intervalos de três anos, no cerrado sentido restrito da Fazenda Água Limpa, Brasília-DF. Segundo estas autoras, entre 1985 e 2003 queimadas ocorreram na área em intervalo de aproximadamente cinco anos. Neste período, *B. salicifolius* apresentou incremento em IVI (índice de valor de importância), densidade, dominância e frequência (Libano & Felfili 2007).

Nossos resultados permitiram concluir que, partindo-se da pressuposta origem florestal de *B. salicifolius* e com base nas características morfológicas desta espécie, estratégias populacionais poderiam ser adaptações ecológicas para colonizar ambientes savânicos. Trata-se de uma espécie compartilhada por dois importantes biomas, Cerrado e Floresta Atlântica e características morfológicas do caule (casca), ramos (gemas) e folhas desta espécie são mais relacionadas ao ambiente florestal do

que savânico. Apesar disso, esta espécie é capaz de colonizar e se manter em áreas de cerrado sentido restrito com frequência moderada de queimadas. Atribui-se tal habilidade ao expressivo investimento em crescimento vertical. Esta característica possibilita aos indivíduos lenhosos superar a linha de fogo em caso de queimadas, comuns em ambientes savânicos. Do mesmo modo, esta habilidade possibilita estratégias de sobrevivência em áreas com alta densidade de indivíduos como em cerrado denso e ambientes florestais, situação em que a competição em altura pode representar fator limitante para o estabelecimento e manutenção de espécies lenhosas.

## Referências Bibliográficas

- ASSUNÇÃO, S.L., AND J.M. FELFILI, 2004. Fitossociologia de um fragmento de cerrado sensu stricto na APA do Paranoá, DF, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18: p.903–909.
- AZEVEDO, L.G., J.R. RIBEIRO, I. SCHIAVINI, AND P.E.A.M. OLIVEIRA, 1990. *Levantamento da vegetação do Jardim Botânico de Brasília-DF. Fundação Zoobotânica, Brasília, DF, Brasília: Fundação Zoobotânica.*
- BANDELT, H.J., P. FORSTER, AND A. RÖHL, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16: p.37–48.
- BERRY, E., 1916. *The lower Eocene floras of southeastern North America*, Washington: Department of the Interior - United States Geological Survey.
- BIFFIN, E., E.J. LUCAS, L.A. CRAVEN, I.R. COSTA, M.G. HARRINGTON, AND M.D. CRISP, 2010. Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae. *Annals of Botany* 106: p.79–93.
- BORAZAN, A., AND M.T. BABAÇ, 2003. Morphometric leaf variation in oaks (*Quercus*) of Bolu, Turkey. *In Annales Botanici Fennici*. pp. 233–242, Finnish Zoological and Botanical Publishing Board 2003.
- BRIDGEWATER, S., AND J. RATTER, 2004. Biogeographic patterns , b-diversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. *Biodiversity and Conservation* p.2295–2318.
- BRIGGS, B.G., AND L. JOHNSON, 1979. Evolution in the Myrtaceae-evidence from inflorescence structure. *Proc. Linn. Soc. New S. Wales* 102: p.157–256.
- BROWER, J.E., AND J.H. ZAR, 1984. *Field & laboratory methods for general ecology* 2nd ed., Iowa: W.C. Brown Publishers.
- BUCCI, S.J., F.G. SCHOLZ, G. GOLDSTEIN, F.C. MEINZER, A.C. FRANCO, Y. ZHANG, AND G.-Y. HAO, 2008. Water relations and hydraulic architecture in Cerrado trees: adjustments to seasonal changes in water availability and evaporative demand. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: p.233–245.
- CARNAVAL, A.C., M.J. HICKERSON, C.F.B. HADDAD, M.T. RODRIGUES, AND C. MORITZ, 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science (New York, N.Y.)* 323: p.785–9.

- CATALANO, S.A., B.O. SAIDMAN, AND J.C. VILARDI, 2009. Evolution of small inversions in chloroplast genome: a case study from a recurrent inversion in angiosperms. *Cladistics* 25: p.93–104.
- CHASE, M.W., AND H.H. HILLS, 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon* 40: p.215–220.
- COLLEVATTI, R.G., L.C. TERRIBILE, M.S. LIMA-RIBEIRO, J.C. NABOUT, G. DE OLIVEIRA, T.F. RANGEL, S.G. RABELO, AND J.A.F. DINIZ-FILHO, 2012. A coupled phylogeographical and species distribution modelling approach recovers the demographical history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. *Molecular ecology* 21: p.5845–63.
- CRANE, P., S. MANCHESTER, AND D. DILCHER, 1990. A preliminary survey of fossil leaves and well-preserved reproductive structures from the Sentinel Butte Formation (Paleocene) near Almont, North Dakota. *Fieldiana Geology* 20: p.1–64.
- CUÉNOUD, P., V. SAVOLAINEN, L.W. CHATROU, M. POWELL, R.J. GRAYER, AND M.W. CHASE, 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American journal of botany* 89: p.132–44.
- DANQUAH, J.A., M. APPIAH, AND P. ARI, 2011. Leaf Morphometric Variation in Two Species of African Mahoganies: *Khaya ivorensis* and *Khaya anthotheca* (Meliaceae). *European Journal of Scientific Research* 54: p.325–338.
- DARRIBA, D., G.L. TABOADA, R. DOALLO, AND D. POSADA, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9: p.772.
- DILCHER, D., 1973. A paleoclimatic interpretation of the Eocene floras of southeastern North America. *In* A. Graham (Ed.) *Vegetation and Vegetational History of Northern Latin America*. pp. 39–59, Amsterdam-London-New York: Elsevier.
- DOLPH, G.E., AND D.L. DILCHER, 1980. Variation in leaf size with respect to climate in Costa Rica. *Biotropica* 12: p.91.
- DONOGHUE, M.J., 2008. Colloquium paper: a phylogenetic perspective on the distribution of plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 Suppl : p.11549–55.
- DOYLE, J.J., AND J.L. DOYLE, 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: p.13–15.
- DRUMMOND, A., AND A. RAMBAUT, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7: p.214.

- DRUMMOND, A.J., S.Y.W. HO, M.J. PHILLIPS, AND A. RAMBAUT, 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS biology* 4: p.e88.
- EITEN, G., 1972. The Cerrado Vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: p.201–341.
- FANK-DE-CARVALHO, S.M., M.B.S. CAMPOS, E.M.B. PRATES, L. V. ZUANY, A.C. ARCANJO, I.C. GALHARDO, R.W. ALBUQUERQUE, P.S. DE-CARVALHO, S.C. MIRANDA, G.A. AMARAL, N.S. SOMAVILLA, AND C.E.B. PROENÇA, 2009. Florística de uma Área de Cerrado da Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil. *Revista Heringeriana* 3: p.19–43.
- FELFILI, J.M., AND M.C. SILVA-JÚNIOR, 1988. Distribuição dos diâmetros numa faixa de cerrado na Fazenda Água Limpa (FAL) em Brasília-DF. *Acta botânica brasílica* 2: p.85–104.
- FONSECA, M.S. DA, AND M.C. DA SILVA JÚNIOR, 2004. Fitossociologia e similaridade florística entre trechos de Cerrado sentido restrito em interflúvio e em vale no Jardim Botânico de Brasília, DF. *Acta Botanica Brasilica* 18: p.19–29.
- GREGORY-WODZICKI, K.M., 2000. Relationships between leaf morphology and climate, Bolivia: implications for estimating paleoclimate from fossil floras. *Paleobiology* 26: p.668–688.
- HAMILTON, M.B., 1999. Primer Notes: Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: p.513–525.
- HILU, K.W., T. BORSCH, K. MÜLLER, D.E. SOLTIS, P.S. SOLTIS, V. SAVOLAINEN, M.W. CHASE, M.P. POWELL, L.A. ALICE, R. EVANS, H. SAUQUET, C. NEINHUIS, T.A.B. SLOTTA, J.G. ROHWER, C.S. CAMPBELL, AND L.W. CHATROU, 2003. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *American journal of botany* 90: p.1758–76.
- HILU, K.W., AND H. LIANG, 1997. The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 84: p.830–839.
- IBGE, 2004. Mapa de Biomas do Brasil. Available at: <http://www.ibge.gov.br/> [Accessed August 16, 2012].
- JANZEN, D.H., 1976. Why bamboos take so long to flower. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7: p.347–391.
- JOHNSON, L., AND B.G. BRIGGS, 1984a. Myrtales and Myrtaceae—a phylogenetic analysis. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: p.700–756.

- JOHNSON, L.A., AND D.E. SOLTIS, 1994. matK DNA Sequences and Phylogenetic Reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Systematic Botany* 19: p.143.
- JOHNSON, L.A.S., AND B.G. BRIGGS, 1984b. Myrtales and Myrtaceae—a phylogenetic analysis. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: p.700–756.
- JÚNIOR, M.S., AND T. SARMENTO, 2009. Comunidades lenhosas no cerrado sentido restrito em duas posições topográficas na Estação Ecológica do Jardim Botânico de Brasília, DF, Brasil. *Rodriguésia* 60: p.277–294.
- KUHLMANN, M., 2012. *Frutos e sementes do Cerrado atrativos para fauna: guia de campo*, Rede de Sementes do Cerrado.
- LANDRUM, L.R., 1986. Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae). *Flora Neotropica* 45: p.1–178.
- LANDRUM, L.R., AND M.L. KAWASAKI, 1997. Identification Keys The genera of Myrtaceae in Brazil : an illustrated synoptic treatment and identification keys. *New York* 49: p.508–536.
- LEGRAND, C.D., AND R.M. KLEIN, 1978. Mirtáceas. *In* P. R. REITZ (Ed.) *Flora ilustrada catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- LENZA, E., AND C.A. KLINK, 2006. Comportamento fenológico de espécies lenhosas em um cerrado sentido restrito de Brasília, DF. *Revista Brasileira de Botânica* 29: p.627–638.
- LIBANO, A.M., AND J.M. FELFILI, 2007. Fitossociologia de um cerrado sensu stricto no Brasil Central ao longo de 18 anos. *Brasileira de Biociências* 5: p.90–92.
- LIBRADO, P., AND J. ROZAS, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: p.1451–1452.
- LOHMANN, L.G., C.D. BELL, M.F. CALIÓ, AND R.C. WINKWORTH, 2013. Pattern and timing of biogeographical history in the Neotropical tribe Bignonieae (Bignoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: p.154–170.
- LUCAS, E.J., S.A. HARRIS, F.F. MAZINE, S.R. BELSHAM, E.M.N. LUGHADHA, A. TELFORD, P.E. GASSON, AND M.W. CHASE, 2007. Suprageneric Phylogenetics of Myrteae, the Generically Richest Tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: p.1105.
- LUGHADHA, E.N., 1994. Notes on the Myrtaceae of the Pico das Almas, Bahia, Brazil. *Kew Bulletin* 49: p.321.

- LUGHADHA, E.N., AND C. PROENÇA, 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: p.480–503.
- MANCHESTER, S.R., 1999. Biogeographical Relationships of North American Tertiary Floras. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: p.472.
- MATOS, M.R.B., 1994. *Efeito do fogo sobre os regenerantes de Blepharocalyx salicifolius (H.B.K.) Berg. (MYRTACEAE) em cerrado aberto, Brasília, DF*. Universidade de Brasília.
- MCCUNE, B., AND M.J. MEFFORD, 2006. *PC-ORD: multivariate analysis of ecological data*, MjM Software Design.
- MCVAUGH, R., 1968. The Genera of American Myrtaceae: An Interim Report. *Taxon* 17: p.354–418.
- MENDONÇA, R.C., J.M. FELFILI, B.M.T. WALTER, M.C. SILVA-JÚNIOR, A. V. REZENDE, T. S. FILGUEIRA, AND P.E. NOGUEIRA, 2008. Flora vascular do Cerrado. *In* S. M. Sano, S. P. Almeida., and F. Ribeiro (Eds.) *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília - DF: Embrapa Cerrados.
- MEYER, H.A., 1952. Structure, growth and drain in balance uneven-aged forest. *Journal of Forest* 50: p.85–92.
- MIRANDA, S.C., M.C. SILVA-JÚNIOR, P.S. DE-CARVALHO, L.A. SALLES, A.M. OLIVEIRA, AND A.C. COREZZI, 2009. O cerrado sentido restrito no Jardim Botânico de Brasília 24 anos sem incêndios. *In* 60o Congresso Nacional de Botânica. Feira de Santana. Feira de Santana.
- MORAIS, P.O., AND J.A. LOMBARDI, 2006. A família Myrtaceae na reserva particular do patrimônio natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 7: p.3–32.
- MOREIRA, A.G., 2000. Effects of Fire Protection on Savanna Structure in Central Brazil. *Journal of Biogeography* 27: p.1021–1029.
- MORI, S.A.S.A., B.M.B.M. BOOM, A.M.A.M. CARVALINO, T.S. SANTOS, A.M. DE CARVALINO, AND T.S. DOS SANTOS, 1983. Ecological Importance of Myrtaceae in an Eastern Brazilian Wet Forest. *Biotropica* 15: p.68–70.
- MURILLO-A, J., E. RUIZ-P, L.R. LANDRUM, T.F. STUESSY, AND M.H.J. BARFUSS, 2012. Phylogenetic relationships in Myrceugenia (Myrtaceae) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* 62: p.764–76.

- MYERS, N., AND R. MITTERMEIER, 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: p.853–8.
- NUNES, R. V., M.C. SILVA-JÚNIOR, J.M. FELFILI, AND B.M.T. WALTER, 2002. Intervalos de classe para a abundância, dominância e frequência do componente lenhoso do cerrado sentido restrito no Distrito Federal. *Revista Árvore* 26: p.173–182.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T., AND M.A.L. FONTES, 2000. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica* 32: p.793–810.
- OLMSTEAD, R.G., AND J.D. PALMER, 2013. Chloroplast DNA Systematics: A Review of Methods and Data Analysis. *American Journal of Botany* 81: p.1205–1224.
- PARMESAN, C., AND G. YOHE, 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421: p.37–42.
- PENNINGTON, R.T., AND C.W. DICK, 2004. The role of immigrants in the assembly of the South American rainforest tree flora. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359: p.1611–22.
- PENNINGTON, R.T., M. LAVIN, AND A. OLIVEIRA-FILHO, 2009. Woody Plant Diversity, Evolution, and Ecology in the Tropics: Perspectives from Seasonally Dry Tropical Forests. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: p.437–457.
- PIGG, K.B., R.A. STOCKEY, AND S.L. MAXWELL, 1993. Paleomyrtinaea, a new genus of permineralized myrtaceous fruits and seeds from the Eocene of British Columbia and Paleocene of North Dakota. *Canadian Journal of Botany* 71: p.1–9.
- POLE, M., J. DAWSON, AND T. DENTON, 2008. Fossil Myrtaceae from the Early Miocene of southern New Zealand. *Australian Journal of Botany* 56: p.67.
- POOLE, R.W., 1974. *An Introduction to Quantitative Ecology*, New York: McGraw-Hill, Inc.
- PROENÇA, C.E.B., 1992. Buzz pollination—older and more widespread than we think? *Journal of Tropical Ecology* 8: p.115–120.
- PROENÇA, C.E.B., AND P.E. GIBBS, 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytologist* 126: p.343–354.
- RAMBAUT, A., AND A. DRUMMOND, 2007. Tracer v1.4. <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> [Accessed February 11, 2013].

- RATTER, J., J. RIBEIRO, AND S. BRIDGEWATER, 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*.
- RAVEN, P.H., AND D.I. AXELROD, 1974. Angiosperm Biogeography and Past Continental Movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: p.539–673.
- REGO, S.S., A.C. NOGUEIRA, Y.S. KUNIYOSHI, AND Á.F. DOS SANTOS, 2009. Germinação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e umidade. *Revista Brasileira de Sementes* 31: p.212–220.
- ROIG, F.A., 2000. Dendrocronología en los bisques del Neotrópico: revisión y prospección futura. *In* F. A. Roig (Ed.) *Dendrocronología em América Latina*. pp. 307–355, Mendoza: EDIUCN.
- RONQUIST, F., AND J.P. HUELSENBECK, 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: p.1572–1574.
- ROYER, D.L., P. WILF, D.A. JANESKO, E.A. KOWALSKI, AND D.L. DILCHER, 2005. Correlations of climate and plant ecology to leaf size and shape: potential proxies for the fossil record. *American Journal of Botany* 92: p.1141–51.
- ROZEFELDS, A., 1996. Eucalyptus phylogeny and history: a brief summary. *TASFORESTS-HOBART*- 8: p.15–26.
- SAN JOSE, J.J., M.R. FARINAS, AND J. ROSALES, 1991. Spatial Patterns of Trees and Structuring Factors in a Trachypogon Savanna of the Orinoco Llanos. *Biotropica* 23: p.114.
- SÄRKINEN, T.E., M.F. NEWMAN, P.J.M. MAAS, H. MAAS, A.D. POULSEN, D.J. HARRIS, J.E. RICHARDSON, A. CLARK, M. HOLLINGSWORTH, AND R.T. PENNINGTON, 2007. Recent oceanic long-distance dispersal and divergence in the amphi-Atlantic rain forest genus *Renealmia* L.f. (Zingiberaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 44: p.968–80.
- SCOLFORO, T.R., 1994. *Mensuração Florestal 5: crescimento florestal 1* 1st ed., Lavras: ESAL/FAEPE.
- SHAW, J., E.B. LICKEY, J.T. BECK, S.B. FARMER, W. LIU, J. MILLER, K.C. SIRIPUN, C.T. WINDER, E.E. SCHILLING, AND R.L. SMALL, 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: p.142–66.

- SILVA JÚNIOR, M.C., 2012. *100 árvores do cerrado – sentido restrito: guia de campo* 2a ed.,
- SILVA JÚNIOR, M.C., J.M. FELFILI, B.M.T. WALTER, P.E. NOGUEIRA, A.V. REZENDE, R.O. MORAIS, AND M.G.G. NÓBREGA, 2001. Análise da flora arbórea de Matas de Galeria no Distrito Federal: 21 levantamentos. *In* J. F. Ribeiro, C. E. L. Fonseca, and J. C. Sousa-Silva (Eds.) *Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria*. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 159–173.
- SILVA JÚNIOR, M.C., AND A.F. SILVA, 1988. Distribuição dos diâmetros dos troncos das espécies mais importantes do cerrado na Estação Florestal de Experimentação de Paraopeba (EFLEX)-MG. *Acta botânica brasílica* 2: p.107–126.
- SIMON, M.F., R. GREYER, L.P. DE QUEIROZ, C. SKEMA, R.T. PENNINGTON, AND C.E. HUGHES, 2009. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: p.20359–64.
- SOLÓRZANO, A., J. PINTO, J. FELFILI, AND J. HAY, 2012. Perfil florístico e estrutural do componente lenhoso em seis áreas de cerradão ao longo do bioma Cerrado. *Acta Botanica Brasilica* 26: p.328–341.
- SPECIESLINK, 2012. Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: a Integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP). Available at: <http://splink.cria.org.br/> [Accessed August 16, 2012].
- STENSTRÖM, A., I.S. JÓNSDÓTTIR, AND M. AUGNER, 2002. Genetic and environmental effects on morphology in clonal sedges in the Eurasian Arctic. *American Journal of Botany* 89: p.1410–21.
- SUN, Y., D.Z. SKINNER, G.H. LIANG, AND S.H. HULBERT, 1994. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: .
- SYTSMA, K.J., A. LITT, M.L. ZHRA, J.C. PIRES, M. NEPOKROEFF, E. CONTI, J. WALKER, AND P.G. WILSON, 2004. Clades, Clocks, and Continents: Historical and Biogeographical Analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and Relatives in the Southern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences* 165: p.S85–S105.

- THOMPSON, J.D., T.J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, AND D.G. HIGGINS, 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: p.4876–4882.
- THORNHILL, A.H., AND M.D. CRISP, 2012. Phylogenetic assessment of pollen characters in Myrtaceae. *Australian Systematic Botany* 25: p.171–187.
- THORNHILL, A.H., L.W. POPPLE, R.J. CARTER, S.Y.W. HO, AND M.D. CRISP, 2012. Are pollen fossils useful for calibrating relaxed molecular clock dating of phylogenies? A comparative study using Myrtaceae. *Molecular phylogenetics and evolution* 63: p.15–27.
- WHITLOCK, B. A, A.M. HALE, AND P. A GROFF, 2010. Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode. *PloS one* 5: p.e11533.
- WIEMANN, M.C., S.R. MANCHESTER, D.L. DILCHER, L.F. HINOJOSA, AND E.A. WHEELER, 1998. Estimation of temperature and precipitation from morphological characters of dicotyledonous leaves. *American Journal of Botany* 85: p.1796–1802.
- WILF, P., K.R. JOHNSON, AND B.T. HUBER, 2003. Correlated terrestrial and marine evidence for global climate changes before mass extinction at the Cretaceous-Paleogene boundary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: p.599–604.
- WILSON, P.G., M.M. O'BRIEN, P.A. GADEK, AND C.J. QUINN, 2001a. Myrtaceae Revisited: A Reassessment of Intrafamilial Groups. *American Journal of Botany* 88: p.2013–2025.
- WILSON, P.G., M.M. O'BRIEN, P.A. GADEK, AND C.J. QUINN, 2001b. Myrtaceae Revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany* 88: p.2013–2025.
- WILSON, P.G., M.M. O'BRIEN, M.M. HESLEWOOD, AND C.J. QUINN, 2004. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 251: p.3–19.
- WOLFE, J., 1995. Paleoclimatic estimates from Tertiary leaf assemblages. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 23: p.119–142.
- WORLD CHECKLIST OF MYRTACEAE, 2006. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Available at: <http://www.kew.org/wcsp/myrtaceae> [Accessed January 23, 2013].

- WRIGHT, S.D., C.G. YONG, S.R. WICHMAN, J.W. DAWSON, AND R.C. GARDNER, 2001. Stepping stones to Hawaii: a trans-equatorial dispersal pathway for *Metrosideros* (Myrtaceae) inferred from nrDNA (ITS+ ETS). *Journal of Biogeography* 28: p.769–774.
- YOSHIOKA, Y., H. IWATA, R. OHSAWA, AND S. NINOMIYA, 2004. Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* by elliptic fourier descriptors and principal component analysis. *Annals of Botany* 94: p.657–64.

## Material Suplementar

**Material Suplementar 1:** Lista dos 97 vouchers de coletas de *Blepharocalyx salicifolius* e 28 tipos utilizados para estudos de morfometria foliar e inferência biogeográfica.

Aguirre, 135 (UEC) São Luíz do Piratinga - SP (voucher); Aguirre, 728 (ESA) São Manoel - SP (voucher); Araújo, 346 (ESA) Ouro Branco - MG (voucher); Arbo, 5738 (HUEFS) Barra da Estiva - BA (voucher); Moacir Barbosa, 2354 (UB) Ritópolis - MG (voucher); Barreto, 1438 (ESA) Corumbataí - SP (voucher); Barreto, 3455 (ESA) Itirapina - SP (voucher); Barreto, 3506 (ESA) Anhembi - SP (voucher); Bautista, 3941 (HUEFS) Piatã - BA (voucher); Bernacci, 827 (ESA) Votuporanga - SP (voucher); Britaz, 1193 (UEC) São Mateus do Sul - PR (voucher); Carvalho, 252 (ESA) Colombo - PR (voucher); Cerqueira, 199 (UB) Itatiba - SP (voucher); Chaddad, 150 (ESA) Lavras - MG (voucher); Chagas, 1993 (UB) Apucarana - PR (voucher); Chagas, 2043 (UB) - PR (voucher); Chagas e Silva, 2086 (UB) Pirai Sul - PR (voucher); Chagas e Silva, 2120 (UB) Mauá da Serra - PR (voucher); Chagas, 2150 (ESA) Palmeira - PR (voucher); Chagas e Silva, 2150 (UB) Vieiras-Palmeiras - PR (voucher); Chagas, 2200 (ESA) Arredores de Santa Barbara - PR (voucher); Chagas, 2200 (UB) Arredores de Santa Barbara - PR (voucher); Cordeiro, 742 (ESA) Curitiba - PR (voucher); Correia, 124 (UB) Sobradinho - DF (voucher); Costa, 835 (UB) Lapa - PR (voucher); De-Carvalho, 428 (UB) Brasília - DF (voucher); De-Carvalho, 450 (UB) Cristalina - GO (voucher); De-Carvalho, 531 (UB) Paracatú - MG (voucher); De-Carvalho, 604 (UB) Urubici - SC (voucher); De-Carvalho, 631 (UB) Vacaria - RS (voucher); De-Carvalho, 648 (UB) Alto Paraíso - GO (voucher); De-Carvalho, 665 (UB) Santana da Boa Vista - RS (voucher); De-Carvalho, 668 (UB) Jaquirana - RS (voucher); Dematteis, 1617 (RB) Corrientes - ARG (voucher); Dombrowski, 13740 (UB) Piraquara - PR (voucher); Elias, 307 (ESA) Itararé - SP (voucher); Falkenberg, 1521 (FLOR) Itapeva - RS (voucher); Falkenberg, 1537 (FLOR) Itapeva - RS (voucher); Falkenberg, 7242 (FLOR) Urubici - SC (voucher); Farah, 8341 (ESA) Orlandia - SP (voucher); Farias, 138 (UB) Canápolis - MG (voucher); Felfili, 81 (UB) Patrocínio e Coromandel - MG (voucher); Folli, 3407 (RB) Linhares - ES (voucher); Forzza, 2691 (RB) Lima Duarte - MG (voucher); Francisco, 117 (RB) Capelinha - MG (voucher); Funch, 982 (HUEFS) Feira de Santana -

BA (voucher); Ganev, 1367 (UB) Abaira - BA (voucher); Ganev, 2131 (UB) Rio de Contas - BA (voucher); Ganev, 2203 (ESA) Abaira - BA (voucher); Ganev, 2407 (UB) Abaira - BA (voucher); Ganev, 2549 (UB) Abaira - BA (voucher); Garcia, 928 (ESA) Parque Estadual da Serra do Mar - SP (voucher); Godoi, 148 (UEC) Mogi Guaçu - SP (voucher); Gomes, 46 (UEC) Brotas - SP (voucher); Hanazaki, 133 (UEC) Ilha Comprida - SP (voucher); Haridasan, 485 (UB) Brasília - DF (voucher); Harley, 15647 (RB) Serra do Sincorá - BA (voucher); Harley, 25872 (RB) Rio de Contas - BA (voucher); Harley, 27110 (RB) Rio de Contas - BA (voucher); Harley, 25774 (RB) Rio de Contas - BA (voucher); Hatschbach, 30223 (ESA) Diamantina - MG (voucher); Hatschbach, 50205 (FLOR) Berilo - MG (voucher); Hatschbach, 71695 (ESA) Urubici - SC (voucher); Hatschbach, 73505 (RB) Joaquim Felício - MG (voucher); Heringer, 16131 (UB) Luziania - GO (voucher); Zappi, 778 (RB) Santana do Pirapama - MG (voucher); Heringer, 8987 (UB) Brasília - DF (voucher); Stehmann, 1316 (UEC) Caçapava do Sul - RS (voucher); Irwin, s/n (UB) Morro das Pedras - MG (voucher); Jarenkow, 520 (FLOR) Capão do Leão - RS (voucher); Jarenkow, 1491 (FLOR) Morro Redondo - RS (voucher); Jarenkow, 1546 (FLOR) Pinheiro Machado - RS (voucher); Kawasaki, 6442 (UB) Serra do Calixto - MG (voucher); Krieger, 9677 (RB) Itabirito - MG (voucher); Kummrow, 2544 (UEC) Curitiba - PR (voucher); Landrum, 4046 (RB) Curitiba - PR (voucher); Legrand, 11123 (UB) Brasília - DF (voucher); Lindeman, 3368 (RB) Capanema - PR (voucher); Marquete, 3980 (RB) Santa Cruz de Minas - MG (voucher); Martins, 2125 (UEC) Poços de Caldas - MG (voucher); Mattos, 10724 (UB) Itapetininga - SP (voucher); Nakajima, 3195 (UB) Delfinópolis - MG (voucher); Nascimento, 272 (RB) Rio de Contas - BA (voucher); Campos Novaes, 975 (UB) Campinas - SP (voucher); Pereira, 3234 (UB) Brasília - DF (voucher); Proença, 1993 (UB) Brasília - DF (voucher); Proença, 3368 (UB) - PR (voucher); Ratter, 3977 (UB) Brasília - DF (voucher); Rocha, 46 (UB) Lençóis Capitinga - BA (voucher); Sampaio, 73 (UEC) Iguapé - SP (voucher); Sidney, 1573 (UB) Santa Helena de Goiás - GO (voucher); Silva, 938 (RB) - PR (voucher); Soares, 665 (RB) Apucarana - PR (voucher); Soares, 667 (UB) Apucarana - PR (voucher); Silva, 1125 (UB) Brasília - DF (voucher); Sobral, 2594 (UB) Durasnal Cachoeira do Sul - RS (voucher); Spdad, 262 (RB) - ES (voucher); *Blepharocalyx acuminatus* Pohl (K) (tipo); *B. affinis* Riedel s.n. (K) – MG (tipo); *B. amarus* Sellow s.n. (K) – RS (tipo); *B. angustifolius* Sellow s.n. (K) – URU (tipo); *B. angustissimus* Sellow s.n. (K) – URU (tipo); *B. apiculatus* var. *Rubellus* Sellow s.n. (K) –

SP (tipo); *B. brunneus* Sellow 4968 (K) – RS (tipo); *B. canescens* Sellow s.n. (K) – SP (tipo); *B. cuspidatus* Neuwied 18 – DF (tipo); *B. lanceolatus* var *arborescens* Saint Hilaire s.n. (B) – RS (tipo); *B. lanceolatus* var *frutescens* Sellow - URU (tipo); *B. longipes* Widgren 553 (K) (tipo); *B. picrocarpus* Sellow (tipo); *B. pilosus* Sellow (tipo); *B. ramosissimus* Sellow – MG (tipo); *B. salicifolius* var *longipes* Klein (tipo); *B. suaveolens* var *cuneatus* Klein 2434 (tipo); *B. umbilicatus* var *paranaensis* Hatschbach 17567 (tipo); *B. villosus* Sellow – MG (tipo); *B. widgreni* Widgren 548 (tipo); *Eugenia acuminatissima* Claussen (tipo); *Eugenia depauperata* (tipo); *Eugenia tweediei* (*Blepharocalyx tweedie*) (tipo); *Marlieriopsis eggersii* (*Blepharocalyx*) (tipo); *Myrcia mugiensis* (*Blepharocalyx*) (tipo); *Myrtus dumosa* (tipo); *Myrtus salicifolia* Humboldt e Bonpland (tipo); *Myrtus umbilicata* Saint Hilaire (tipo).

**Material Suplementar 2:** Sequências utilizadas nos estudos filogenéticos com seus respectivos acessos no Genbank; itens marcados com (\*) são sequências geradas neste estudo para indivíduos (haplótipos) de *Blepharocalyx salicifolius*.

Espécie/Indivíduo*	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>	ITS	ETS
BSALPARMG539_Hap_1	-	-	-	-
BSALCAXRS579_Hap_2	-	-	-	-
BSALPOUGO648_Hap_3	-	-	-	-
BSALCRIGO450_Hap_4	-	-	-	-
BSALDIAMG785_Hap_5	-	-	-	-
BSALLENBA656_Hap_6	-	-	-	-
BSALTIJRJ807_Hap_7	-	-	-	-
BSALURUSC625_Hap_8	-	-	-	-
BSALURUSC625_Hap_9	-	-	-	-
BSALVACRS634_Hap_10	-	-	-	-
BSALYUNBO669_Hap_11	-	-	-	-
<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret	AM234067	AM489888	AM489807	AM489973
<i>Acmena smithii</i> (Poir.) Merr. & L.M. Perry	AM234137	AM489889	AM489808	AM489974
<i>Algrizea macrochlamys</i> (DC.) Proença & Nic Lughadha	AM234126	AM489890	AM489809	AM489975
<i>Amomyrtus meli</i> (Phil.) D. Legrand & Kausel	AM234069	AM489891	AM489810	AM489976
<i>Anetholea anisata</i> (Vickery) Peter G. Wilson	AM234138	AM489893	AM489812	-
<i>Austromyrtus dulcis</i> (C.T. White) L.S. Sm.;	AM234133	AM489894	AM489813	AM489977
<i>Blepharocalyx cruckshanksii</i> (Hook. & Arn.) Nied.	AM234070	AM489895	AM489814	AM489978
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	AM234084	AM489896	AM489815	AM489979
<i>Callistemon comboynensis</i> Cheel	AM234140	AM489897	AM489816	-
<i>Calyptranthes concinna</i> DC.	AM234103	AM489898	AM489817	AM489980
<i>Calyptranthes kiaerskovii</i>	AM234105	AM489900	AM489819	AM489981

---

Krug. & Urb.				
<i>Campomanesia pubescens</i> O. Berg	AM234077	AM489903	AM489822	
<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg				
	AM234076	AM489902	AM489821	AM489982
<i>Decaspermum humile</i> (G. Don) A.J. Scott				
	AM234128	AM489905	AM489824	
<i>Eucalyptus perriniana</i> F. Muell. ex Rodway				
	AM234139	AM489907	AM489825	AM489985
<i>Eucalyptus tetragona</i> F. Muell.				
	AF190364	AM489906	AF190381	AM489984
<i>Eugenia florida</i> DC.				
	AM234090	AM489912	AM489830	
<i>Eugenia puniceifolia</i> (Kunth) DC.				
	AM234087	AM489909	AM489827	
<i>Eugenia sulcata</i> Spring ex Mart.				
	AM234089	AM489911	AM489829	AM489987
<i>Eugenia uniflora</i> L.;				
	AM234088	AM489910	AM489828	AM489986
<i>Gossia inophloia</i> (J.F.Bailey&C.T.White) Snow & Guymer; Cult				
	AM234131	AM489919	AM489837	
<i>Gossia hillii</i> (Benth.) Snow & Guymer; Cult				
	AM234132	AM489920	AM489838	
<i>Legrandia concinna</i> (Phil.) Kausel; Cult				
	AM234072	AM489921	AM489839	AM489990
<i>Leptospermum scoparium</i> J.R. Forst. & G. Forst.; Cult				
	AM234142	AM489922	AM489840	AM489991
<i>Lophomyrtus obcordata</i> (Raoul) Burret; Cult				
	AM234146	AM489924	AM489842	AM489993
<i>Lophostemon confertus</i> (R. Br.) Peter G. Wilson & J.T. Waterh.;				
	AF048897	AM489925	AF190368	AM489994
<i>Luma apiculata</i> (DC.) Burret; Cult				
	AM234101	AM489926	AM489843	AM489995
<i>Luma chequen</i> (DC.) Burret; Cult				
	AM234102	AM489927	AM489844	
<i>Marlierea eugeniopsoides</i> (Kausel) D. Legrand				
	AM234107	AM489928	AM489845	AM489996

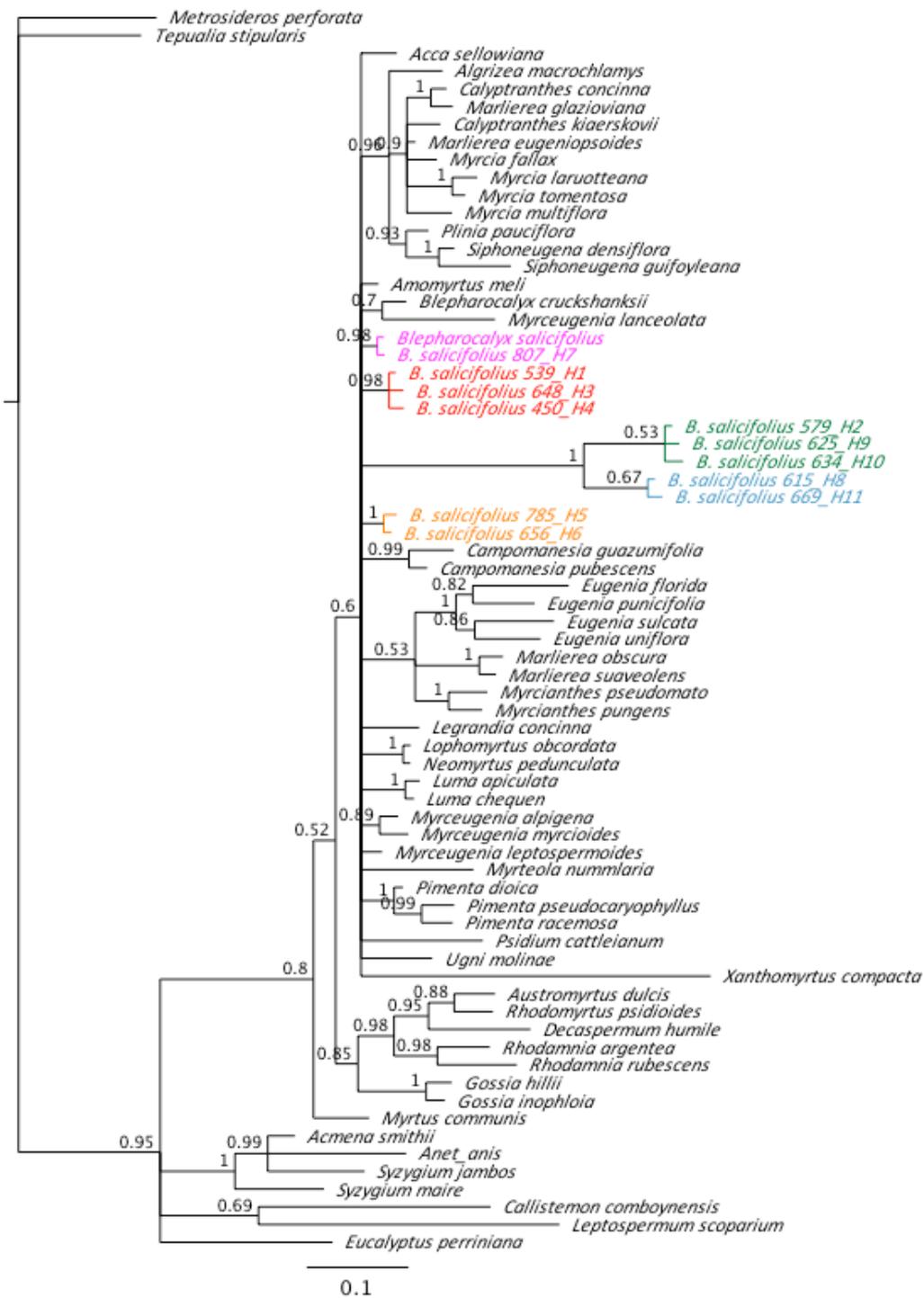
---

<i>Marlierea obscura</i> O. Berg	AM234109	AM489930	AM489847	AM489997
<i>Marlierea suaveolens</i> Cambess.	AM234108	AM489929	AM489846	
<i>Metrosideros perforata</i> (J.R. & G. Forst.) A. Rich.	AM234141	AM489931	AM489848	AM489998
<i>Myrceugenia alpigena</i> (DC.) Landrum	AM234098	AM489937	AM489854	
<i>Myrceugenia lanceolata</i> (Juss. ex J. St.-Hil.) Kausel	AM234074	AM489932	AM489849	
<i>Myrceugenia leptospermoides</i> (DC.) Kausel	AM234075	AM489933	AM489850	AM489999
<i>Myrceugenia myrcioides</i> O. Berg	AM234097	AM489936	AM489853	AM490000
<i>Myrceugenia ovata</i> O. Berg	AM234096	AM489935	AM489852	
<i>Myrcia fallax</i> (Rich.) DC.	AM234124	AM489948	AM489865	AM490006
<i>Myrcia laruotteana</i> Cambess.	AM234115	AM489939	AM489856	AM490002
<i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.	AM234117	AM489941	AM489858	AM490003
<i>Myrcia tomentosa</i> (Aubl.) DC.	AM234116	AM489940	AM489857	
<i>Myrcia venulosa</i> DC.	AM234125	AM489949	AM489866	
<i>Myrcianthes pseudomato</i> (D. Legrand) McVaugh	AM234100	AM489951	AM489868	
<i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand	AM234099	AM489950	AM489867	
<i>Myrteola nummularia</i> (Lam.) O. Berg	AM234068	AM489954	AM489871	AM490008
<i>Myrtus communis</i> L.	AM234149	AM489955	AM489872	AM490009
<i>Neomyrtus pedunculata</i> (Hook. f.) Burret	AM234144	AM489956	AM490637	AM490010
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	AM234081	AM489958	AM489874	AM490011
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum	AM234083	AM489960	AM489876	AM490013
<i>Pimenta racemosa</i> (Mill.) J.W. Moore	AM234082	AM489959	AM489875	AM490012
<i>Plinia pauciflora</i> M.L. Kawas. & B. Holst	AM489411	AM489414	AM489570	
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	AM234080	AM489962	AM489878	AM490014
<i>Rhodamnia argentea</i> Benth.	AM234129	AM489964	AM489880	

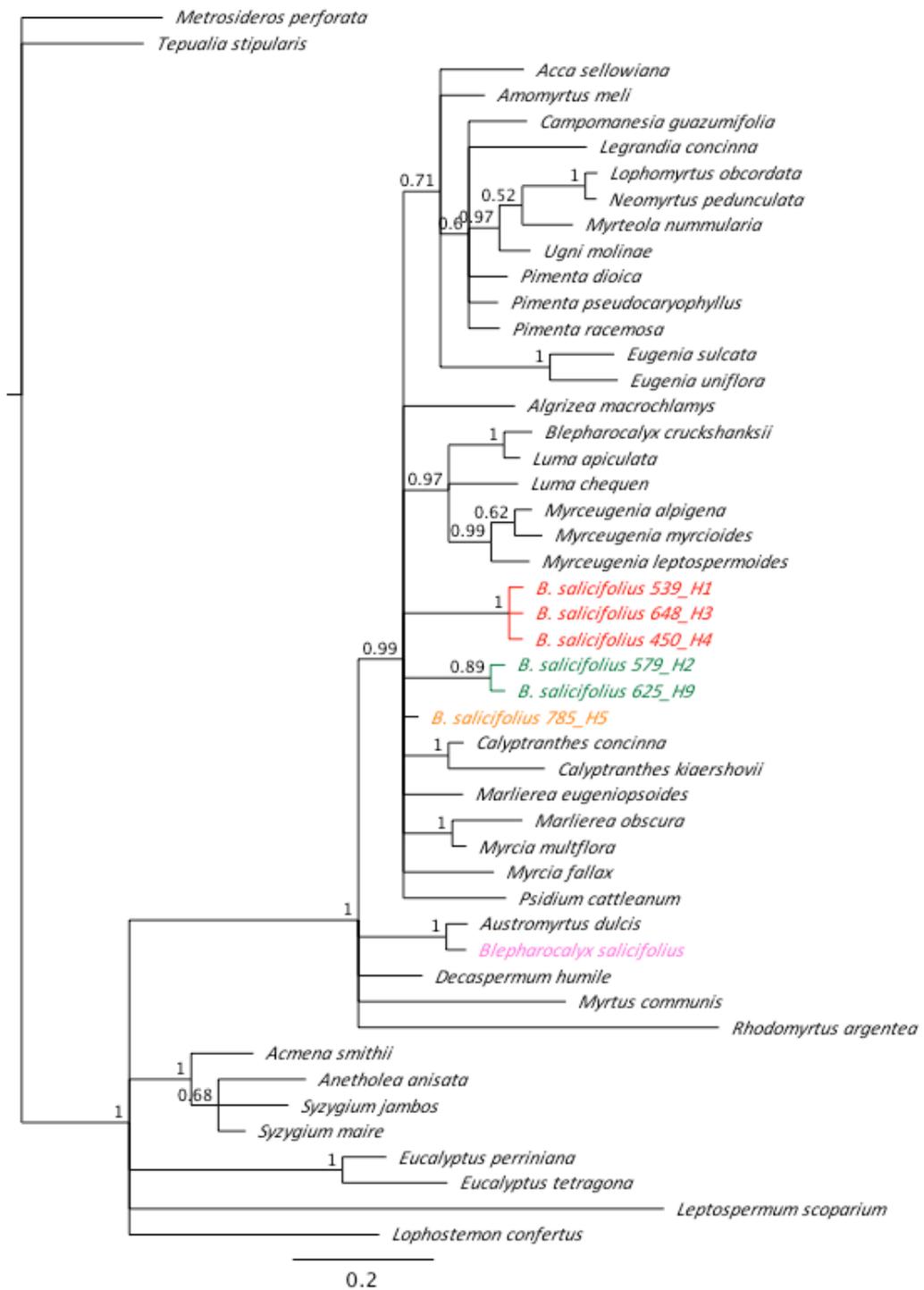
---

<i>Rhodamnia</i>	<i>rubescens</i>	AM234127	AM489963	AM489879	AM490015
(Benth.) Miq.					
<i>Rhodomyrtus</i>	<i>psidioides</i>	(G. AM234134	AM489965	AM489881	
Don) Benth.					
<i>Siphoneugena</i>	<i>densiflora</i>	O. AM489412	AM489572	AM489571	
Berg					
<i>Siphoneugena</i>	<i>guilfoyleana</i>	C. AM234085	AM489966	AM490638	AM490016
Proença					
<i>Syzygium</i>	<i>jambos</i>	(L.) Alston	AM234135	AM489967	AM489882
AM490017					
<i>Syzygium</i>	<i>maire</i>	(A. Cunn.)	AM234136	AM489968	AM489883
W.R. Sykes & P.J. Garnock-					
Jones					
<i>Tepualia</i>	<i>stipularis</i>	(Hook. &	AM234071	AM489969	AM489884
Arn.) Griseb.					
<i>Ugni</i>	<i>molinae</i>	Turcz.	AM234143	AM489970	AM489885
AM490018					
<i>Xanthomyrtus</i>	<i>compacta</i>	Diels	AM234148	AM489972	AM489887

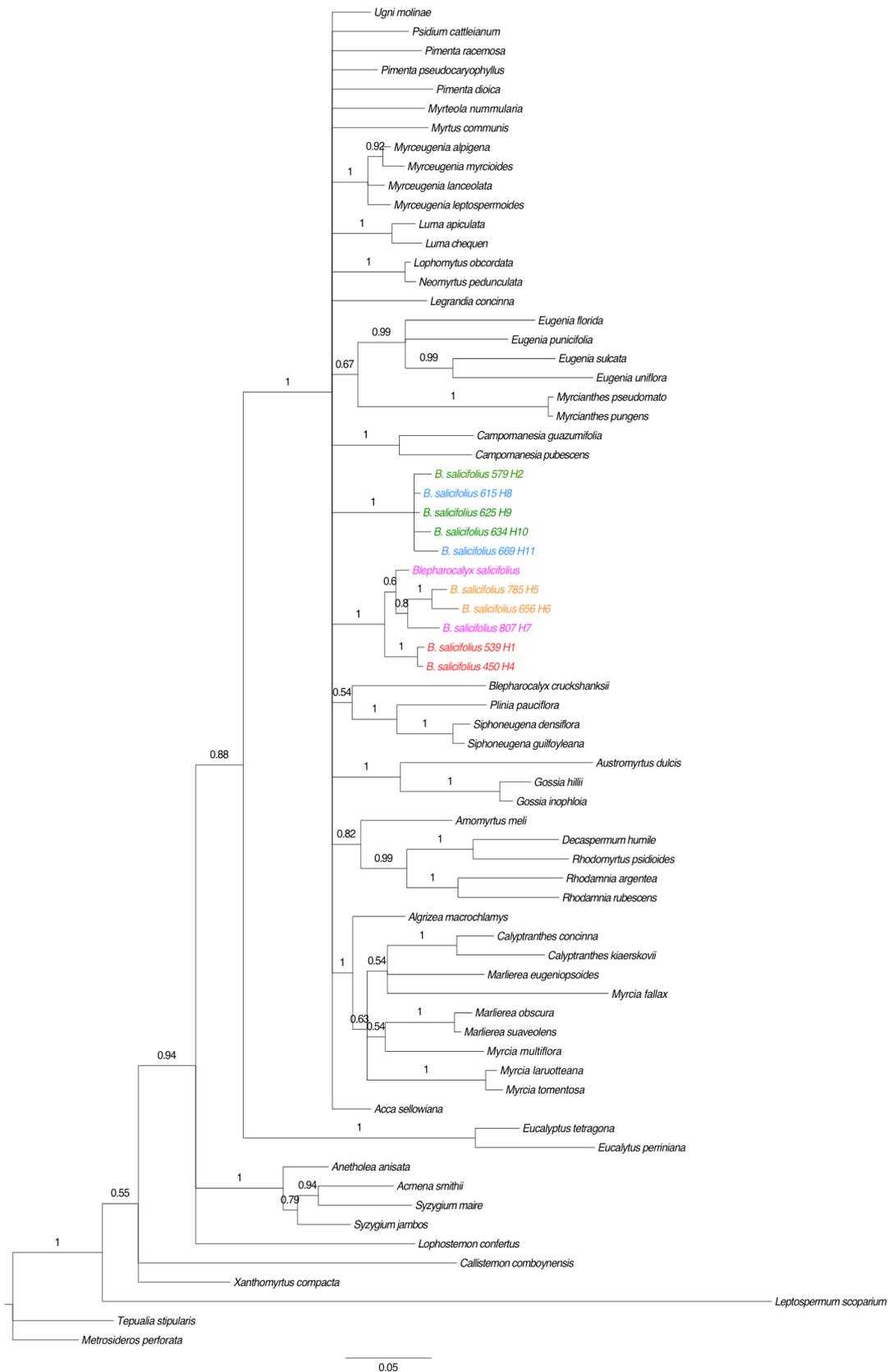
---



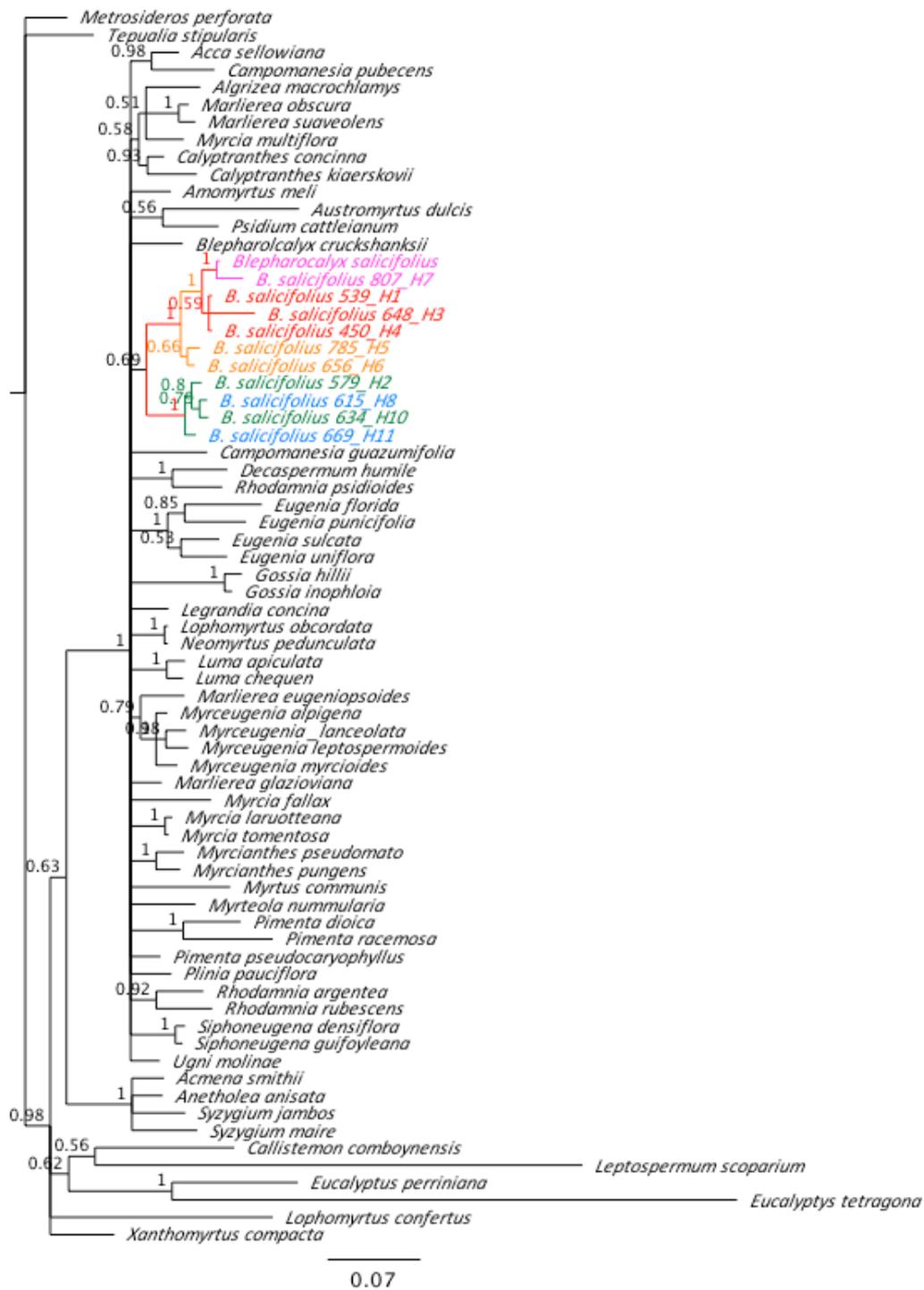
**Material Suplementar 3:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de *psbA-trnH* com valores de probabilidades posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*.



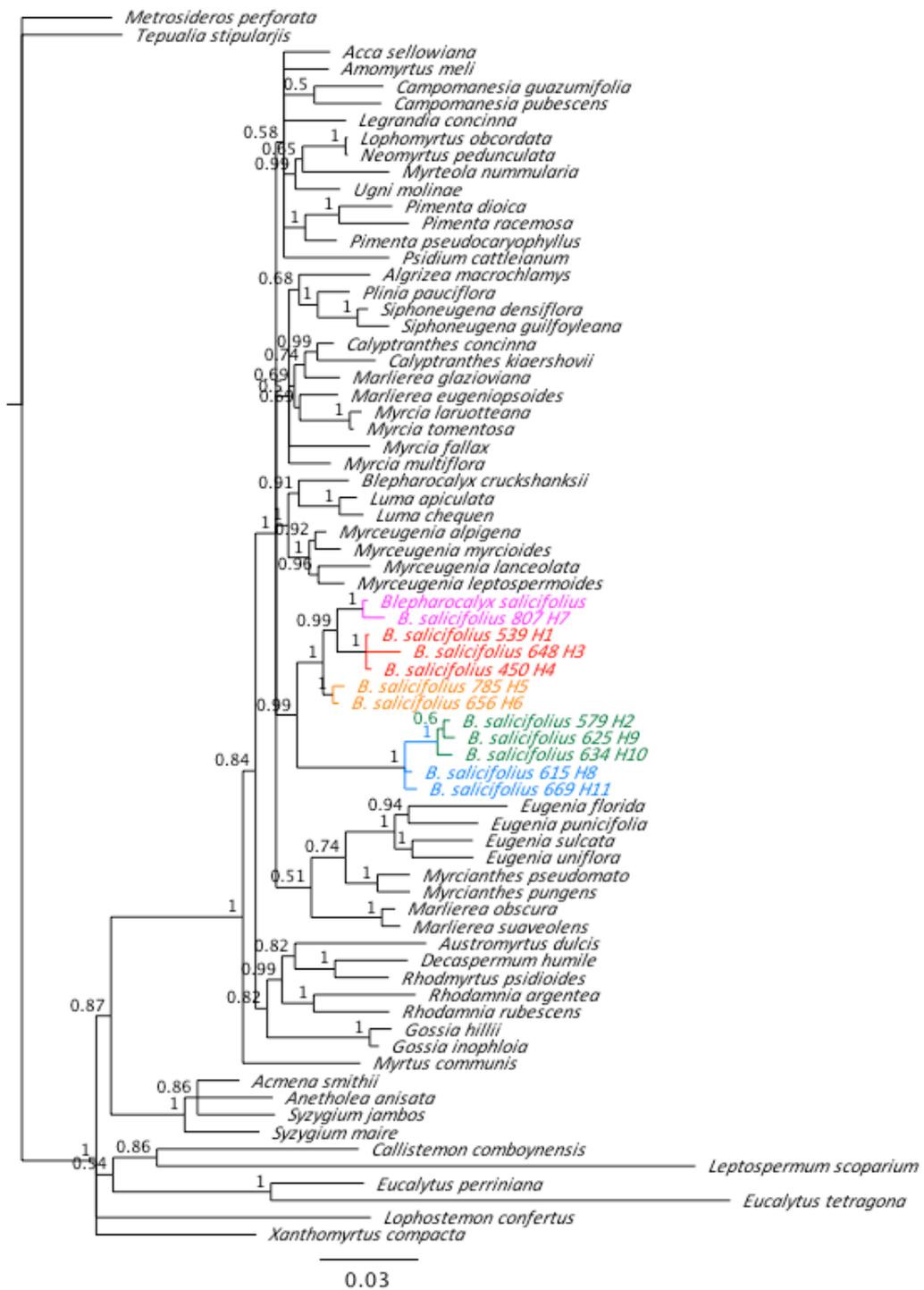
**Material Suplementar 4:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de matK com valores de probabilidades posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*.



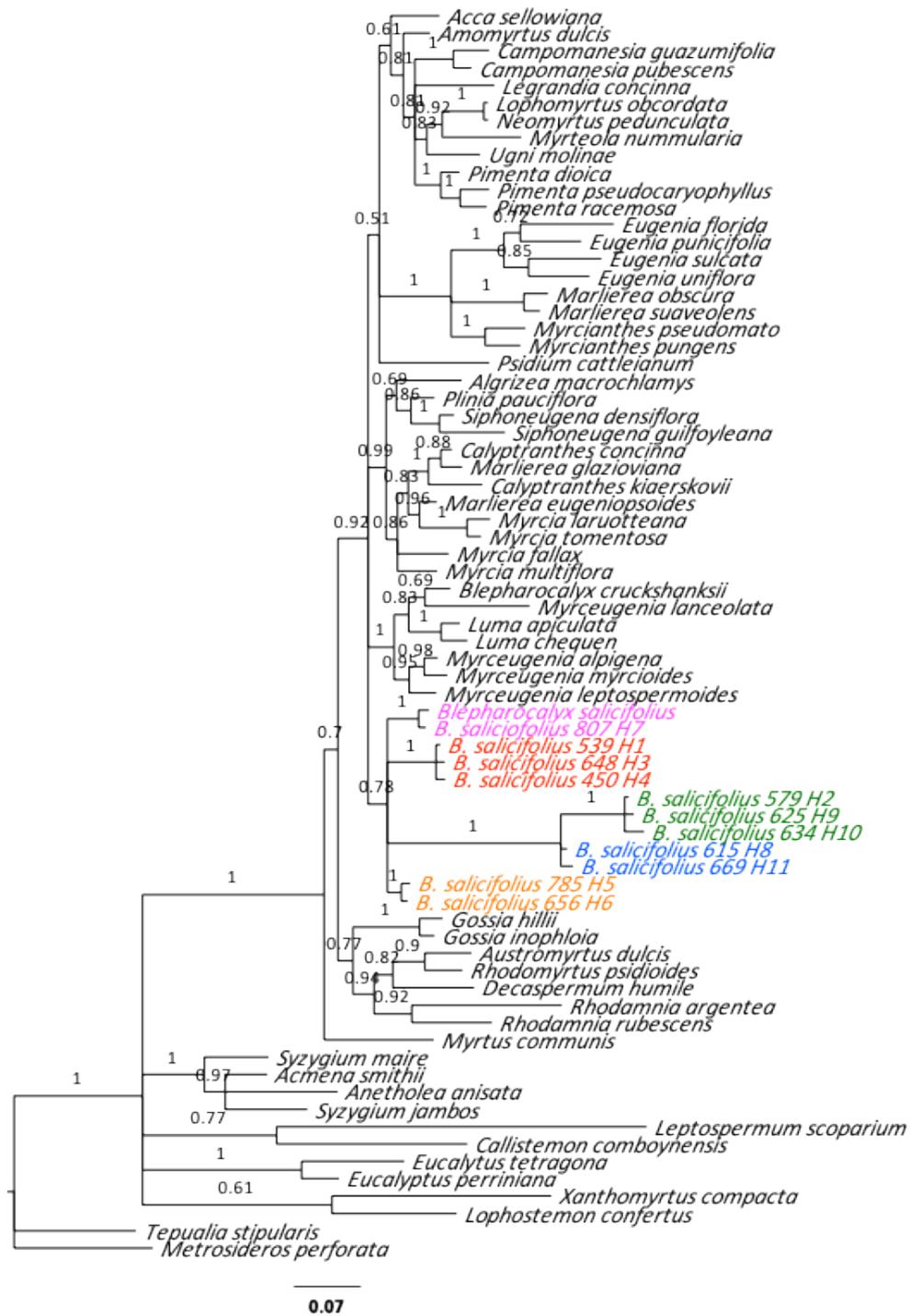
**Material Suplementar 5:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de ETS com valores de probabilidade posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *B. salicifolius*.



**Material Suplementar 6:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de ITS com valores de probabilidades posteriores para espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*.



**Material Suplementar 7:** Árvore consenso resultante da Análise Bayesiana (BA) de cpDNA + ITS com valores de probabilidade posteriores de espécies de Myrtaceae e haplótipos de *Blepharocalyx salicifolius*.



**Material Suplementar 8:** Árvore consenso resultante de Análise Bayesiana (BA) de cpDNA (psbA-trnH e matK) com valores de probabilidade posteriores para espécies de Myrtaceae e *Blepharocalyx salicifolius*.