

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Avanços na compreensão dos padrões evolutivos em Myrtaceae: estudo de caso  
do complexo de espécies *Eugenia involucrata* através de uma abordagem  
integrativa

JOSÉ DIAS DE SOUZA NETO

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreia Carina Turchetto-Zolet  
Porto Alegre, Outubro de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Avanços na compreensão dos padrões evolutivos em Myrtaceae: estudo de caso  
do complexo de espécies *Eugenia involucrata* através de uma abordagem  
integrativa

JOSÉ DIAS DE SOUZA NETO

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreia Carina Turchetto-Zolet  
Porto Alegre, Outubro de 2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Souza Neto, José Dias de

Avanços na compreensão dos padrões evolutivos em  
Myrtaceae: estudo de caso do complexo de espécies  
Eugenia involucrata através de uma abordagem  
integrativa / José Dias de Souza Neto. -- 2022.  
190 f.

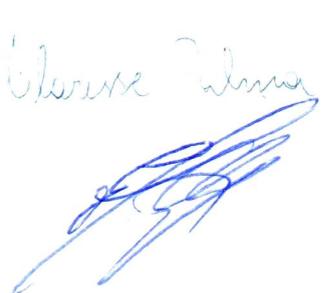
Orientadora: Andreia Carina Turchetto-Zolet.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto  
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Myrtaceae. 2. Genetics and Evolution. 3.  
Integrative approach. 4. Eugenia involucrata. 5.  
Neotropical. I. Turchetto-Zolet, Andreia Carina,  
orient. II. Título.

ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE  
JOSÉ DIAS DE SOUZA NETO – Nº 477

Aos 27 (vinte e sete) dias do mês de outubro de 2022 (dois mil e vinte e dois), por meio de videoconferência, com acesso aberto ao público em geral, a defesa de Tese de Doutorado de **JOSÉ DIAS DE SOUZA NETO**, apresentada em conformidade com o Regimento vigente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM/UFRGS), intitulada **“Avanços na compreensão dos padrões evolutivos em Myrtaceae: estudo de caso do complexo de espécies *Eugenia involucreta* através de uma abordagem integrativa”**, sob a orientação da Profa. Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet. Às 9h (nove horas), a Profa. Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet, na condição de Orientadora do candidato e de Representante da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM/UFRGS) neste ato de defesa, passou a presidir os trabalhos e deu início à sessão. Em seguida, apresentou ao público presente os membros da Banca Examinadora, fazendo, logo após, uma retrospectiva do currículo do Candidato. Conforme preconiza o Regimento em vigência do Programa, o Candidato fez uma apresentação sucinta da tese, antes de sua defesa oral. Dando continuidade, a Profa. Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet passou a palavra ao primeiro membro da Banca, Profa. Dra. Clarisse Palma da Silva (Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP). Após, fez uso da palavra o segundo membro da Banca, Profa. Dra. Verônica Aydos Thode (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS). Para finalizar, fez uso da palavra o terceiro membro da Banca, Profa. Dra. Loreta Brandão de Freitas (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGBM/UFRGS). Os membros examinadores mantiveram diálogo com o Candidato e consideraram a tese de alto gabarito científico. Finda a defesa de tese, a Profa. Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates e comunicou aos presentes que a Banca Examinadora iria proceder ao ato de divulgação dos resultados, reunindo-se em sessão secreta. Para tanto, os trabalhos foram interrompidos por 10 (dez) minutos. Após esse intervalo, foram proclamados pela Banca Examinadora os seguintes resultados: Profa. Dra. Clarisse Palma da Silva – “Aprovado”; Profa. Dra. Verônica Aydos Thode – “Aprovado”; e Profa. Dra. Loreta Brandão de Freitas – “Aprovado”. Com o resultado final global “Aprovado”, o Candidato fez jus ao título de DOUTOR EM CIÊNCIAS (GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR). Às 13h25min (treze horas e vinte e cinco minutos), os trabalhos foram encerrados, dos quais eu, Elmo Jurandir Antunes Cardoso, Coordenador Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, lavrei a presente ata, que assino com a Profa. Dra. Andréia Carina Turchetto Zolet, orientadora do Candidato e representante da Coordenação do Programa neste ato de defesa, e os Membros Examinadores. Porto Alegre, 27 (vinte e sete) de outubro de 2022 (dois mil e vinte e dois).



Andreia C.T. Zolet



Verônica A. Thode

## **Instituições e fontes financiadoras**

O presente trabalho foi executado no Núcleo de Genômica e Evolução de Populações Naturais (GENP), junto ao Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Teve como fontes financiadoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **Agradecimento**

Agradeço às instituições de fomento financeiro e formação de recursos humanos que possibilitaram a condução deste trabalho ao longo dos 4 anos do doutorado, representadas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Genética e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM/UFRGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradeço aos professores do PPGBM que contribuíram ativamente para minha formação pessoal, acadêmica e profissional.

Agradeço a banca e a relatora da tese pela oportunidade de aprender com os criteriosos apontamentos ofertados por estes, e que claramente serão úteis na melhoria das informações apresentadas neste documento.

Agradeço imensamente aos amigos e colegas dos diferentes laboratórios da UFRGS, em especial à Ossman Barientoz, Fernanda Valandro, Thomaz Trenz, Analu, Alice, Joãozinho e Ana Luíza por serem amigos maravilhosos que tornaram ainda mais feliz a vida em PoA.

Agradeço aos integrantes da colônia Capixaba, Aléxia, Fábio, Ariane, Drielli, André, pelo suporte emocional, parceria, sessões de descarrego, troca de informações e risadas nos duros dias desta especialização.

Agradeço à minha orientadora pelo poderoso exemplo de pesquisadora eficaz, inteligente e humana, que sempre estava aberta a me corrigir e ouvir meus problemas pessoais.

Aos amigos da UFES e IFES, por serem a base de quem sou, e por me ajudarem a superar muitos obstáculos da vida.

Ao Fagner, pela paciência e resiliência nos meus últimos meses de doutorado, onde estava sobrecarregado de afazeres a ponto de não dar a devida atenção à ele.

Agradeço também a minha família gaúcha, Francieli Ortolan, Adriana, Master e Magrãozinho, por serem acolhedores, ternos e inclusivos nos anos que passei

nos rincões do Sul. Saibam que, em qualquer lugar que estiver, terão um lar, e a qualquer momento que precisarem, estarei de prontidão para vocês.

Agradeço por fim a minha família, em especial a Maristela, cuja presença foi decisiva para ter um emprego, uma outra família, meus atuais amigos, e uma boa vida oriunda do estudo.

## Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Capítulo I	9
INTRODUÇÃO	10
1.1 Família Myrtaceae	10
1.2 Abordagem integrativa e complexo de espécies	12
1.3 Complexo de espécies <i>Eugenia involucrata</i> DC.	13
1.4 Marcadores moleculares e aplicações na Filogeografia e Genética de Populações	18
1.5 Morfometria Geométrica	19
1.6 Fenologia e suas aplicações	20
OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
Capítulo II	23
ARTIGO CIENTÍFICO 1	24
Capítulo III	79
ARTIGO CIENTÍFICO 2	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	177
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178

## Resumo

Myrtaceae inclui espécies vegetais com ampla distribuição mundial, sendo a Oceania e as regiões Neotropicais seus centros de diversidade. Na região Neotropical, a família é mais representada pela tribo Myrteae, com 29 gêneros e 2164 espécies de plantas frutíferas com significativa importância ecológica e econômica. A problemática na sistemática dentro de Myrteae limitou os estudos dentro deste grupo. A tribo inclui grandes gêneros com complexos crípticos de espécies, como *Eugenia involucrata* DC., uma espécie amplamente difundida e com alta variabilidade morfológica. Assim, a compreensão dos padrões evolutivos de Myrteae é de interesse. O principal objetivo deste estudo é fornecer uma visão geral da evolução das Myrtaceae Neotropicais e desvendar a história evolutiva de um complexo de espécies de Myrteae (*Eugenia involucrata*) através de uma abordagem integrativa baseada em genética de populações, filogeografia e morfometria. No capítulo II desta tese produzimos um artigo de revisão que contempla estudos de Filogenia, Biogeografia, Genética de Populações, Filogeografia, Citogenética e Genômica de Myrtaceae Neotropicais. A partir da análise desses artigos, evidenciamos avanços significativos na pesquisa e algumas áreas de pesquisa negligenciadas. Também detectamos que algumas espécies apresentam dificuldade de manutenção da diversidade intraespecífica devido a atividades antrópicas. Por um lado, identificamos um aumento no número de estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares nos últimos anos, contribuindo para a compreensão dos padrões macroevolutivos. Por outro lado, encontramos uma carência de estudos abrangendo aspectos microevolutivos, como estudos filogeográficos, os quais foram realizados apenas para duas espécies. No capítulo III, realizamos um estudo de diversidade genética e estrutura populacional de *E. involucrata* no sul da Floresta Atlântica. Também realizamos uma análise da morfometria geométrica foliar dessa espécie a partir de imagens de exsicatas. As análises populacionais com marcadores moleculares nucleares (ITS) e plastidiais (*matK*, *trnC-ycf6*, *psbA-trnH*, *trnS-trnG*) revelaram que as populações de *E. involucrata* no sul da distribuição apresentam uma alta diversidade genética e não estão geneticamente estruturadas. A análise das imagens de exsicatas de *E. involucrata* mostraram que alguns grupos de plantas

apresentaram diferenças no formato das folhas. Em conjunto, esses resultados contribuirão para a compreensão dos processos micro e macroevolutivos na tribo Myrteae, e desvendarão a história evolutiva de *E. involucrata*. Particularmente para mostrar se a variabilidade fenotípica deste complexo está associada a algum fator ambiental ou genético.

## Abstract

Myrtaceae includes plant species with worldwide distribution, with Oceania and Neotropical regions being its centers of diversity. In the Neotropical region, the family is more represented by the Myrteae tribe, with 29 genera and 2164 species of fruit plants with significant ecological and economic importance. The systematic problem within Myrteae limited the studies within this group. The tribe includes large genera with cryptic species complexes, such as *Eugenia involucrata* DC., a widespread species with high morphological variability. Thus, understanding the evolutionary patterns of Myrteae is of interest. The main objective of this study is to provide an overview of the evolution of Neotropical Myrtaceae and to unravel the evolutionary history of a Myrteae species complex (*Eugenia involucrata*) through an integrative approach based on population genetics, phylogeography and morphometry. In chapter II of this thesis we produced a review article that includes studies of Phylogeny, Biogeography, Population Genetics, Phylogeography, Cytogenetics and Genomics of Neotropical Myrtaceae. From the analysis of these articles, we evidenced significant advances in research and some neglected research areas. We also detected that some species have difficulties in maintaining intraspecific diversity due to anthropic activities. On the one hand, we have identified an increase in the number of phylogenetic studies based on molecular markers in recent years, contributing to the understanding of macroevolutionary patterns. On the other hand, we found a lack of studies covering microevolutionary aspects, such as phylogeographic studies, which were carried out only for two species. In chapter III, we carried out a study of genetic diversity and population structure of *E. involucrata* in the southern Atlantic Forest. We also performed an analysis of the leaf morphometry of this species from images of exsiccates. Population analyzes with nuclear (*ITS*) and plastid (*matK*, *trnC-ycf6*, *psbA-trnH*, *trnS-trnG*) molecular markers revealed that *E. involucrata* populations in the southern range have a high genetic diversity and are not genetically structured. The analysis of exsiccates images of *E. involucrata*, showed that some groups of plants showed differences in leaf shape. Together, these results will contribute to the understanding of micro and macroevolutionary processes in the Myrteae tribe, and will reveal the evolutionary history of *E.*

*involucrata*. Particularly to show if the phenotypic variability of this complex is associated with some environmental or genetic factor.

## Capítulo I

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae (ordem Myrtales) é composta por 126 gêneros (WCSP, 2022) e 5900 espécies (Stevens, 2017) de angiospermas, que apresenta distribuição pantropical (Wilson *et al.*, 2005), com maior ocorrência no hemisfério Sul (Thornhill *et al.*, 2015). A família é subdividida em: Myrtoideae, distribuída principalmente na América do Sul e Central, e Psiloxylodeae, com maior concentração na Austrália (Wilson *et al.*, 2005). O centro de diversidade região o aior número de espécies, da família está distribuído na Austrália, África, Sudeste da Ásia, e nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (Wilson *et al.*, 2001). A família Myrtaceae é composta por 17 tribos, sendo 14 delas encontradas no continente Australiano (Wilson *et al.*, 2005; Thornhill *et al.*, 2015). Na região Neotropical, apenas duas tribos ocorrem: Metrosídereae (uma espécie - *Metrosideros stipularis* (Hook. & Arn.) Hook.f.) e Myrteae (2164 espécies) (WCVP, 2021; Souza Neto *et al.*, 2022), com a última possuindo plantas com frutos carnosos, que são fonte de alimento para sustentação da biota local (Lucas *et al.*, 2005; Gressler, Pizo, & Morellato, 2006; Staggemeier, Cazetta, & Morellato, 2017).

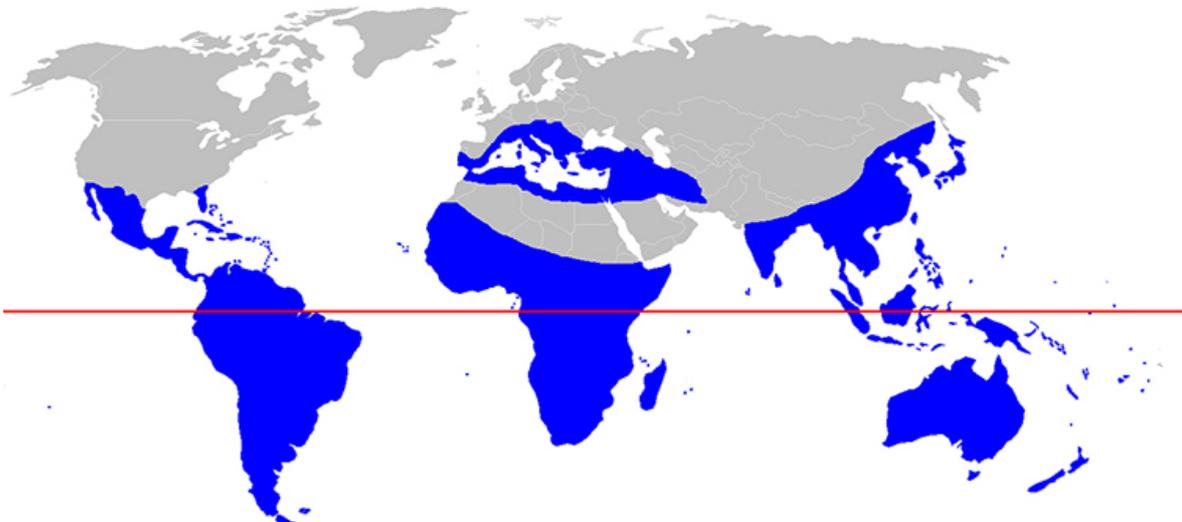


Figura 1: Áreas de distribuição da família Myrtaceae ao redor do mundo (Raiz, 2022).

A família é caracterizada por serem plantas lenhosas, de porte arbustivo ou arbóreo, que possuem folhas inteiras, com disposição alternada ou oposta e às vezes oposta cruzada, e com estípulas muito pequenas (Joly, 1966). Apresentam abundante ritidoma no caule, com a maioria das espécies possuindo flores brancas, efêmeras, hermafroditas e de simetria radial (Joly, 1966). Seus frutos são do tipo baga ou cápsulas (Simpson, 2010) que podem fornecer alimento à fauna local. Ao redor do mundo, não somente seus frutos, mas flores, folhas e madeira são utilizados de diferentes formas, e empregados na alimentação, ornamentação, marcenaria e medicina (Simpson, 2010; Cascaes *et al.*, 2015; Farias *et al.*, 2020a; Nogueira *et al.*, 2020).

Assim, percebe-se que a família possui uma ampla gama de uso em diferentes áreas, sendo de extrema importância em ações diretamente ligadas a economia humana. Exemplo disto são as goiabas (*Psidium guajava* L. (Gutiérrez, Mitchell, & Solis, 2008)), araçás (*P. cattleianum* Sabine (dos Santos Pereira *et al.*, 2018)), jambos (*Syzygium jambos* (L.) Alston (Ochieng *et al.*, 2022)), pitangas (*Eugenia uniflora* L. (Moura *et al.*, 2018)) e outras espécies que possuem valor local, consumidas frescas ou processadas, na forma de doces, geleias, licores e sucos (Farias *et al.*, 2020), sendo ricas fontes de nutrientes e vitaminas (SiBBr, 2022). Outras espécies da família apresentam valor comercial não como alimento, mas como matéria-prima na construção (Lahr *et al.*, 2018), na produção de medicamentos (Cascaes *et al.*, 2015) e especiarias (e.g., *Syzygium aromaticum* L. (Batiha *et al.*, 2020)), e outras áreas industriais (*Pimenta racemosa* (Mill.) J.W.Moore (perfume) e *P. dioica* (L.) Merr. (pigmento) (Britannica, 2022; POWO, 2022)).

A família também possui uma grande importância ecológica, fornecendo alimento para aves, mamíferos e insetos, que atuam como polinizadores e dispersores de sementes (Gressler *et al.*, 2006). Segundo Gressler *et al.* (2006) abelhas das

subfamílias Meliponinae e Bombinae (Apidae) são as de maior ocorrência na polinização das espécies de Myrtaceae, enquanto aves e macacos são os principais dispersores das sementes com outros animais também sendo dispersores, porém em menor frequência. Além de fornecerem alimento para a biota local, Myrtaceae, por ser uma das principais famílias de árvores da Mata Atlântica (Mori *et al.*, 1983) fornece proteção ao solo contra a elevada evaporação (Ilstedt *et al.*, 2016), o excesso de luminosidade para desenvolvimento de plantas secundárias, e contra impacto da chuva, promovendo a infiltração de água no solo (Bessi *et al.*, 2018) e prevenindo erosão (Song *et al.*, 2019). As espécies da família Myrtaceae também fornecem abrigo para animais, suporte para crescimento de epífitas (Nieder, Prosperí, & Michaloud, 2001) e promovem a diversificação do ambiente (Barbosa *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2016), além de promoverem um microclima local (Frenne *et al.*, 2021).

Além dos diversificados usos antrópicos (Farias *et al.*, 2020a) e ecológicos que as espécies da família Myrtaceae, estas também possuem uma diversidade de frutos, flores (Vasconcelos *et al.*, 2019) e outros caracteres que variam em cor, tamanho e forma. Contudo, nem todos caracteres reprodutivos são capazes de sustentar a separação das espécies de Myrtaceae. Assim, alguns gêneros possuem uma fraca delimitação entre espécies, sendo formados os complexos de espécies (Oliveira *et al.*, 2018). Uma das maneiras de resolver esses complexos é através da Taxonomia integrativa (Lima *et al.*, 2015; Vitecek *et al.*, 2017; Prata *et al.*, 2018; Mendes, Norenburg, & Andrade, 2021).

## **1.2 Abordagem integrativa e complexo de espécies**

A abordagem integrativa é utilizada para dar uma visão mais completa sobre uma questão, a partir da combinação de diferentes metodologias a respeito de um problema ou espécie (Dayrat, 2005; Padial *et al.*, 2010). Podem ser utilizadas na melhor compreensão dos fatores bióticos e abióticos que atuam numa espécie ou objeto de interesse (Wake, 2003), e na resolução de complexos de espécies (Lima *et al.*, 2015; Vitecek *et al.*, 2017; Prata *et al.*, 2018; Garraffoni *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2021). No caso do complexo de espécies, a abordagem integrativa

dá uma visão geral sobre os aspectos limitantes de uma espécie por meio das ferramentas de distintas áreas (Dayrat, 2005; Padial *et al.*, 2010).

O complexo de espécies é o termo dado a um conjunto de indivíduos que apresentam fenótipos ligeiramente diferentes, não sendo possível determinar um caractere diagnóstico para sua classificação numa espécie (Brown, Frohlich, & Rosell, 1995; Queiroz, 2007; Sousa-Paula *et al.*, 2021). Geralmente este fenótipo pode estar atrelado à plasticidade fenotípica, visto a grande área de ocorrência deste complexo, e ao grande número de ambientes no qual ocorre (Cardoso & Lomônaco, 2003; Pinheiro, Dantas-Queiroz, & Palma-Silva, 2018).

Devido à homoplasia de caracteres reprodutivos na família Myrtaceae, grandes gêneros, como *Myrcia* (Lima *et al.*, 2015; Burton, Campbell, & Lucas, 2021), *Campomanesia* (Oliveira *et al.*, 2018) e *Eugenia* (Bünger *et al.*, 2016), apresentam grandes complexos de espécies. Um destes complexos é o da *Eugenia involucrata* DC., que, apesar de apresentar muitos caracteres reprodutivos hipoplásicos, possui uma ampla variação fenotípica nos frutos e folhas (Bünger *et al.*, 2016), dificultando sua identificação e compreensão da sua história evolutiva.

### **1.3 Complexo de espécies *Eugenia involucrata* DC.**

A *Eugenia involucrata* DC., também conhecida como cerejeira, cerejeira-do-mato, cerejeira-da-terra, cereja-do-rio-grande, cereja-preta, ibaiba e ivaí (Lorenzi, 2002) é uma Myrtaceae presente nas regiões tropicais da América do Sul. No Brasil, sua distribuição vai do Rio Grande do Sul até Goiás (Donadio, Môro, & Servidone, 2002; CRIA, 2018), ocorrendo em diferentes Biomas do país (Figura 2). É nativa das florestas Estacional Semidecidual, Ombrófila Densa e Ombrófila Mista, nos estratos médio e superior, ocorrendo em interior de mata e com frequência de até quatro indivíduos por hectare (10.000 m<sup>2</sup>) (Carvalho, 2009). Segundo Carvalho (2009) *E. involucrata* não é espécie muito frequente nas florestas primárias, dificilmente ocorrendo fora da floresta e estando sempre associada a outras árvores. É encontrada na Mata Atlântica, preferencialmente nos sub-bosques mais desenvolvidos das Florestas Ombrófilas Mista e Densa, em Florestas Estacionais Decidual e Semidecidual, em solos úmidos e com relevo plano ou

pouco acidentado, ou em ambiente fluvial ou ripário (Rodrigues & Nave, 2000; Belotti *et al.*, 2002; Fernandes, 2003; Andrae *et al.*, 2005; Bernacci *et al.*, 2006). Embora sua ocorrência seja maior na Mata Atlântica, há registros nas regiões do Cerrado e no Pampa (Mazine *et al.*, 2022), porém com outras taxonomias do complexo. Assim, devido aos diferentes ambientes de ocorrência, é possível encontrar diferentes fenótipos para porte (Arbustivo ou arbóreo), textura e formato foliar (Bünger *et al.*, 2016) e até para cor e formato de frutos (Figura 3). É uma espécie predominantemente autógama (Carvalho, 2008), com número cromossômico  $n=11$  (Guerra *et al.*, 2016).

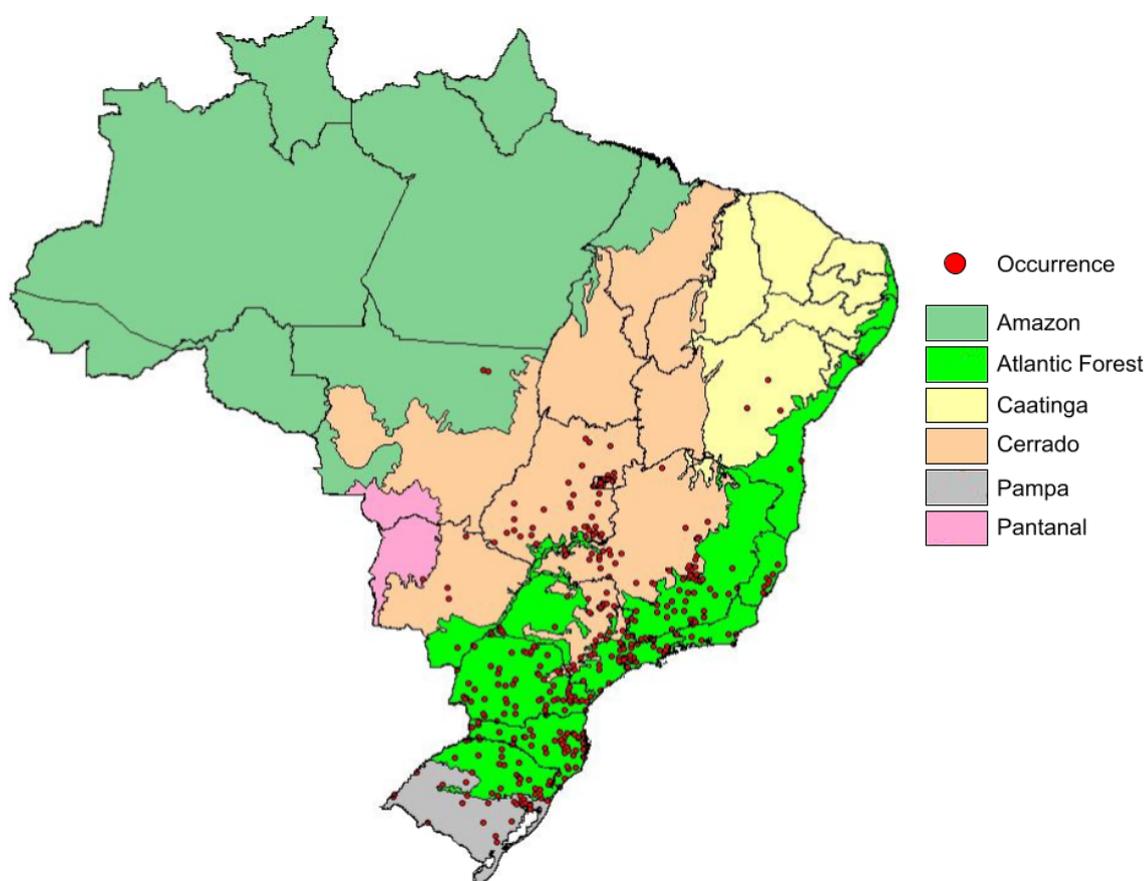


Figura 2: Distribuição de *E. involucrata* nos Biomas do território nacional segundo coordenadas fornecidas pelo Specieslink (CRIA, 2018).

A espécie possui porte variando de subarbustivo à arbórea, com 0.1 a 25.0 m de altura, com tronco liso, esverdeado, com descamação em placas (Carvalho, 2009; REFLORA., 2022) (Figuras 3 e 4a).

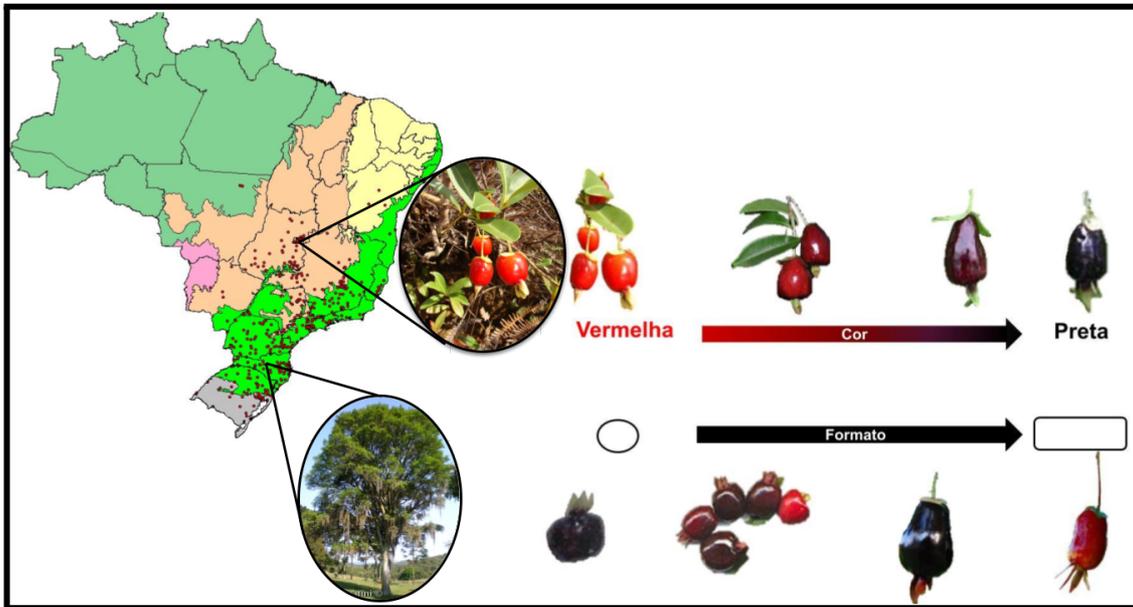


Figura 3: Variação do porte da espécie ao longo da distribuição e do formato e coloração dos frutos. Créditos: Vanessa Grazielle Staggemeier e João Augusto Bagatini.

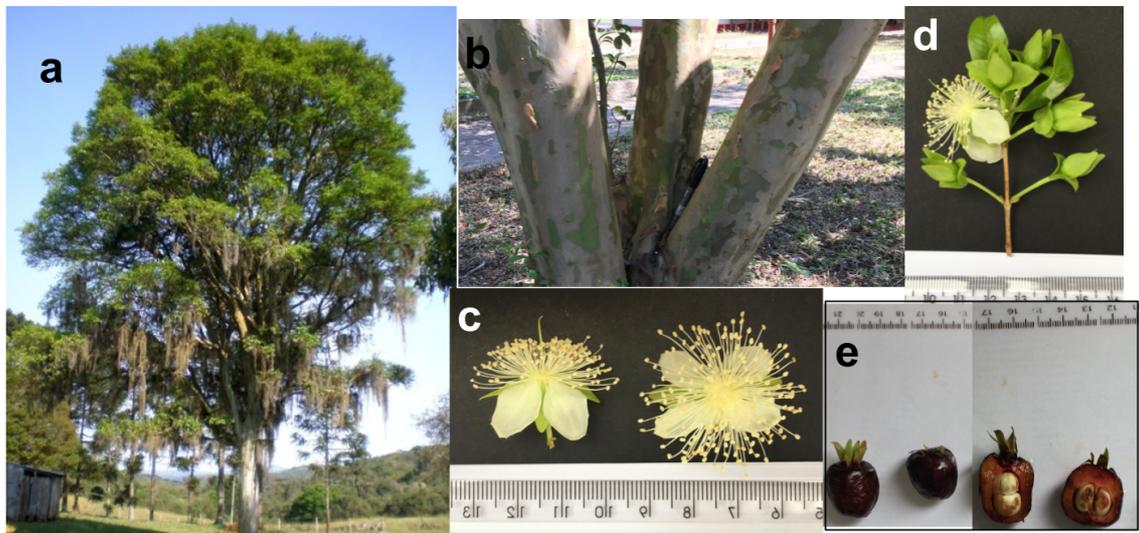


Figura 4: Aspectos morfológicos de *Eugenia involucrata*. a) Porte arbóreo (Créditos: João Augusto Bagatini), b) aspecto branco esverdeado do tronco, característico da espécie; c) visão lateral e frontal das flores, com estames e estigma visíveis; d) formato da inflorescência, do tipo racemo com antese variável entre os botões; e) frutos tipo baga maduros inteiros e seccionados longitudinalmente com visão da organização das sementes em seu interior. Fonte: O autor (2018 e 2021).

Suas folhas possuem tamanhos e formas variáveis ao longo de sua distribuição, podendo ser elíptica, oblonga, obversa, oblanceolada, raro linear-oblanceolada, com comprimento variando de 3.2-16.8 e largura de 1.1-6.4 cm (Figura 5)(Faria Júnior, 2010). Geralmente apresentam nervura média sulcada, com a face abaxial glabra, com ápice sendo arredondado, agudo, acuminado, ou retuso, e a base aguda, cuneada, ou decorrente.

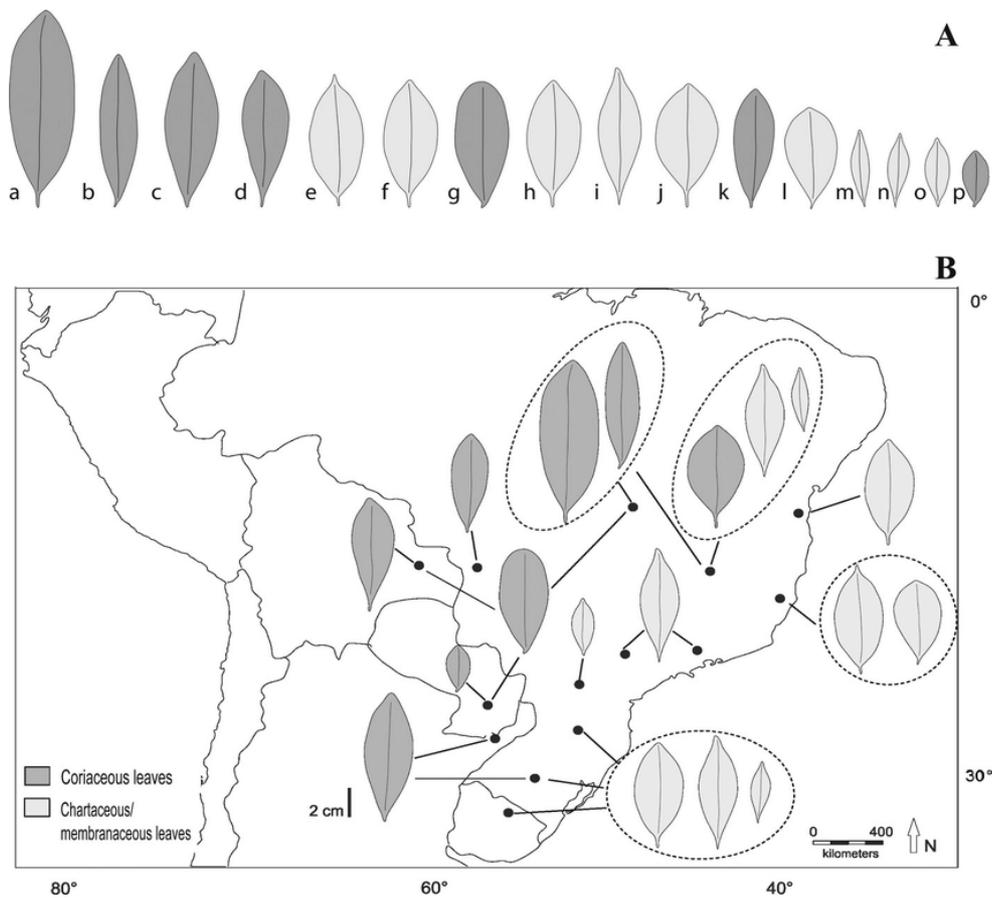


Figura 5: Variação foliar de *E. involucrata* ao longo de sua distribuição no Brasil (Bünger et al., 2016).

Suas flores podem ser solitárias ou racemo precoce, com 2-6 flores nos racemos (Figura 4d) (Faria Júnior, 2010). Geralmente são brancas, hermafroditas, com quatro pétalas, e ricas em estames (Figura 4c). Apresentam duas brácteas e quatro bractéolas que podem ser ovadas a cordiformes. As bractéolas são persistentes após fecundação, se mantendo nos frutos (Figura 6).

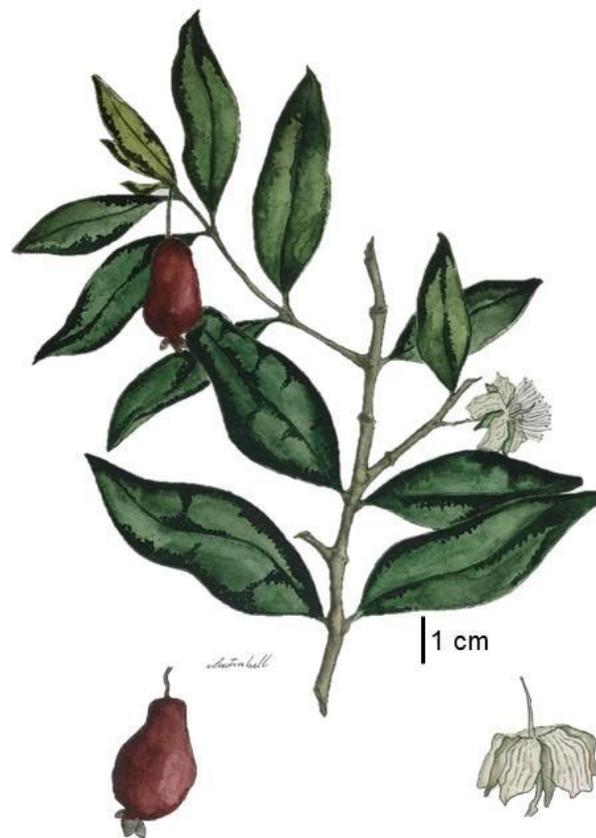


Figura 6: Ilustração botânica de *E. involucrata* com destaque na flor fecundada e sem estames, e o fruto maduro com permanência das bractéolas. Fonte: Isabella Costa.

Os frutos são do tipo baga oblonga a piriforme, de casca lisa, apresentando bractéolas e sépalas (Figura 4e). Quando imaturos apresentam coloração verde mudando para vermelho ou negros, quando maduros, podendo medir de 1.3 a 2.3 cm de comprimento, e apresentar de 1 a 5 sementes por fruto (Figuras 3 e 4e)(Faria Júnior, 2010).

Devido aos frutos serem carnosos, a espécie apresenta potencial econômico, com estes podendo serem consumidos in natura ou na forma de doces, geléias, licores, e ainda ser utilizada como componente florestal na recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 2002). A espécie também pode ser usada como ornamental, devido à beleza de suas plantas. Além disso, a *E. involucrata* vem despertando interesse também na área de fitoterápicos. Na medicina popular, as folhas são

empregadas em forma de chás, com ação antidiarréica e digestiva (Lorenzi, 2002). A avaliação da composição química do óleo volátil revelou a presença de 11 substâncias principais, todas sesquiterpenos, representando aproximadamente 92% do conteúdo total de óleos voláteis (Ramos *et al.*, 2006; Paroul *et al.*, 2007). Embora esta espécie possua grande importância ecológica e potencial comercial, estudos com esta espécie ainda são escassos, principalmente estudos moleculares. Atrelada a escassez de informação sobre esta espécie, *E. involucrata* apresenta uma ampla variação fenotípica ao longo de sua distribuição (Figuras 3 e 5). Alguns autores justificam que essa variação na verdade está associada à presença de espécies dentro deste complexo (Arantes & Monteiro, 2002; Faria Júnior, 2010), o qual possui 31 sinônimos (REFLORA., 2022). Em regiões do Cerrado, *Eugenia calycina* Cambess., possível sinônimo de *E. involucrata*, apresenta modificações morfológicas, como redução do porte arbóreo para subarbustivo, alteração da textura, cor e formato das folhas e frutos (Bünger *et al.*, 2016). Contudo, não é possível confirmar essa hipótese já que não foi encontrado um caractere diagnóstico para sua separação (Bünger *et al.*, 2016). Sabe-se que *E. involucrata* e *E. calycina* são extremidades de um espectro formado por um complexo ou grupo de espécies com cada uma apresentando sutis variações morfológicas (Bünger *et al.*, 2016).

Bünger e colaboradores (2015) tentaram resolver este complexo de espécies a partir de caracteres foliares de amostras ao longo da distribuição desta. Contudo seus achados não deram suporte para resolução do complexo, mas sim a sinonimização justificada. Assim, estudos moleculares a partir de uma abordagem filogeográfica poderiam lançar luz ao complexo. Contudo, para esta espécie estes estudos ainda são recentes (Golle, 2010; Guerra *et al.*, 2016), necessitando, antes de tudo, de uma ampla amostragem ao longo da sua distribuição natural.

#### **1.4 Marcadores moleculares e aplicações na Filogeografia e Genética de Populações**

Marcadores genéticos são caracteres de herança simples podendo ser empregados na avaliação e estimativa das distâncias genéticas entre organismos

intra e intergrupos. Assim, qualquer carácter morfológico ou molecular pode ser utilizado nestas estimativas (Bered, Barbosa Neto & Carvalho, 1997). Um marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Ferreira & Gratapaglia, 1998). Para Milach (1998) os marcadores moleculares são características de DNA que permitem a diferenciação entre dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Dentre as classes de marcadores moleculares, destacamos os baseados em sequência, por suas aplicações em estudos de Sistemática Filogenética e na compreensão e associação de eventos que moldaram a variabilidade genética (Segatto, Goetze, & Turchetto, 2017). Esses marcadores são obtidos pelo sequenciamento de um selecionado fragmento de DNA, amplificado via PCR, a qual se pretende analisar variações contidas neste e origens destas (Segatto *et al.*, 2017).

Estes marcadores são obtidos a partir do DNA nuclear e também citoplasmático (mitocondrial e cloroplastidial), permitindo a reconstrução da história evolutiva de uma região gênica ou de uma espécie (Segatto *et al.*, 2017; Ladoukakis & Zouros, 2017; Ping *et al.*, 2021), e possibilitando compreender os eventos de deriva genética, efeito fundador e gargalos genéticos (bottlenecks) que moldaram a estrutura genética de uma população e como ocorreu o fluxo gênico no espaço-tempo (Powell *et al.*, 1995; Provan, Powell, & Hollingsworth, 2001). Assim, abordagem filogeográficas, que se envolvem em estudar os princípios e processos responsáveis pela distribuição geográfica das linhagens genéticas das espécies (Avice, 2000), se favorecem muito com ferramentas que acessam a variabilidade contida no genoma nuclear e citoplasmático (Ping *et al.*, 2021). Contudo, outras ferramentas, como as morfométricas e fenológicas podem nos fornecer um panorama fenotípico que, em conjunto com os dados genéticos, nos contam uma versão mais completa da história evolutiva de uma ou mais espécies.

### **1.5 Morfometria Geométrica**

A morfometria geométrica é uma ferramenta que permite a análise e comparação da configuração de um objeto com uso de marcações únicas neste extraindo toda

a configuração de referência deste em vez de apenas usar medições únicas (Manthey & Ousley, 2020). A técnica foi desenvolvida por Bookstein (1984, 1986, 1987, 1991) de forma a explorar o morfoespaço dos objetos a partir de marcos nestes, de maneira a quantificá-los como coordenadas cartesianas (x, y, z). (Liuti & Dixon, 2020). Assim, seu uso é aplicado à extração de informação a partir do formato da estrutura analisada visando compreender as causas da variação presente devido à evolução, idade, doença e reprodução seletiva (Zelditch, 2004), além de variações ambientais. Estudos taxonômicos e genéticos tem-se utilizado destas metodologia para identificar fenótipos que suportem a separação de espécies de posicionamento taxonômico incerto (Davis *et al.*, 2016; Lima Boroni *et al.*, 2017; Bellin *et al.*, 2021), ou à compreensão de questões atreladas à hibridação de espécies (Teixeira *et al.*, 2020), adaptação evolutiva (Nannan *et al.*, 2022), à plasticidade fenotípica em resposta às condições ambientais (Alves, Moura, & de Carvalho, 2016; Tirado *et al.*, 2016) e à diferenciação de espécies locais (Moraes *et al.*, 2021), entre outras. Infelizmente em Myrteae, poucos são os estudos com uso de morfometria geométrica (Kriebel, Khabbazian, & Sytsma, 2017; Dalstra *et al.*, 2021).

## **1.6 Fenologia e suas aplicações**

A fenologia é definida como o estudo do tempo de eventos biológicos recorrentes, e as causas de seu tempo em relação às forças bióticas e abióticas e a inter-relação entre as fases de uma mesma espécie ou de diferentes espécies (Lieth, 1974). Assim, a fenologia estuda os eventos cíclicos dos organismos vivos e dos fatores que influenciam esses eventos, fornecendo uma perspectiva chave para olhar para a interdependência destes organismos com o ambiente dentro de contextos espaciais, temporais e ecológicos (Liang, 2019). Com uso de informações fenológicas, é possível compreender melhor questões evolutivas e ecológicas de organismos e sua interação com o meio (Forrest & Miller-Rushing, 2010), permitindo identificar a presença de sinais filogenéticos dentro de táxons (Staggemeier, Diniz-Filho, & Morellato, 2010), alterações fisiológicas em resposta ao ambiente (Vogado *et al.*, 2016; Moraes *et al.*, 2017), a influência do ambiente

no perfil de polinizadores (Torezan-Silingardi & Oliveira, 2004) e a presença de espécies crípticas (Albert *et al.*, 2019). A fenologia também é útil para questões antrópicas, como o monitoramento da qualidade do ar para alérgicos ao pólen (Frenguelli *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2012), da presença de distúrbios florestais (Hargrove *et al.*, 2009), e na organização de datas e horários para eventos e roteiros no ecoturismo (Dai *et al.*, 2021), como a época de floração das cerejeiras ou o período de viagem para as Cores do Outono). Outra grande importância da fenologia é na detecção do efeito das mudanças climáticas na ecologia local, onde já se foi observada alterações na distribuição e sincronia de atividades dos organismos locais nos diferentes níveis tróficos da cadeia (Walther *et al.*, 2002; Cleland *et al.*, 2007; Ovaskainen *et al.*, 2013; Rafferty, CaraDonna, & Bronstein, 2015). Assim, por conta desta abrangência de aplicações e seu poder de detecção de alterações fisiológicas, temporais e climáticas nos indivíduos, a fenologia apresenta forte papel na integração com outras disciplinas (Liang, 2019).

Assim, a integração de dados provindos de diferentes ferramentas, como as fenológicas, morfométricas e moleculares, são importantes por gerarem novos conhecimentos que auxiliam na solução de questões em aberto, como a compreensão do papel dos fatores ambientais na distribuição da diversidade ao longo do espaço e tempo.

## **OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Compreender os padrões evolutivos do complexo de espécies *Eugenia involucrata* por meio de uma abordagem integrativa.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Levantar, na literatura, o conhecimento atual da história evolutiva das Myrtaceae Neotropicais;

- Identificar lacunas no conhecimento da história evolutiva da família Myrtaceae Neotropicais e sugerir algumas linhas de pesquisa;
- Avaliar o padrão de variabilidade genética, morfológica e fenológica em populações de *E. involucrata* em toda sua área de distribuição;
- Reconstruir a história demográfica da espécie e investigar os efeitos das mudanças climáticas quaternárias no padrão espacial de distribuição da diversidade;
- Verificar a presença de estrutura genética nesta espécie como reflexo da influência da biologia da espécie e da heterogeneidade ambiental;

## Capítulo II

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as plantas da família Myrtaceae desempenhem grandes papéis ecológicos e econômicos nos locais de sua distribuição (Lucas *et al.*, 2005; Gressler *et al.*, 2006; Staggemeier *et al.*, 2010), pouca atenção e pesquisa têm sido dadas à estas espécies (Govaerts *et al.*, 2021; Souza Neto *et al.*, 2022). Arelada à esse descaso, a acelerada perda de habitat faz que uma corrida seja realizada por pesquisadores, na busca de financiamento, a fim de direcionar escassos recursos na conservação e compreensão dos fatores diversificadores atuantes neste representativa família do Neotrópico. Assim, os resultados gerados no primeiro artigo nos permitiram verificar as lacunas de conhecimento às plantas da tribo Myrteae, representante marjoritária da família Myrtaceae no Neotrópico. Das áreas que analisamos, verificamos que estudos microevolutivos (Filogeografia e Genética de populações) são recentes e restrito a poucas espécies, o que justifica a necessidade de maior investimento na obtenção destes dados para demais espécies da tribo. Outros estudos, como genômicos e citogenéticos, também possuem poucas informações para muitas espécies, dificultando a compreensão dos aspectos e estratégias evolutivas utilizadas pelas Myrteae ao longo de sua evolução.

Também sugerimos que estudos evolutivos não se limitem a caracteres reprodutivos, mas também aos vegetativos, como tecidos foliares e do câmbio, além da composição química das espécies estudadas (Padovan *et al.*, 2014). Por conta da grande homoplasia dos caracteres reprodutivos das espécies da família Myrtaceae, há possibilidade da atuação de processos de hibridação dentro da família. Essa hibridação leva a formação de híbridos que, quando não compreendidos, dificultam a identificação de caracteres diagnósticos. Tanto a hibridação quanto a homoplasia dos caracteres da família acarretam na formação de complexos de espécies, que necessitam serem resolvidos para adequada conservação e uso destas plantas.

Por fim, é necessária uma abordagem interativa, através de dados genéticos, citogenéticos, fisiológicos, fenotípicos, climáticos, geológicos, ecológicos e reprodutivos, das espécies da tribo Myrteae. Somente com essa integração, há

possibilidade de uma completa compreensão dos fatores atuantes na diversificação da tribo Myrteae, e se estes são compartilhados com as demais famílias da flora Neotropical. Por conta desta capacidade de resolução, e pela falta de informações da espécie, utilizamos essa abordagem integrativa no possível complexo de espécies *Eugenia involucrata*, na perspectiva de compreensão dos padrões evolutivos deste complexo ao longo de sua distribuição. Para isso, utilizamos dados fenológicos e morfométricos de exsicatas amostradas ao longo da distribuição, e de sequências de DNA de populações da região Sul do Brasil. Estes dados mostraram que, assim como sugerido por Bünger *et al.* (2016), *E. involucrata* não aparenta ser um complexo de espécies, mas sim uma única espécie com ampla plasticidade fenotípica. Esta plasticidade, ao longo da distribuição natural da espécie, têm apresentado possíveis ecótipos, como sugerido por Cardoso & Lomônaco (2003). Em relação aos padrões de diversidade, é visto que as populações de *E. involucrata* na região Sul do Brasil são muito diversificadas, apresentando grande número de haplótipos nucleares e plastidiais. Também é visto que esta diversidade tem sido estável ao longo dos anos, com recente declínio, possivelmente ligado a perda de habitat. Tanto a sua história evolutiva quanto os padrões de diversidades parecem serem compartilhados com os encontrados para *Eugenia uniflora* (Turchetto-Zolet *et al.*, 2016). Contudo, futuras amostragens de *E. involucrata* serão realizadas nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Espírito Santo, e em regiões de Brasília, São Paulo e Paraná onde há sinônimos com diferentes formatos foliares de próxima ocorrência geográfica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert LP, Restrepo-Coupe N, Smith MN, Wu J, Chavana-Bryant C, Prohaska N, Taylor TC, Martins GA, Ciais P, Mao J, Arain MA, Li W, Shi X, Ricciuto DM, Huxman TE, McMahon SM & Saleska SR. 2019. Cryptic phenology in plants: Case studies, implications, and recommendations. *Global Change Biology* **25**:

3591–3608.

**Alves VM, Moura MO & de Carvalho CJB. 2016.** Wing shape is influenced by environmental variability in *Polietina orbitalis* (Stein) (Diptera: Muscidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **60**: 150–156.

**Andrae FH, Palumbo R, Marchiori JNC & Durlo MA. 2005.** O sub-bosque de reflorestamentos de pinus em sítios degradados da região da Floresta Estacional Decidual do Rio Grande do Sul. *Ciência Florestal* **15**: 43–63.

**Arantes AA & Monteiro R. 2002.** A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana: International Journal of Biodiversity* **3**: 111–127.

**Avise JC. 2000.** *Phylogeography*. Harvard University Press.

**Barbosa M, Becker D, Cunha S, Droste A & Schmitt J. 2015.** Vascular epiphytes of the Atlantic Forest in the Sinos River basin, state of Rio Grande do Sul, Brazil: richness, floristic composition and community structure. *Brazilian Journal of Biology* **75**: 25–35.

**Batiha GES, Alkazmi LM, Wasef LG, Beshbishy AM, Nadwa EH & Rashwan EK. 2020.** *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules* **10**: 202.

**Bellin N, Calzolari M, Callegari E, Bonilauri P, Grisendi A, Dottori M & Rossi V. 2021.** Geometric morphometrics and machine learning as tools for the identification of sibling mosquito species of the *Maculipennis* complex (Anopheles). *Infection, Genetics and Evolution* **95**: 105034.

**Belotti A, Verona LSS, Bieger B, Argenton MJ & Varnier ML. 2002.** Estudo fitossociológico e florístico da mata –, ciliar do lago da Barragem Engenho Braun do Lajeado São José Chapecó – SC. *Acta Ambiental Catarinense* **1**: 43–58.

**Bered F, Barbosa Neto JF & Carvalho FIF de. 1997.** Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural* **27**: 513–520.

**Bernacci LC, Franco GADC, Àrbocz G de F, Catharino ELM, Durigan G & Metzger JP. 2006.** O efeito da fragmentação florestal na composição e riqueza de árvores na região da reserva Morro Grande (Planalto de Ibiúna, SP). *Revista do Instituto Florestal*.

- Bessi D, Tanaka MO, Costa LA da, Correa CJP & Tonello KC. 2018.** Forest restoration and hydrological parameters effects on soil water conditions: a structural equation modelling approach. *RBRH* **23**.
- Bookstein F. 1984.** A statistical method for biological shape comparisons. *J Theor Biol.* **107**: 475–520.
- Bookstein F. 1986.** Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Stat Sci.* **1**: 181–222.
- Bookstein F. 1987.** Describing a craniofacial anomaly: finite elements and the biometrics of landmark locations. *Am J Phys Anthropol.* **74**.
- Bookstein FL. 1991.** Morphometric tools for landmark data. In: *Geometry and Biology*. Cambridge University Press, 1–4.
- Britannica. 2022.** Myrtales Economic and ecological importance.
- Brown JK, Frohlich DR & Rosell RC. 1995.** The Sweetpotato or Silverleaf Whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a Species Complex? *Annual Review of Entomology* **40**: 511–534.
- Bünger M de O, Einsehlor P, Figueiredo MLN & Stehmann JR. 2016.** Resolving Species Delimitations in the *Eugenia involucrata* Group (*Eugenia* sect. *Phyllocalyx* - Myrtaceae) with Morphometric Analysis. *Systematic Botany* **40**: 995–1002.
- Burton GP, Campbell KCSE & Lucas EJ. 2021.** Morphometric Analysis as a Tool to Resolve a Taxonomic Complex in *Myrcia* sect. *Calyptranthes* (Myrtaceae, Myrteae). *Systematic Botany* **46**: 1016–1025.
- Cardoso GL & Lomônaco C. 2003.** Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 131–140.
- Carvalho PER. 2008.** *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília, DF.
- Carvalho PER. 2009.** *Cerejeira Eugenia involucrata*. Colombo.
- Cascaes MM, Guilhon GMSP, Andrade EH de A, Zoghbi M das GB & Santos L da S. 2015.** Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 23881–23904.
- Cleland E, Chuine I, Menzel A, Mooney H & Schwartz M. 2007.** Shifting plant phenology in response to global change. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:

357–365.

**CRIA. 2018.** Centro de Referência e Informação Ambiental. *Specieslink - simple search*.

**Dai J, Gao X, Liu H, Tao Z, Ma X & Cao L. 2021.** Application basis and future perspectives of phenology in the theory and practice of tourism geography. *ECOTOURISM* **11**: 161–175.

**Dalastra CH, Sausen TL, Capellesso ES & Fornel R. 2021.** VARIATIONS IN LEAF SIZE AND LEAF SHAPE IN FOUR SPECIES OF EUGENIA (MYRTACEAE) USING GEOMETRIC MORPHOMETRICS APPROACH. *PESQUISAS, BOTÂNICA*. **75**: 143–154.

**Davis MA, Douglas MR, Collyer ML & Douglas ME. 2016.** Deconstructing a Species-Complex: Geometric Morphometric and Molecular Analyses Define Species in the Western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PLOS ONE* **11**: 1–21.

**Dayrat B. 2005.** Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 407–415.

**Donadio LC, Môro FV & Servidone AA. 2002.** *Frutas brasileiras*. Jaboticabal.

**Faria Júnior JEQ DE. 2010.** O GÊNERO EUGENIA L. (MYRTACEAE) NOS ESTADOS DE GOIÁS E TOCANTINS, BRASIL.

**Farias DD, de Araujo FF, Neri-Numa IA, Dias-Audibert FL, Delafiori J, Catharino RR & Pastore GM. 2020a.** Distribution of nutrients and functional potential in fractions of *Eugenia pyriformis*: An underutilized native Brazilian fruit. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL* **137**.

**Farias D de P, Neri-Numa IA, de Araújo FF & Pastore GM. 2020b.** A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. *Food Chemistry* **306**: 125630.

**Fernandes FAB. 2003.** Estudo de gradientes Semidecídua, vegetacionais em uma floresta Caldas, alto-montana no planalto de Poços de Em, MG.

**Ferreira ME & Gratapaglia D. 1998.** *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN.

**Forrest J & Miller-Rushing AJ. 2010.** Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**: 3101–3112.

- Freitas L, Salino A, Menini Neto L, Almeida T, Mortara S, Stehmann J, Amorim AM, Guimaraes E, A. Nadruz Coelho M, Zanin A & Forzza R. 2016.** A comprehensive checklist of vascular epiphytes of the Atlantic Forest reveals outstanding endemic rates. *PhytoKeys* **58**: 65–79.
- Frenguelli G, Passalacqua G, Bonini S, Fiocchi A, Incorvaia C, Marcucci F, Tedeschini E, Canonica GW & Frati F. 2010.** Bridging allergologic and botanical knowledge in seasonal allergy: a role for phenology. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **105**: 223–227.
- Frenne P de, Lenoir J, Luoto M, Scheffers BR, Zellweger F, Aalto J, Ashcroft MB, Christiansen DM, Decocq G, De Pauw K, Govaert S, Greiser C, Gril E, Hampe A, Jucker T, Klinges DH, Koelemeijer IA, Lembrechts JJ, Marrec R, Meeussen C, Ogée J, Tyystjärvi V, Vangansbeke P & Hylander K. 2021.** Forest microclimates and climate change: Importance, drivers and future research agenda. *Global Change Biology* **27**: 2279–2297.
- Garraffoni ARS, Araújo TQ, Lourenço AP, Guidi L & Balsamo M. 2019.** Integrative taxonomy of a new *Redudasys* species (Gastrotricha: Macrodasysida) sheds light on the invasion of fresh water habitats by macrodasysids. *Scientific Reports* **9**: 2067.
- Golle DP. 2010.** Estabelecimento, Multiplicação, Calogênese, Organosênese in vitro e Análise da Diversidade Genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.
- Govaerts R, Dransfield J, Zona S, Hodel DR & Henderson A. 2021.** World Checklist of Myrtaceae. *Royal Botanic Gardens, Kew*.
- Gressler E, Pizo MA & Morellato LPC. 2006.** Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 509–530.
- Guerra D, Souza PVD de, Schwarz SF, Schifino-Wittmann MT, Werlang CA & Veit PA. 2016.** Genetic and cytological diversity in cherry tree accessions (*Eugenia involucrata* DC) in Rio Grande do Sul. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **16**: 219–225.
- Gutiérrez RMP, Mitchell S & Solis RV. 2008.** *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **117**: 1–27.
- Hargrove WW, Spruce JP, Gasser GE & Hoffman FM. 2009.** Toward a national

early warning system for forest disturbances using remotely sensed canopy phenology. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing* **75**: 1150–1156.

**Ilstedt U, Bargaés Tobella A, Bazié HR, Bayala J, Verbeeten E, Nyberg G, Sanou J, Benegas L, Murdiyarso D, Laudon H, Sheil D & Malmer A. 2016.** Intermediate tree cover can maximize groundwater recharge in the seasonally dry tropics. *Scientific Reports* **6**: 21930.

**Joly AB. 1966.** *Botânica -Introdução à Taxonomia Vegetal*.

**Kriebel R, Khabbazian M & Sytsma KJ. 2017.** A continuous morphological approach to study the evolution of pollen in a phylogenetic context: An example with the order Myrtales (B Heinze, Ed.). *PLOS ONE* **12**: e0187228.

**Ladoukakis ED & Zouros E. 2017.** Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* **24**: 2.

**Lahr FAR, Nogueira MC de JA, Araujo VA De, Vasconcelos JS & Christoforo AL. 2018.** WOOD UTILIZATION OF *Eucalyptus grandis* IN STRUCTURAL ELEMENTS: DENSITIES AND MECHANICAL PROPERTIES. *Engenharia Agrícola* **38**: 642–647.

**Liang L. 2019.** Phenology. In: *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier.

**Lieth H. 1974.** *Phenology and seasonality modeling*. New York: Springer-Verlag.

**Lima DF, Mauad AVS, Silva-Pereira V da, Smidt E de C, Goldenberg R, da Silva-Pereira V, de Camargo Smidt E & Goldenberg R. 2015.** Species boundaries inferred from ISSR markers in the *Myrcia laruotteana* complex (Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution* **301**: 353–363.

**Lima Boroni N, Lobo LS, Romano PSR & Lessa G. 2017.** Taxonomic identification using geometric morphometric approach and limited data: an example using the upper molars of two sympatric species of *Calomys* (Cricetidae: Rodentia). *Zoologia* **34**: 1–11.

**Liuti T & Dixon PM. 2020.** The use of the geometric morphometric method to illustrate shape difference in the skulls of different-aged horses. *Veterinary Research Communications* **44**: 137–145.

**Lorenzi H. 2002.** *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas*

*arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

**Lucas EJ, Belsham SR, Lughadha EMN, Orlovich DA, Sakuragui CM, Chase MW & Wilson PG. 2005.** Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae - preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* **251**: 35–51.

**Manthey L & Ousley SD. 2020.** Geometric morphometrics. In: *Statistics and Probability in Forensic Anthropology*. Elsevier, 289–298.

**Mazine FF, Bünger M, Faria JEQ, Fernandes T, Giaretta A, Valdemarin KS, Santana KC, Souza MAD & Sobral M. 2022.** Eugenia. *Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.

**Mendes CB, Norenburg JL & Andrade SCS. 2021.** Species delimitation integrative approach reveals three new species in the *Nemertopsis bivittata* complex. *Invertebrate Systematics* **35**: 637–654.

**Milach SCK. 1998.** *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS.

**Moraes AC da S, Vitória AP, Rossatto DR, de Miranda L d'Afonseca P & Funch LS. 2017.** Leaf phenology and morphofunctional variation in *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) in gallery forest and “campo rupestre” vegetation in the Chapada Diamantina, Brazil. *Brazilian Journal of Botany* **40**: 439–450.

**Moraes AB DE, Moraes DCS de, Alencar CERD & Freire FAM. 2021.** Native and non-native species of *Litopenaeus Pérez-Farfante, 1969* (Crustacea: Penaeidae) from the East Atlantic: Geometric morphometrics as a tool for taxonomic discrimination. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **93**.

**Mori SA, Boom BM, de Carvalino AM & dos Santos TS. 1983.** Ecological Importance of Myrtaceae in an Eastern Brazilian Wet Forest. *Biotropica* **15**: 68.

**Moura GS, Oliveira IJ de, Bonome LT da S & Franzener G. 2018.** *Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant. *Arquivos do Instituto Biológico* **85**.

**Nannan L, Huamiao L, Yan J, Xingan L, Yang L, Tianjiao W, Jinming H, Qingsheng N & Xiumei X. 2022.** Geometric morphology and population genomics provide insights into the adaptive evolution of *Apis cerana* in Changbai Mountain. *BMC Genomics* **23**: 64.

**Nieder J, Prosperí J & Michaloud G. 2001.** Epiphytes and their contribution to canopy diversity. *Plant Ecology* **153**: 51–63.

**Nogueira M, de Araujo VA, Vasconcelos JS, Christoforo AL & Lahr FAR.**

**2020.** SIXTEEN PROPERTIES OF *Eucalyptus tereticornis* WOOD FOR STRUCTURAL USES. *BIOSCIENCE JOURNAL* **36**: 449–457.

**Ochieng MA, Ben Bakrim W, Bitchagno GTM, Mahmoud MF & Sobeh M. 2022.** *Syzygium jambos* L. Alston: An Insight Into its Phytochemistry, Traditional Uses, and Pharmacological Properties. *Frontiers in Pharmacology* **13**.

**Oh JW, Lee HB, Kang IJ, Kim SW, Park KS, Kook MH, Kim BS, Baek HS, Kim JH, Kim JK, Lee DJ, Kim KR & Choi YJ. 2012.** The Revised Edition of Korean Calendar for Allergenic Pollens. *Allergy, Asthma and Immunology Research* **4**: 5.

**Oliveira MIU de, Rebouças DA, Leite KRB, de Oliveira RP, Funch LS, Oliveira MI de U, Rebouças DA, Leite KRB, Oliveira RP de, Funch LS, de Oliveira MIU, Rebouças DA, Leite KRB, de Oliveira RP & Funch LS. 2018.** Can leaf morphology and anatomy contribute to species delimitation? A case in the *Campomanesia xanthocarpa* complex (Myrtaceae). *Flora* **249**: 111–123.

**Ovaskainen O, Skorokhodova S, Yakovleva M, Sukhov A, Kutenkov A, Kutenkova N, Shcherbakov A, Meyke E & Delgado M del M. 2013.** Community-level phenological response to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 13434–13439.

**Padial JM, Miralles A, De la Riva I & Vences M. 2010.** The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* **7**: 16.

**Padovan A, Keszei A, Külheim C & Foley WJ. 2014.** The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. *Phytochemistry Reviews* **13**: 695–716.

**Paroul N, ZANIN EL, BERALDIN R, PIOVESAN E, MOSSI A & CANSSIAN, R.L. EMMERICH D. 2007.** *Avaliação da composição química do óleo volátil de Cerejeira (Eugenia involucrata DC)*. Águas de Lindóia.

**Ping J, Feng P, Li J, Zhang R, Su Y & Wang T. 2021.** Molecular evolution and SSRs analysis based on the chloroplast genome of *Callitropsis funebris*. *Ecology and Evolution* **11**: 4786–4802.

**Pinheiro F, Dantas-Queiroz MV & Palma-Silva C. 2018.** Plant Species Complexes as Models to Understand Speciation and Evolution: A Review of South American Studies. *Critical Reviews in Plant Sciences* **37**: 54–80.

**Powell W, Morgante M, Andre C, McNicol JW, Machray GC, Doyle JJ, Tingey SV & Rafalski JA. 1995.** Hypervariable microsatellites provide a general source of

polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* **5**: 1023–1029.

**POWO**. 2022. Plants of the World Online. *Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew*.

**Prata EMB, Sass C, Rodrigues DP, Domingos FMCB, Specht CD, Damasco G, Ribas CC, Fine PVA & Vicentini A**. 2018. Towards integrative taxonomy in Neotropical botany: disentangling the *Pagamea guianensis* species complex (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **188**: 213–231.

**Provan J, Powell W & Hollingsworth PM**. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 142–147.

**Queiroz K de**. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* **56**: 879–886.

**Rafferty NE, CaraDonna PJ & Bronstein JL**. 2015. Phenological shifts and the fate of mutualisms. *Oikos* **124**: 14–21.

**Ramos MFS, SIANI AC, SOUZA MC, ROSAS EC & HENRIQUES MGMO**. 2006. Avaliação da atividade antiinflamatória dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae. *Revista Fitos* **2**: 58–66.

**REFLORA**. 2022. Eugenia in Flora e Funga do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.

**Rodrigues RR & Nave AG**. 2000. Heterogeneidade florística das matas ciliares. In: RODRIGUES RR, LEITÃO FILHO H de F, eds. *Matas ciliares: USP, conservação e recuperação*. São Paulo: Ed. da Fapesp, 45–71.

**dos Santos Pereira E, Vinholes J, C. Franzon R, Dalmazo G, Vizzotto M & Nora L**. 2018. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. *Food Chemistry* **258**: 95–103.

**Segatto ALA, Goetze M & Turchetto C**. 2017. Marcadores moleculares baseados na análise de sequências: utilização em filogenia e filogeografia. In: Turchetto-Zolet AC, Zanella C, Passaia G, eds. *Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181.

**SiBBR**. 2022. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira.

Biodeiversidade de Nutrição.

**Simpson MG. 2010.** Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. In: *Plant Systematics*. Elsevier, 275–448.

**Song Z, Seitz S, Li J, Goebes P, Schmidt K, Kühn P, Shi X & Scholten T. 2019.** Tree diversity reduced soil erosion by affecting tree canopy and biological soil crust development in a subtropical forest experiment. *Forest Ecology and Management* **444**: 69–77.

**Sousa-Paula LC de, Pessoa FAC, Otranto D & Dantas-Torres F. 2021.** Beyond taxonomy: species complexes in New World phlebotomine sand flies. *Medical and Veterinary Entomology* **35**: 267–283.

**Souza Neto JD de, Santos EK dos, Lucas E, Vetö NM, Barrientos-Diaz O, Staggemeier VG, Vasconcelos T & Turchetto-Zolet AC. 2022.** Advances and perspectives on the evolutionary history and diversification of Neotropical Myrteae (Myrtaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **199**: 173–195.

**Staggemeier VG, Cazetta E & Morellato LPC. 2017.** Hyperdominance in fruit production in the Brazilian Atlantic rain forest: the functional role of plants in sustaining frugivores. *Biotropica* **49**: 71–82.

**Staggemeier VG, Diniz-Filho JAF & Morellato LPC. 2010.** The shared influence of phylogeny and ecology on the reproductive patterns of Myrteae (Myrtaceae). *Journal of Ecology* **98**: 1409–1421.

**Stevens PF. 2017.** Angiosperm Phylogeny Website. Myrtales. *Missouri Botanical Garden*.

**Sytsma KJ, Litt A, Zjhra ML, Chris Pires J, Nepokroeff M, Conti E, Walker J, Wilson PG, Pires JC, Nepokroeff M, Conti E, Walker J & Wilson PG. 2004.** Clades, Clocks, and Continents: Historical and Biogeographical Analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and Relatives in the Southern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences* **165**: S85–S105.

**Teixeira MC, Turchetto C, Maestri R & Freitas LB. 2020.** Morphological characterization of sympatric and allopatric populations of *Petunia axillaris* and *P. exserta* (Solanaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 550–567.

**Thornhill AH, Ho SYW, Külheim C & Crisp MD. 2015.** Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. *Molecular*

*Phylogenetics and Evolution* **93**: 29–43.

**Tirado T, Saura M, Rolán-Alvarez E & Quesada H. 2016.** Historical Biogeography of the Marine Snail *Littorina saxatilis* Inferred from Haplotype and Shell Morphology Evolution in NW Spain (DJ Colgan, Ed.). *PLOS ONE* **11**: e0161287.

**Torezan-Silingardi HM & Oliveira PEAM de. 2004.** Phenology and reproductive ecology of *Myrcia rostrata* and *M. tomentosa* (Myrtaceae) in central Brazil. In: *Phyton - Annales Rei Botanicae.*, 23–43.

**Turchetto-Zolet AC, Salgueiro F, Turchetto C, Cruz F, Veto NM, Barros MJF, Segatto ALA, Freitas LB & Margis R. 2016.** Phylogeography and ecological niche modelling in *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) suggest distinct vegetational responses to climate change between the southern and the northern Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society* **182**: 670–688.

**Vasconcelos TNC, Chartier M, Prenner G, Martins AC, Schönenberger J, Wingler A & Lucas E. 2019.** Floral uniformity through evolutionary time in a species-rich tree lineage. *New Phytologist* **221**: 1597–1608.

**Vitecek S, Kučinić M, Previšić A, Živić I, Stojanović K, Keresztes L, Bálint M, Hoppeler F, Waringer J, Graf W & Pauls SU. 2017.** Integrative taxonomy by molecular species delimitation: multi-locus data corroborate a new species of Balkan Drusinae micro-endemics. *BMC Evolutionary Biology* **17**: 129.

**Vogado NO, de Camargo MGG, Locosselli GM, Morellato LPC, Camargo MG de G, Locosselli GM & Morellato LPC. 2016.** Edge Effects on the Phenology of the Guamirim, *Myrcia Guianensis* (Myrtaceae), a Cerrado Tree, Brazil. *Tropical Conservation Science* **9**: 291–312.

**Wake MH. 2003.** What is 'Integrative Biology'? *Integrative and Comparative Biology* **43**: 239–241.

**Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O & Bairlein F. 2002.** Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**: 389–395.

**WCSP. 2022.** Myrtaceae Juss.

**WCVP. 2021.** World Checklist of Selected Plant Families, version 2.0. *Kew: Facilitated by the Royal Botanic Gardens.*

- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA & Quinn CJ. 2001.** Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany* **88**: 2013–2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM & Quinn CJ. 2005.** Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. In: *Plant Systematics and Evolution.*, 3–19.
- Zelditch ML. 2004.** *Introduction: in geometric morphometric for biologist.* Elsevier Ltd.