

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Genética  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Sistemática e filogenética molecular do gênero *Hexachlamys*  
(Myrtaceae) através do uso de marcadores plastidiais e nucleares**

**FERNANDA DA CRUZ**

**Orientador:**

Dr. Rogério Margis

**Co-orientadora:**

Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em Genética  
e Biologia Molecular da UFRGS como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre, abril de 2012.

## Instituições e Fontes Financiadoras

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Dr. Rogério Margis e co-orientação da Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet, através de bolsa de mestrado disponibilizada pelo CNPq, e contou com recursos do CNPq e FAPERGS.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de uma forma ou outra colaboraram para a execução desta dissertação, que acreditaram e que nunca me deixaram desistir. Reservo a seguir os agradecimentos especiais:

- Aos pesquisadores da banca examinadora, Dra. Loreta Brandão de Freitas, Dr. João André Jarenkow e Dra. Clarisse Palma Silva, e claro, ao membro suplente dessa banca e também relator dessa dissertação Dr. Nelson J. Rosa Fagundes, pela paciência e disponibilidade.

- Ao meu orientador Dr. Rogério Margis, por ter, em primeiro lugar, me aceitado em seu laboratório e por toda confiança concedida. Pela orientação e ensinamentos, pela busca de recursos para execução deste e de outros trabalhos e por ter sido além de um orientador um grande amigo.

- A minha querida co-orientadora Dra. Andreia Carina Turchetto Zolet, pelo seu grande empenho neste projeto, por ter arregaçado as mangas e ter participado ativamente de todas as etapas deste trabalho. Por ter sido muito mais que uma orientadora, ter sido uma grande amiga, conselheira, uma verdadeira mãe ao longo da minha estada neste laboratório. Dedico a você esse título, por todo o apoio e incentivo de sempre, por todo ensinamento e longas discussões em torno de papers e bancadas. Obrigada de coração por tudo!!!

- Ao Dr. Marcos Sobral por toda sua colaboração, e, principalmente, pelo seu auxílio na identificação das amostras de plantas utilizadas neste trabalho.

- Ao Dr. Claudio Mondim pela sua disponibilidade e entusiasmo em ir coletar e identificar as plantas a campo. Sua participação, com certeza, foi crucial para o andamento do trabalho.

- Ao PPGBM e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Ao Elmo, que com muita rapidez e objetividade torna a vida dos alunos do PPGBM mais tranquila.

- Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado.

- aos colegas e amigos do LGPP – Laboratório de Genomas e Populações de Plantas: Ana (mestranda), Dra. Claudia, Felipe (mestrando), Franceli (doutoranda),

Frank (doutorando), Guilherme Loss (doutorando), Guilherme Cordenonsi (mestrando), Dra. Joseane, Lorryne (mestranda), Mariana (graduanda), Dr. Maurício e em especial a minha amiga Nicole (B.Sc.) por muitas ajudas na bancada e pela ótima companhia nas coletas a campo.

- Aos meus grandes amigos e colegas da PUCRS, Ana, Carol, Marta, Thefy, Rita, Aline e Calino pelos nossos encontros sempre cheios de alegria e por todo incentivo de sempre... Força Fê, vai dar tudo certo!!

- As minhas grandes amigas, desde os tempos do colégio, Débora Schell e Márcia Knapp pela companhia e apoio de sempre e em todas as horas.

- Ao lugar que me dá muita inspiração e recarrega minhas energias...a praia!!!

- E por fim, mas não menos importante, a minha grande família:

Ao meu Pai (Luiz Cruz) que amo tanto, por ter sempre incentivado os estudos e nunca ter medido esforços para me dar sempre o melhor, pelos muitos conselhos e pelas intermináveis conversas falando sobre a vida. Por me mostrar que nem sempre a vida é fácil, mas que o importante é nunca desistir, parar de chorar e “tocar o barco”. A sua esposa Cátia, por toda força de sempre também.

À minha Mãe querida (Eliane Martins), que também amo de mais, por todo seu amor maluco e por toda sua garra e coragem que admiro tanto, e ao tio Reinaldo, seu esposo, pelo seu carisma e por sempre nos fazer rir muito da vida.

Aos meus irmãos, Eduarda, Luiza, Thiago e o mais novo membro da família Toninho, por todo carinho e amor.

A Graça por todo apoio de uma segunda mãe.

E, claro, a minha estrela guia, que mora lá no céu e que sempre me proteje, minha vó querida.

Muitíssimo Obrigada!!! Tenho muito orgulho dessa família.

# SUMARIO

<b>RESUMO</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>9</b>
A FAMÍLIA MYRTACEAE	9
A TRIBO MYRTEAE	11
OS GÊNEROS: <i>EUGENIA</i> L. E <i>HEXACHLAMYS</i> O. BERG	13
SISTEMÁTICA E FILOGENIA MOLECULAR	18
<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>20</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>CAPÍTULO II: PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE GENUS <i>HEXACHLAMYS</i> (MYRTACEAE) BASED ON CHLOROPLAST AND NUCLEAR DNA SEQUENCES AND THEIR TAXONOMIC IMPLICATIONS.</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>58</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>59</b>
HERBÁRIOS	59
QUESTÕES TAXONÔMICAS E ANÁLISES FILOGENÉTICAS	59
MARCADORES MOLECULARES	61
<b>REFERÊNCIAS DOS CAPÍTULOS I E III</b>	<b>66</b>

## RESUMO

A família Myrtaceae inclui mais de 5.500 espécies de árvores e arbustos, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Representantes dessa família possuem grande importância ecológica para os ecossistemas florestais, além de serem importantes economicamente pelo uso de muitas espécies na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e de perfumaria. A sistemática dessa família é bastante complexa, o que provavelmente se deva ao grande tamanho da mesma. O gênero *Hexachlamys* O.Berg apresenta cerca de 10 espécies distribuídas no Brasil, pelas regiões Sul e Sudeste, no Paraguai, Argentina, Bolívia e Uruguai. Esse gênero foi considerado independente em 1968. Em uma revisão mais recente sobre os gêneros de Myrtaceae do Brasil, *Hexachlamys* foi diferenciado do gênero *Eugenia* baseado em apenas um caractere morfológico: cálice pentâmero ou hexâmero (*Hexachlamys*) versus cálice tetrâmero (*Eugenia*). Entretanto, essa classificação tem sido considerada vaga, pois um único caractere é insuficiente para distinção genérica. Assim, a sinonimização de *Hexachlamys* em *Eugenia* vem sendo sugerida por alguns autores. Portanto, estudos de sistemática e filogenética molecular devem ser considerados para o auxílio e na compreensão da taxonomia desses grupos. O objetivo desse estudo foi realizar uma análise filogenética molecular para o gênero *Hexachlamys*. Quatro regiões do cloroplasto (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* e *trnH-psbA*) e uma região nuclear (ITS2) foram selecionadas. Análises filogenéticas baseadas em parcimônia e inferência bayesiana foram realizadas, usando os marcadores combinados e separados. A maior parte da variação encontrada nos marcadores foi relacionada a diferença entre espécies e nenhum polimorfismo nessas regiões do DNA foi relacionado com diferenças entre os gêneros *Eugenia* e *Hexachlamys*. De um modo geral, todos os marcadores (cpDNA e nrDNA) e ambas as análises filogenéticas (parcimônia e bayesiana) mostraram que as espécies de *Hexachlamys* não formam um grupo monofilético. Esse resultado corrobora com os dados morfológicos que sugerem a inclusão de *Hexachlamys* em *Eugenia*. Dessa forma, os dados moleculares gerados nesse estudo contribuem com dados para a sistemática e taxonomia desse gênero, além de disponibilizar informações que possam colaborar e orientar programas de conservação destas espécies e seu habitat.

## ABSTRACT

Myrtaceae family includes more than 5500 species of trees and shrubs, mainly distributed in tropical and subtropical areas of the world. Species of this family have great ecological significance in forest ecosystems, and they are also economically important to the pharmaceutical, food, cosmetic and perfumery industries. The systematic of this family is very complex, in part by the species-richness of the family. The *Hexachlamys* O.Berg genus currently encompasses 10 to 15 species, distributed from southern and southeastern Brazil to Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay. It was considered an independent genus in 1968. In a recent review about Brazilian Myrtaceae genera, *Hexachlamys* was distinguished from *Eugenia* genus based on a single morphological character: calyx pentamerous or hexamerous (*Hexachlamys*) versus Calyx tetramerous (*Eugenia*). However, this classification has been considered weak, since only one character is not enough to assure generic delimitations. Thus, the synonymization of the *Hexachlamys* in *Eugenia* has been suggested by some authors. Therefore, systematic and molecular phylogeny may be important to help the taxonomy of these groups. The aim of this study was to perform a molecular phylogenetic analysis for *Hexachlamys* genus. A set of four chloroplast (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* e *trnH-psbA*) and one nuclear (ITS2) regions were selected. Phylogenetic analysis based on maximum parsimony and Bayesian methods were performed using these markers alone or in combination. The major variation found in these DNA regions was related to species differentiation and no one was related to differences between *Eugenia* and *Hexachlamys*. In general, both Parsimony and Bayesian analyses performed with all markers have showed that *Hexachlamys* species did not form a monophyletic group. This results corroborates with the morphological data that has included *Hexachlamys* in *Eugenia*. Thus, the molecular data of this study contributed with additional data to the systematic and taxonomy of this genus, and also with genetic information to help in the conservation of these species.

## **CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL**



# INTRODUÇÃO GERAL

## A Família Myrtaceae

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 142 gêneros e mais de 5.500 espécies de árvores e arbustos (Wilson, 2011), distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na América Tropical e na região da Oceania e com poucas espécies ocorrendo na África (Wilson et al., 2001) (Figura 1). Os membros da família Myrtaceae possuem folhas inteiras, opostas ou alternas, com glândulas oleíferas translúcidas no limbo, nervura submarginal e estípulas muito pequenas, proponentes caducas. As flores são geralmente hermafroditas, polistêmones, brancas e de simetria radial. Entretanto, essas generalidades morfológicas contam com numerosas exceções (Marchiori and Sobral, 1997).

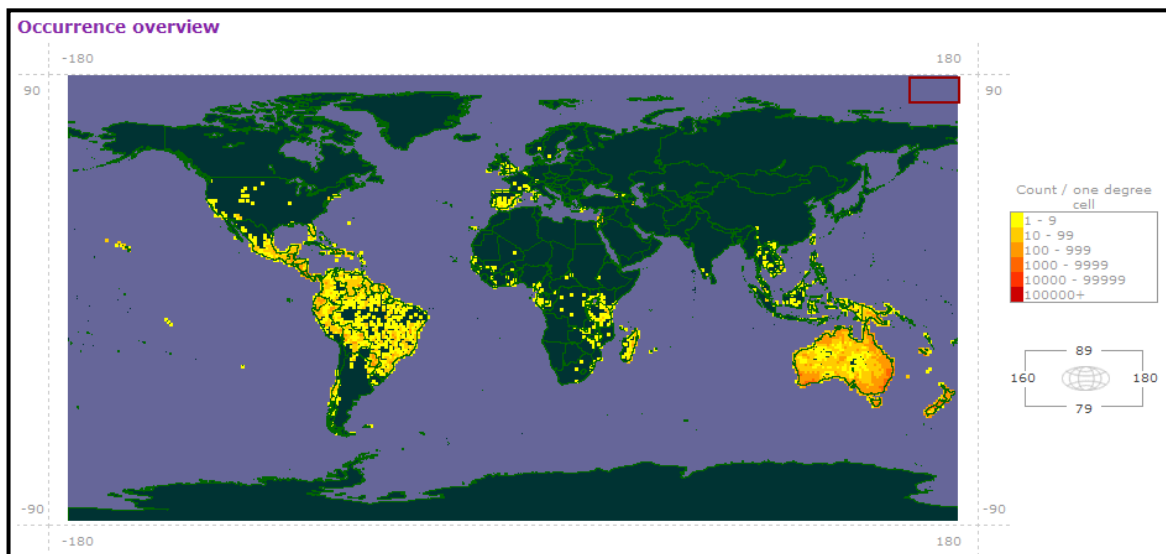


Figura 1: Mapa mostrando registros de ocorrência de Myrtaceae com coordenadas da rede GBIF (<http://www.gbif.org/>).

Essa família destaca-se em diversos estudos florísticos e fitossociológicos como uma das mais frequentes nas florestas neotropicais (Oliveira-Filho and Fontes, 2000). Em um dos mais completos levantamentos realizados para a família na flora brasileira (Berg, 1857, 1859) foram listadas 1.726 espécies, sendo, 696 exclusivas do território brasileiro, com grande ocorrência nas regiões sudeste e centro-oeste.

Dentre os levantamentos taxonômicos realizados com Myrtaceae no Brasil, merecem destaque os estudos realizados para todo o país por (Berg, 1857, 1859), na Bahia (Lughadha, 1996), no Paraná (Soares-Silva, 2000), no Rio Grande do Sul (Sobral, 2003), em São Paulo (Mattos, 1958), em Santa Catarina (Legram, 1969), no Rio de Janeiro (Souza et al., 2007; Souza and Morim, 2008), no Mato Grosso do Sul (Morais & Lombardi, 2006), em Minas Gerais (Arantes and Monteiro, 2002), (Mazine et al., 2008), na Amazônia (Rosário & Secco, 2006), no Distrito Federal (Proença, 1991).

Na América do Sul, a família Myrtaceae é representada principalmente por espécies frutíferas (Wilson et al., 2001). É uma das famílias mais diversificadas e de melhor representatividade nas formações vegetais do Brasil, onde são encontrados 23 gêneros e cerca de 1000 espécies (Barroso and Peron, 1994; Guedes-Bruni, 1998), sendo todas pertencentes a subfamília Myrtoideae. Suas flores são polinizadas principalmente por abelhas e seus frutos carnosos são procurados por diversas espécies de frugívoros, sendo um importante recurso para a manutenção dos animais na Mata Atlântica (Pizo, 2002). Representantes dessa família possuem grande importância ecológica para os ecossistemas florestais, além de serem importantes economicamente por apresentar espécies que são utilizadas na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e de perfumaria.

Até o trabalho de Wilson (2005) a família era dividida em duas grandes subfamílias: Leptospermoideae e Myrtoideae (McVaugh, 1968; Cronquist, 1981). Enquanto Leptospermoideae apresenta fruto tipo cápsula e se distribui principalmente na Austrália (Landrum, 1981), Myrtoideae apresentam fruto tipo baga e distribui-se principalmente nas Américas do Sul e Central.

Wilson et al (2005) sugeriram uma nova classificação baseando-se em dados filogenéticos. A análise de parcimônia, utilizando o gene plastidial *matK* para representantes de 68 gêneros de Myrtaceae, revelou que a família continuava sendo dividida em duas subfamílias, mas que essas eram: Psiloxylloideae e Myrtoideae. A primeira se distingue por ser dióica, apresentar filotaxia alterna, cavidades secretoras, mas não contendo óleos essenciais em *Psiloxylon* Thou. ex Tul., estames não inflexos no botão, anteras com antese tetralocular, óvulos bispóricos, saco embrionário do tipo *Allium* e um número cromossômico básico  $n = 12$ . A segunda tem como principais características ser hermafrodita, raramente andromonóica, filotaxia alterna ou oposta,

com cavidades secretoras contendo óleos essenciais, estames inflexos no botão, anteras biloculares em antese, óvulos monospóricos, saco embrionário do tipo *Polygonum* e um número cromossômico básico  $n=11$ . Esses autores ainda subdividiram as duas subfamílias em tribos, sendo Psiloxyleae dividida em duas tribos: Psiloxyleae e Heteropyxideae; e Myrtoideae dividida em 15 tribos: Xanthostemoneae, Lophostemoneae, Osbornieae, Melaleuceae, Kanieae, Backhousieae, Metrosidereae, Tristanieae, Syzygieae, Myrteae, Eucalypteae, Syncarpieae, Lindsayomyrteae, Leptospermeae e Chamelaucieae.

### **A Tribo Myrteae**

A tribo Myrteae (Myrtoideae), a qual engloba todos os gêneros de Myrtaceae encontrados no Brasil (Sobral et al., 2010), é subdividida em três subtribos (*Eugeniinae*, *Myrciinae* e *Myrtinae*). Essa divisão deve-se basicamente ao caráter estrutura dos embriões (Marchiori and Sobral, 1997). Segundo Landrum e Kawasaki (1997), os três planos básicos de embriões nas Myrtoideae são conhecidos desde De Candolle (1828) e eles têm sido usados como os caracteres mais importantes para a distinção das três subtribos desde os trabalhos de Berg (1856, 1857, 1858, 1859).

Na subtribo *Myrciinae*, incluem-se as espécies que possuem embrião mircióide, com cotilédones normalmente finos, folhosos e dobrados (contortuplicados), com um hipocótilo relativamente estreito, longo e cilíndrico, o qual circunda parcialmente o cotilédone. Os gêneros brasileiros que estão representados nessa subtribo são: *Myrcia* DC. ex Guill; *Myrceugenia* O.Berg; *Calyptranthes* Sw. e *Marlierea* Cambess. (Landrum and Kawasaki, 1997).

A subtribo *Myrtinae* engloba espécies com embrião mirtóide, hipocótilo geralmente do mesmo comprimento que os cotilédones, ou ainda mais longo, contudo ainda existem variações. Nos gêneros com sementes de testa dura tal como *Pimenta* Lindl. e *Psidium* L., o embrião está confinado em uma cavidade em forma de C e este também possui forma de C. Nestes embriões os cotilédones podem ter o mesmo tamanho que o hipocótilo ou serem menores que ele. Nos gêneros que possuem sementes com testa membranáceas ou submembranáceas tal como *Campomanesia* Ruiz & Pav. o crescimento do embrião parece ser menos restrito, o hipocótilo é grande e intumescido, e algumas vezes o embrião tem formato em espiral. Os gêneros brasileiros

desta subtribo são: *Acca* Landrum, *Blepharocalyx* O.Berg, *Calycolpus* O.Berg, *Campomanesia* Ruiz & Pav., *Curitiba* Salywon & Landrum, *Myrrhinium* Schott, *Pimenta* Lindl., *Psidium* L. e *Ugni* Turcz. (adaptado de Landrum e Kawasaki, 1997).

As espécies pertencentes a subtribo *Eugeninae* apresentam embrião eugenióide, com cotilédones espessos, separados e plano-convexos e o hipocótilo é uma curta protrusão, ou os cotilédones são fusionados parcial ou completamente e o hipocótilo, neste caso, é indistinto. Os gêneros brasileiros que pertencem a essa subtribo são: *Calycorectes* O.Berg, *Eugenia* L., *Hexachlamys* O.Berg, *Myrcianthes* O.Berg, *Myrciaria* O.Berg, *Neomitranthes* D. Legrand, *Plinia* L. e *Siphoneugena* O.Berg (Landrum and Kawasaki, 1997). Apesar da configuração supracitada dessas subtribos, essa classificação não é estática.

Um trabalho recente utilizando marcadores moleculares (ITS, ETS, *psbA-trnH* e *matK*), realizou uma análise filogenética de 31 gêneros e 75 espécies da tribo Myrteae e obteve resultados que podem alterar a configuração das subtribos (Lucas et al 2007). Esse estudo encontrou sete grupos distintos em suas análises, sendo eles: O grupo *Plinia* que engloba os gêneros *Algrizea* Proença & Nic Lugh., *Myrciaria*, *Neomitranthes*, *Plinia*, *Siphoneugena*; o grupo *Myrciinae sensu stricto* que engloba os gêneros centrais da subtribo *Myrciinae* *Calyptanthes*, *Gomidesia*, *Marlierea* e *Myrcia*, o grupo *Myrceugenia* com *Blepharocalyx cruckshanksii* Hook. & Arn., *Luma* e *Myrceugenia*; o grupo *Myrteola* que engloba os gêneros *Lophomyrtus* Burret, *Myrteola* O.Berg, *Neomyrtus* Burret e *Ugni*; o grupo *Pimenta* que inclui os gêneros *Acca*, *Amomyrtus* (Burret) D. Legrand & Kausel, *Campomanesia*, *Legrandia* Kausel, *Pimenta* e *Psidium*; o grupo *Eugenia* que engloba os gêneros *Eugenia* e *Myrcianthes* e um grupo Australiano-Asiático que inclui os gêneros *Austromyrtus* (Nied.) Burret, *Decaspermum* Forst., *Gossia* N. Snow & Guymmer, *Octomyrtus* Diels, *Rhodamnia* Jack e *Rhodomyrtus* (DC) Rchb. Nesse estudo, os autores não incluíram nenhum representante do gênero *Hexachlamys*. O resultado desse estudo sugere a criação de novas subtribos que agrupem os gêneros segregados das subtribos usuais. Entretanto, mais estudos são necessários para que isto se consolide.

Como podemos observar, a sistemática da família Myrtaceae é bastante complexa e suas espécies são de difícil delimitação. Essa família possui um grande número de problemas taxonômicos evidentes em diversos níveis hierárquicos (Parnell,

1999), o que possivelmente se deve ao grande tamanho da família. As espécies americanas assemelham-se muito na maioria dos caracteres, tornando-se tedioso o trabalho de identificá-las e classificá-las. Assim, fica evidente a necessidade de mais estudos taxonômicos e moleculares para tentar elucidar tais problemas.

### **Os Gêneros: *Eugenia* L. e *Hexachlamys* O. Berg**

Os gêneros pertencentes a subtribo Eugeniinae (Landrum e Kawasaki, 1997) estão divididos em dois grupos, baseados em caracteres morfológicos: (i) *Eugenia*, *Hexachlamys* e *Calycorectes* O.Berg que apresentam inflorescências dispostas em “ramos bracteados”, geralmente mais de sete óvulos e embriões sólidos com os cotilédones fundidos e (ii) *Myrciaria*, *Neomitranthes*, *Plinia* e *Siphoneugena*, apresentando inflorescência geralmente um glomérulo ou pequeno ramo bracteado, 2-6 (-7) óvulos, embriões geralmente com dois cotilédones separados e plano-convexo. Esses autores referem ainda, que *Hexachlamys* e *Calycorectes* são gêneros muito proximamente relacionados com *Eugenia*. A diferenciação entre esses gêneros é cálice tetrâmero em *Eugenia*, cálice fechado no botão destacando-se na antese irregular, ou regularmente em quatro lobos iguais em *Calycorectes* e cálice pentâmeros ou hexâmeros em *Hexachlamys*. No entanto, os autores afirmam que os limites genéricos desses gêneros ainda são vagos e que são necessários mais estudos para elucidar essa questão.

*Eugenia* L. é um dos cerca de 142 gêneros da família Myrtaceae e o maior gênero dessa família na América Tropical, o qual possui aproximadamente 1000 espécies (Govaerts et al., 2008). O gênero ocorre desde o México e Caribe até o norte da Argentina e são estimadas cerca de 350 espécies para o Brasil (Landrum e Kawasaki, 1997). Segundo Lucas et al. (2007), o gênero é originário do oeste ou sudeste da América do Sul, migrando desde as regiões andinas para o norte ou nordeste da América do Sul.

Segundo (McVaugh, 1958, 1989), Kawasaki (1984,1989), Sánchez-Vindas (1990), Rotman (1995), Holst and Kawasaki (2002) e Holst et al; (2003), espécies desse gênero caracterizam-se por serem árvores ou arbustos glabros ou com indumento de tricomas simples ou dibraceados, de folhas opostas e flores solitárias ou reunidas em racemos, frequentemente com eixo principal reduzido e então inflorescências em

fascículos, com flores sésseis ou pediceladas, ou dicásios, raramente panículas. As flores apresentam duas bractéolas, geralmente persistentes e hipanto geralmente não prolongado sobre o ovário, às vezes pouco prolongado. As flores são tetrâmeras, de sépalas livres, raramente parcialmente conadas, distintas e imbricadas no botão floral, geralmente persistente até o fruto. As pétalas são brancas, raramente rosadas ou azuladas. As anteras apresentam deiscência longitudinal e o ovário é 2-locular (muito raramente 1-, 3- ou 4-locular), com muitos rudimentos seminiais (raramente 3). Os frutos de *Eugenia* são bagas, geralmente com sépalas persistentes e apresentam 1-2 sementes, com testa membranácea ou cartilaginosa (Figura 2). O embrião é eugenióide, com cotilédones concrecidos e radícula inconspícua.

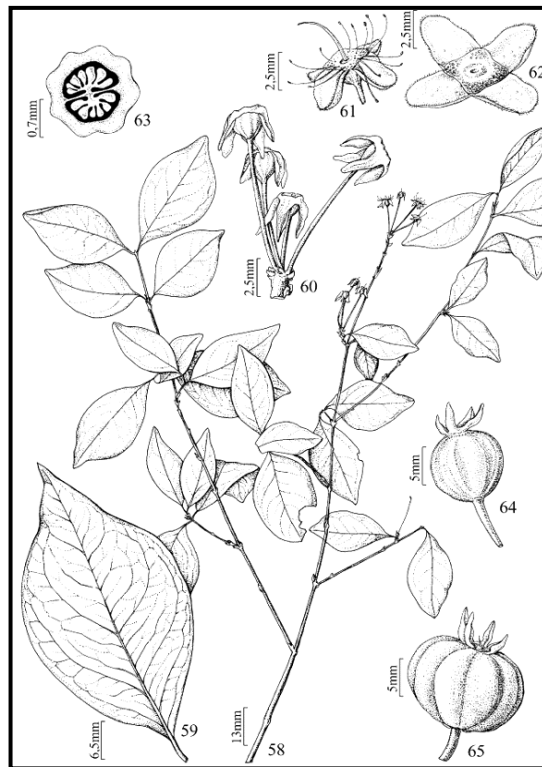


Figura 2: *Eugenia uniflora* L. 58. Ramo com inflorescência. 59. Folha. 60. Inflorescência. 61. Disco estaminal. 62. Disco estaminal e sépalas. 63. Ovário em corte transversal. 64. Fruto jovem. 65. Fruto maduro. (M.B. Romagnolo 655).

Este gênero é o mais rico em espécies arbóreas de floresta ombrófila, e *Eugenia uniflora*, *E. involucrata* e *E. brasiliensis* são exemplos de espécies frutíferas nativas que ocorrem na Mata Atlântica brasileira e destacam-se pela sua importância ecológica, econômica e farmacêutica (Legrand and Klein, 1969; Barroso and Peron, 1994) (Figura 3).



Figura 3: A) *E. uniflora*:fruto=Pitanga, B) *E. brasiliensis*:fruto= Grumixama e C) *E. involucrata*: fruto= Cereja do Rio Grande. ([hppt://pitangadoce.blogspot.com](http://pitangadoce.blogspot.com); [hppt://lilliverdi.blogspot.com](http://lilliverdi.blogspot.com); [hppt://frutosatrativosdocerrado.bio.br](http://frutosatrativosdocerrado.bio.br))

O gênero *Hexachlamys* foi descrito por Berg (1856), compreendendo uma única espécie, *H. humilis*, cuja descrição deve ser entendida como a mesma do gênero, uma vez que não foi apresentada naquela obra uma descrição apenas para a espécie. O gênero, hoje, apresenta cerca de 10 espécies distribuídas no Brasil, pelas regiões Sul e Sudeste, no Paraguai, Argentina, Bolívia e Uruguai (McVaugh, 1968; Legram and Klein, 1969) (Figura 4). É composto de subarbustos ou arbustos, entouceirado ou árvores de até 10 m de altura e 40 cm de diâmetro à altura do peito, com casca espessa, acinzentada e com fissuras longitudinais. Flores solitárias, axilares ou em partes dos ramos sem folhas. Bractéolas decíduas ou persistentes na antese. Cálices com lobos individualizados, persistentes nos frutos; pétalas presentes; ovário 2-3-lobular, com 2 a 5 óvulos por lóculo; lóculos pilosos internamente, hipanto ausente. Frutos 1-3 seminados, com embrião eugenióide de cotilédones soldados (Figura 5).

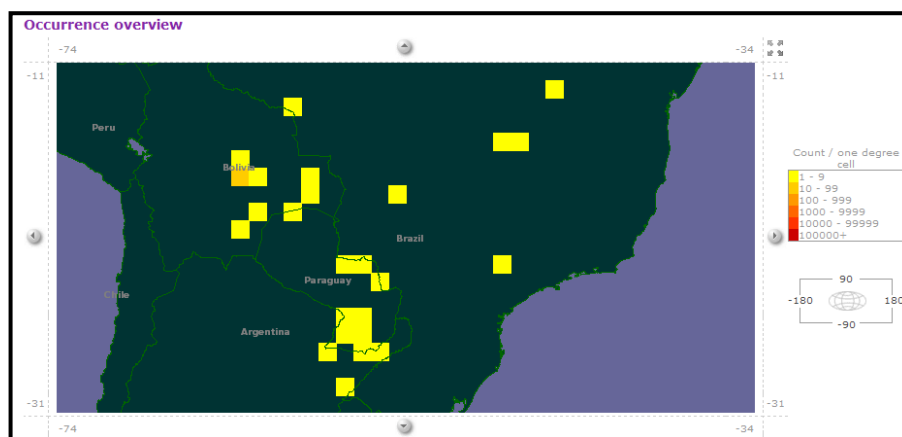


Figura 4. Mapa mostrando registros de ocorrência do gênero *Hexachlamys* com coordenadas da rede GBIF (<http://www.gbif.org/>).

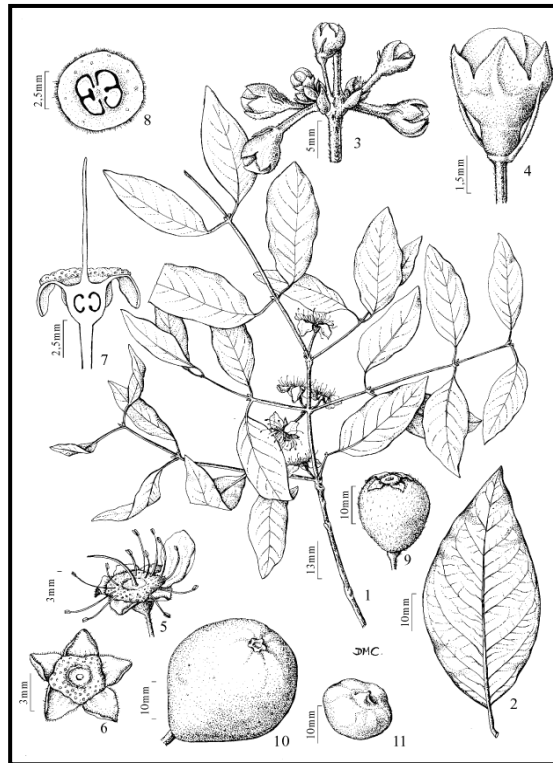


Figura 5. *Hexachlamys edulis* (O. Berg) Kausel & D. Legrand - 1. Hábito. 2. Folha. 3. Inflorescência. 4. Botão floral. 5. Disco estaminal, vista lateral. 6. Disco estaminal, vista frontal. 7. Flor em corte longitudinal. 8. Ovário em corte transversal. 9. Fruto jovem. 10. Fruto maduro. 11. Embrião (*M.B. Romagnolo, 301*).

Além de ornamental, as espécies do gênero *Hexachlamys* destacam-se pelos frutos comestíveis, relativamente grandes se comparados ao restante da família. Sua madeira, moderadamente pesada, dura, compacta e resistente, é tida como de longa durabilidade natural, recomendando-se para marcenaria comum, obras internas e cabos de ferramentas (Figura 6).



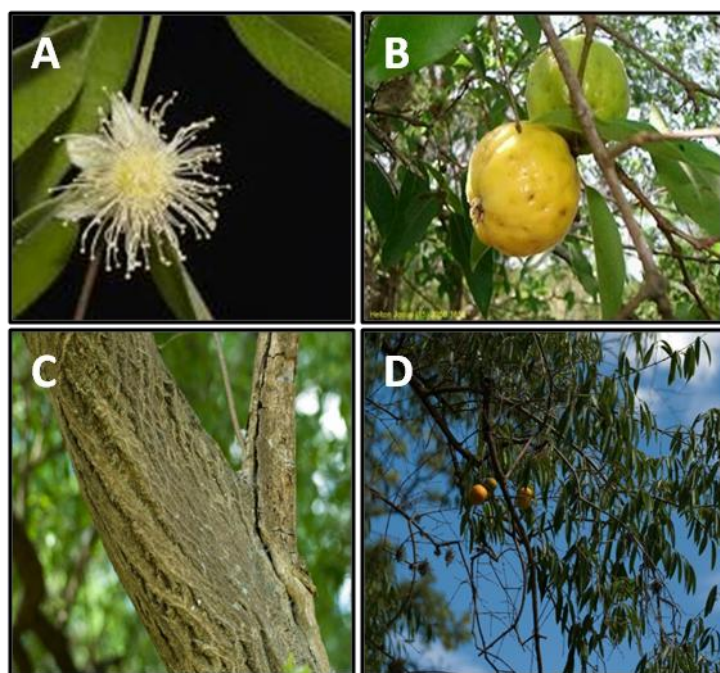


Figura 6: *Hexachlamys edulis*. A) Flores, B) Fruto, C) Caule e D) Árvore com frutos.

(<http://frutasraras.sites.uol.com.br/hexachlamysedulis.htm>;

<http://floradeluruguay.blogspot.com/2008/12/ubajay.html>).

No estado do Rio Grande do Sul ocorrem quatro espécies do gênero *Hexachlamys*: *H. edulis* (Berg), *H. hamiltonii* Mattos, *H. humilis* Berg e *H. itatiaiensis* Mattos (Marchiori and Sobral, 1997).

*H. edulis*, em especial, conhecida pelos nomes comuns de pêssego-do-rio-grande, cerejeira-do-rio-grande, ivaí ou ubajaí, é uma planta pioneira, rústica e fornecedora de abundante alimentação para a fauna e é indispensável nos plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente, tem seus frutos (Figura 6B) relativamente grandes e que são comestíveis e muito saborosos, sendo consumidos tanto ao natural como na forma de doces, sucos e geleias (Lorenzi, 2009).

Apesar da sua importância ecológica e econômica, pouco se sabe a respeito deste gênero e de suas espécies. Em 1968, McVaugh considerou este gênero independente, e a principal característica utilizada para a distinção de *Eugenia* e *Hexachlamys* foi a presença de flores predominantemente pentâmeras ou hexâmera em *Hexachlamys* e tetrâmeras em *Eugenia*. No entanto, com o tempo, novas espécies foram sendo descritas e essa característica se tornou insuficiente para a distinção genérica.

Então, Legrand e Klein (1977) afirmaram que *Hexachlamys* diferenciava-se de *Eugenia* por apresentar flor geralmente pentâmera, fruto drupáceo com umbigo tubular e embrião com a radícula perpendicular exserta. Mas em uma revisão mais recente sobre os gêneros brasileiros de Myrtaceae, Landrum e Kawasaki (1997) revelaram que a diferenciação entre esses gêneros pode ser feita apenas com base em um único caráter: cálice tetrâmero (*Eugenia*) e cálice pentâmero ou hexâmero (*Hexachlamys*). Entretanto, tais características são reconhecidamente vagas quando usadas para a distinção genérica, já que um único caractere é considerado insuficiente e vulnerável à união ou desmembramento de um gênero (Landrum and Kawasaki, 1997; Sobral, 2003). Dessa forma, alguns autores já vêm tratando esse gênero como sinônimo de *Eugenia* em muitos levantamentos florísticos (Niedenzu, 1893; Proença, 1991; Landrum and Kawasaki, 1997; Sobral, 2003; Sobral et al; 2010) e, assim, mais estudos são necessários para tentar esclarecer a delimitação desses gêneros.

Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares tem se mostrado bastante útil para auxiliar na resolução dessas questões taxonômicas. A maior vantagem dos métodos moleculares é a investigação direta da situação genotípica, o que permite a detecção de variação ao nível de DNA e, dependendo da metodologia aplicada, os métodos moleculares podem ser bem mais sensíveis a qualquer diferença genética e detectar mais diversidade genética do que com os métodos clássicos de caracterização morfológica (Buso, 2005).

### **Sistemática e Filogenia Molecular**

Desde o início da década de 1990, técnicas moleculares, tais como PCR e sequenciamento de DNA, vem ganhando espaço no campo da sistemática, e tornaram-se ferramentas importantes e comumente usadas para auxiliar na identificação e delimitação taxonômicas de diversos grupos (Gardner et al., 2008; Zarrei et al., 2009; Kim et al., 2010; Martinez-Azorin et al., 2011; Takano and Okada, 2011). Os estudos de filogenia e sistemática molecular têm sido de grande relevância nos últimos anos, principalmente pelo fato de que muitas relações filogenéticas são impossíveis de serem descobertas de outra forma e muitos táxons são difíceis de serem classificados usando somente caracteres morfológicos. Muitos estudos recentes mostram a importância da sistemática molecular na elucidação das relações taxonômicas de diversas espécies

(Karehed and Bremer, 2007; Karehed et al., 2008; Peterson et al., 2008; Redondo et al., 2008; van Ee et al., 2011; Wilson, 2011). Dados de filogenias usando marcadores moleculares também são importantes no campo da conservação (Moritz, 1995; Soltis and Gitzendanner, 1999; Boon et al., 2000; Veron et al., 2004; Andreasen, 2005; Aleixo et al., 2006; Gompert et al., 2006).

Marcadores moleculares são bastante empregados nos estudos de sistemática. Para estudos de sistemática molecular de plantas são usados tanto marcadores nucleares como plastidiais. Os marcadores plastidiais caracterizam-se pela frequente herança uniparental, que é uma vantagem para a avaliação diferencial do fluxo de pólen e sementes (Birky, 1995; Korpelainen, 2004). A análise do DNA plastidial permite, ainda, a detecção de híbridos, que podem não ser identificados somente através da análise morfológica (Fant et al., 2003, 2005; Chen et al., 2004; Modliszewski et al., 2006; Tovar-Sanchez et al., 2008). Dentre os marcadores plastidiais que se destacam encontra-se o espaçador intergênico *psbA-trnH*, os genes *matk*, *rpl16*, *rbcL* entre outros (van der Merwe et al., 2005; Wilson et al., 2005; Lucas et al., 2007; Ji et al., 2008; Englund et al., 2009). Por outro lado, os marcadores nucleares apresentam modo de herança biparental e, geralmente, evoluem mais rapidamente do que os plastidiais, podendo revelar diferentes padrões evolutivos (Buso, 2005). O *internal transcribed spacer* (ITS) é um dos marcadores nucleares mais utilizados em estudos de sistemática molecular de plantas em baixos níveis taxonômicos, devido a sua rápida taxa evolutiva aliados a facilidade de amplificação por PCR (Karehed et al., 2008; Englund et al., 2009; Zarrei et al., 2009; Kim et al., 2010).

Desta forma, levando em consideração os diversos problemas taxonômicos que envolvem muitos gêneros da família Myrtaceae, a importância econômica e ecológica das espécies dos gêneros *Hexachlamys* e *Eugenia* e o pouco conhecimento que se tem em relação a muitas dessas espécies, torna-se importante a realização de estudos que possam auxiliar na sua taxonomia. Assim, o presente trabalho procurou utilizar dados moleculares para realizar análises filogenéticas a fim auxiliar no esclarecimento das relações entre esses dois gêneros e disponibilizar informações que possam colaborar e orientar programas de conservação destas espécies e seu hábitat no futuro.

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo desse trabalho foi gerar dados moleculares e realizar uma análise filogenética dentre as espécies pertencentes ao gênero *Hexachlamys* (Myrtaceae), através do uso de marcadores plastidiais e nucleares, para contribuir na sua sistemática e taxonomia.

### **Objetivos específicos**

1. Testar e selecionar marcadores moleculares para a realização das análises filogenéticas;
2. Determinar se o gênero *Hexachlamys* é monofilético;
3. Verificar o relacionamento do gênero *Hexachlamys* com espécies do gênero *Eugenia*.
4. Examinar o relacionamento entre as espécies do gênero *Hexachlamys*.

**CAPÍTULO II: Phylogenetic analysis of the genus *Hexachlamys* (Myrtaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences and their taxonomic implications.**

**Authors:**

Fernanda da Cruz<sup>1,2</sup>; Andreia C. Turchetto-Zolet\*<sup>1,2</sup>; Nicole Veto<sup>2</sup>; Cláudio Augusto Mondin<sup>3</sup>; Marcos Sobral<sup>4</sup>; Maurício Almerão<sup>2</sup>; Rogério Margis<sup>1,2,5</sup>

**Affiliation:**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

<sup>3</sup>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Naturais - Universidade Federal de São João del-Rei.

<sup>5</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

Artigo submetido para publicação no periódico Botanical Journal of the Linnean Society.

**Title:**

Phylogenetic analysis of the genus *Hexachlamys* (Myrtaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences and their taxonomic implications.

**Running title:**

Molecular phylogenetic of *Hexachlamys*.

**Authors:**

Fernanda da Cruz<sup>1,2</sup>; Andreia C. Turchetto-Zolet\*<sup>1,2</sup>; Nicole Veto<sup>2</sup>; Cláudio Augusto Mondin<sup>3</sup>; Marcos Sobral<sup>4</sup>; Maurício Almerão<sup>2</sup>; Rogério Margis<sup>1,2,5</sup>

**Affiliation:**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

<sup>3</sup>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Naturais - Universidade Federal de São João del-Rei.

<sup>5</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

**Corresponding authors (\*):**

Andreia Carina Turchetto-Zolet, sala 213, prédio 43431, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre Brasil, Cx. Postal 15005.

Phone: 55 (51) 3308-7766, Fax: 55 (51) 3308-7309, e-mail: [aturchetto@gmail.com](mailto:aturchetto@gmail.com)

Website: <http://www.ufrgs.br/RNAi/LGPP.htm>

## ABSTRACT

The family Myrtaceae is one of the most species-rich families of flowering plants in the Neotropics, and it is also one of the most systematically complex, with several problematic delimitations of genera and species. One of these troubling genera is *Hexachlamys* O.Berg, which has been merged into the genus *Eugenia* L. on morphological grounds. In this study, we performed a molecular phylogenetic analysis of *Hexachlamys* and *Eugenia* to examine the support that the molecular data lend to the inclusion of *Hexachlamys* in *Eugenia*. Sequence data from cpDNA and ITS2 regions, alone and in combination, were analyzed using Bayesian (BA) and parsimony (MP) methods. Phylogenetic analyses demonstrated well-resolved species relationships. All BA and MP analyses revealed the nonmonophyly of *Hexachlamys*. The trees constructed using nrDNA (ITS2) were best able to resolve the relationships between species and genera. The molecular phylogenetic analysis corroborates the synonymization of *Hexachlamys* in *Eugenia*, reinforcing the importance of uniting knowledge and strategies to better understand issues of delimitation of genera and species in groups of plants with large taxonomic problems.

ADDITIONAL KEYWORDS: cpDNA, ITS, Molecular Phylogeny; Myrtaceae.

## INTRODUCTION

Myrtaceae is a pantropical family of flowering plants with 142 genera and more than 5500 species (Wilson & Hildebrand, 2010), and is it one of the most species-rich families in the Neotropics (Lucas *et al.*, 2007). Species of this family have great ecological significance in forest ecosystems, and they are also economically important to the pharmaceutical, food, cosmetic and perfumery industries (Barroso & Peron, 1994). Despite the relevance of this family, the identities of several of its species, as well as its generic frontiers, are still debatable (Lucas *et al.*, 2005).

The pantropical tribe Myrteae DC. (*sensu* Wilson *et al.*, 2005) contains approximately 54 genera and 1887 species of trees and shrubs, of which approximately 35 genera and 1700 species are Neotropical (Wilson & Hildebrand, 2010). All Brazilian Myrtaceae (approximately 24 genera and 927 species; Sobral *et al.*, 2010) belong to tribe Myrteae.

The genus *Hexachlamys* was erected by Berg (1855-1856) with only one species, *H. humilis*, which he placed in the subtribe Eugeniinae. Since that time, several new *Hexachlamys* species have been reported; the genus currently contains approximately 10 (Legrand & Klein, 1977) to 15 (Wilson & Hildebrand, 2010) species, distributed from southern and southeastern Brazil to Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay (McVaugh, 1968; Legrand & Klein, 1977). It is distinguished morphologically from *Eugenia* by its pentamerous or hexamerous flowers (*vs.* tetramerous in *Eugenia*) and seeds with slightly exerted radicle (*vs.* radicle absent (Berg, 1855-1856; McVaugh, 1956; McVaugh, 1968). It was considered a synonym of *Eugenia* by Niedenzu (1893), although it has been accepted by most studies of the Myrtaceae throughout the 20<sup>th</sup> century (e.g., Kausel, 1966; Legrand, 1968; McVaugh, 1968; Rotman 1982; Mattos, 1983). In a synopsis of the Brazilian genera of Myrtaceae, Landrum and Kawasaki



(1997) reported that *Hexachlamys* was closely related to *Eugenia* and should eventually be united with it, a circumscription that has been accepted by some authors (Mattos, 1995; Sobral *et al.*, 2010). Most species of *Hexachlamys* have been sporadically treated across a number of floristic studies, mostly in southern Brazil, Argentina and Uruguay (Legrand, 1968; Legrand & Klein, 1977; Rotman, 1982; Mattos, 1983; Romagnolo & Souza, 2004). However, there is not a thorough systematic treatment of all species included in the genus, since the knowledge about the relationships among them shows a high complexity of morphological structures, making its taxonomy complex and difficult.

In this context, studies of molecular systematics may be useful to understand and to solve these relationships. A better understanding of taxonomically complex groups is unquestionable and many recent studies have shown the importance of molecular systematics in the elucidation of the taxonomic relationships of several species (Karehed & Bremer, 2007; Karehed *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008; Redondo *et al.*, 2008; van Ee *et al.*, 2011; Wilson, 2011). For molecular phylogenetic studies in plants, chloroplast markers are widely used, and among them we highlight the intergenic spacers (Miller *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2008; de Andrade *et al.* 2010). Internal transcribed spacers (Nomura *et al.*, 2010) are among the most widely used nuclear markers in studies of plant molecular systematics at low taxonomic levels. The popularity of ITS is due to their rapid rates of evolution and ability to resolve phylogenetic relationships at various taxonomic levels, combined with the ease of their PCR amplification (Karehed *et al.*, 2008). Methods for identifying species using short sequences of DNA, known as "DNA barcode", also have been proposed to facilitate the study of biodiversity (Kress *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Kress *et al.*, 2010) and is

advantageous because it can be applied in DNA samples preserved for a long time after the death of the organism (Shneyer, 2009). Many markers have proved to be good candidates for barcodes on plants, for example: the non-coding plastid *trnH-psbA* intergenic spacer region and the multicopy nuclear internal transcribed spacer (Nomura et al.) (Kress *et al.*, 2005) and also, plastid coding regions (*accD*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB2*, *rpoC1* and *ycf5*) have been recommended as putative plant barcodes (Newmaster *et al.*, 2008) (see <http://www.rbgekew.org.uk/barcoding/index.html>).

In order to check if the inclusion of *Hexachlamys* in *Eugenia*, as proposed by some authors since the work of Niedenzu (1893), is phylogenetically acceptable, we performed a molecular phylogenetic analysis including species of *Hexachlamys* and *Eugenia*, using chloroplast (cpDNA) and nuclear (nrDNA) markers. In this way, the present analyses contribute to the taxonomy of these genera.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Samples collection*

The study samples were collected as leaf material from either herbaria specimens or field samples (Fig.1). Six species formerly included in *Hexachlamys* were included in this study, two collected in the field and four from herbaria. Eighteen *Eugenia* species were used; for outgroup taxa, *Myrciaria cuspidata* O.Berg, *Myrcia glabra* (O.Berg) D.Legrand, *Myrcia brasiliensis* Kiaersk., *Myrcia palustris* DC., *Myrcianthes cisplatensis* (Cambess.) O.Berg, *Myrcianthes gigantea* (D.Legrand) D.Legrand and *Psidium* sp. were selected (Table 1). The genera used as outgroups were, until recently, considered members of the three different subtribes within Myrteae in which the American genera have traditionally been included: subtribes Myrciinae O.Berg (*Myrcia*), Eugeniinae O.Berg (*Myrcianthes* and *Myrciaria*) and Myrtinae O.Berg

(*Psidium sp.*). However, this subtribal circumscription is not phylogenetically sound, according to the results of Lucas *et al.* (2007), and the authors of that study have proposed an arrangement of the American Myrteae into six informal groups. Following their arrangement, *Myrcia* would be placed in the *Myrcia* group, *Myrcianthes* in the *Eugenia* group, *Myrciaria* in the *Plinia* group and *Psidium* in the *Myrteola* group. In most cases, more than one individual was sampled for each species. Samples were collected as silica gel dried leaves from natural populations and as leaves from herbaria. Voucher specimens were collected and deposited in the ICN Herbarium of Department of Botany at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) (Table 1). Appendix S1 in the supporting information shows a list of *Hexachlamys* species with their alternatives names in *Eugenia*.

#### *DNA extraction, amplification and sequencing*

Total genomic DNA was isolated using the CTAB method (Doyle & Doyle, 1987). For the samples taken from herbaria, we used the GenomiPhi V2 DNA amplification Kit (GE Healthcare). In this study, we tested 15 potential DNA regions (Table 2); however, due to the difficulty of amplification for herbaria samples, only four cpDNA regions (*accD*, *psbA-trnH*, *rpoC1* and *rpoB*) and one nrDNA (ITS2) region were considered appropriate for our analysis.

All primer sequences used for PCR amplification and sequencing, as well as the expected sizes of the resulting fragments, are described in Table 2. The PCR protocol was conducted using 10 ng of genomic DNA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP mix, 1x PCR buffer, 0.05 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 0.25 μM of each primer, in a total volume of 20 μl. All primers were initially tested, and the following PCR conditions were able to amplify all fragments: an initial hot-start step at 94° C for

5 min, followed by 35 cycles with denaturation at 94° C for 20 s, an annealing temperature of 50°C for 30 s, and 45 s of elongation at 72° C. All PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5 % agarose gels stained with SYBR Gold (Invitrogen) and precipitated using 3 M sodium acetate (1:10) and 95% ethanol before sequencing. Nuclear and plastid amplified PCR products were sequenced with the dideoxy chain-termination method using Big-Dye according to the manufacturer's instructions and run on an ABI-3100 automatic sequencer (Applied Biosystems). Both DNA strands were fully sequenced.

#### *Editing and sequence alignment*

Sequences were individually checked by eye, and all detected polymorphisms were checked with the original electropherograms. If possible polymorphisms were still unclear, independent PCR reactions were carried out to confirm them. Sequence identities were certified using the BLASTn algorithm against plant DNA sequences deposited at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nucleotide sequences were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004) implemented in MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Sequences generated in this study were deposited in GenBank, and accession numbers are found in Table 1.

#### *Phylogenetic Analyses*

Four separate analyses were carried out. The first (Analysis A) analysis used three concatenate plastid markers (*accD*, *rpoB* and *rpoC1*) and included 18 species of *Eugenia* and six *Hexachlamys* species. The second (Analysis B) analysis used four concatenate plastid markers (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* and *trnH-psbA*) and only four *Hexachlamys* species and 17 species of *Eugenia*. The third (Analysis C) analysis used concatenate nrDNA and cpDNA for 17 species of *Eugenia* and four species of

*Hexachlamys*. The last one (Analysis D) was performed using only the nrDNA marker and included six *Hexachlamys* and 18 *Eugenia* species. For all four analyses, species from four genera (*Myrcia*, *Myrciaria*, *Myrcianthes* and *Psidium*) were used as outgroups. Two different methods, parsimony and Bayesian analyses, were used for phylogenetic inference. The number of *Hexachlamys* species varied between analyses due to difficulties in the amplification of DNA for all of the samples obtained from herbaria.

#### *Maximum Parsimony analysis (MP)*

PAUP\* (version 4.10b; Swofford, 2007) was used for parsimony analysis following widely used methods, including successive approximations, weighting and bootstrapping (Fay *et al.*, 2000, Clarkson *et al.*, 2004) (the bootstrap did not use the relative weights). In analyses A, B, C and D, tree searches were performed under the heuristic search criterion with 1000 random sequence additions and tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping, permitting ten trees to be held at each step (Multrees on), which reduced the time spent searching suboptimal "islands" of trees (Chase *et al.*, 2006). All of the shortest trees collected in the 1000 replicates were swapped on to completion without a tree limit. To evaluate internal support, 1000 bootstrap (BS) replicates were carried out with equal weights, TBR branch swapping with five trees held at each step and simple taxon addition (Felsenstein, 1985). The following descriptions for categories of bootstrap support were used: weak, 50–74; moderate; 75–84; well supported, 85–100 % (Chase *et al.*, 2000).

#### *Bayesian analysis (BA)*

Further phylogenetic analyses were performed using Bayesian inference as implemented in MrBayes (version 3.12; Ronquist & Mark, 2005). MrModeltest (version

2.2; Nylander, 2005) was used to determine the best model of DNA substitution for each partition, evaluating all models against the defaults of the program. The GTR + I + G model (a general time reversible model with a proportion of invariable sites and a gamma-shaped distribution of rates across sites) was chosen for the four data sets as the best-fitting among the 24 models compared. Thus, all four data sets were assigned a model of six substitution types ( $n = 6$ ) with a proportion of invariable sites. Two independent runs of 3,000,000 generations, each with two Monte Carlo Markov chains (MCMC), were run in parallel (starting each from a random tree). Markov chains were sampled every 100 generations, and the first 25% of the trees were discarded as burn-in. The remaining ones were used to compute the majority rule consensus tree (MrBayes command `allcompat`), the posterior probability (PP) of clades and branch lengths. Convergence of the two runs was assessed by checking the average standard deviation of split frequencies (below 0.01) and the Potential Scale Reduction Factor (PSRF, very close to 1.00 for all parameters).

## RESULTS

### *Sequence characteristics of the ITS and the four cpDNA regions*

Sequence characteristics for each of the five markers and the three datasets (analysis A, B and C) are shown in Table 3. The total aligned length for nrDNA (ITS2) sequences was 418 bp, which included 160 variable and 81 (19.38%) parsimony-informative characters. For *accD*, the total aligned length sequences was 221, with 85 variable and 52 (23.53%) parsimony-informative characters. The total aligned length for *rpoB* sequences was 407 bp, which included 49 variable and 45 (11.06%) parsimony-informative characters. The *rpoC1* sequences contained variation at 59 out 434 sites and 49 (11.29%) parsimony-informative characters. The *trnH-psbA* intergenic spacer

sequences showed variation at 243 of 563 sites and 85 (15.10%) parsimony-informative characters.

### *Phylogenetic analyses*

All cpDNA and nrDNA regions presented polymorphisms among the studied species and were used to reconstruct the phylogenetic analysis. In general, results from the BA and MP tree analyses produced similar topologies and revealed that the *Hexachlamys* species did not form a monophyletic group (Fig. 2, 3 and 4). The *Hexachlamys* species were grouped together with *Eugenia* species with high bootstrap values.

### *cpDNA data set (analysis A)*

The total aligned length for the combined sequences in analysis A (*accD*, *rpoB* and *rpoC1*) was 1,062 characters, which included 193 variable sites and 151 (14.22%) parsimony-informative characters. In this analysis, MP or BA produced similar topologies; both recovered unresolved topologies with moderately to highly supported branches (Fig. 2A and Appendix S2A). The MP analysis produced 51 equally most-parsimonious trees with a consistency index (CI) of 0.871 and a retention index (RI) of 0.940. The topologies of the MP and BA analyses revealed that the six *Hexachlamys* species did not form a monophyletic group. However, these markers were not very effective at resolving relationships among species.

### *cpDNA data set (analysis B)*

The combined sequences in analysis B (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* and *trnH-psbA*) presented 1,505 characters, which included 405 variable sites and 138 (9.17%) parsimony-informative characters. BA and MP produced similar and well-resolved topologies with highly supported branches (Fig. 2B and Appendix S2B). The MP analysis produced 81

equally most-parsimonious trees (CI = 0.798, RI = 0.818). The presence of the *trnH-psbA* intergenic spacer in this dataset caused it to produce trees with better topology than analysis A, which only contained three markers (*accD*, *rpoB* and *rpoC1*). In both analyses (BA and MP), the four *Hexachlamys* (*H.edulis*, *H. itatiaiensis*, *H. emrichii* and *H. humilis*) did not form a monophyletic group, and the clade *Eugenia/Hexachlamys* was well supported (BS = 90%).

#### *cpDNA and nrDNA combined (analysis C)*

The combined cpDNA and nrDNA sequences in analysis C (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* and *trnH-psbA* + ITS2) consisted of 1,933 characters, which included 566 variable sites and 221 (11.43%) parsimony-informative characters. Both MP and BA analyses resulted in similar topologies (Fig. 3 and Appendix S3). The MP analysis produced 35 equally most-parsimonious trees (CI = 0.763, RI = 0.804). In this analysis, as observed in analysis B, the *Hexachlamys* species did not form a monophyletic group. *H. emrichii* grouped with *E.pyriformis* and *E.beaurepaireana* with moderate support (PP = 0.81) and the clade of *Eugenia/Hexachlamys* was well supported (PP = 0.97).

#### *nrDNA (ITS2) data set (Analysis D)*

The nrDNA (ITS2) sequences alone were used to perform this phylogenetic analysis. The MP analysis produced 81 equally most parsimonious trees (CI = 0.718 and RI = 0.825). In both BA and MP analysis, the six species of *Hexachlamys* (*H. edulis*, *H. itatiaiensis*, *H. emrichii*, *H. boliviana*, *H. hamiltonii* and *H. humilis*) also did not form a monophyletic group. This analysis shows strong support for the grouping of *H. boliviana* with *E. uniflora* and *E.dysenterica* (PP = 1, BS = 100%) and the clade of *Eugenia/Hexachlamys* also was well supported (PP = 0.89). The separate analysis of



nrDNA was more effective for resolving the relationships between species and genera (Fig. 4 and Appendix S4).

## **DISCUSSION**

The high similarity and complex taxonomic and nomenclatural history of Myrtaceae species have resulted in notorious difficulties for basic identification, inventory compilation and floristic treatment (Govaerts *et al.*, 2008). The original description of many Myrtaceae genera was for one or only few species and in most cases based on single characters (Landrum and Kawasaki, 1997). This situation makes the systematics of many taxa to remain unresolved, as the case of *Hexachlamys*. Over the last years, some studies using molecular phylogenetic approach have been employed to determine relationships at both higher and lower taxonomic levels in the Myrtaceae (Wilson *et al.*, 2001; Van der Merwe *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2005; Biffin *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2007). However, further studies are needed to solve these questions. In the present study we use sequence data from both biparentally (nrDNA) and maternally (cpDNA) inherited genomes to perform a molecular phylogenetic analysis for *Hexachlamys* and try to contribute with its taxonomy.

### *Phylogenetic signal of molecular data*

The four cpDNA and one nrDNA regions analyzed were all informative to some degree, although the cpDNA (*accD*, *rpoB* and *rpoC1*) sequences showed little divergence and were relatively ineffective in resolving relationships among the species in this study, producing unresolved phylogenetic trees with many polytomies (Fig. 2A and Appendix S2A). It is probable that the high genetic similarity that resulted in these unresolved trees was caused by the low rate of sequence divergence in these genes allied to the recent and rapid speciation of the taxa studied. Therefore, these gene sequences may not

have had enough time for divergence. A study with a group of land plants belonging to the mahogany family (Meliaceae) using these markers also showed that they were not effective at resolving species, and even the combination of multiple loci did not improve performance (Muellner *et al.*, 2011). On the other hand, the analyses using *trnH-psbA* (Analysis B and C) and ITS2 (Analysis C and D) markers produced the best topologies for both methods used (MP and BA). The *trnH-psbA* intergenic spacer is among the most variable regions in the angiosperm chloroplast genome. This marker has been used to provide phylogenetic information for many groups of plants (Azuma *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2003; Schonenberger & Conti, 2003; Lucas *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2007). In a study by Chen *et al.* (2010), covering 2108 plant samples from 1433 species of 551 genera in 135 families from 4 phyla (Angiosperms, Gymnosperms, Ferns and Mosses), the identification rate of the *trnH-psbA* region was 96.5% at the genus level using the nearest distance method; however, this rate was lower (72.8%) at the species level. Unfortunately, we found some difficulties in PCR amplification and sequencing of *trnH-psbA* in samples taken from herbaria. This observation suggests that, despite the general usefulness of *trnH-psbA* in phylogenetic studies, alternative markers should be developed and used for analyses of herbarium samples. In contrast, ITS2 region was successfully amplified and sequenced from herbarium specimens and also was very useful in resolving the phylogenetic relationships between species. It has been widely used for phylogenetics reconstructions at both the genus and species levels (Schultz *et al.*, 2005; Schultz, 2009; Muellner *et al.*, 2011). According to Chen *et al.* (2010) ITS2 region is an accurate and very reliable tool for species authentication. In this study, the authors tested the discrimination ability of ITS2 in more than 6600 plant samples belonging to 4800 species from 753 distinct genera and found that the rate of successful identification with ITS2 was 92.7% at the

species level. Therefore, it is important the use of different markers from different genomes to better elucidate the phylogenetic and taxonomic relationships.

In our study, several indels were observed in the *trnH-psbA* intergenic spacer. This characteristic appears to be common in this region, as observed in other studies (Aldrich *et al.*, 1988; Mast & Givnish, 2002; Miller *et al.*, 2003; Kyndt *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2005; Winkworth & Donoghue, 2005). In contrast, the *accD*, *rpoB* and *rpoC1* and ITS2 showed more nucleotide substitutions than indels.

#### *Taxonomic implications for Hexachlamys and Eugenia*

The separation of *Hexachlamys* from *Eugenia* genera based on morphological characters has caused long discussion. Since there is only one ancestral phenotypic character states distinguishing these genera: Calyx tetramerous (*Eugenia*) versus calyx pentamerous or hexamerous (*Hexachlamys*), some authors have considered that *Hexachlamys* should be included in *Eugenia* (Proença, 1991; Landrum & Kawasaki, 1997; Sobral, 2003). According to Landrum & Kawasaki (1997), all genera should have a set of characters to separate them from other genera. In this study, molecular phylogenetic results using different data sets (analyses A, B, C and D) and two methods (BA and MP), resulted in congruent trees corroborating with the morphological evaluations that have included *Hexachlamys* species in *Eugenia*. A well supported clade including *Hexachlamys* and *Eugenia* species was observed in most phylogenetic analysis. Moreover, we did not find polymorphisms related to a divergent trend between the *Hexachlamys* and *Eugenia* genera. These results suggest a close relationship between them. For example, in the analysis A and D, we observed that *E. dysenterica* grouped with *H. boliviana* with high support (Figure 2A and Figure 4).

## CONCLUSIONS

This study conducted the first molecular phylogenetic analysis among species previously classified as *Hexachlamys* and several *Eugenia* species. The present molecular analyses corroborate the proposed synonymization of *Hexachlamys* in *Eugenia*. Thus, this study reinforces the importance of uniting knowledge and strategies to better understand issues of delimitation of genera and species in groups of plants with large taxonomic problems, such as the Myrtaceae family.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul). Fernanda da Cruz received a master's fellowship from CNPq, Andreia Turchetto-Zolet received PNPd/CAPES fellowships, Maurício Almerão received PDJ/CNPq fellowships, Nicole Veto received IC fellowships, and Rogério Margis is the recipient of CNPq research fellowships. We would like to thank the herbarium ICN at the Department of Botany of the Federal Universidad do Rio Grande do Sul (UFRGS), the herbarium Alarich Rudolf Holger Schultz of the Museu de Ciências Naturais from the Fundação Zoobotânica of Rio Grande do Sul (FZB) and the herbarium Maria Eneyda P. K. Fidalgo from the Institute of Botany of São Paulo (SP) for providing the *Hexachlamys* samples for this study. We also thank the administrators of Park Saint Hilaire and Pró-Mata of Rio Grande do Sul for their permission to collect *Eugenia* and *Hexachlamys* species in these areas.

## REFERENCES

- Aldrich J, Cherney BW, Williams C, Merlin E. (1988).** Sequence-analysis of the junction of the large single copy region and the large inverted repeat in the petunia chloroplast genome. *Current Genetics*, **14** (5), 487-492.
- Azuma H, Garcia-Franco JG, Rico-Gray V, Thien LB. (2001).** Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: The biogeography of tropical and temperate disjunctions. *American Journal of Botany*, **88** (12), 2275-2285.
- Barroso, GM, Peron MV. 1994.** Myrtaceae. In: J. Botânico (Ed.). Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo: RJ. Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares. Rio de Janeiro. Myrtaceae, **1**: p.261-302.
- Berg, OC. 1855-1856.** Revisio *Myrtacearum* Americae. *Linnaea* **27**: 1-799.
- Biffin E, Craven LA, Crisp MD, Gadek PA. 2006.** Molecular systematics of *Syzygium* and allied genera (Myrtaceae): evidence from the chloroplast genome. *Taxon*, **55**: 79-94.
- Brown GK, Craven LA, Udovicic F, Ladiges PY. (2006).** Phylogeny of *Rhododendron* section *Vireya* (Ericaceae) based on two non-coding regions of cpDNA. *Plant Systematics and Evolution*, **257** (1-2), 57-93.
- Chase MW de BA, Cox AV, et al. 2000.** Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): an analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. *Annals of Botany*, **86**: 935–951.
- Chase MW FM, Devey DS, et al. 2006.** Multigene analyses of monocot relationships: a summary. In: JT Columbus, Friar EA, Hamilton CW, Porter JM, Prince LM, Simpson MG, eds. *Monocots: comparative biology and evolution*. Claremont, CA: Rancho Santa Ana Botanic Garden.: 63–75.
- Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, et al. 2010.** Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *Plos One*, **5**: 8.
- Clarkson JJ KS, Garcia VF, Olmstead RG, et al. 2004.** Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, **33**: 75–90.

- De Andrade MJG, Giulietti AM, Rapini A, et al. (2010).** A comprehensive phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: Evidence from nuclear (ITS) and plastid (psbA-trnH and trnL-F) DNA sequences. *Taxon*, **59** (2), 379-388.
- Doyle JJ, and Doyle JL. 1987.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13-15.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**: 1792-1797.
- Fay MF RP, Sullivan S, et al. 2000.** Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions. In: *Wilson KL, Morrison DA eds. Monocots: systematics and evolution.* , Melbourne:CSIRO: 360–371.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783–791.
- Gong W, Chen C, Dobes C, et al. 2008.** Phylogeography of a living fossil: Pleistocene glaciations forced *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) into two refuge areas in China with limited subsequent postglacial expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**: 1094-1105.
- Gonzalez MA, Baraloto C, Engel J, et al. 2009.** Identification of Amazonian Trees with DNA Barcodes. *Plos One*, **4**.
- Ji SG, Huo KK, Wang J, Pan SL. (2008).** A molecular phylogenetic study of Huperziaceae based on chloroplast *rbcL* and *psbA-trnH* sequences. *Journal of Systematics and Evolution*, **46** (2), 213-219.
- Karehed J, Bremer B. 2007.** The systematics of Knoxiaceae (Rubiaceae) - molecular data and their taxonomic consequences. *Taxon*, **57**: 668-668.
- Karehed J, Groeninckx I, Dessein S, et al. 2008.** The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**: 843-866.
- Kass E, Wink M. 1997.** Phylogenetic relationships in the papilionoideae (family leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS 1 and 2). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8**: 65-88.

- Kress WJ, WKJ, Zimmer EA, Weigt LA, et al. 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **102**: 8369-8374.
- Kress WJ, Erickson DL, Swenson NG, et al. 2010.** Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. *Plos One*, **5**.
- Kyndt T, Van Droogenbroeck B, Romeijn-Peeters E, et al. (2005).** Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37** (2), 442-459
- Landrum LR, Kawasaki ML. 1997.** The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, **49**: 508-536.
- Legrand, CD. 1968.** Las mirtáceas del Uruguay. III. *Boletín de la Facultad de Agronomía de Montevideo* **101**: 1-80.
- Legrand CD, Klein RM. 1977.** Mirtáceas - *Campomanesia*, *Feijoa*, *Britoa*, *Myrrhinium*, *Hexachlamys*, *Siphoneugena*, *Myrcianthes*, *Neomitranthes*, *Psidium*. In Reitz, R. (org.) *Flora Ilustrada Catarinense*. p. 571-730.
- Lucas EJ, Belsham SR, Lughadha EMN, et al. 2005.** Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae - preliminary molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution*, **251**: 35-51.
- Lucas EJ, Harris SA, Mazine FF, et al. 2007.** Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon*, **56**: 1105-1128.
- Martin-Bravo S, Meimberg H, Luceno M, et al. 2007.** Molecular systematics and biogeography of Resedaceae based on ITS and *trnL-F* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**: 1105-1120.
- Mast AR, Givnish TJ. (2002).** Historical biogeography and the origin of stomatal distributions in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) based on their cpDNA phylogeny. *American Journal of Botany*, **89** (8), 1311-1323.
- Mattos, JR. 1983.** Myrtaceae do Rio Grande do Sul. *Roessleria* **5**: 169-359.
- Mattos, JR. 1995.** Novidades taxonômicas em Myrtaceae - IX. *Loefgrenia* **105**: 1-3.

- Miller JT, Grimes JW, Murphy DJ, et al. (2003).** A phylogenetic analysis of the Acacieae and Ingeae (Mimosoideae : Fabaceae) based on trnK, matK, psbA-trnH, and trnL/trnF sequence data. *Systematic Botany*, **28** (3), 558-566.
- McVaugh R. 1968.** The Genera of American Myrtaceae - An Interin Report. *Taxon*, **17**: 354-418.
- Muellner AN, Schaefer H, Lahaye R. 2011.** Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (Meliaceae). *Molecular Ecology Resources*, **11**: 450-460.
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, et al. 2008.** Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 480-490.
- Niendenzu, F. 1893.** Myrtaceae. In: Engler, A.; Prantl, K. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, ed. III, Abteilung **7**, p. 57—105.
- Nunes F, Fukami H, Vollmer SV, et al. 2008.** Re-evaluation of the systematics of the endemic corals of Brazil by molecular data. *Coral Reefs*, **27**: 423-432.
- Nylander JA. 2005.** MrModeltest ver. 2.2. Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala*.
- Nomura N, Takaso T, Peng CI, et al. (2010).** Molecular phylogeny and habitat diversification of the genus *Farfugium* (Asteraceae) based on nuclear rDNA and plastid DNA. *Annals of Botany*, **106** (3), 467-482.
- Peterson A, Levichev IG, Peterson J. 2008.** Systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae) and infrageneric classification of *Gagea* based on molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**: 446-465.
- Proença CEB. 1991.** A Revision of *Siphoneugena* Berg. *Edinb. J. Bot.*, **47** (3): 239-271.
- Rannala B YZ. 1996.** Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Jornal Molecular Evolution*, **43**: 304–311.
- Redondo RAF, Brina LPS, Silva RF, Ditchfield AD, Santos FR. 2008.** Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**: 44-58.



- Romagnolo MB, Souza, MC 2004.** Os gêneros *Calycorectes* O.Berg, *Hexachlamys* O.Berg, *Myrcianthes* O.Berg, *Myrciaria* O.Berg e *Plinia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **18**: 613-627.
- Ronquist F HJ, van der Mark P. 2005.** MrBayes 3.1 Manual. <http:// mrbayes.csit.fsu.edu/manual.php>.
- Rotman, AD. 1982.** Los géneros *Calycorectes*, *Hexachlamys*, *Myrciaria*, *Paramyrciaria*, *Plinia* y *Siphoneugena* en la flora argentina (Myrtaceae). *Darwiniana* **24**: 157-185.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, et al. (2005).** The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, **92** (1), 142-166.
- Shneyer, V.S. (2009).** DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russian Journal of Genetics*, **45** (11), 1267-1278.
- Schultz J. MS, Gerlach D., Muller T., Wolf M. 2005.** A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA*, **11**: 361–364.
- Schultz J WM. 2009.** ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetic Evolution*, **52**: 520–523.
- Sobral M. 2003.** *A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul*, Editora Unisinos.
- Sobral M, Proença C, Souza M, et al. 2010.** *Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http:// floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB010528>).
- Soltis ED, Soltis PS. 2000.** Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology*, **42**: 45-75.
- Schonenberger J, Conti E. (2003).** Molecular phylogeny and floral evolution of Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae, and Alzateaceae (Myrtales). *American Journal of Botany*, **90** (2), 293-309.

- Swofford D. 2007.** PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony, ver. 4.10b. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731-2739.
- Van Ee BW, Riina R, Berry PE. (2011).** A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World Croton (Euphorbiaceae). *Taxon*, **60** (3), 791-823.
- Van der Merwe MM, Van Wyk AE, Botha AM. 2005.** Molecular phylogenetic analysis of Eugenia L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. *Plant Systematics and Evolution*, **251**: 21-34.
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, et al. 2001.** Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany*, **88**: 2013-2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM, et al. 2005.** Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution*, **251**: 3-19.
- Wilson, P.G. 2010.** Myrtaceae. In Kubitzki, K. (ed.) The families and genera of vascular plants. 10. Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Berlin, Springer, 436p. (p. 212-271).
- Wilson RF, Hildebrand DF. (2010).** Engineering Status, Challenges and Advantages of Oil Crops. In plant biotechnology for sustainable production of energy and co-products P.N.S.J.W.J.M. Mascia, ed, pp 209-259.
- Wilson, C.A. (2011).** Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. *Taxon*, **60** (1), 27-35.
- Winkworth RC, Donoghue MJ. (2005).** *Viburnum* phylogeny based on combined molecular data: Implications for taxonomy and biogeography. *American Journal of Botany*, **92** (4), 653-666.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Map showing the collection sites of *Eugenia* and *Hexachlamys* species used in this study. The circles and triangles represent samples collected from the field and from herbaria, respectively. Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP), Mato Grosso (MT).

Figure 2: Maximum parsimony analysis. (A) Phylogenetic analysis of combined *accD*, *rpoB* and *rpoC1* sequences (Analysis A). (B) Phylogenetic analysis of combined *accD*, *rpoB* and *rpoC1* and *trnH-psbA* sequences (Analysis B). Bootstrap values higher than 50% are shown above the branches.

Figure 3: Bayesian inference analysis based on combined data of four cpDNA (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* and *trnH-psbA*) and nrDNA (ITS2) regions (Analysis C). Posteriori probabilities values higher than 50% are shown above the branches.

Figure 4: Bayesian inference analysis obtained from ITS2 (Analysis D). Posteriori probabilities values higher than 50% are shown above the branches.

## SUPPORTING INFORMATION

Appendix S1: Table showing the *Hexachlamys* species with their alternative names under *Eugenia* based on World Checklist of Myrtaceae, <http://www.kew.org/wcsp/myrtaceae>. Accessed October 2011.

Appendix S2: Bayesian inference analysis. (A) Phylogenetic analysis of combined *accD*, *rpoB* and *rpoC1* sequences (Analysis A). (B) Phylogenetic analysis of combined *accD*, *rpoB* and *rpoC1* and *trnH-psbA* sequences (Analysis B). Posteriori probabilities values higher than 50% are shown above the branches.

Appendix S3: Maximum parsimony analysis based on combined data of four cpDNA (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* and *trnH-psbA*) and nrDNA (ITS2) regions (Analysis C). Bootstrap values higher than 50% are shown above the branches.

Appendix S4: Maximum parsimony analysis obtained from ITS2 (Analysis D). Bootstrap values higher than 50% are shown above the branches.

Table 1: The species name, locality, GenBank access and voucher numbers for the taxa used in this study.

Species	Locality information	GenBank n°					Voucher
		accD	rpoB	rpoC1	trnH-psbA	ITS2	
<b><i>Hexachlamys</i></b>							
<i>Hexachlamys edulis</i> (O.Berg) Kausel & D.Legrand	Brazil, RS, Palmares do Sul	JQ033227	JQ033259	JQ033352	JQ033323	JQ033291	ICN167437
<i>Hexachlamys edulis</i> (O.Berg) Kausel & D.Legrand	Brazil, RS, Palmares do Sul	JQ033227	JQ033259	JQ033352	JQ033323	JQ033291	ICN167438
<i>Hexachlamys edulis</i> (O.Berg) Kausel & D.Legrand	Brazil, RS, Palmares do Sul	JQ033227	JQ033259	JQ033352	JQ033323	JQ033291	ICN167439
<i>Hexachlamys edulis</i> (O.Berg) Kausel & D.Legrand	Brazil, RS, Porto Alegre, Parque Itapuã	JQ033227	JQ033259	JQ033352	JQ033323	JQ033291	ICN167440
<i>Hexachlamys edulis</i> (O.Berg) Kausel & D.Legrand	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033227	JQ033259	JQ033352	JQ033323	JQ033291	ICN167421
<i>Hexachlamys itatiaiensis</i> Mattos	Brazil, RS, São Francisco de Paula, Pró-Mata	JQ033228	JQ033260	JQ033353	JQ033324	JQ033292	ICN167441
<i>Hexachlamys itatiaiensis</i> Mattos	Brazil, RS, São Francisco de Paula, Pró-Mata	JQ033228	JQ033260	JQ033353	JQ033324	JQ033292	ICN167442
<i>Hexachlamys itatiaiensis</i> Mattos	Brazil, RS, São Francisco de Paula, Pró-Mata	JQ033228	JQ033260	JQ033353	JQ033324	JQ033292	ICN167443
<i>Hexachlamys itatiaiensis</i> Mattos	Brazil, RS, São Francisco de Paula, Pró-Mata	JQ033228	JQ033260	JQ033353	JQ033324	JQ033292	ICN167444
<i>Hexachlamys itatiaiensis</i> Mattos	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033228	JQ033260	JQ033353	JQ033324	JQ033292	ICN167420
<i>Hexachlamys hamiltonii</i> Mattos	Brazil, PR, Jaguariaíva	JQ033229	JQ033261	JQ033354	#	JQ033293	ICN123668
<i>Hexachlamys emrichii</i> Mattos	Paraguay, Departament San Pedro	JQ033231	JQ033263	JQ033356	JQ033325	JQ033295	SP93121
<i>Hexachlamys boliviana</i> D. Legrand	Bolívia, Santa Cruz	JQ033232	JQ033264	JQ033357	#	JQ033296	SP337751
<i>Hexachlamys humilis</i> O. Berg	Brazil, RS, São Francisco de Assis	JQ033233	JQ033265	JQ033358	JQ033326	JQ033297	ICN159209
<i>Hexachlamys humilis</i> O. Berg	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033251	JQ033283	JQ033376	JQ033344	JQ033314	ICN167436
<b><i>Eugenia</i></b>							
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	Brazil, MT, Água Boa	JQ033230	JQ033262	JQ033355	#	JQ033294	SP234179
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Brazil, RS, Palmares, RS040	JQ033234	JQ033266	JQ033359	JQ033327	JQ033303	ICN167404
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Brazil, RS, Palmares, RS040	JQ033234	JQ033266	JQ033359	JQ033327	JQ033303	ICN167405
<i>Eugenia hyemalis</i> Cambess.	Brazil, RS, Palmares do Sul	JQ033235	JQ033267	JQ033360	JQ033328	JQ033298	ICN167406
<i>Eugenia hyemalis</i> Cambess.	Brazil, RS, Palmares do Sul	JQ033235	JQ033267	JQ033360	JQ033328	JQ033298	ICN167407
<i>Eugenia hyemalis</i> Cambess.	Brazil, RS, Palmares do Sul	JQ033235	JQ033267	JQ033360	JQ033328	JQ033298	ICN167408
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	Brazil, RS, Viamão, Parque Tarumã	JQ033236	JQ033268	JQ033361	JQ033329	JQ033299	ICN167409

<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	Brazil, RS, Capivari	JQ033236	JQ033268	JQ033361	JQ033329	JQ033299	ICN167410
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	Brazil, RS, Capivari	JQ033236	JQ033268	JQ033361	JQ033329	JQ033299	ICN167411
<i>Eugenia bacopari</i> D. Legrand	Brazil, RS, Torres, Lagoa de Itapeva	JQ033237	JQ033269	JQ033362	JQ033330	JQ033301	ICN167412
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess.	Brazil, SP, Jardim Botânico	JQ033238	JQ033270	JQ033363	JQ033331	JQ033304	ICN167413
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess.	Brazil, SP, Jardim Botânico	JQ033238	JQ033270	JQ033363	JQ033331	JQ033304	ICN167414
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess.	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033238	JQ033270	JQ033363	JQ033331	JQ033304	ICN167415
<i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	Brazil, SP, Jardim Botânico	JQ033239	JQ033271	JQ033364	JQ033332	JQ033300	ICN167416
<i>Eugenia involucrata</i> DC.	Brazil, SP, Jardim Botânico	JQ033240	JQ033272	JQ033365	JQ033333	JQ033302	ICN167417
<i>Eugenia involucrata</i> DC.	Brazil, RS, Passo Fundo	JQ033240	JQ033272	JQ033365	JQ033333	JQ033302	ICN167418
<i>Eugenia involucrata</i> DC.	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033240	JQ033272	JQ033365	JQ033333	JQ033302	ICN167419
<i>Eugenia burkartiana</i> (D. Legrand) D. Legrand	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033241	JQ033273	JQ033366	JQ033334	JQ033305	ICN167422
<i>Eugenia verticillata</i> O. Berg	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033242	JQ033274	JQ033367	JQ033335	JQ033311	ICN167423
<i>Eugenia multicostata</i> (D. Legrand & Mattos) D. Legrand	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033243	JQ033275	JQ033368	JQ033336	JQ033312	ICN167424
<i>Eugenia rostrifolia</i> D. Legrand	Brazil, RS, Viamão, Parque Saint Hilaire	JQ033244	JQ033276	JQ033369	JQ033337	JQ033306	ICN167426
<i>Eugenia speciosa</i> Cambess.	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033245	JQ033277	JQ033370	JQ033339	JQ033309	ICN167428
<i>Eugenia florida</i> DC.	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033246	JQ033278	JQ033371	JQ033340	JQ033313	ICN167429
<i>Eugenia matosii</i> D. Legrand	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033247	JQ033279	JQ033372	JQ033341	JQ033308	ICN167431
<i>Eugenia subcordata</i> O.Berg	Brazil, RS, Viamão, Parque Saint Hilaire	JQ033249	JQ033280	JQ033375	JQ033342	JQ033315	ICN167432
<i>Eugenia subcordata</i> O.Berg	Brazil, RS, Maquiné, Mundo Novo	JQ033249	JQ033280	JQ033375	JQ033342	JQ033315	ICN167433
<i>Eugenia brevistyla</i> Sobral	Brazil, RS, Torres, Lagoa de Itapeva	JQ033248	JQ033282	JQ033374	JQ033338	JQ033307	ICN167434
<i>Eugenia beaurepaireana</i> (Kiaersk.) D.Legrand	Brazil, RS, Morrinhos do Sul	JQ033250	JQ033281	JQ033373	JQ033343	JQ033310	ICN167435

---

#### Outgroups

<i>Myrciaria cuspidata</i> O. Berg	Brazil, RS, Palmares, RS040	JQ033252	JQ033284	JQ033377	JQ033345	JQ033316	ICN167445
<i>Myrcia glabra</i> (O. Berg) D. Legrand	Brazil, RS, Palmares, RS040	JQ033253	JQ033285	JQ033378	JQ033346	JQ033317	ICN167446
<i>Myrcia brasiliensis</i> Kiaersk.	Brazil, RS, Palmares, RS040	JQ033254	JQ033286	JQ033379	JQ033347	JQ033318	ICN167447
<i>Myrcia palustris</i> DC.	Brazil, RS, Capivari	JQ033255	JQ033287	JQ033380	JQ033348	JQ033319	ICN167449
<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O.Berg	Brazil, RS, Porto Alegre, Jardim Botânico	JQ033256	JQ033288	JQ033381	JQ033349	JQ033320	ICN167450

<i>Myrcianthes gigantea</i> (D.Legrand) D.Legrand	Brazil, RS, Viamão, Parque Saint Hilaire	JQ033257	JQ033289	JQ033382	JQ033350	JQ033321	ICN167451
<i>Psidium sp.</i> L.	Brazil, RS, Morungava	JQ033258	JQ033290	JQ033383	JQ033351	JQ033322	ICN167496
<i>Psidium sp.</i> L.	Brazil, RS, Morungava	JQ033258	JQ033290	JQ033383	JQ033351	JQ033322	ICN167497
<i>Psidium sp.</i> L.	Brazil, RS, Palmares, RS040	JQ033258	JQ033290	JQ033383	JQ033351	JQ033322	ICN167448

---

# Samples not sequenced

Table 2: Markers tested and used in analysis.

Locus	Features	Primers sequences (5'-3')	PCR (pb)	Authors
<b>cpDNA</b>				
<i>accD</i>	acetil-CoA carboxilase subunid beta	<b>F-AGTATGGGATCCG TAGTAGG</b> <b>R-TCTTTTACCCGCAAATGCAAT</b>	250 – 300	Kress & Erickson 2007
<i>rpoB</i>	RNA Polimerase beta subunit	<b>F-ATGCAACGTC AAGCAGTTCC</b> <b>R-GATCCCAGCATCACAATTCC</b>	600	Kress & Erickson 2007
<i>rpoC1</i>	RNA Polimerase beta subunit	<b>F-GTGGATACACTTCTTGATAATGG</b> <b>R-TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC</b>	600	Kress & Erickson 2007
<i>trnH-psbA</i>	espaçador intergênico	<b>F-ACTGCCTTGATCCACTTGGC</b> <b>R-CGAAGCTCCATCTACAAATGG</b>	500	Kress & Erickson 2007
<i>rbcLa</i>	ribulose bisfosfate carboxilase	F-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC R-CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCT	500-600	Kress & Erickson 2007
<i>rpS16</i>	Intron	F-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT R-TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	#	Oxelman <i>et al.</i> 1996
<i>trnG-trnS</i>	espaçador intergênico	F-GAACGAATCACACTTTTACCAC R-GCCGCTTAGTCCACTCAGC	700-800	Hamilton, M.B. 1999
<i>trnL-F</i>	espaçador intergênico	F-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC R-ATTTGAACTGGTGACACGAG	250-300	Kress <i>et al.</i> 2005
<i>trnL intron</i>	Intron	F-CGAAATCGGTAGACGCTACG R-GGGGATAGAGGGACTTGAAC	#	Taberlet <i>et al.</i> 2007
<i>ndhJ</i>	NADH deidrogenase subunid J	F-TTGGGCTTCGATTACCAAGG R-TCAATGAGCATCTTGATTTTC	350 – 400	Kress & Erickson 2007
<i>matK</i>	maturase K	F-CCTATCCATCTGGAATCTTAG R-GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG	800	Wojciechowski <i>et al.</i> 2004
<i>Ycf5</i>	proteína de biogênese do citocrome c	F-GGATTATTAGTCACTCGTTGG R-CCCAATACCATCATACTTAC	#	Kress & Erickson 2007
<b>nrDNA</b>				
<b>ITS2</b>	<b>Internal transcribed spacer</b>	<b>F-ATGCGATACTTGGTGTGAAT</b> <b>R-GACGCTTCTCCAGACTACAAT</b>	400	Schultzj <i>et al.</i> 2007
ITSa	Internal transcribed spacer	F-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG R-TCCTCCGCTTATTGATATGC	700	Schultzj <i>et al.</i> 2005
ITS1-2	Internal transcribed spacer	F-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG R-TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC	800	White <i>et al.</i> 1990

\*Markers in bold were used in this study.

#It was not possible to amplify these markers.



Table 3: DNA site variation for each marker and for the data sets used in the phylogenetic analyses.

	Total sites aligned (n)	Variable sites (n)	Parsimony informative (n)	Parsimony informative (%)
<i>accD</i>	221	85	52	23,53
<i>rpoB</i>	407	49	45	11,06
<i>rpoC1</i>	434	59	49	11,29
<i>trnH-psbA</i>	563	243	85	15,10
(AnalysisA) <i>accD</i> + <i>rpoB</i> + <i>rpoC1</i>	1062	193	151	14,22
(AnalysisB) <i>accD</i> + <i>rpoB</i> + <i>rpoC1</i> + <i>trnH-psbA</i> *	1505	405	138	9,17
(AnalysisC) <i>accD</i> + <i>rpoB</i> + <i>rpoC1</i> + <i>trnH-psbA</i> + <i>ITS2</i> *	1933	566	221	11,43
(AnalysisD) <i>ITS2</i>	418	160	81	19,38

\*For the combined data set in Analysis B and C, only four species of *Hexachlamys* were used.

Figure 1

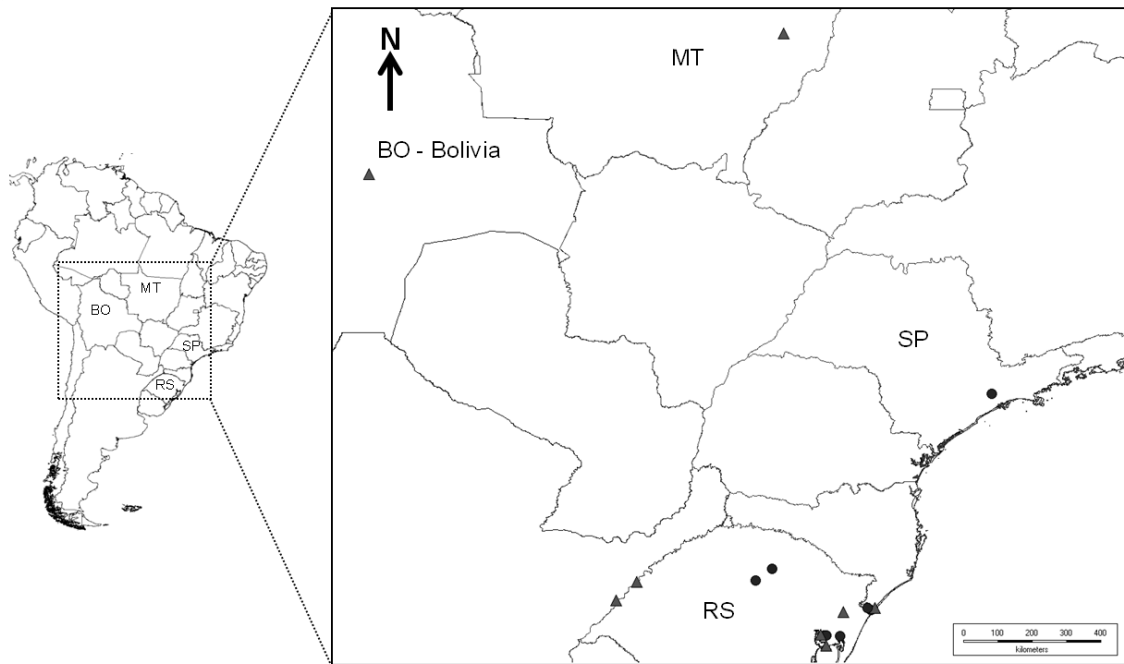


Figure 2

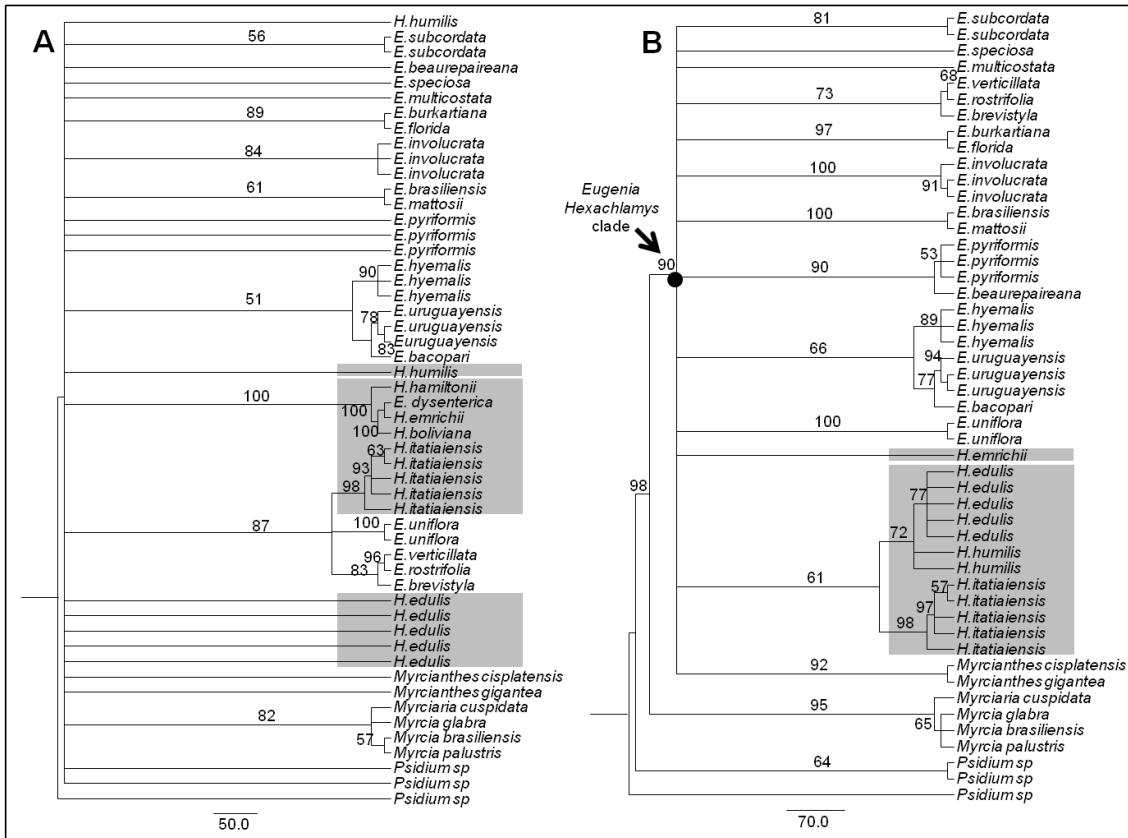


Figure 3

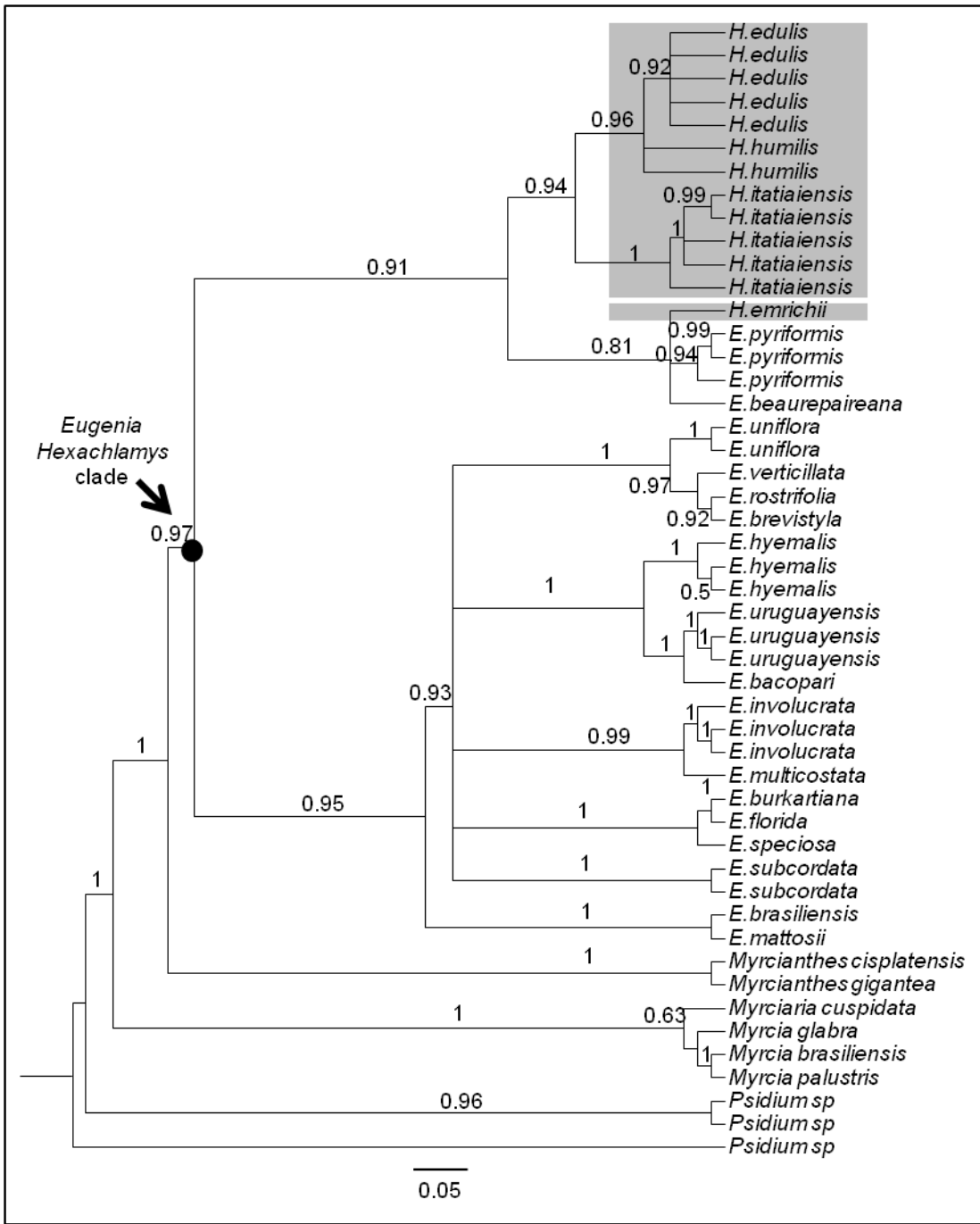
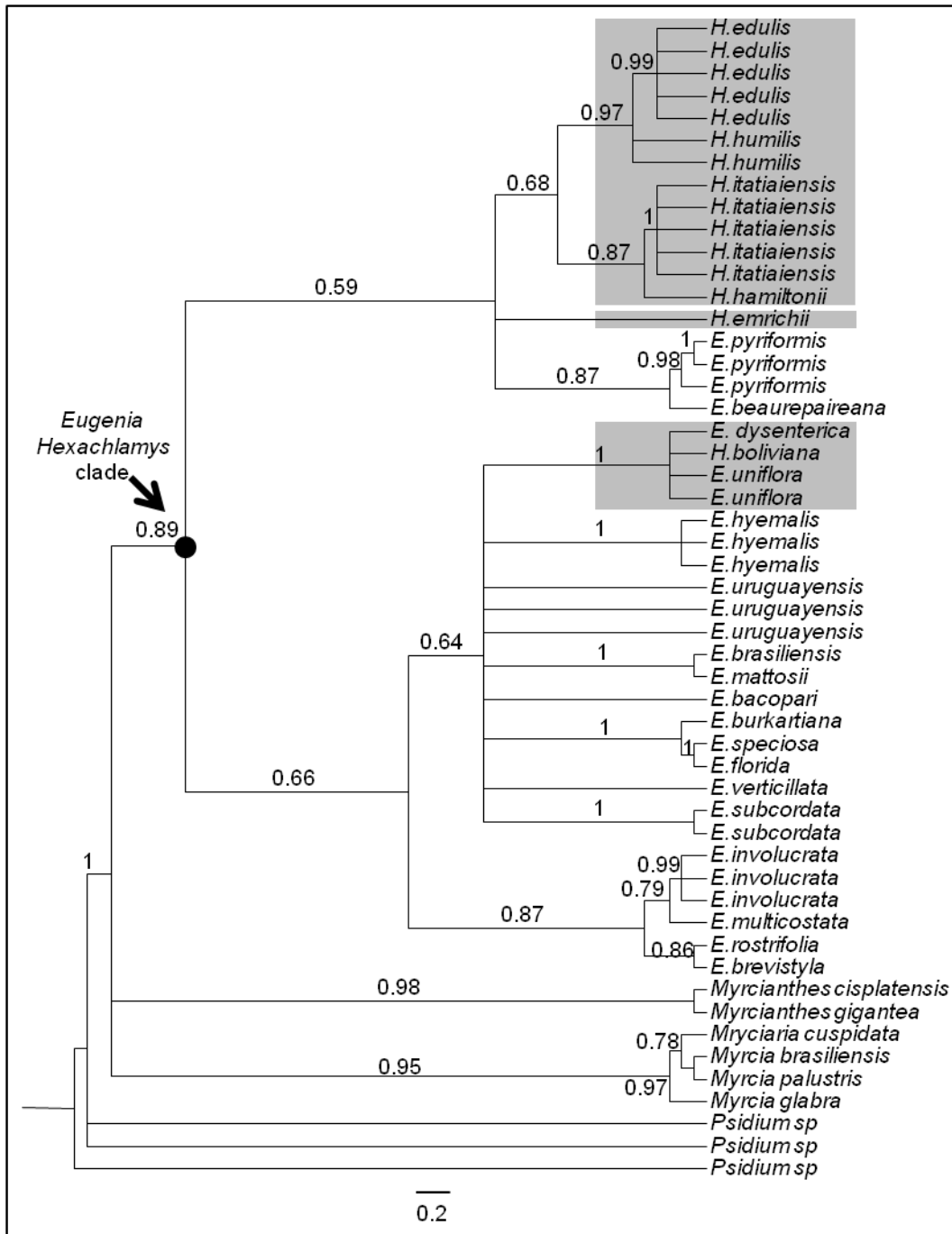


Figure 4

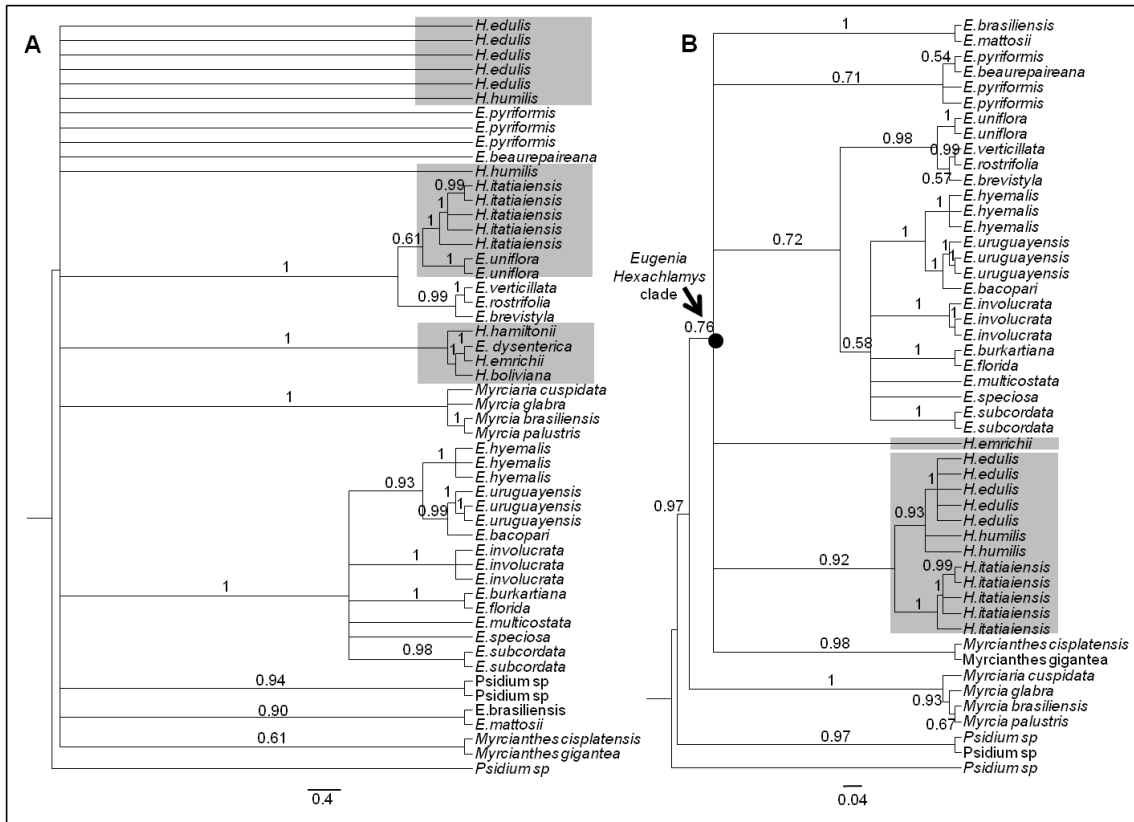


Appendix S1: *Hexachlamys* species with their alternative names under *Eugenia* based on World Checklist of Myrtaceae, <http://www.kew.org/wcsp/myrtaceae>. Accessed october 2011.

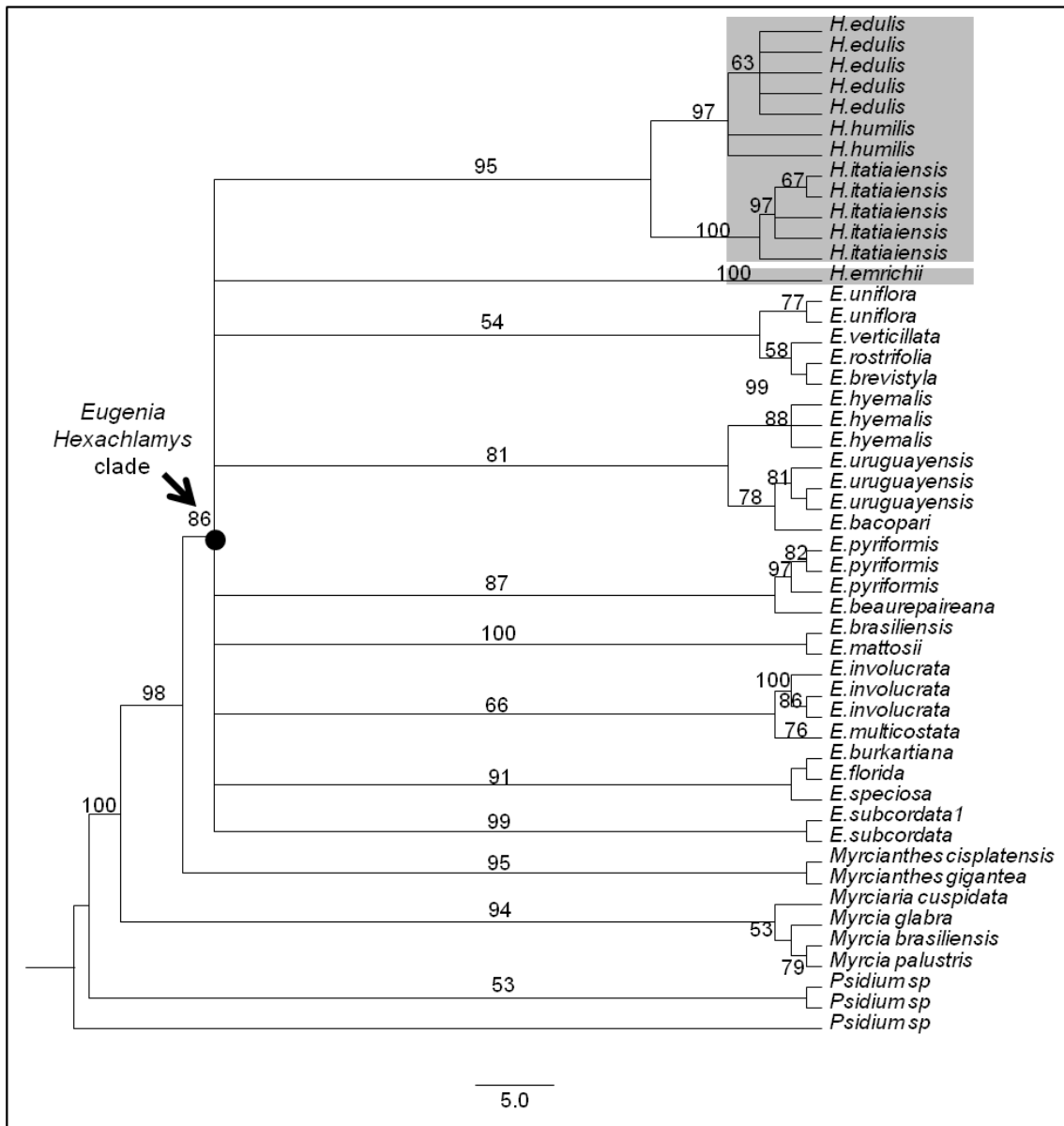
<i>Hexachlamys</i>	<i>Eugenia</i>
<i>Hexachlamys anomala</i> (D.Legrand) D.Legrand	<i>Eugenia anomala</i> D.Legrand
<i>Hexachlamys anomala</i> var. <i>rojasiana</i> D.Legrand	<i>Eugenia rojasiana</i> (D.Legrand) Mattos
<i>Hexachlamys anomala</i> var. <i>tomentosa</i> Loefgr. ex Mattos	<i>Eugenia anomala</i> D.Legrand
<b><i>Hexachlamys boliviana</i> D.Legrand</b>	<b><i>Eugenia boliviana</i> (D.Legrand) Mattos</b>
<i>Hexachlamys boliviensis</i> Kausel	<i>Eugenia boliviana</i> (D.Legrand) Mattos
<b><i>Hexachlamys edulis</i> (O.Berg) Kausel &amp; D.Legrand</b>	<b><i>Eugenia myrcianthes</i> Nied.</b>
<b><i>Hexachlamys emrichii</i> Mattos</b>	<b><i>Eugenia plurisepala</i> Nied.</b>
<i>Hexachlamys excelsa</i> (Cambess.) Mattos	<i>Eugenia myrcianthes</i> Nied.
<i>Hexachlamys geraensis</i> D.Legrand & Mattos	<i>Eugenia geraensis</i> (D.Legrand & Mattos) Mattos
<b><i>Hexachlamys hamiltonii</i> Mattos</b>	<b><i>Eugenia hamiltonii</i> (Mattos) Mattos</b>
<i>Hexachlamys hamiltonii</i> var. <i>sehnemiana</i> Mattos	<i>Eugenia sehnemiana</i> (Mattos) Mattos
<i>Hexachlamys handroi</i> Mattos	<i>Eugenia handroi</i> (Mattos) Mattos
<b><i>Hexachlamys humilis</i> O.Berg</b>	<b><i>Eugenia anomala</i> D.Legrand</b>
<i>Hexachlamys humilis</i> var. <i>tomentosa</i> Loefgr. ex Mattos	<i>Eugenia anomala</i> D.Legrand
<i>Hexachlamys itararensis</i> Mattos	<i>Eugenia itararensis</i> (Mattos) Mattos
<b><i>Hexachlamys itatiaiensis</i> Mattos</b>	<b><i>Eugenia handroi</i> (Mattos) Mattos</b>
<i>Hexachlamys itatiaiensis</i> var. <i>kleinii</i> D.Legrand ex Mattos	<i>Eugenia handroi</i> (Mattos) Mattos
<i>Hexachlamys kleinii</i> (D.Legrand ex Mattos) Mattos	<i>Eugenia handroi</i> (Mattos) Mattos
<i>Hexachlamys legrandii</i> Mattos	<i>Eugenia legrandii</i> (Mattos) Mattos
<i>Hexachlamys macedoi</i> var. <i>pubescens</i> Mattos	<i>Eugenia macedoi</i> D.Legrand
<i>Hexachlamys rojasiana</i> (D.Legrand) D.Legrand	<i>Eugenia rojasiana</i> (D.Legrand) Mattos
<i>Hexachlamys sehnemiana</i> (Mattos) Mattos	<i>Eugenia sehnemiana</i> (Mattos) Mattos
<i>Hexachlamys tapiraguaiensis</i> (Barb.Rodr. ex Chodat & Hassl.) Mattos	<i>Eugenia tapiraguayensis</i> Barb.Rodr. ex Chodat & Hassl.
<i>Hexachlamys toledoii</i> Mattos	<i>Eugenia toledoii</i> (Mattos) Mattos

Species in bold were used in this study.

Appendix S2

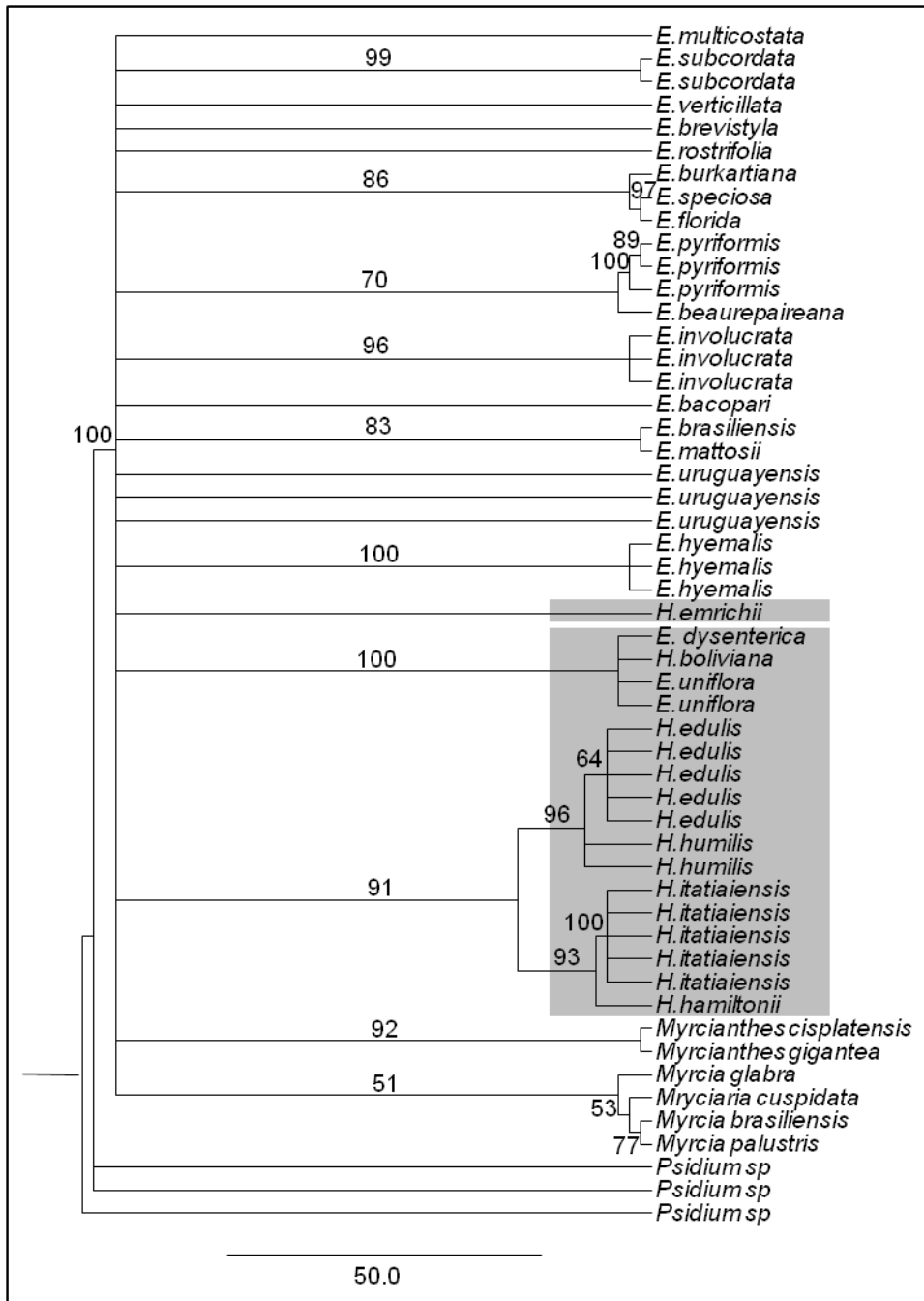


Appendix S3





Appendix 4



### **CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## **DISCUSSÃO GERAL**

### **Herbários**

O presente trabalho teve a colaboração do herbário ICN do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, do herbário Alarich Rudolf Holger Schultz do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul e do herbário Maria Eneyda P. K. Fidalgo do Instituto de Botânica de São Paulo, que prontamente disponibilizaram amostras das plantas do gênero *Hexachlamys* para extração de DNA.

Apesar dos herbários serem bastante úteis em casos em que fica difícil a coleta a campo das plantas, alguns aspectos devem ser considerados: (I) dificuldades para extração e amplificação do DNA da grande maioria das espécies. Isso se deve principalmente pelo modo de conservação das exsicatas nos herbários. Por exemplo, o uso do etanol para preservar as amostras contra ataques de fungos e da degradação, especialmente em locais de clima tropicais úmidos pode ser um problema, pois o etanol tem se mostrado muito prejudicial para a obtenção de um DNA de qualidade (Flournoy, 1996). Devido a isso, de 60 amostras de espécies de *Hexachlamys* obtidas dos herbários, foi possível o sucesso na extração e amplificação do DNA, com o conjunto de todos os marcadores utilizados, em apenas cinco dessas amostras; (II) confiabilidade da identificação das amostras, pela presença de algumas plantas identificadas erroneamente. Esse problema advem da grande semelhança entre os caracteres morfológicos das espécies dos grupos em estudo (*Eugenia* e *Hexachlamys*), o que torna muito difícil a identificação correta de muitas das espécies, mesmo por profissionais da área. No caso em estudo, tivemos a colaboração do professor Marcos Sobral, que é um especialista em Myrtaceae, e que muito nos auxiliou na identificação das amostras de plantas utilizadas neste trabalho.

### **Questões Taxonômicas e Análises Filogenéticas**

A taxonomia e a filogenética são duas áreas de pesquisa que podem parecer bastante diferentes uma da outra (taxonomia envolve principalmente os nomes de organismos e sistemas de classificação, enquanto a filogenia envolve a história e os

padrões de evolução), no entanto, são igualmente importantes. Estas áreas envolvem o uso de diferentes tipos de provas para descrever as características dos organismos, fornecendo métodos convenientes de identificação, nomenclatura e descrição de novas espécies. Com relação as espécies de plantas, essas duas áreas permitem descobrir os fatores que limitam a sua distribuição no espaço geográfico, a criação de inventários florísticos de áreas, a determinação das tendências filogenéticas entre taxa, a compreensão dos mecanismos de evolução e as relações entre plantas e desenvolvimento de sistemas naturais de classificação que refletem hipóteses de relações evolutivas entre as espécies (Vereecken et al., 2010).

Ambas as áreas são estabelecidas para refletir os sistemas naturais de classificação em que as espécies colocadas em um gênero comum, e gêneros dentro de uma família comum, e assim por diante, são assumidos como sendo mais de perto relacionados uns aos outros do que para as outras espécies e gêneros.

A identificação e classificação de alguns organismos baseando-se apenas em dados morfológicos a cada dia que passa fica mais difícil. Muitas espécies vem sendo descobertas e mais e mais caracteres morfológicos se tornam relevantes para tentar classificá-las em algum grupo. No caso dos gêneros de Myrtaceae neotropicais, por exemplo, alguns gêneros são separados com base em apenas um único caractere. No entanto, essa não é uma situação desejável, pois todos os gêneros deveriam ter um conjunto de caracteres que os separem uns dos outros. Um único caractere será sempre vulnerável ao desmembramento ou a união com outro gênero quando alguém os estuda com mais detalhes (Landrum and Kawasaki, 1997), tornando assim a taxonomia e sistemática desses grupos muito complexas e possibilitando erros de identificação.

No caso do gênero *Hexachlamys*, McVaugh (1968) o distinguiu do gênero *Eugenia* por diferenças no número de pétalas. Entretanto, no decorrer dos anos em que novas espécies foram sendo identificadas, esse caráter não foi mantido, já que variações nesse número foram encontradas para outras espécies. Em um estudo mais recente, Landrum & Kawasaki (1997) realizaram uma revisão dentre os gêneros brasileiros de Myrtaceae e verificaram que a variação no número de sépalas do cálice é a única característica morfológica que diferencia as espécies desses dois gêneros (*Hexachlamys* e *Eugenia*). Essa subjetividade leva a classificações divergentes, sendo que as discussões

taxonômicas podem atravessar décadas. Neste sentido, os dados moleculares têm sido utilizados como ferramentas auxiliares na tentativa da estabilização das classificações taxonômicas.

Historicamente, o grau de fusão do cálice e características do embrião tem sido considerado de grande importância para a taxonomia e muitas vezes tem sido a base para separação genérica. No caso dos gêneros em estudo, o cálice tetrâmero em *Eugenia* e cálice pentâmero ou hexâmero em *Hexachlamys* é a única característica que os diferenciam (Landrum e Kawasaki, 1997). Essa questão é bastante complexa, e tais características já são reconhecidas como sendo insuficientes para classificação genérica (Landrum e Kawasaki, 1997; Sobral, 2010).

Estudos de filogenia molecular também têm contribuído no campo da taxonomia e nomenclatura botânica em outros grupos taxonômicos. Por exemplo, para o gênero *Passiflora* L. o estudo de Muschener et al. (2003) corroborou com a redução drástica no número de subgêneros no grupo, sugerida a partir de dados morfológicos por Feuillet e MacDougal (2003) e contribuiu para a inclusão do gênero monoespecífico *Tetrastylis* em *Passiflora*. Estes são apenas dois exemplos restritos a um gênero, mas é importante destacar que está em andamento uma grande discussão sobre a nomenclatura de grupos monofiléticos a partir de análises filogenéticas usando marcadores moleculares.

### **Marcadores Moleculares**

A utilização de marcadores moleculares no auxílio de questões taxonômicas vem ganhando destaque na tentativa de elucidar problemas na classificação de plantas e animais (Muschner et al., 2003; Karehed and Bremer, 2007; Karehed et al., 2008; Peterson et al., 2008; Redondo et al., 2008; Van Ee et al., 2011; Wilson, 2011).

Para estudos em níveis filogenéticos abaixo de família, são amplamente utilizadas sequências não codificadoras do genoma plastidial, a partir do pressuposto de que regiões não codificadoras têm menos restrições funcionais que regiões codificadoras e, portanto, podem apresentar maiores níveis de variação (Gielly e Taberlet, 1994; Shaw et al., 2005).

Shaw *et al.* (2005), em uma revisão comparando a utilidade filogenética de 21 regiões não codificadoras do DNA de cloroplasto, demonstraram que as taxas evolutivas

das regiões estudadas, são heterogêneas e que eventos de inserção e deleção correspondem à cerca de 30% dos caracteres potencialmente informativos e, por isso, os mesmos podem ser de grande utilidade em estudos filogenéticos infragenéricos. Atualmente, *indels* (inserções e/ou deleções) são caracteres amplamente utilizados em análises filogenéticas, como por exemplo, na filogenia da família Verbenaceae J. St.-Hil. recentemente publicada (Marx et al., 2010).

DNA barcoding tem sido proposto, também, como um método para o reconhecimento e identificação de espécies eucarióticas, e através da comparação de sequências curtas de DNA, vem sendo bastante útil em estudos de filogenia (Kress, 2005; Chen et al., 2010; Jeanson et al., 2011). Esta abordagem implica que se pode encontrar uma região no genoma, que ocorre na grande maioria dos organismos (ou pelo menos em todos os membros de um grande táxon), cuja sequência de nucleotídeos seria idêntica ou muito semelhante em indivíduos dentro de uma espécie, mas que difere entre as espécies. Deste modo, esta região pode ser usada para identificação das espécies, comparando a sua sequência em organismos testados a partir de referência específica encontradas em banco de dados. Além disso, são vantajosos, pois permitem a identificação de um organismo, em qualquer fase de desenvolvimento, a partir de uma amostra de tecido muito pequeno, fresco ou conservado há muitos anos (Shneyer, 2009), como é o caso de algumas amostras de herbário.

Os marcadores de DNA utilizados em análises filogenéticas podem apresentar diferentes formas de herança genética (cpDNA e nrDNA) e diferentes taxas evolutivas. A escolha desses marcadores está relacionada com o objetivo que se quer alcançar. Se o caso em estudo é conhecer a relação filogenética entre parentes próximos, tais como espécies dentro de um gênero, regiões do DNA que evoluem rapidamente (regiões neutras do DNA), como introns e espaçadores são os mais indicados. Por outro lado, se o objetivo é verificar as relações entre parentes distantes, tais como entre e dentro de famílias ou ordens dentro de classes diferentes, procura-se utilizar uma porção do DNA que está evoluindo mais lentamente, como, por exemplo, regiões codantes (Buso, 2005).

Neste trabalho, foram selecionados e testados marcadores nucleares e plastidiais os quais vem sendo usados em diversos estudos de relações filogenéticas, além de serem potenciais para uso como barcode em plantas (Tabela 1). Os que apresentaram melhor

desempenho, tanto em termos de facilidade de amplificação e sequenciamento, quanto em variação e sinal filogenético, foram a região nuclear ITS2 e as regiões plastidiais *trnH-psbA* (espaçador intergênico), *accD*, *rpoB2* e *rpoC1* (genes).

Tabela 1: Marcadores testados para a realização de análises filogenéticas dos grupos em estudo.

<b>Marcadores Testados</b>	<b>Características</b>	<b>PCR (pb)</b>	<b>Sucesso na amplificação</b>	<b>Sucesso no Sequenciamento</b>	<b>Polimorfismo</b>
<i>accD</i>	<b>acetil-CoA carboxilase subunid beta</b>	<b>250 – 300</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM</b>
<i>rpoB</i>	<b>RNA Polimerase beta subunit</b>	<b>600</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM</b>
<i>rpoC1</i>	<b>RNA Polimerase beta subunit</b>	<b>600</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM</b>
<i>trnH-psbA</i>	<b>Intergenic spacer</b>	<b>500</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM</b>
<i>ndhJ</i>	NADH deidrogenase subunid J	350 – 400	SIM † ‡	SIM † ‡	SIM
<i>rbcLa</i>	ribulose bisfosfate carboxilase	500 – 600	SIM ‡	SIM ‡	*
<i>rpS16</i>	Intron	#	NÃO	NÃO	#
<i>trnG-trnS</i>	Intergenic spacer	700 - 800	SIM ‡	SIM ‡	SIM
<i>trnL-F</i>	Intergenic spacer	250 - 300	SIM ‡	NÃO	#
<i>trnL intron</i>	Intron	#	§	NÃO	#
<i>Ycf5</i>	protein cytochrome c biogênese	#	§	NÃO	#
<i>matK</i>	maturase K	800	SIM ‡	NÃO	*
ITSa	Internal transcribed spacer	700	SIM ‡	SIM ‡	SIM
<b>ITS2</b>	<b>Internal transcribed spacer</b>	<b>400</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM † ‡</b>	<b>SIM</b>
ITS1-2	Internal transcribed spacer	800	SIM ‡	NÃO	#

Os marcadores selecionados para esse estudo estão marcados em negrito.

\* Faltaram sequências de espécies do gênero *Hexachlamys* retiradas de herbário.

# Não foi possível amplificar esses marcadores.

† Sucesso com espécies obtidas de exsicatas de herbários.

‡ Sucesso com espécies obtidas de coletas a campo.

§ Mais de um produto de amplificação.

Corroborando o que já foi descrito em alguns trabalhos (Schultz et al; 2005; Storchova and Olson, 2007; Schultz, 2009; Jeanson et al., 2011; Muellner et al., 2011), o espaçador intergênico *trnH-psbA* e a região nuclear ITS2 foram bastante eficazes em resolver relações filogenéticas em nível de gênero e espécie (Figuras 3 e 4, do capítulo II). No presente estudo, o espaçador intergênico *trnH-psbA*, mostrou-se mais conservado que a região nuclear ITS2. Além disso, observou-se a presença de um maior número de *indels*

(inserção/deleção) na sequência de *trnH-psbA*, em relação aos demais marcadores analisados. As regiões plastidiais *accD*, *rpoB* e *rpoC1*, não se mostraram muito eficientes em resolver as relações entre as espécies desse estudo, resultando em árvores com topologias mal resolvidas (Figura 2A, do capítulo II). Normalmente, genes que codificam proteínas do cloroplasto (cpDNA) evoluem a uma taxa cinco vezes mais lenta que os nucleares (Glegg et al., 1992) e isso, provavelmente tenha sido a causa de topologias mal resolvidas neste caso. Além disso, é possível que as espécies estudadas nesse trabalho apresentem uma elevada similaridade genética causada pela baixa taxa de divergência de sequência nestes genes, aliada à taxa de especiação rápida e recente, como também já observado no trabalho com a família Meliaceae (Muellner et al., 2011).

Apesar de algumas diferenças nas informações obtidas com os marcadores utilizados, de um modo geral, todos foram informativos em nível de gênero e, desta maneira, este trabalho é mais um a contribuir com questionamentos taxonômicos através de marcadores moleculares e análises filogenéticas.

Os resultados obtidos no presente trabalho com base na análise de quatro regiões do cloroplasto (*accD*, *rpoB*, *rpoC1* e *trnH-psbA*) e uma região nuclear (ITS2), utilizando sete espécies de *Hexachlamys* (incluindo a espécie tipo *H. humilis*), mostrou que os dois gêneros são filogeneticamente próximos, não tendo sido observada a formação de um grupo monofilético para o gênero *Hexachlamys* (Figuras 2, 3 e 4 do capítulo II). Assim, os resultados moleculares corroboram com os autores que vem tratando as espécies desse gênero como sinonímias do gênero *Eugenia*, baseados em caracteres morfológicos (Niedenzu, 1893; Proença, 1991; Landrum & Kawasaki 1997; Sobral, 2003, Sobral et al; 2010). Essas análises poderão contribuir para um melhor entendimento do relacionamento entre esses dois gêneros, proporcionando um maior esclarecimento da sua taxonomia.

Em um estudo sobre relações filogenéticas entre gêneros neotropicais da subtribo Eugeniinae (Myrtaceae), utilizando os marcadores ITS, ETS e *psbA-trnH*, Mazine et al (2006) também verificaram que as espécies *H. hamiltonii* e *H. itatiaiensis* agruparam no mesmo clado que continha espécies de *Eugenia*. Entretanto, esse trabalho não incluiu a espécie tipo *H. humilis* e o valor de *bootstrap* encontrado para o clado foi baixo (66%).

Assim, os resultados expostos neste estudo provem dados complementares e mais precisos sobre as semelhanças e divergências de caracteres entre esses gêneros, ressaltando



a importância de se unir esforços, conhecimentos e estratégias para melhor entender questões de delimitação de gêneros e espécies em grupos de plantas com grandes problemas taxonômicos, como é o caso da família Myrtaceae. Entretanto, ressalta-se a importância de utilizar métodos tradicionais de classificação dos organismos, afinal, só a interpretação de um conjunto de informações ampliará o entendimento da história evolutiva e da taxonomia em trabalhos como este.

## REFERÊNCIAS DOS CAPÍTULOS I e III

- Aleixo, A., Burlamaqui, T., Goncalves, E., and Schneider, P. (2006) Molecular systematics of the *Ocellated Woodcreeper* complex (Dendrocolaptidae) in tropical South America: Implications for taxonomy, conservation, and historical biogeography. *J. Ornithol.* 147, 125-126.
- Andreasen, K. (2005) Implications of molecular systematic analyses on the conservation of rare and threatened taxa: Contrasting examples from Malvaceae. *Conserv. Genet.*, 6(3), 399-412.
- Arantes, A.A., and Monteiro, R. (2002) A família Myrtaceae na estação ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana*, 3 (2), 111-127.
- Barroso, G.M., and Peron, M.V. (1994) Myrtaceae. In *Reserva Ecológica de Macaé de Cima*, Nova Friburgo: RJ. Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares (J. Botânico, ed, Rio de Janeiro, pp 261-302.
- Berg, O. (1856) Revisio Myrtacearum Americae. *Linnaea*, 27 (4), 385-512.
- Berg, O. (1857) Myrtaceae. In: C. F.P. Martius. *Flora Brasiliensis.*, 14 (1), 1-468.
- Berg, O. (1858) Myrtaceae. In: C. F.P. Martius. *Flora Brasiliensis.*, 14 (1), 469-528.
- Berg, O. (1859) Myrtaceae. In: C. F.P. Martius. *Flora Brasiliensis.*, 14 (1), 529-656.
- Birky, C.W. (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes - mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11331-11338.
- Boon, W.M., Kearvell, J.C., Daugherty, C.H., and Chambers, G.K. (2000) Molecular systematics of New Zealand *Cyanoramphus parakeets*: conservation of orange-fronted and Forbes' Parakeets. *Bird Conserv. Int.*, 10(3), 211-239.
- Buso, G.S.C. (2005) Marcadores moleculares e análise filogenética. *Embrapa - Recursos genéticos e Biotecnologia*, 1º edição, 7-21.
- Chen, S.L., Yao, H., Han, J.P., Liu, C., Song, J.Y., Shi, L.C., Zhu, Y.J., Ma, X.Y., Gao, T., Pang, X.H., Luo, K., Li, Y., Li, X.W., Jia, X.C., Lin, Y.L., and Leon, C. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 5(1), 8.
- Chen, S.Y., Liu, S.W., Xu, C.H., Chen, Y.Z., and Xia, G.M. (2004) Heredity of chloroplast and nuclear genomes of asymmetric somatic hybrid lines between wheat and couch grass. *Acta Botanica Sinica*, 46(1), 110-115.
- Cronquist, A. (1981) *An Integrated system of classification of flowering plants*. New York, pp.1262.
- De Candolle, A.P. (1828) Myrtaceae. In: *Prodromus*, 3, 207-296.
- Englund, M., Pornpongrueng, P., Gustafsson, M.H.G., and Anderberg, A.A. (2009) Phylogenetic relationships and generic delimitation in *Inuleae* subtribe *Inulinae* (Asteraceae) based on ITS and cpDNA sequence data. *Cladistics*, 25(4), 319-352.

- Fant, J.B., Kamau, E.A., and Preston, C.D. (2003) Chloroplast evidence for the multiple origins of the hybrid *Potamogeton x Sudermanicus* Hagstr. *Aquat. Bot.*, 75(4), 351-356.
- Fant, J.B., Kamau, E., and Preston, C.D. (2005) Chloroplast evidence for the multiple origins of the hybrid *Potamogeton x fluitans*. *Aquat. Bot.*, 83(2), 154-160.
- Flournoy, L.E., Adams, R. P. & Pandey, R. N. (1996) *BioTechniques*. 20, 657-660.
- Gardner, M.G., Hugall, A.F., Donnellan, S.C., Hutchinson, M.N., and Foster, R. (2008) Molecular systematics of social skinks: phylogeny and taxonomy of the *Egernia* group (Reptilia: Scincidae). *Zool. J. Linn. Soc.*, 154(4), 781-794.
- Gielly, L., and Taberlet, P. (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies - noncoding versus *rbcl* sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 11(5), 769-777.
- Glegg, S.A.L., Hundley, A.J., Riley, J.M., Yuan, J.R., and Uberall, H. (1992) Laboratory scale measurements and numerical predictions of underwater sound-propagation over a sediment layer. *J. Acoust. Soc. Am.*, 92(3), 1624-1630.
- Gompert, Z., Nice, C.C., Fordyce, J.A., Forister, M.L., and Shapiro, A.M. (2006) Identifying units for conservation using molecular systematics: the cautionary tale of the Karner blue butterfly. *Mol. Ecol.*, 15(7), 1759-1768.
- Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B.K., Landrum, L.R., Matsumoto, K., Mazine, F.F., NicLughadha, E., Proença, C., Soares-Silva, L.H., Wilson, P.G., and Lucas, E.J. (2008) *World Checklist of Myrtaceae*.
- Guedes-Bruni, R.R. (1998) *Composição, estrutura e similaridade florística de dossel em seis unidades fisionômicas de Mata Atlântica no Rio de Janeiro*. Tese de Doutorado Thesis, USP, São Paulo.
- Harri Lorenzi (2009). *Arvores Brasileiras*. Instituto Plantarum, 1.
- Holst, B.K., and Kawasaki, M.L. (2002) Myrtaceae. In. *Guide to the Vascular Plants of Central French Guiana*. *Mem. N. Y. Bot. Gard.*, 76 (2), 539-551.
- Holst, B.K., Landrum, L., and Grifo, F. (2003) Myrtaceae. *Flora of the Venezuelan Guayana.*, 7, 1-99 Missouri Botanical Garden Press.
- Jeanson, M.L., Labat, J.N., and Little, D.P. (2011) DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? *Ann. Bot.*, 108(8), 1445-1451.
- Ji, S.G., Huo, K.K., Wang, J., and Pan, S.L. (2008) A molecular phylogenetic study of Huperziaceae based on chloroplast *rbcL* and *psbA-trnH* sequences. *J. Syst. Evol.*, 46(2), 213-219.
- Karehed, J., and Bremer, B. (2007) The systematics of *Knoxieae* (Rubiaceae)-molecular data and their taxonomic consequences. *Taxon*, 56(4), 1051-1076.
- Karehed, J., Groeninckx, I., Dessein, S., Motley, T.J., and Bremer, B. (2008) The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 49(3), 843-866.
- Kawasaki, M.L. (1984) *A família Myrtaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São paulo., 202.

- Kawasaki, M.L. (1989) Flora da Serra do Cipó, MG, Brasil. Myrtaceae. Bol. Botânica, USP, São Paulo, 11, 121-170.
- Kim, J.H., Kim, D.K., Forest, F., Fay, M.F., and Chase, M.W. (2010) Molecular phylogenetics of Rusceae sensu lato and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. Ann. Bot., 106(5), 775-790.
- Korpelainen, H. (2004) The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. Naturwissenschaften, 91(11), 505-518.
- Kress W.J., W.K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 102, 8369-8374.
- Landrum, L.R. (1981) The Phylogeny and Geography of *Myrceugenia* (Myrtaceae). Brittonia, 33(1), 105-129.
- Landrum, L.R., and Kawasaki, M.L. (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia, 49(4), 508-536.
- Legrand, D., and Klein, R.M. (1969) Myrtáceas In Flora Ilustrada Catarinense (R. Reitz, ed, Itajaí, pp 172.
- Lucas, E.J., Harris, S.A., Mazine, F.F., Bellsham, S.R., Lughadha, E.M.N., Telford, A., Gasson, P.E., and Chase, M.W. (2007) Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). Taxon, 56(4), 1105-1128.
- Marchiori, J.N.C., and Sobral, M. (1997) Dendrologia das Angiospermas: Myrtales. Santa Maria, pp.304.
- Martinez-Azorin, M., Crespo, M.B., Juan, A., and Fay, M.F. (2011) Molecular phylogenetics of subfamily Ornithogaloideae (Hyacinthaceae) based on nuclear and plastid DNA regions, including a new taxonomic arrangement. Ann. Bot, 107(1), 1-37.
- Marx, H.E., O'Leary, N., Yuan, Y.W., Lu-Irving, P., Tank, D.C., Mulgura, M.E., and Olmstead, R.G. (2010) A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. Am. J. Bot., 97(10), 1647-1663.
- Mattos, J.R. (1958) Estudos pomológicos dos frutos das Mirtáceas em São Paulo. Anais 5º Reunião Anual da SBB, Porto Alegre, RS., 67-111.
- Mazine, F.F. (2006). Estudos taxonômicos em *Eugenia* L. (Myrtaceae), com ênfase em *Eugenia* Sect. *Racemosae* O.Berg. Tese de doutorado. Instituto de botânica, Universidade Estadual de Campinas, p. 239.
- Mazine, F.F., Lughadha, E.M.N., Proença, C., Soares-Silva, L.H., Wilson, P.G., and Lucas, E.J. (2008) World Checklist of Myrtaceae. Royal Botanic Garden, Kew., 455.
- McVaugh, R. (1958) Myrtaceae. In Flora of Peru. Field Mus. nat. hist., Bot. Ser., 13 (4), 561-818.
- McVaugh, R. (1968) The genera of American Myrtaceae - Na interim report. Taxon, 17, 354-418.

- McVaugh, R. (1989) Myrtaceae. In: R. A. Howard, Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Island (Dicotyledoneae-Part2). 5, 463-532.
- Modliszewski, J.L., Thomas, D.T., Fan, C.Z., Crawford, D.J., DePamphilis, C.W., and Xiang, Q.Y. (2006) Ancestral chloroplast polymorphism and historical secondary contact in a broad hybrid zone of *Aesculus* (Sapindaceae). *Am. J. Bot.*, 93(3), 377-388.
- Moritz, C. (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 349(1327), 113-118.
- Muellner, A.N., Schaefer, H., and Lahaye, R. (2011) Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (Meliaceae). *Mol. Ecol. Resources*, 11(3), 450-460.
- Muschner, V.C., Lorenz, A.P., Cervi, A.C., Bonatto, S.L., Souza-Chies, T.I., Salzano, F.M., and Freitas, L.B. (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *Am. J. Bot.*, 90(8), 1229-1238.
- Lughadha, E. (1996) A survey of the reproductive biology of Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Gardens.*, 83, 480-503.
- Oliveira-Filho, A.T., and Fontes, M.A.L. (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica*, 32(4B), 793-810.
- Parnell, J. (1999) Numerical analysis of Thai members of the *Eugenia-Syzygium* Group (Myrtaceae). *Blumea*, 44(2), 351-379.
- Peterson, A., Levichev, I.G., and Peterson, J. (2008) Systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae) and infrageneric classification of *Gagea* based on molecular and morphological data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 46(2), 446-465.
- Pizo, M.A. (2002) The Seed-dispersers and Fruit Syndromes of Myrtaceae in the Brazilian Atlantic Forest. In *Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evol. and Conserv.* (C. International, ed).
- Proença, C.E.B. (1991) A Revision of *Siphoneugena* Berg. *Edinb. J. Bot.*, 47(3), 239-271.
- Redondo, R.A.F., Brina, L.P.S., Silva, R.F., Ditchfield, A.D., and Santos, F.R. (2008) Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 49(1), 44-58.
- Rotman, A.D. (1995) Las especies argentinas del genero *Eugenia* (Myrtaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 31 (1-2), 69-93.
- Sánchez-Vindas, P.E. (1990) Flora de Vera Cruz - Myrtaceae. 32-94.
- Schultz J., M.S., Gerlach D., Muller T., Wolf M. (2005) A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA*, 11, 361-364.
- Schultz J., W.M. (2009) ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. *Mol Phylogenet Evol*, 52, 520-523.

- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W.S., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., and Small, R.L. (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.*, 92(1), 142-166.
- Shneyer, V.S. (2009) DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russ. J. Genet.*, 45(11), 1267-1278.
- Soares-Silva, L.H. (2000) A família Myrtaceae - subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas., 476.
- Sobral, M. (2003) A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul. São Leopoldo: Ed. Unisinos., 216.
- Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E. (2010) Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB031528>).
- Soltis, P.S., and Gitzendanner, M.A. (1999) Molecular systematics and the conservation of rare species. *Conserv. Biol.*, 13(3), 471-483.
- Souza, M.C., Morim, M.P., Conde, M.N.S., and Menezes, L.F.T. (2007) Subtribo Myrciinae O. Berg (Myrtaceae) na restinga, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 21 (1), 49-63.
- Souza, M.C., and Morim, M.P. (2008) Subtribo Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. *Acta Bot. Brasílica.*, 22 (3), 652-683.
- Storchova, H., and Olson, M.S. (2007) The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Syst. Evol.*, 268(1-4), 235-256.
- Takano, A., and Okada, H. (2011) Phylogenetic relationships among subgenera, species, and varieties of Japanese *Salvia* L. (Lamiaceae). *J. Plant Res.*, 124(2), 245-252.
- Tovar-Sanchez, E., Mussali-Galante, P., Esteban-Jimenez, R., Pinero, D., Arias, D.M., Dorado, O., and Oyama, K. (2008) Chloroplast DNA polymorphism reveals geographic structure and introgression in the *Quercus crassifolia* x *Quercus crassipes* hybrid complex in Mexico. *Botany-Botanique*, 86(3), 228-239.
- van der Merwe, M.M., van Wyk, A.E., and Botha, A.M. (2005) Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. *Plant Syst. Evol.*, 251(1), 21-34.
- van Ee, B.W., Riina, R., and Berry, P.E. (2011) A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 60(3), 791-823.
- Vereecken, N.J., Dafni, A., and Cozzolino, S. (2010) Pollination Syndromes in Mediterranean Orchids-Implications for Speciation, *Taxon*.and *Conserv. Bot.Review*, 76(2), 220-240.
- Veron, G., Rosenthal, S.H., Long, B., and Robertson, S. (2004) The molecular systematics and conservation of an endangered carnivore, the Owston's palm civet *Chrotogale*

- owstoni (Thomas, 1912) (Carnivora, Viverridae, Hemigalinae). *Anim. Conserv.*, 7, 107-112.
- Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Gadek, P.A., and Quinn, C.J. (2001) Myrtaceae revisited: A reassessment of infrafamilial groups. *Am. J. Bot.*, 88(11), 2013-2025.
- Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Heslewood, M.M., and Quinn, C.J. (2005) Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Syst. Evol.*, 251(1), 3-19.
- Wilson, C.A. (2011) Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. *Taxon*, 60(1), 27-35.
- Zarrei, M., Wilkin, P., Fay, M.F., Ingrouille, M.J., Zarre, S., and Chase, M.W. (2009) Molecular systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae; Liliales): implications of analyses of nuclear ribosomal and plastid DNA sequences for infrageneric classification. *Ann. Bot.*, 104(1), 125-142.