

Regina Célia Freitas Vilela

BIOLOGIA REPRODUTIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA EM  
JABUTICABEIRAS (*Myrciaria* spp., Myrtaceae)

Salvador/BA  
2009

Regina Célia Freitas Vilela

BIOLOGIA REPRODUTIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA EM  
JABUTICABEIRAS (*Myrciaria* spp., Myrtaceae)

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Federal da Bahia,  
como parte dos requisitos para a obtenção de  
Título de Mestre em Ecologia e  
Biomonitoramento.

Orientador: Dr. José Geraldo de Aquino Assis

Co-orientadora: Dra. Blandina Felipe Viana

Salvador/BA  
2009

Vilela, Regina Célia Freitas  
Biologia Reprodutiva e  
Diversidade Genética de Jabuticabeiras  
(*Myrciaria* spp., Myrtaceae).  
84 páginas.

Dissertação de Mestrado -  
Instituto de Biologia da Universidade  
Federal da Bahia.

1. *Myrciaria* spp. 2. Ecologia  
3. Sistema reprodutivo 4. Polinização  
5. RAPD I. Universidade Federal da  
Bahia. Instituto de Biologia.

Dedico esta dissertação ao meu filho João Pedro, a quem  
tanto amo e que enche meus dias de alegria e novas  
descobertas,

e a meu pai, José Aurélio Vilela (*in memoriam*), agrônomo  
apaixonado pelas frutas brasileiras, que durante toda  
sua vida coletou sementes de jabuticabeiras por todo o  
Brasil e que hoje se tornaram meu objeto de pesquisa.  
Por tudo que me ensinou durante toda sua vida e pelo  
grande amigo e exemplo que foi para mim,  
sempre.

### *Agradecimentos:*

Ao prof. Dr. José Geraldo de Aquino Assis, que desde o primeiro momento abraçou comigo este projeto, por acreditar no meu trabalho, pela dedicação e por todo conhecimento que me fez adquirir.

À prof<sup>a</sup> Dra. Blandina Felipe Viana, por aceitar ser co-orientadora neste projeto e, com isso, enriquecer meu trabalho com seus ensinamentos e sugestões.

### *Aos meus amigos da Bahia:*

Fernanda Tosta Anjos, pela amizade sincera construída durante todo este tempo, pelas inúmeras caronas e pelas aulas de "Bahia".

Maria Cecília de L. e Sá de Alencar Rocha e Camila M. Pigozzo, que me ajudaram muito nos protocolos de extração de DNA e biologia floral respectivamente. Sem vocês esta conquista teria sido muito mais difícil. Não tenho como agradecer todo o carinho e atenção que vocês me deram!

Zafira E. da Rocha Gurgel, pela amizade e ajuda no laboratório no momento de extração do DNA, a Cyntia Anjos e Anne Moreira Costa pela amizade e convivência.

Elizabete Alves, João Paulo Loyola e Jaqueline Rosa, pelo companheirismo demonstrado durante todo o curso e pela inesquecível aula de biologia floral no Zoobotânico de Salvador.

Deraldo, pelos primeiros ensinamentos em extração de DNA e a todos do Laboratório de Biologia Molecular da UFBA, pela infra-estrutura fornecida na primeira fase do projeto.

Jussara, secretária do Programa de Mestrado, por toda a sua dedicação.

### *Aos meus amigos de Lavras:*

Lamartine Nóbrega Filho, responsável pelo Laboratório de Genética Molecular da UFLA, por todos os desafios que me ajudou a superar e, principalmente, pela persistência e sabedoria.

Ao tio Walter e tia Beatriz, que me acolheram com carinho em sua casa em Lavras e às primas Flaviani e Cristiani por todo o carinho recebido durante essas visitas.

Márcia Ribeiro, por tudo que me ajudou e toda companhia que me fez nos dias que passei na UFLA.

Silvia e Mariney, pelas longas conversas no laboratório de genética molecular.

Prof. Dr. João Bosco dos Santos, da UFLA, pela disponibilização de materiais e equipamentos do laboratório de genética molecular, sem os quais teria sido impossível a finalização do meu trabalho.

*E mais:*

Helena e Tonho, que tanto me ajudaram nas coletas dos dados de campo e por serem os "guardiões" desta linda coleção de jabuticabeiras.

Gleiciani Bürger Patricio, bióloga e doutoranda da Unesp de Rio Claro, que me ensinou a prática de biologia floral e por toda a disponibilidade em me ajudar na pesquisa de campo.

Marco Lacerda, profundo conhecedor das jabuticabeiras, pela identificação das plantas e pelas inúmeras aulas via e-mail que recebi.

Harry Lorenzi, por me mostrar o potencial de pesquisa desta coleção.

Dr. Marco Sobral, taxonomista de Myrtaceae, pela confirmação da identificação das plantas utilizadas no estudo.

Maria Lúcia R. Mosconi, por todo o apoio que recebi durante a fase de coleta dos dados de campo.

Natanael Nascimento dos Santos, pelos desenhos, que tanto enriqueceram meu trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante parte deste trabalho.

*E especialmente:*

Ao Jorge, meu marido, grande incentivador de meus estudos, por toda estrutura fornecida durante este período e também pelo carinho e por toda compreensão que teve nos momentos de ausência.

À Célia, minha mãe, por estar sempre ao meu lado, por me ajudar tanto e ser sempre alegre e otimista. Pelo exemplo de profissional que sempre foi para mim e, principalmente, por ser uma mãe maravilhosa!

Às minhas irmãs Gisele e Lilian, pelo exemplo que são para mim e pelo incentivo e apoio que recebi de ambas durante todo o tempo de desenvolvimento desta dissertação, e mais uma vez à Lilian, por todas as bibliografias que conseguiu para mim na Unicamp.

À Vanessa, minha prima querida, por todo o incentivo que sempre me deu e à tia Vera por todo carinho que sempre demonstrou.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

# ÍNDICE

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO GERAL.....	6
REVISÃO DE LITERATURA.....	10
A jabuticabeira ( <i>Myrciaria</i> spp. Berg.).....	10
Isolamento Reprodutivo.....	12
Marcadores Moleculares tipo RAPD.....	15
Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO 1 – COMPORTAMENTO DA FLORAÇÃO E BIOLOGIA FLORAL DE JABUTICABEIRAS ( <i>Myrciaria</i> spp. - Myrtaceae).....	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	31
Discussão.....	34
Referências Bibliográficas.....	51
CAPÍTULO 2 - COMPATIBILIDADE DE CRUZAMENTO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE JABUTICABEIRAS ( <i>Myrciaria</i> spp., Myrtaceae).....	53
Resumo.....	54
Abstract.....	55
Introdução.....	56
Material e Métodos.....	59
Resultados.....	64
Discussão.....	68
Referências Bibliográficas.....	74
CONCLUSÃO GERAL.....	77
Referências Bibliográficas Gerais.....	78

## LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1.1 - Dados de precipitação (barras) e temperatura média (linha) mensais coletados de março de 2008 a fevereiro de 2009, na Estação de Avisos Fitossanitários da Fundação Pró-Café em Boa Esperança, Minas Gerais. Fonte: [www.fundacaoprocafe.com.br](http://www.fundacaoprocafe.com.br) 39
- Figura 1.2 - Comparação entre os percentuais de intensidade e de atividade de floração de *Myrciaria cauliflora*; *Myrciaria coronata*; *Myrciaria jaboticaba* e *Myrciaria trunciflora* e 12 táxons e os dados meteorológicos de precipitação do município de Boa Esperança, Minas Gerais, no período de março de 2008 a fevereiro de 2009. 40
- Figura 1.3 - *Myrciaria coronata*: A – botão floral; B – folhas; C – fruto; *Myrciaria jaboticaba*: D – folhas; E – botão floral; F – flora aberta; G – corte da flor; H – frutos no tronco. 44
- Figura 1.4 - *Myrciaria cauliflora*: A – botão floral e flor; B – fruto; *Myrciaria trunciflora*: C – folhas; D – botões florais e flores no tronco; E – botão floral; F – flor aberta; G – frutos no tronco. 45
- Figura 1.5 – Fotos de *Myrciaria cauliflora*: A – Botão floral e flor; B – Fruto; C – Folhas com brotações novas; D – Árvore. 46
- Figura 1.6 – Fotos de *Myrciaria jaboticaba*: A – Botão floral e flor; B – Folhas; C – Frutos verdes; D – Árvore. 47
- Figura 1.7 – Fotos de *Myrciaria coronata*: A – botão floral; B – Flor; C – Folhas; D – fruto; E – árvore. 48
- Figura 1.8 – Fotos de *Myrciaria trunciflora*: A – botão floral; B – Flores; C – Folhas; D – frutos verdes; E – frutos maduros. 49
- Figura 1.9 – A – *Myrciaria cauliflora* logo após a antese; B – *Myrciaria cauliflora* 5 horas após a antese 50
- Figura 1.10 – *Apis mellifera* coletando pólen em *Myrciaria* sp. 50
- Figura 2.1 - Dendrograma de similaridade genética, obtido através do coeficiente de Jaccard, de 66 genótipos de jaboticabeiras e 1 jambeiro rosa. 66
- Figura 2.2 - Fruto em início de formação referente ao cruzamento entre *Myrciaria coronata* x *Myrciaria jaboticaba*. 73



## LISTA DAS TABELAS

Tabela 1.1 – Percentagem de intensidade de floração representados por 5 categorias com intervalo de 25% cada.	29
Tabela 1.2 - Números de estames por flor em quatro espécies de <i>Myrciaria</i> .	39
Tabela 1.3- Fenograma representando cinco intensidades de floração de todos os táxons de <i>Myrciaria</i> , entre março de 2008 a fevereiro de 2009, Coqueiral, Minas Gerais.	42
Tabela 2.1 - Primers utilizados e suas respectivas sequências de bases arbitrárias.	63
Tabela 2.2 - Programa de amplificação utilizado no termociclador.	63
Tabela 2.3. Percentual de frutificação das polinizações experimentais de apomixia, autopolinização espontânea, autopolinização manual e polinização aberta natural nas quatro espécies de jaboticabeiras. Coqueiral, Minas Gerais.	64
Tabela 2.4 - Percentual de frutificação das polinizações experimentais interespecíficas em <i>Myrciaria</i> spp. Coqueiral, Minas Gerais.	65
Tabela 2.5 - Percentual de germinação das polinizações experimentais interespecíficas em <i>Myrciaria</i> spp. Coqueiral, Minas Gerais.	65

BIOLOGIA REPRODUTIVA E DIVERSIDADE  
GENÉTICA EM JABUTICABEIRAS (*Myrciaria* spp.,  
Myrtaceae)

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos principais investigar os fatores ecológicos envolvidos no sistema de reprodução de espécies em simpatria de jabuticabeiras (*Myrciaria* spp.). Para isso, foram realizados estudos quanto ao comportamento da floração, biologia floral e sistema reprodutivo, aliando estes dados aos dados genéticos obtidos através de marcadores moleculares tipo RAPD. Foram realizados cruzamentos interespecíficos para avaliar a capacidade de formação de híbridos e investigar a presença de mecanismos de isolamento reprodutivo pós-zigóticos existentes. O trabalho foi conduzido em uma população *ex situ* de jabuticabeiras de setenta e uma plantas de dezoito táxons, em Minas Gerais. As espécies estudadas quanto à biologia floral e sistema reprodutivo foram *Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria coronata* e *Myrciaria trunciflora*. Para os dados de comportamento da floração e diversidade genética foram estudadas todas as plantas da população. As flores das quatro espécies avaliadas são caulifloras, hermafroditas, brancas e tetrâmeras. A floração ocorreu principalmente da 2ª quinzena de setembro a 1ª quinzena de outubro, sendo que algumas plantas apresentaram períodos de floração variáveis e mesmo florações extemporâneas. A antese ocorre entre 05h00min e 07h00min. Na fase de pré-antese e antese os grãos de pólen se apresentaram viáveis e os estigmas receptivos. O pólen é o maior recurso oferecido aos visitantes. O visitante floral mais frequente e abundante foi a abelha *Apis mellifera*. A jabuticabeira é uma planta autocompatível e os cruzamentos bidirecionais de polinização interespecífica entre *M. trunciflora* x *M. cauliflora* e entre *M. jaboticaba* x *M. coronata*, produziram pegamentos de 22 a 27% e uma proporção de frutos abortados precocemente. O comportamento da floração foi realizado para os dezoito táxons da população. A inexistência de períodos distintos de florescimento entre eles e

juntamente com a similaridade entre a morfologia floral, horário da antese e o tipo de polinizador, podemos concluir que não há impedimentos ecológicos para o intercruzamento entre os táxons. O desenvolvimento de frutos e a germinação das sementes resultantes dos cruzamentos interespecíficos confirmam o resultado encontrado na análise genética, onde os genótipos se mostraram próximos entre si, sem resolução de grupos específicos. Deste modo, podemos concluir que não há barreiras ao cruzamento entre os táxons estudados e, embora seja indicada a análise com outras ferramentas genéticas para corroborar os dados obtidos neste trabalho, sugere-se que este grupo deveria ter sua taxonomia revisada.

Palavras-chave: jaboticabeira, ecologia, biologia floral, polinização, isolamento reprodutivo, RAPD.

## ABSTRACT

One of the main aims of this study was to investigate the ecological factors involved in breeding systems in sympatric taxons of "jaboticaba" trees (*Myrciaria* spp.). For this aim, we have studied the blooming behavior and the floral biology of jaboticaba trees (*Myrciaria* spp) and evaluated its reproductive system joining these data to the genetic data obtained through RAPD molecular markers. Also, interespecific crossings to evaluate the capacity of hybrid formation and to investigate the presence of mechanism of existing post-zygotis reproductive isolation were made. The work was conducted in an *ex situ* population of 71 jaboticaba trees, in Minas Gerais. The floral blooming studied species and the reproductive system were *Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria coronata* and *Myrciaria trunciflora*. For the blooming behavior data and genetic diversity, all plants of the population have been studied. The flowers from the four evaluated species are cauliflorous, hermaphrodites, whites and tetrameters. The blooming occurred mainly between the last fifteen days of September and the first fifteen days of October, but some taxa presented variable blooming period and even extemporaneous blooming. The anthesis occurs between 05h00 a.m. and 07h00 a.m. In the pre-anthesis and anthesis phase, viable pollen grains were found the stigmas were receptive. The pollen is the biggest resource offered to the visitors. The most often and plentiful floral visitors were the bee *Apis mellifera*. The "jaboticaba" trees are self-compatible and the interespecific pollination bidirectional crossing between *M. trunciflora* x *M. cauliflora* and *M. jaboticaba* x *M. coronata* produced gluing of 22% and 27% and a proportion of 0% and 39% of precociously aborted fruits. The non-existence of distinct flowering periods between the studied taxa and with the similarity among floral morphology, anthesis schedule and the pollinator type, we can

conclude that there are no ecological impediments for the intercrossing between them. Seeds germination and fruit development resulted by the interespecific crossings, confirms the genetic isolation absence. The small genetic differentiation was confirmed by the RAPD data, not forming well resolved groupings. This way, we can conclude that there are no genetic and ecological barriers for the crossing between the studied taxa. This can suggest a taxonomic revision to the group and, also, can manage genetic improvement works in "jaboticaba".

Keywords: jaboticaba tree, ecology, floral biology, pollination, reproductive isolation, RAPD.

## INTRODUÇÃO GERAL

O sistema reprodutivo das plantas é resultado de características reprodutivas próprias e, também, de suas interações com o meio ambiente (Dafni *et al.*, 2005). Embora as plantas não possam escolher seus “parceiros”, elas possuem mecanismos que controlam a estrutura genética de sua população e seus padrões de evolução (Richards, 1997). Espécies simpátricas, muitas vezes, apresentam diferentes estratégias florais que reduzem o fluxo gênico interespecífico e mantêm a identidade das espécies. Porém, características florais similares e compartilhamento do mesmo polinizador podem ocasionar fluxo gênico entre espécies simpátricas, favorecendo a formação de híbridos (Costa, 2007).

Mecanismos de isolamento reprodutivos, tanto ecológicos quanto genéticos, podem atuar como barreiras para reduzir a possibilidade de cruzamento entre estas espécies.

Estudos ecológicos são fundamentais para a compreensão destes mecanismos de isolamento que estão atuando em espécies simpátricas e para entender as estratégias reprodutivas que garantem o sucesso reprodutivo e a identidade genética de cada espécie (Costa, 2007). Para tanto, é necessário o conhecimento prévio da biologia floral, fenologia, polinização e comportamento dos polinizadores, pontos fundamentais para a compreensão da biologia reprodutiva e na identificação de mecanismos de isolamento reprodutivos existentes (Kearns & Inouye, 1993 e Maués & Couturier, 2002).

Já os estudos de biologia reprodutiva são básicos para o entendimento do sistema reprodutivo das plantas e para o entendimento da espécie como um todo.

Um dos mecanismos de maior importância no processo de especiação das angiospermas é a polinização (Richards, 1997).

Segundo Faegri & Pijl (1979), pequenas modificações no sistema de polinização podem iniciar um processo de especiação ou manter populações cruzáveis separadas, mesmo estando em simpatria.

Este estudo trabalhou com a hipótese de presença de isolamento reprodutivo entre as espécies estudadas e buscou identificar a distância genética entre elas, através de marcadores moleculares tipo RAPD. Para este estudo foi escolhida uma coleção de jabuticabeiras em simpatria em Minas Gerais. A existência dessas plantas no mesmo ambiente nos fornece um modelo para estudo de espécies em simpatria e de quais barreiras ecológicas existem entre elas e investigar as estratégias para a manutenção da integridade genética de cada uma delas.

As jabuticabeiras pertencem à família Myrtaceae e ao gênero *Myrciaria*. A família Myrtaceae destaca-se como uma das famílias com maior riqueza de espécies na maioria das formações vegetacionais do Brasil (Romagnolo & Souza, 2004) e compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos que se distribuem por todos os continentes, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barroso, 1991 e Marchiori & Sobral, 1997). Diversos autores têm ressaltado a elevada riqueza específica da família e a importância fitossociológica de suas espécies para as florestas do Sul e Sudoeste do Brasil (Mori *et al.*, 1983; Peixoto & Gentry, 1990; Werneck *et al.*, 2000; Assis *et al.*, 2004; Morellato *et al.*, 2000; Soares-Silva, 2000; Meira-Neto & Martins, 2002 e Souza *et al.*, 2003).

As jabuticabeiras possuem importância econômica principalmente para pequenos produtores e para a agricultura familiar. Grande parte da produção nacional da fruta é comercializada em feiras ou por ambulantes, representando uma renda extra para estas famílias. O conhecimento das estratégias reprodutivas e do comportamento da floração pode subsidiar mudanças no manejo da cultura para melhoria na produção e aumento do período produtivo.



O gênero *Myrciaria* possui 31 espécies no Brasil e entre estas, nove são jabuticabeiras. As jabuticabeiras apresentam sérios problemas quanto a sua classificação taxonômica, existindo controvérsias quanto à diferenciação entre as espécies (Mattos, 1983 e Landrum & Kawasaki, 1997). Sobral (1985) elaborou uma proposta para a alteração de nomenclatura do gênero *Myrciaria* para o gênero *Plinia*, onde as espécies de *Myrciaria* que possuem inflorescências caulinares, cálice persistente, bractéolas separadas e sementes de cotilédones separados, são consideradas espécies de *Plinia*. Segundo o mesmo autor, todas as jabuticabas receberiam a denominação de *Plinia*. Neste estudo, identificaremos as jabuticabeiras pelo gênero *Myrciaria*, conforme utilizado por Lorenzi *et al.* (2006).

O presente estudo foi realizado entre março de 2008 e fevereiro de 2009, em população *ex situ* de jabuticabeiras de aproximadamente 40 anos, localizado no município de Coqueiral, Minas Gerais. Esta coleção possui 71 plantas de 18 diferentes táxons de jabuticabeira originários de vários estados brasileiros. As plantas foram identificadas taxonomicamente por Marco Lacerda e Marco Sobral (UFSJ). Para o estudo de biologia floral e sistema reprodutivo foram utilizadas quatro espécies de jabuticabeiras: *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg (jabuticaba paulista ou jabuticaba-açu), *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg (jabuticaba Sabará), *Myrciaria coronata* Mattos (coroadá) e *Myrciaria trunciflora* O. Berg (de penca). Para os estudos de comportamento da floração e diversidade genética foram utilizadas todas as plantas da coleção.

Desta forma, este trabalho busca preencher lacunas no tocante à biologia reprodutiva das jabuticabeiras, sua divergência genética e possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo e foi organizado em dois capítulos. O primeiro relata os seguintes aspectos: comportamento da floração de todas as plantas da coleção, a morfologia e a biologia floral de quatro espécies de jabuticabeiras e identifica os agentes polinizadores, a fim de verificar quais

mecanismos ecológicos de isolamento reprodutivo podem ocorrer entre as diferentes espécies de jabuticabeiras estudadas. O segundo capítulo tem por objetivo investigar o sistema reprodutivo de *Myrciaria* spp., sua capacidade de cruzamento interespecífica e o grau de diferenciação genética entre os diferentes táxons de *Myrciaria* existentes nesta coleção, através da análise das plantas matrizes, utilizando-se marcadores genéticos de DNA tipo RAPD. Com isso, pretende-se identificar possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo pós-zigótico entre as plantas estudadas.

## REVISÃO DE LITERATURA

### **A jabuticabeira (*Myrciaria* spp. Berg.)**

A jabuticabeira pertence à família Myrtaceae. São nativas principalmente do Brasil, podendo ser encontradas também na Bolívia, Peru, Paraguai, Uruguai e Argentina (Morton, 1987). São encontradas em cultivo desde o Pará até o Rio Grande do Sul e em estado silvestre, da Bahia ao Rio Grande do Sul. Segundo Lorenzi (1998), a jabuticabeira ocorre, preferencialmente, em planícies aluviais e matas abertas do litoral e em submatas do planalto, principalmente de pinhais, situadas em baixadas e beira de rios.

A família Myrtaceae compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies que se distribuem por todos os continentes, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barroso, 1991 e Marchiori & Sobral, 1997), sendo que cerca de 1.000 ocorrem no Brasil (Landrum & Kawasaki, 1997). Esta família compreende as subfamílias Leptospermoideae e Myrtoideae, sendo que a primeira possui maior concentração na Austrália. A segunda, que inclui o gênero *Myrciaria*, distribuiu-se, principalmente, nas Américas do Sul e Central (Briggs & Johnson, 1979).

Do ponto de vista econômico, a família Myrtaceae apresenta muitas espécies que produzem frutos carnosos muito apreciados pela população, entre os quais podemos destacar além da jabuticaba (*Myrciaria* spp.), a pitanga (*Eugenia uniflora*), a goiaba (*Psidium guajava*), a uvaia (*Eugenia pyriformis*), o cambucá (*Plinia edulis*), a grumixama (*Eugenia brasiliensis*), a guabiroba (*Campomanesia xantocarpa*), além de espécies florestais comerciais como o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), cuja importância econômica é indiscutível.

Cruz (2004), em trabalho sobre o perfil químico e uso popular de Myrtaceae e Melastomataceae, verificou que cerca de 70% das citações no levantamento etnomédico correspondem às espécies da

família Myrtaceae. Na medicina popular, diversas espécies desta família são utilizadas de maneira extensiva pela população brasileira no tratamento de diversos males como diarreias, hemorragias, febre, cistite, uretrite, reumatismo e hiperglicemia. Além disso, entre as famílias de Angiospermas citadas para fins medicinais no Brasil, as Myrtaceae ocupam o terceiro lugar.

Dentre as Myrtaceae, a jabuticabeira se destaca por ser uma planta extremamente ornamental e muito cultivada em quintais de todo o país, cujos frutos são consumidos *in natura* ou utilizados na fabricação de geléias, licores, vinhos e chás. Seu desenvolvimento é bastante lento, podendo levar de 8 a 10 anos para iniciar a produção. É uma fruta extremamente perecível, fato que tem incentivado a sua comercialização no próprio pé, como tem acontecido nos arredores da cidade de Goiânia, principalmente em Hidrolândia, onde, segundo a reportagem da Revista "O Sulco" (Castro, 2007), 27 propriedades rurais abrem anualmente suas portas para visitantes que chegam para chupar a fruta diretamente no pé, no período de setembro a novembro. Na região são produzidas 6 mil toneladas da fruta, além de vinho, cachaça, geléias e licores.

A jabuticaba apresenta em sua composição diversos minerais como ferro, cálcio, fósforo e potássio e teores médios de vitamina C, com valores que variam de 13 a 20 mg/100g (Oliveira *et al.*, 2003). Além disso, pesquisadores da Unicamp descobriram altos teores de antocianinas (314 ml/g da fruta), substância protetora das artérias, também presente na uva escura (227 ml/g da fruta) (Pereira, 2005).

## **Isolamento Reprodutivo**

O conceito de espécie, ainda hoje, é uma questão muito discutida dentro da biologia, com inúmeras definições. O termo espécie pode ser referente tanto à categoria taxonômica quanto à própria espécie biológica (Futuyma, 1992), assim como pode ter uma definição ecológica, filogenética ou evolutiva. Através desta revisão de literatura, serão descritos e discutidos os mecanismos de isolamento, que fazem com que espécies simpátricas existam e compreender porque a diversidade vem através da especiação.

Os mecanismos de isolamento reprodutivos, na maioria de natureza ecológica, podem ser classificados em pré-zigóticos e pós-zigóticos (Mettler, 1973).

Os mecanismos de isolamento pré-zigóticos ocorrem impedindo a fecundação, ou seja, a formação do zigoto. Um dos mecanismos de isolamento pré-zigótico é o isolamento ecológico ou de habitat e ocorre quando há isolamento entre duas populações em diferentes habitats dentro de uma mesma área geográfica, resultado de preferências ecológicas distintas (Grant, 1971). Em um trabalho realizado na Califórnia, Hodges & Arnold (1994) estudaram se o sistema de polinização e a preferência por diferentes habitats eram responsáveis pela barreira ao fluxo gênico entre duas espécies de *Aquilegia*. *Aquilegia pubescens* ocorre em altitudes elevadas, acima de 2744 metros e em solos secos e *Aquilegia formosa* ocorre em altitudes mais baixas e em solos úmidos na mesma região geográfica. Na estreita faixa de encontro entre os dois habitats ocorre a formação de híbridos. O estudo concluiu que os fatores ecológicos, como diferença de habitats e de polinização, são os principais fatores que limitam o fluxo gênico e mantêm a integridade das espécies.

O isolamento temporal é também outra forma de isolamento pré-zigótico e ocorre entre espécies de plantas, cuja floração ocorre em diferentes épocas do ano, ou mesmo em diferentes horas do dia

(Grant, 1971), impossibilitando a troca de genes. Costa (2007), em um trabalho com espécies do gênero *Chamaecrista* (Leguminosae – Caesalpinioideae) realizado na Chapada Diamantina/BA, encontrou isolamento temporal entre *C. confertifomis* e *C. rotundifolia* var. *grandiflora*. Estas espécies ocorrem em simpatria, mas possuem floração em épocas distintas, sem que haja sobreposição dos períodos de floração, impedindo o fluxo gênico entre elas.

Isolamento mecânico e o isolamento por diferentes polinizadores são também classificados como mecanismo de isolamento pré-zigótico. No isolamento mecânico em plantas, a fecundação cruzada é impedida devido a diferenças estruturais de suas flores (Mettler, 1969), pois promove a polinização por agentes específicos e são essenciais para espécies que vivem em simpatria (Tang, 2007). A polinização especializada traz uma vantagem clara para a planta, pois reduz a probabilidade de receber pólen incompatível ou ter seu pólen transferido para um estigma incompatível (Sargent, 2004).

Algumas espécies de orquídeas alcançaram grande especialização dos mecanismos de polinização e possuem polinizadores altamente especializados. Um trabalho realizado no México por Albores-Ortiz & Sosa (2006) com orquídeas da família Pleurothallidinae, pode ilustrar esta forma de isolamento. As orquídeas epífitas *Stelis hymenantha* e *S. immersa* foram estudadas quanto a sua fenologia, preferências ecológicas, polinizadores, biologia floral e, também, os atrativos e recompensas que oferecem. Elas ocorrem em simpatria e possuem floração coincidente em uma época do ano, além de emitirem diferentes fragrâncias. Foram observados diferentes polinizadores para cada uma delas, mostrando que a morfologia floral divergente e a emissão de fragrâncias impedem à hibridação entre estas orquídeas, pois requerem polinizadores de tamanhos específicos e, também, com preferência por diferentes fragrâncias.

Os mecanismos de isolamento reprodutivo pós-zigóticos (genéticos) ocorrem após a fecundação, reduzindo a fecundidade ou causando a inviabilidade do híbrido.

A inviabilidade do híbrido ou viabilidade reduzida ocorre quando a polinização cruzada interespecífica ocorre, porém falha na formação de um híbrido viável, devido a uma série de barreiras de incompatibilidade (Dobzansky, 1973).

Em trabalho realizado na Chapada Diamantina, Costa *et al.* (2007) realizaram cruzamentos entre duas variedades simpátricas de *Chamaecrista desvauxii* (var. *graminea* e var. *latistipula*) com o objetivo de analisar os mecanismos de isolamento reprodutivo existentes. Foram realizados cruzamentos controlados, tanto inter como intratáxon. Nos cruzamentos intertáxons, houve grande formação de frutos, porém com produção de sementes não viáveis, demonstrando a existência de barreiras pós-zigóticas que impedem o cruzamento entre as variedades. Os autores concluíram que se tratam de espécies biologicamente distintas, devendo ter sua taxonomia revista.

O que pode ocorrer também e é considerado outro tipo de isolamento pós-zigótico é a esterilidade do híbrido (F1). Neste caso o embrião se desenvolve e pode ou não atingir a idade adulta e, se atinge, é estéril. É o caso do híbrido entre *Rhizophora mangle* e *R. stylosa* (ambas com  $2n=36$ ), encontrado em área de mangue, no Pacífico Sul, que apresentou em estudo feito por Tyagi (2002), falha do pareamento dos cromossomos na meiose e alta porcentagem de pólen não viável.

A degeneração do híbrido ocorre, quando os híbridos F<sub>2</sub> ou os provenientes de retrocruzamentos têm viabilidade ou fertilidade reduzida.

## **Marcadores moleculares tipo RAPD**

O surgimento da tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction), em meados da década de 80 do século XX, causou uma verdadeira revolução na biologia e tornou-se uma poderosa ferramenta para pesquisa genética de qualquer ser vivo. A PCR é um método de amplificação do DNA, que envolve a síntese de milhões de cópias de um segmento de DNA, na presença da enzima *taq* DNA polimerase (Costa, 2003).

Porém esta técnica apresentava um uso limitado, pois dependia do conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos do organismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O grande avanço na área dos marcadores moleculares ocorreu no início da década de 90, através da técnica de RAPD. Esta tecnologia é uma derivação da técnica de PCR e consiste na amplificação simultânea de vários locos do genoma, utilizando “primers” de sequência arbitrária curtas, em geral, em torno de 10 nucleotídeos, eliminando, assim, a necessidade de conhecimento prévio da sequência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Em 1990, Williams *et al.* descreveram a tecnologia com o nome que se tornou mais comumente utilizado, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA” ou DNA amplificado ao acaso). Simultaneamente, Welsh & McClelland (1990) desenvolveram a técnica que chamaram de AP-PCR (Arbitrarily Primed – PCR), utilizando uma sequência arbitrária de 20 nucleotídeos, corrida eletroforética em géis de poliacrilamida e visualização de bandas por auto-radiografia, que promove maior poder de resolução (Lacerda *et al.*, 2002 e Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A partir daí o uso de marcadores moleculares se tornou uma poderosa ferramenta com diversas aplicações (Pigato & Lopes, 2001) e os estudos de genética foram ampliados rapidamente. O avanço



nesta área promoveu um aumento significativo de conhecimento em genética de populações, com diversas aplicações em estudos evolutivos, permitindo avaliar a diversidade genética de populações, livres de influências ambientais e independente do estágio de desenvolvimento do organismo analisado (Lacerda *et al.*, 2002).

A técnica de marcadores moleculares tipo RAPD apresenta diversas vantagens em relação a outros métodos como simplicidade, rapidez, baixo custo e tem se mostrado muito eficiente na detecção de polimorfismo. Além disso, requer uma quantidade mínima de DNA necessária para a análise genética de um organismo. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), esta técnica de PCR utilizando "primers" de sequência arbitrária abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações e "democratizou" a análise de polimorfismo molecular.

Podemos encontrar diversos trabalhos na literatura envolvendo o uso de marcadores moleculares na análise da diversidade genética de plantas.

Barros *et al.* (2005) desenvolveram um estudo com a coleção de *Stylosanthes macrocephala* do banco de germoplasma, da Embrapa Cerrados, com o objetivo de obter descritores ecológicos, moleculares e avaliar a variabilidade genética dos indivíduos. O emprego da técnica de RAPD permitiu a diferenciação dos acessos e evidenciou a alta variabilidade genética da coleção.

Em estudo realizado com acerola (*Malpighia emarginata*) por Salla *et al.* (2002) foi encontrado alto grau de polimorfismo através da técnica de RAPD, quando comparada com os primers SSR, demonstrando a alta variabilidade genética entre os acessos da coleção estudada.

O potencial da técnica de RAPD também se mostrou eficiente na estimativa da variabilidade genética de uma população de *Eucalyptus urophilla* S. T. Blake submetida a um teste de progênies, em trabalho realizado por Pigato & Lopes (2001). As autoras conseguiram, com os

resultados das distâncias genéticas estabelecidas pela análise do DNA, simular uma seleção genética onde se aliaram dados de variabilidade genética e silviculturais, evitando perdas excessivas de variabilidade.

Costa (2003) estudou a variabilidade genética de uma coleção de jabuticabeiras (*Myrciaria* spp.) com o objetivo de buscar uma associação entre marcadores moleculares e marcadores morfológicos. Além disso, testou diferentes protocolos de extração de DNA para estas espécies. Foram encontradas algumas divergências quanto à identificação taxonômica das espécies.

Em estudo realizado com pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), Vilela (1998) pesquisou aspectos da fenologia, teor nutricional e divergência genética entre populações da espécie. Através dos marcadores moleculares tipo RAPD foi possível detectar a divergência genética em três populações naturais de Minas Gerais.

Outro estudo utilizando a técnica RAPD foi realizado com 17 acessos de *Salvia* spp. (Labiatae), por Bruna *et al.* (2006). Esta espécie é largamente utilizada para fins ornamentais, culinários e aromáticos e o gênero compreende cerca de 1000 espécies. A técnica de RAPD mostrou-se muito promissora na identificação das diferentes espécies e pode ser útil na elucidação da taxonomia do gênero, principalmente, em casos onde há dificuldades na distinção das espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORES-ORTIZ, O. & SOSA, V. 2006. Polinización de dos especies simpátricas de *Stelis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta Botanica Mexicana* 74: 155-168.

ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. & THOMAZ, L. D. 2004. Fitosociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES) *Revista Brasileira de Botânica* 27(2): 349-361.

BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P. de & LOPES, G. K. B. 2005. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(9): 899-909.

BARROSO, G. M. 1991. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 2.

BRIGGS, B. C. & JOHNSON, L. A. S. 1979. Evolution in the Myrtaceae-evidence from inflorescence structure. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* 102: 157-256.

BRUNA, S.; GIOVANNINI, A. de; BENEDETTI, L.; PRINCIPATO, M. C. & RUFFONI, B. 2006. Molecular analysis of *Salvia* spp. through RAPD markers. *Acta Horticulturae (ISHS)* 723:157-160.

CASTRO, G. 2007. Turismo em volta da árvore – Sabores do Brasil. O Sulco: 18-19.

COSTA, C. B. N. 2007. Mecanismos de isolamento reprodutivo em espécies simpátricas: biologia reprodutiva de *Chamaecrista* (Leguminosae-Caesalpinioideae) em Mucugê, Bahia. Dissertação de Mestrado. Feira de Santana, BA. 160p.

COSTA, C. B. N.; LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L. & QUEIROZ, L. P. de. 2007. Post-zigotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Annals of Botany* 99: 625-635.

COSTA, J. R. V. da. 2003. Uso de marcadores morfológicos e moleculares do tipo RAPD em jaboticabeiras (*Myrciaria* spp.). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP. 59p.

CRUZ, A. V. M. & KAPLAN, M. A. C. 2004. Estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias Myrtaceae e

Melastomataceae. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Macromoleculares. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense.

DAFNI, A.; KEVAN, P. G. & HUSBAND, B. C. (eds.). 2005. Practical Pollination Ecology. Cambridge: Cambridge University Press. 590p.

DOBZANSKY, T. 1973. Genética do processo evolutivo. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo.

FAEGRI, K. & van der PIJL, L. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press. Oxford-New York. 243p.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p.

FUTUYMA, D. J. 1992. Biologia Evolutiva. 2ª ed. Ribeirão Preto. Editora da SBG. 631p.

GRANT, V. 1971. Plant Speciation. New York: Columbia University Press. 435p.

HODGES, S. A. & ARNOLD, M. L. 1994. Floral and ecological isolation between *Aquilegia formosa* and *Aquilegia pubens*. Evolution 91: 2493-2496.

KEARNS C. A. & INOUE D. W. 1993. Techniques for Pollination Biologists. Colorado University Press, Niewot, Colorado. 583p.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P. & LOVATO, M. B. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. Lundiana 3(2): 87-92.

LANDRUM, L. R. & KAWASAKI, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia 49: 508-536.

LORENZI, H. 1998. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, v.1, 352p.

LORENZI, H.; BACKER, L.; LACERDA, M. & SARTORI, S. 2006. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas. São Paulo. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 640p.

MARCHIORI, J. N. C. & SOBRAL, M. 1997. Dendrologia das angiospermas – Myrtales. Editora da UFSM, Santa Maria. 304p.

MATTOS, J. R. de. 1983. Frutíferas Nativas do Brasil: Jaboticabeiras. Porto Alegre, RS. 92p.

MAUÉS, M. M. & COUTURIER, G. 2002. Biologia Flora e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no estado do Pará, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 25 (4): 441-448.

MEIRA-NETO, J. A. A. & MARTINS, F. R. 2002. Composição florística de uma floresta estacional semidecidual Montana no município de Viçosa – MG. Revista Árvore, 26(4): 437-446.

METTLER, L. E. 1969. Population Genetics and Evolution. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

METTLER, L. E. & GREGG, T. G. 1973. Genética de Populações e Evolução. Polígono, São Paulo, 262p.

MORELLATO, L. P. C.; TALORA, D. C.; TAKAHASI, A.; BENCKE, C. C., ROMERA, E. C. & ZIPPARRO, V. B. 2000. Phenology of Atlantic rain forest trees – a comparative study. Biotropica 32 (4b): 811-823.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M. de & SANTOS, T. S. dos. 1983. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern brazilian wet forest. Biotropica, 15: 68-70.

MORTON, J. F. 1987. Jaboticabas. P. 371–374. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL.

OLIVEIRA, A. L. de; BRUNINI, M. A.; SALANDINI, C. A. R. & BAZZO, F. R. 2003. Caracterização tecnológica de jaboticabas 'Sabará' provenientes de diferentes regiões de cultivo. Revista Brasileira de Fruticultura 25 (3): 397-400.

PEIXOTO, A. L. & GENTRY, A. 1990. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). Revista Brasileira de Botânica 13: 19-25.

PEREIRA, R. Revista Saúde é Vital. Ed. Abril 2005 nº 259. [http://saude.abril.com.br/edicoes/0259/nutricao/conteudo\\_87702.shtml](http://saude.abril.com.br/edicoes/0259/nutricao/conteudo_87702.shtml)

PIGATO, S. M. P. C. & LOPES, C. R. 2001. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio de marcadores moleculares RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. Scientia Forestalis 60: 135-148.

RICHARDS, A. J. 1997. Plant Breeding Systems. London: Chapman & Hall. 529p.

ROMAGNOLO, M. B. & SOUZA, M. C. de. 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 Botânica Brasileira, São Paulo, v. 18, n. 3.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. & CARPENTIERI-PÍPOLO, V. 2002. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). Revista Brasileira de Fruticultura 24(1): 15-22.

SARGENT, R. D. 2004. Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. Proc. R. Soc. Lond. B 271, 603-608.

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. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 462p.

SOBRAL, M. 1985. Alterações Nomeclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). Boletim do Museu Botânico de Curitiba 63: 1-4.

SOUZA, J. S.; ESPÍRITO-SANTO, F. D. B.; FONTES M. A. L.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. de & BOTEZELLI, L. 2003. Análise das variações florísticas e estruturais da comunidade arbórea de um fragmento de floresta semidecídua às margens do rio Capivari, Lavras-MG. Revista Árvore, Viçosa, MG 27(2): 185-206.

TANG, L. L. ; YU, Q. ; SUN, J. F. & HUANG, S. Q. 2007. Floral traits and isolation of three sympatric *Aquilegia* species in the Qinling Mountains, China. Plant Systematics and Evolution 267: 121-128.

TYAGI, A. P. 2002. Chromosomal pairing and pollen viability in *Rhizophora mangle* and *Rhizophora stylosa* hybrids. South Pacific Journal of Natural Science 20: 1-3.

VILELA, G. F. 1998. Variações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb. (Cariocaraceae): fenológicas, genéticas e de valores nutricionais de frutos. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Florestais. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 88p.

WERNECK, M. S.; PEDRALLI, G.; KOENIG, R. & GIESEKE, L. F. 2000. Florística e estrutura de três trechos de uma floresta semidecídua na Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto, MG. Revista Brasileira de Botânica 23: 97-106.

## Capítulo 1

# COMPORTAMENTO DA FLORAÇÃO E BIOLOGIA FLORAL DE JABUTICABEIRAS (*Myrciaria* spp., Myrtaceae)

## RESUMO

COMPORTAMENTO DA FLORAÇÃO E BIOLOGIA FLORAL DE JABUTICABEIRAS (*Myrciaria* spp., Myrtaceae). Este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento da floração de uma população *ex situ* no Sul do estado de Minas Gerais, contendo 18 diferentes táxons e a biologia floral de quatro espécies de jabuticabeiras (*Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria coronata* e *Myrciaria trunciflora*) a fim de identificar possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigótico. As flores das quatro espécies são caulifloras, hermafroditas, brancas, tetrâmeras, sempre com o perianto diferenciado em cálice e corola, ovário ínfero com dois óvulos por lóculo. Os frutos são globosos e negros. A floração ocorreu, em *Myrciaria coronata* e *M. trunciflora*, na primeira quinzena de outubro enquanto que *M. cauliflora* e *M. jaboticaba* apresentaram uma maior variação, onde a floração ocorreu de agosto até a 1ª quinzena de outubro e, também, apresentaram pequena floração extemporânea. As demais plantas tiveram maior floração também entre setembro e outubro, sendo que algumas apresentaram floração ao longo do ano. A floração da jabuticabeira acontece em massa e a antese ocorre entre 05h00min e 07h00min. Na fase de pré-antese e antese, os grãos de pólen apresentaram alta viabilidade (95%). Os estigmas encontram-se receptivos desde a fase de pré-antese até um dia após a abertura da flor. Não foi detectada a presença de néctar e o pólen é o maior recurso oferecido aos visitantes. O visitante floral mais frequente e abundante foi a abelha *Apis mellifera*. Não houve períodos distintos de florescimento entre os táxons estudados e juntamente com a morfologia floral, o horário da antese e o tipo de polinizador, podemos concluir que não há impedimentos pré-zigóticos para o intercruzamento entre os táxons. Palavras-chave: *Myrciaria* spp., biologia floral, polinização, isolamento reprodutivo.



## ABSTRACT

BLOOMING BEHAVIOR AND FLORAL BIOLOGY OF JABOTICABA TREE (*Myrciaria* spp., Myrtaceae). This work aimed to study the Minas Gerais *ex situ* population blooming behavior and the floral biology of four jaboticaba species (*Myrciaria* spp.) in order to identify possible prezygotic reproductive isolation. The species studied for the floral biology were *Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria coronata* and *Myrciaria trunciflora*. The four species flowers are similar, cauliflorous, hermaphrodite, and white. The stamens are numerous. The fruits are rounded and black. The blooming, in these species and others analyzed taxa, occurs mainly from the last two weeks of September to the first two weeks of October, but some taxa showed variable blooming period or even extemporaneous blooming. In all species, the blooming is massive and the anthesis occurs between 5:00h a.m. and 7:00h a.m. In the pre-anthesis and anthesis phases, the pollen grains showed high viability levels (95%). The stigmas were receptive from the pre-anthesis phase until one day after the flower opening. The presence of nectar was not detected and the pollen is the main resource offered to the visitors. The most frequent visitor was the bee *Apis mellifera*. There was no distinct period of blooming among the studied species and with the floral morphology, the time of anthesis and the type of pollinator, we can conclude that there is no prezygotic isolation for the intercross between the taxa.

Keywords: *Myrciaria* spp., floral biology, pollination, reproductive isolation.

## INTRODUÇÃO

O estudo do comportamento da floração contribui para o entendimento do ciclo reprodutivo das plantas, da organização temporal dos recursos dentro das comunidades, das interações planta-animal e da vida dos animais que dependem destes recursos para alimentação (Morellato & Leitão-Filho, 1996 e Talora & Morellato, 2000). Os eventos repetitivos de floração são de grande importância tanto para a ecologia como para a evolução, pois, do ponto de vista ecológico, as flores são importantes fontes de recursos alimentares e do ponto de vista evolutivo essas promovem mecanismos de isolamento reprodutivo ou especiação (Kearns & Inouye, 1993). Porém, sabemos que espécies relacionadas e simpátricas nem sempre exibem padrões de floração diferenciados, o que proporciona, muitas vezes, fluxo gênico e consequente hibridação (Coyne & Orr, 2004).

Os estudos comparativos de biologia floral e comportamento da floração de táxons proximamente relacionados permitem esclarecer sobre os mecanismos de isolamento mecânico ou temporal entre eles.

Para este estudo foi escolhida uma coleção *ex situ*, em Minas Gerais, composta por diversos táxons de jabuticabeiras. A existência dessas plantas no mesmo ambiente nos fornece um modelo para o estudo de táxons em simpatria, que busque investigar a existência de barreiras ecológicas e as estratégias para a manutenção da integridade genética de cada táxon.

As jabuticabeiras pertencem à família Myrtaceae e ao gênero *Myrciaria*. As flores das Myrtaceae brasileiras são hermafroditas, geralmente de cor branca, com estames numerosos, corola e cálice 4-5-mero (tetrâmero/pentâmero), iguais ou desiguais entre si e ovário ínfero (Barroso, 1991 e Lughadha & Proença, 1996). Flores menores são mais comuns, embora o tamanho varie de pequeno

(< 1,5 cm de diâmetro), como em *Calyptranthes* e *Myrcia* a relativamente grande (> 2,0 cm), como em *Acca* e *Campomanesia* (Gressler *et al.*, 2006). Os frutos são carnosos, tipo baga, podendo apresentar diversas formas (Barroso, 1991). Os indivíduos do gênero *Myrciaria* estudados são árvores semidecíduas, que podem alcançar de 3 a 9 metros de altura. Possuem folhas opostas, glabras, com nervura circundante.

O pólen é o principal recurso oferecido aos polinizadores, sendo o recurso primário pelo qual as abelhas, provavelmente o grupo mais importante de polinizadores de Myrtaceae, visitam as flores (Lughadha & Proença, 1996). Porém não há relatos de estudos envolvendo a biologia floral de jabuticabeiras e determinação dos efetivos polinizadores. A maioria dos estudos sobre a polinização de Myrtaceae brasileiras enfoca alguns poucos aspectos como biologia floral e a relação de visitantes observados, sendo que poucos demonstram os efetivos polinizadores da espécie estudada. Espécies ocorrentes no cerrado foram as mais estudadas e abelhas foi o grupo mais comum de visitantes florais (Gressler *et al.*, 2006).

Estudos envolvendo a biologia floral do gênero *Myrciaria* são raros. Maués & Couturier (2002) estudaram a biologia floral e aspectos relacionados à polinização e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia*), fruteira nativa do Brasil, que ocorre nas margens de rios e lagos inundável da Amazônia e está sendo domesticada, visando o cultivo em terra firme.

Sobre trabalhos envolvendo a biologia reprodutiva de Myrtaceae podemos destacar o realizado por Proença & Gibbs (1994), onde foram estudadas oito espécies do cerrado (*Eugenia dysenterica*, *Siphoneugena densiflora*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Camponesia pubescens*, *Camponesia velutina*, *Myrcia linearifolia*, *Myrcia rhodosepala* e *Psidium firmum*) quanto aos aspectos da fenologia, polinização, sistema de cruzamento e sucesso reprodutivo. E, também, de Silva & Pinheiro (2007), realizado em restinga de um

Parque Natural em Grumari, no município do Rio de Janeiro, com o objetivo de conhecer a biologia floral, a polinização e a fenologia de quatro espécies de *Eugenia*.

Do ponto de vista ecológico, ainda são desconhecidas as interações com os visitantes florais tanto autóctones quanto exóticos, e a importância dessas relações para manutenção da variabilidade genética da população.

Nesse contexto, as investigações que pretendemos realizar no presente estudo com as jabuticabeiras, como anteriormente mencionadas, além de contribuírem para preencher as lacunas de conhecimentos referidas acima para o gênero em questão, pretendem esclarecer sobre os mecanismos ecológicos de isolamento reprodutivo e os sistemas de polinização em espécies tropicais.

## MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO - O trabalho proposto foi conduzido em uma população *ex situ* de jabuticabeiras de aproximadamente 40 anos, localizada no município de Coqueiral, região do sul do Estado de Minas Gerais, Brasil (45°27'58" de latitude, 21°14'74" de longitude e 817m de altitude). Esta coleção conta com 71 plantas e possui exemplares de vários táxons de jabuticabeiras, originários de diversos estados brasileiros. O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen, definido como subtropical, com inverno seco e verão úmido. Registra temperatura média anual de 19,4°C e precipitação anual em torno de 1.500mm (Brasil, 1992)(FIGURA 1.1). O entorno da área é formado por matas ciliares e um grande número de espécies florestais e frutíferas, nativas e exóticas. Há também área de plantio de café e pastagens.

Os registros de temperatura e precipitação foram correlacionados com os resultados obtidos.

A coleção possui dezoito táxons de jaboticabeiras, sendo que o *status* taxonômico de algumas plantas não está devidamente determinado.

ESPÉCIES ESTUDADAS - Para o estudo de biologia floral foram utilizadas quatro espécies de jaboticabeiras: *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg (jaboticaba paulista ou jaboticaba-açu), *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg (jaboticaba sabará), *Myrciaria coronata* Mattos (jaboticaba coroada) e *Myrciaria trunciflora* O. Berg (jaboticaba-depenca), todas devidamente classificadas.

COMPORTAMENTO DA FLORAÇÃO - Para os estudos do comportamento da floração, foram realizadas visitas semanais à área e registradas as ocorrências de floração e frutificação. Estes dados foram coletados para todas as 71 plantas da coleção, entre março de 2008 a fevereiro de 2009. Os padrões de floração foram determinados, segundo à classificação proposta por Newstrom *et al.* (1994).

Para a análise dos dados de comportamento da floração foram estimadas as porcentagens de intensidade de fenofase e índice de atividade (FIGURA 1.2), conforme descrito por Bencke & Morellato (2002), a seguir:

Os valores quantitativos de floração obtidos em campo foram representados por 5 categorias (0 a 4) com intervalo de 25% entre cada categoria (TABELA 1.1). Em cada mês, fez-se a soma dos valores de intensidade da fenofase para todos os indivíduos da espécie e, então, este valor foi dividido pelo valor máximo possível, ou seja, número de indivíduos multiplicado por quatro. O resultado foi, então, multiplicado por 100 para representar percentual. Para a obtenção dos índices de atividade, foram registradas a presença e ausência da fenofase no indivíduo. Este método tem caráter quantitativo em nível populacional, indicando a porcentagem de

indivíduos da população que está manifestando determinado evento fenológico e a sincronia entre os indivíduos da população. Estes dados foram correlacionados com os dados de precipitação.

Tabela 1.1 - Percentagem de intensidade de floração representados por 5 categorias com intervalo de 25% cada.

Intensidade de Floração		Categorias
Ausência de floração	0%	0
MB - muito baixa	0,1 a 25%	1
B - baixo	26% a 50%	2
M - média	51 a 75%	3
G - grande	76 a 100%	4

MORFOLOGIA FLORAL - Os estudos de biologia floral foram realizados de agosto a novembro de 2008, época de maior intensidade da floração e foram executados de acordo com Dafni *et al.* (2005). Para o estudo da morfologia, 10 flores e 10 botões florais de cada uma das 4 espécies (*Myrciaria jaboticaba*, *M. cauliflora*, *M. trunciflora* e *M. coronata*), foram observados em campo e complementados com observações em laboratório e fotografias. Amostras de flores e botões fixados em álcool etílico a 70% foram posteriormente examinadas sob microscópio estereoscópico. Foram feitos, ainda, registros da forma, localização, cor, simetria, emissão de odor, recursos e quantidade de estames.

A partir das flores coletadas e conservadas em álcool 70% e de fotografias de todas as partes da planta, foram feitas pranchas mostrando detalhes morfológicos (FIGURAS 1.3 e 1.4).

O número de estames foi determinado, com contagens em 10 flores recém-abertas de cada espécie, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, utilizando-se o programa Instat.

Para complementar a descrição das espécies, foram também observados os aspectos das folhas, frutos e planta.

ANTESE - A antese foi observada para as quatro espécies já citadas marcando-se dez botões florais em cada planta e fazendo o acompanhamento periódico para identificação do horário de abertura dos botões florais e longevidade da flor.

FUNCIONALIDADE DOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS - O teste de receptividade do estigma foi realizado em dez flores coletadas de cada espécie em cada fenofase. O teste foi realizado imergindo-se os estigmas em placa de petri contendo peróxido de hidrogênio a 10% e observando a liberação de bolhas nos estigmas receptivos através de lupa de cabeça.

Para o teste de viabilidade polínica foram retiradas de quatro a cinco anteras de cada flor nas seguintes fenofases: pré-antese, antese, cinco horas após a antese, dez horas após a antese e vinte e quatro horas após a antese. As anteras foram ligeiramente maceradas sobre uma lâmina, coradas com vermelho neutro a 3% e, posteriormente, foi colocada uma lamínula e feita observação sob microscópio. Este teste foi realizado com a espécie *Myrciaria coronata*. Para as demais espécies foram feitos teste apenas nas fenofases de pré-antese e antese. O pólen corado foi considerado viável.

VISITANTES FLORAIS - As observações quanto aos visitantes florais e recursos ofertados foram realizadas de agosto a novembro, período de maior intensidade de floração. Os horários de visita e comportamento do inseto na flor foram registrados durante todo o florescimento, nas 4 espécies estudadas (*Myrciaria jaboticaba*, *M. cauliflora*, *M. trunciflora* e *M. coronata*). Para verificação da presença ou ausência de néctar, foram utilizados tubos micro-capilares de 1-5

μl graduados, em diferentes fenofases. Os insetos frequentes nas flores foram coletados com puçá no decorrer do dia e conservados em álcool 70%, para posterior identificação.

## RESULTADOS

**COMPORTAMENTO DA FLORAÇÃO** - No período de estudo, a floração das plantas ocorreu com maior intensidade entre a segunda quinzena de setembro a final de outubro, período com temperaturas mais altas e maior precipitação na região (FIGURA 1.1). De acordo com a FIGURA 1.2, podemos classificar o padrão de floração como anual, ou seja, um ciclo maior de floração por ano, conforme classificação de Newstrom *et al.* (1994).

A floração ocorreu, em *M. coronata* e *M. trunciflora*, entre setembro e outubro com maior concentração na segunda quinzena de outubro enquanto que *Myrciaria jaboticaba* e *Myrciaria cauliflora* apresentaram maior período de florescimento, que se estendeu de agosto a outubro. Tanto *M. cauliflora* como *M. jaboticaba* apresentaram pequeno florescimento entre abril e junho. Os híbridos existentes na coleção apresentaram floração coincidente com as quatro espécies já citadas. Na TABELA 1.3 são apresentadas as intensidades de floração de todas as plantas da coleção, inclusive dos híbridos e outros táxons, e seus respectivos períodos de florescimento.

A frutificação ocorreu, em média, 40 dias após a floração.

As brotações foliares ocorreram entre outubro e novembro, coincidindo, também, com o período de início das chuvas na região.

**MORFOLOGIA FLORAL** - As flores de todas as espécies estudadas são caulifloras, hermafroditas, actinomorfas, brancas, tetrâmeras, sempre com o perianto diferenciado em cálice e corola, ovário ínfero com dois óvulos por lóculo. O cálice é persistente na



antese. As flores são aromáticas e exalam um aroma adocicado. O estigma é capitado e os estames são numerosos. Esta característica da morfologia floral pode favorecer a autopolinização, pois nas flores os estames são voltados para o centro da flor. Os estames variaram em número de 48, em média, nas flores de *Myrciaria trunciflora* a aproximadamente 64 em *Myrciaria coronata*, com diferenças estatisticamente significativas (TABELA 1.2).

Abaixo, segue a caracterização geral das quatro espécies, incluindo os caracteres florais.

*Myrciaria cauliflora* (DC.) O. Berg

Nome popular: jabuticaba paulista.

As árvores desta espécie podem alcançar 6 m de altura e são semidecíduas. Possuem folhas finas, longas, glabras, opostas e com brotações novas arroxeadas. As flores nascem aglomeradas junto ao caule e ramos, com pedicelos curtíssimos, com cerca de 1 mm de comprimento. Os frutos são globosos, possuem sépala persistente enquanto verdes, negros quando maduros e podem alcançar até 3 cm de diâmetro (FIGURA 1.5).

*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg

Nome popular: jabuticaba sabará.

Esta é sem dúvida a jabuticabeira mais cultivada nos pomares brasileiros devido ao sabor agradável e doce de seus frutos. Árvore de até 9 m de altura, semidecídua. Possui caule bastante ramificado, folhas glabras, pequenas, opostas e com brotações novas esverdeadas. Flores aglomeradas junto ao caule e ramos, com pedicelos não muito curtos. Seus frutos são globosos, pequenos (2 cm), de casca fina e muito saborosos (FIGURA 1.6).

*Myrciaria coronata* Mattos

Nome popular: jabuticaba coroadada.

Árvore não muito grande de até 4 m de altura, semidecídua. Suas folhas são glabras, opostas e com brotações novas arroxeadas. As flores são aglomeradas no caule e ramos, em grupos de 1 a 6, pedicelos curtos, envoltos por quatro filas de brácteas imbricadas (figura 1.7 - A). Os frutos são grandes, negros, podendo atingir mais de 3 cm de diâmetro. Possuem o contorno de um disco no ápice, por isso recebem o nome de "jabuticaba coroada" (FIGURA 1.7).

*Myrciaria trunciflora* O. Berg

Nome popular: jabuticaba de penca; jabuticaba de cabinho.

Árvore de até 8 m de altura, semidecídua. Folhas glabras, opostas e com brotações levemente arroxeadas. As flores são aglomeradas sobre o caule e ramos com pedicelos que podem chegar a 3 cm de comprimento. Seus frutos são globosos, negros e muito saborosos (FIGURA 1.8).

ANTESE - A antese ocorreu entre 05h00min e 07h00min para todas as espécies. As jabuticabeiras produzem floradas em massa, que duram em média de dois a três dias. As flores duram apenas um dia.

FUNCIONALIDADE DOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS - A maior quantidade de pólen permanece nas anteras por quatro a cinco horas após a antese, sendo que após este período, grande parte dos grãos de pólen já foi levada pelos visitantes florais através do comportamento pilhador (FIGURA 1.9). Na fase de pré-antese e antese, os grãos de pólen apresentaram viabilidade alta (em torno de 95%), para todas as espécies, sendo que esta viabilidade foi mantida alta até cinco horas após a antese. Após este período, além da perda de viabilidade, que foi de 70% para *M. coronata* (24 horas após a antese), foi notável a diminuição da quantidade de pólen nos preparos citológicos para observação da viabilidade, devido ao forrageio das abelhas.

Os estigmas se encontram receptivos já na pré-antese e permaneceram assim até um dia após a abertura da flor em todas as espécies estudadas.

Não foi detectada a presença de néctar através dos micro-capilares e o pólen é o principal recurso oferecido aos visitantes.

VISITANTES FLORAIS - Dentre as quatro espécies de jabuticabeiras estudadas, não houve variação entre as espécies de visitantes. A abelha africanizada (*Apis mellifera*) pode ser considerada a visitante mais frequente e abundante. As visitas eram iniciadas logo no início da manhã, iniciando-se logo após a antese e duravam em torno de quatro a cinco horas, terminando com o aumento da temperatura e provavelmente devido à diminuição da oferta de pólen. As abelhas pousavam diretamente sobre as anteras, coletando o pólen de toda a inflorescência e apresentando comportamento pilhador (FIGURA 1.10). Com estas observações pode-se notar que as abelhas promoviam a queda dos grãos de pólen sobre as outras flores localizadas em planos inferiores dos ramos.

O horário de visita das abelhas foi coincidente com a maior disponibilidade de alimento no pomar. Foi registrada, também, a presença da abelha nativa *Trigona* sp, porém, com frequência de visitas inferior a de *Apis mellifera*.

## DISCUSSÃO

De maneira geral, padrões temporais no florescimento de plantas tropicais estão associados a fatores físicos, como fotoperíodo, temperatura e precipitação e a fatores bióticos, como a disponibilidade de agentes polinizadores (Bawa, 1983).

As jabuticabeiras estudadas apresentaram padrão de floração anual (Newstrom *et al.*, 1994).

Dentre as demais espécies analisadas quanto ao comportamento de floração, a grande maioria floresceu entre setembro e outubro e algumas espécies como *Myrciaria aureana* "branca" e *Myrciaria* sp 1 "vermelha", tiveram floração extemporânea, conforme TABELA 1.3. O período de florescimento de cada planta, entretanto, é bastante curto, durando em média dois a três dias. O período de maior florescimento na grande maioria dos táxons coincidiu com o início do aumento da temperatura e da precipitação na região. Estes resultados corroboram os encontrados por Proença & Gibbs (1994) e Silva & Pinheiro (2007) para espécies da família Myrtaceae, em locais com estação seca e úmida distintas, onde o florescimento ocorre no início da estação chuvosa garantindo, assim, a germinação das sementes dispersas e pegamento das plântulas na estação mais adequada para seu desenvolvimento. O início das chuvas é também a época de maior densidade de vertebrados dispersores de sementes na floresta atlântica (Taberelli & Peres, 2002 citado por Benevides, 2006). Segundo Landrum & Kawasaki (1997), todas as Myrtaceae brasileiras possuem frutos carnosos e, conforme a revisão realizada por Glessler *et al.* (2006), as aves são os principais dispersores das Myrtaceae, porém, neste mesmo estudo, os macacos e outros mamíferos carnívoros foram apontados como dispersores de sementes de jaboticabeira (*Myrciaria* spp.).

A ocorrência de sobreposição na floração em espécies simpátricas pode favorecer a ocorrência de fluxo gênico e consequente hibridação (Coyne & Orr 2004). No presente estudo, não foi encontrado isolamento reprodutivo temporal representativo entre as espécies de *Myrciaria cauliflora*, *M. trunciflora*, *M. jaboticaba* e *M. coronata*, ou seja, provavelmente, não há barreiras pré-zigóticas atuando de forma a impedir o fluxo gênico. No entanto, os dados fenológicos foram obtidos apenas durante o período de um ano. Desse modo, faz-se necessária uma investigação com maior tempo

de coleta dos dados a fim de ser avaliada a ocorrência de um padrão de floração para cada espécie nesta região. Algumas espécies como a *Myrciaria trunciflora* e *M. jaboticaba* não tiveram a floração coincidente, porém a diferença foi muito pequena, chegando a apenas alguns dias de intervalo. Como podemos observar na TABELA 1.3, houve variação de florescimento entre as plantas da mesma espécie, indicando uma variação fenotípica entre elas, possivelmente por se tratarem de plantas de diferentes origens.

A sobreposição da floração entre os táxons pode indicar que não há diferenciação da floração por pressão dos agentes polinizadores e este evento pode estar sendo regulado por fatores abióticos, como temperatura e precipitação.

Todas as espécies de *Myrciaria* estudadas apresentam flores brancas, agrupadas e estames numerosos. Os táxons observados apresentaram estratégias florais semelhantes, sugerindo a possibilidade de troca de fluxo gênico entre os táxons, pois florescem na mesma época e compartilham o mesmo visitante floral. As diferenças morfológicas entre as espécies são muito pequenas e se mostram como um grande desafio para os taxonomistas. Sabemos que características florais similares e compartilhamento de polinizadores podem proporcionar fluxo gênico entre os táxons e levar à formação de híbridos (Costa, 2007).

A antese ocorre pouco antes do nascer do sol, coincidindo com o início do período de maior atividade dos visitantes florais. As flores exalam um aroma adocicado, importante na atração e orientação dos polinizadores. A presença de fragrância nas flores é um mecanismo primitivo de comunicação entre as fanerógamas e seus polinizadores (Raguso, 2001).

De quatro a cinco horas após a antese, as flores entram em senescência e os estames passam a apresentar coloração marrom (FIGURA 1.9) e diminuição na quantidade disponível de pólen. A partir deste momento, a presença dos visitantes florais é

extremamente reduzida. Este resultado coincide com o encontrado por Maués & Couturier (2002) no estudo do camu-camu no Pará e, também, com o descrito por Ludhagha & Proença (1996) para a sub-família Myrtoideae e para o gênero *Myrciaria*, onde é descrito que as flores deste gênero, dentre outros, duram apenas um dia.

O pólen é o mais importante recurso oferecido aos visitantes, já que não foi detectada a presença de néctar através de micro-capilares. As abelhas (*Apis mellifera* L.), principal visitante floral das jabuticabeiras, apresentaram o comportamento pilhador (FIGURA 1.10). A produção de pólen é uma característica de todas as angiospermas, com função primária no processo da polinização (Benevides, 2006). Alves & Freitas (2006) sugerem que as visitas em busca de pólen favorecem a polinização, pois os visitantes carregam grandes quantidades de pólen aderido ao corpo e ao tocar o estigma, promovem a polinização. Além disso, o pólen é uma rica fonte de alimento aos visitantes florais, essencial para a nutrição das abelhas *Apis mellifera*, pois fornece proteína para larvas e adultos. É constituído também por amido, lipídeos e açúcares (Modro *et al.*, 2007).

As abelhas, ao pousarem sobre as flores, promovem a liberação de grãos de pólen, que caem sobre as flores localizadas nas partes inferiores dos ramos ou da própria inflorescência. Este mecanismo pode favorecer a ocorrência de geitonogamia, ou seja, fecundação pelos grãos de pólen de flores da mesma planta. A principal vantagem deste mecanismo é o aumento do sucesso da polinização. Em um pomar de jabuticabeiras no interior de São Paulo, Malerbo-Souza *et al.* (1991), também encontrou as abelhas *Apis mellifera* (africanizada) e as abelhas nativas, *Tetragonisca angustula* e *Trigona spinipes* como as mais frequentes, sendo estas atraídas para coleta de pólen. Em outro trabalho dos mesmos autores, foram encontradas as abelhas *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula*, *Chloralictus* sp e *Trigona spinipes* como os únicos insetos nas flores de jabuticabeiras,

com as frequências de 98,0%, 0,88%, 0,57% e 0,55%, respectivamente e coletaram exclusivamente pólen (Malerbo-Souza *et al.*, 2004).

Neste estudo, foi registrada também a presença da abelha nativa *Trigona* sp, porém com frequência de visitas inferior a de *Apis mellifera*. Estas abelhas nativas iniciam o forrageio após o pico de visitas de *Apis mellifera*, sendo assim, pouco provável de realizarem, efetivamente, à polinização das jabuticabeiras.

Silva & Pinheiro (2007) também encontraram a abelha *Apis mellifera* como um dos visitantes mais comuns em quatro espécies de *Eugenia*, sendo considerada o polinizador efetivo das espécies estudadas.

A antese, a morfologia floral e os visitantes florais são coincidentes para todas as espécies estudadas, portanto, estes dados, não apresentaram diferenças capazes de identificação de algum tipo de isolamento pré-zigótico entre as diferentes espécies. No entanto, existem claras distinções morfológicas entre as espécies, como evidenciadas nas quatro espécies descritas neste trabalho, que variam em comprimento de pedicelo em todos os táxons analisados e número de estames por flor, sendo menor em *M. trunciflora*, como mostrado na TABELA 1.2. Na ausência de isolamento pré-zigótico, o isolamento pós-zigótico ou genético pode ser uma estratégia para garantir a diferenciação entre as espécies. No capítulo 2, são apresentados dados referentes a experimentos que testaram a hipótese de isolamento genético entre alguns táxons.

## ANEXOS

Tabela 1.2 - Números de estames por flor em quatro espécies de *Myrciaria*.

Espécies	Nº estames (média* ± DP)
<i>M. trunciflora</i>	48 ± 5,3 <sup>a</sup>
<i>M. cauliflora</i>	54,5 ± 4,4 <sup>b</sup>
<i>M. coronata</i>	63,9 ± 3,0 <sup>b</sup>
<i>M. jaboticaba</i>	58,9 ± 4,0 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey-kramer (p=0,05).

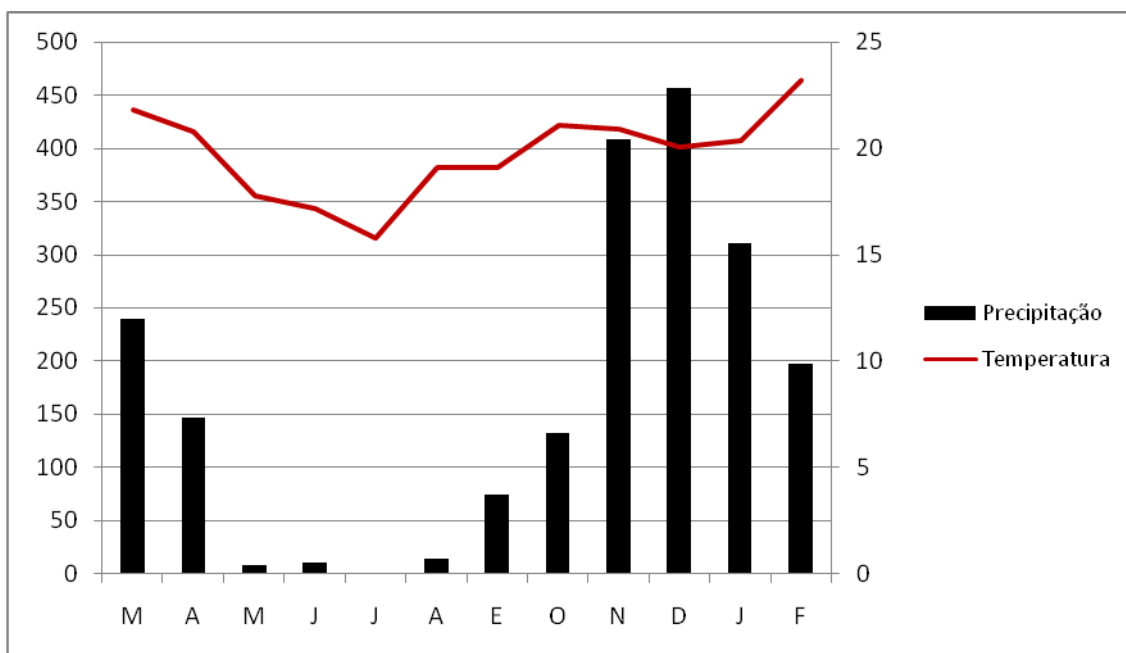
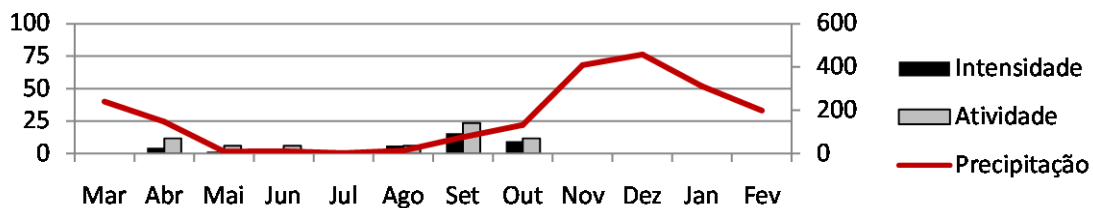
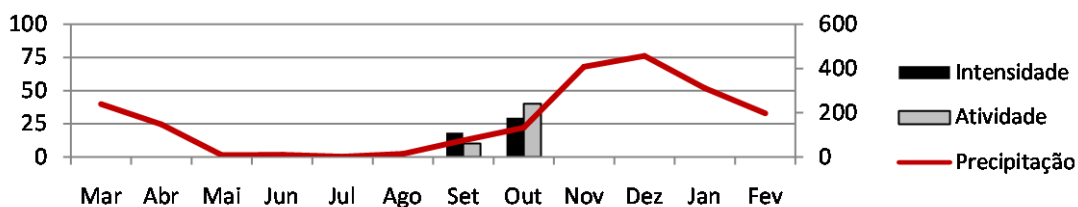
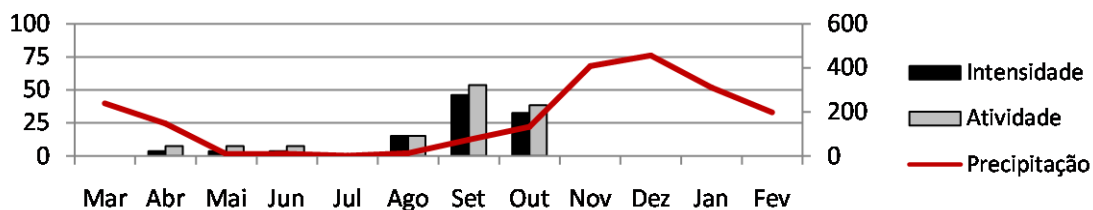
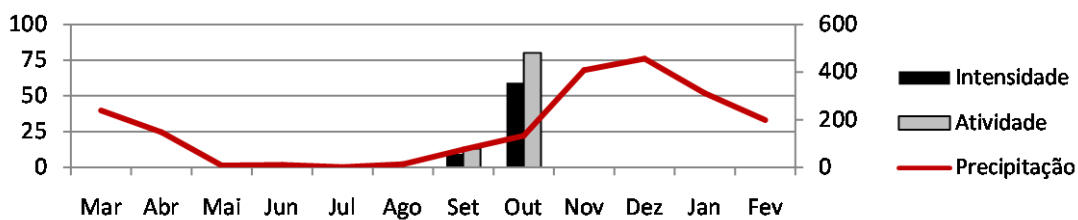


Figura 1.1 - Dados de precipitação (barras) e temperatura média (linha) mensais coletados de março de 2008 a fevereiro de 2009, na Estação de Avisos Fitossanitários da Fundação Pró-Café, em Boa Esperança, Minas Gerais. Fonte: [www.fundacaoprocafe.com.br](http://www.fundacaoprocafe.com.br)



*Myrciaria cauliflora**Myrciaria coronata**Myrciaria jaboticaba**Myrciaria trunciflora*

*Myrciaria* spp. (12 táxons de jaboticabeiras)

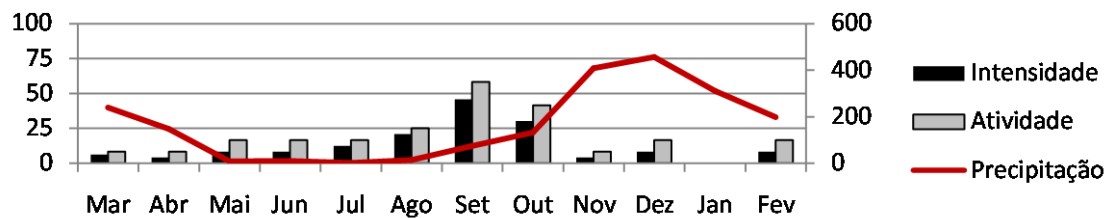


Figura 1.2 - Comparação entre os percentuais de intensidade e atividade de floração de *Myrciaria cauliflora*; *Myrciaria coronata*; *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria trunciflora* e 12 táxons e os dados meteorológicos de precipitação do município de Boa Esperança/MG, no período de março de 2008 a fevereiro de 2009.





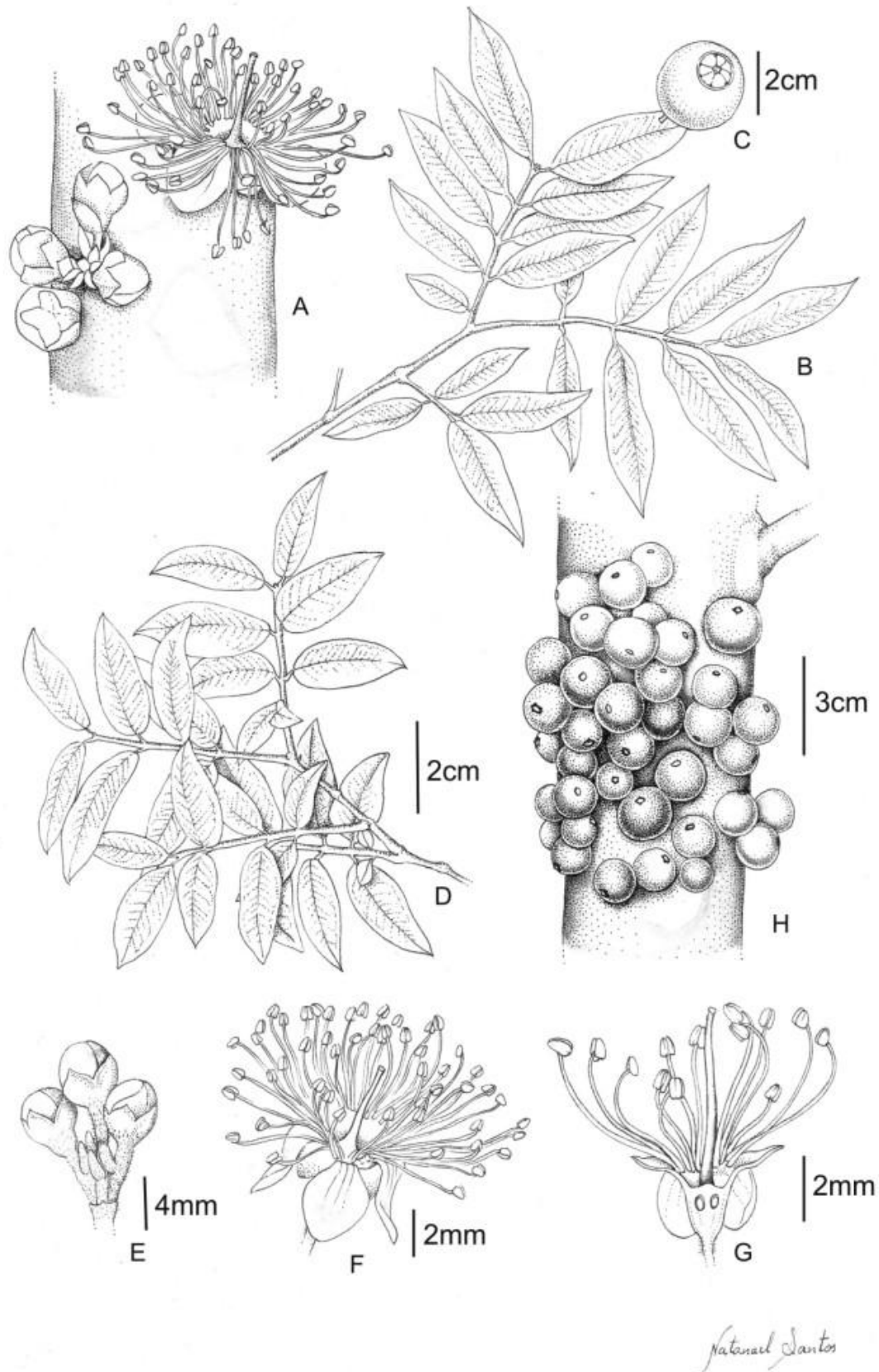


FIGURA 1.3 - *Myrciaria coronata*: A - botão floral; B - folhas; C - fruto; *Myrciaria jaboticaba*: D - folhas; E - botão floral; F - flora aberta; G - corte da flor; H - frutos no tronco.

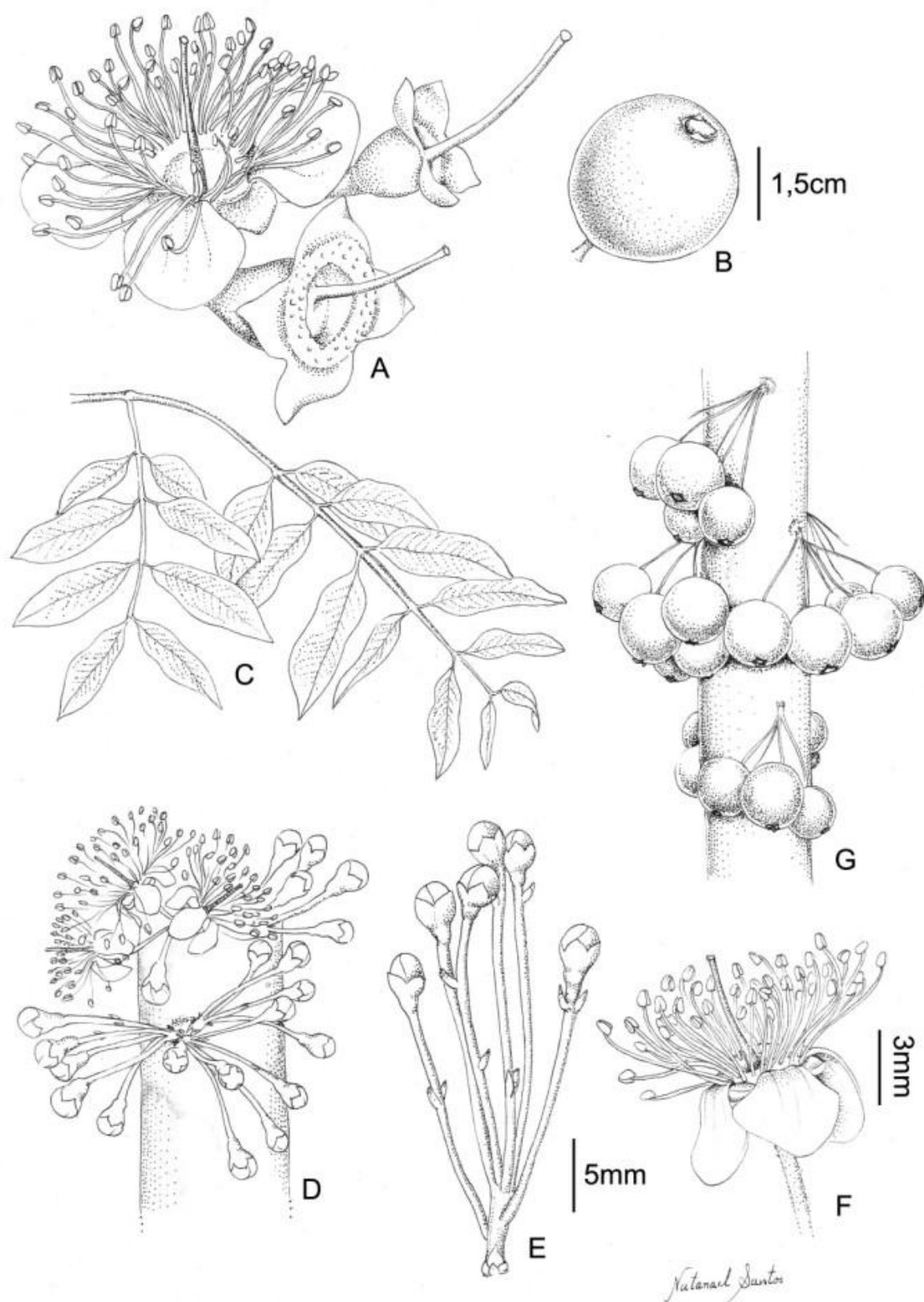


FIGURA 1.4 - *Myrciaria cauliflora*: A - botão floral e flor; B - fruto; *Myrciaria trunciflora*: C - folhas; D - botões florais e flores no tronco; E - botão floral; F - flor aberta; G - frutos no tronco.



FIGURA 1.5 – Fotos de *Myrciaria cauliflora*:  
A – Botão floral e flor; B – Fruto; C – Folhas  
com brotações novas; D – Árvore.



FIGURA 1.6 - Fotos de *Myrciaria jaboticaba*: A - Botão floral e flor; B - Folhas; C - Frutos verdes; D - Árvore.





FIGURA 1.7 – Fotos de *Myrciaria coronata*: A – botão floral; B – Flor; C – Folhas; D – fruto; E – árvore.

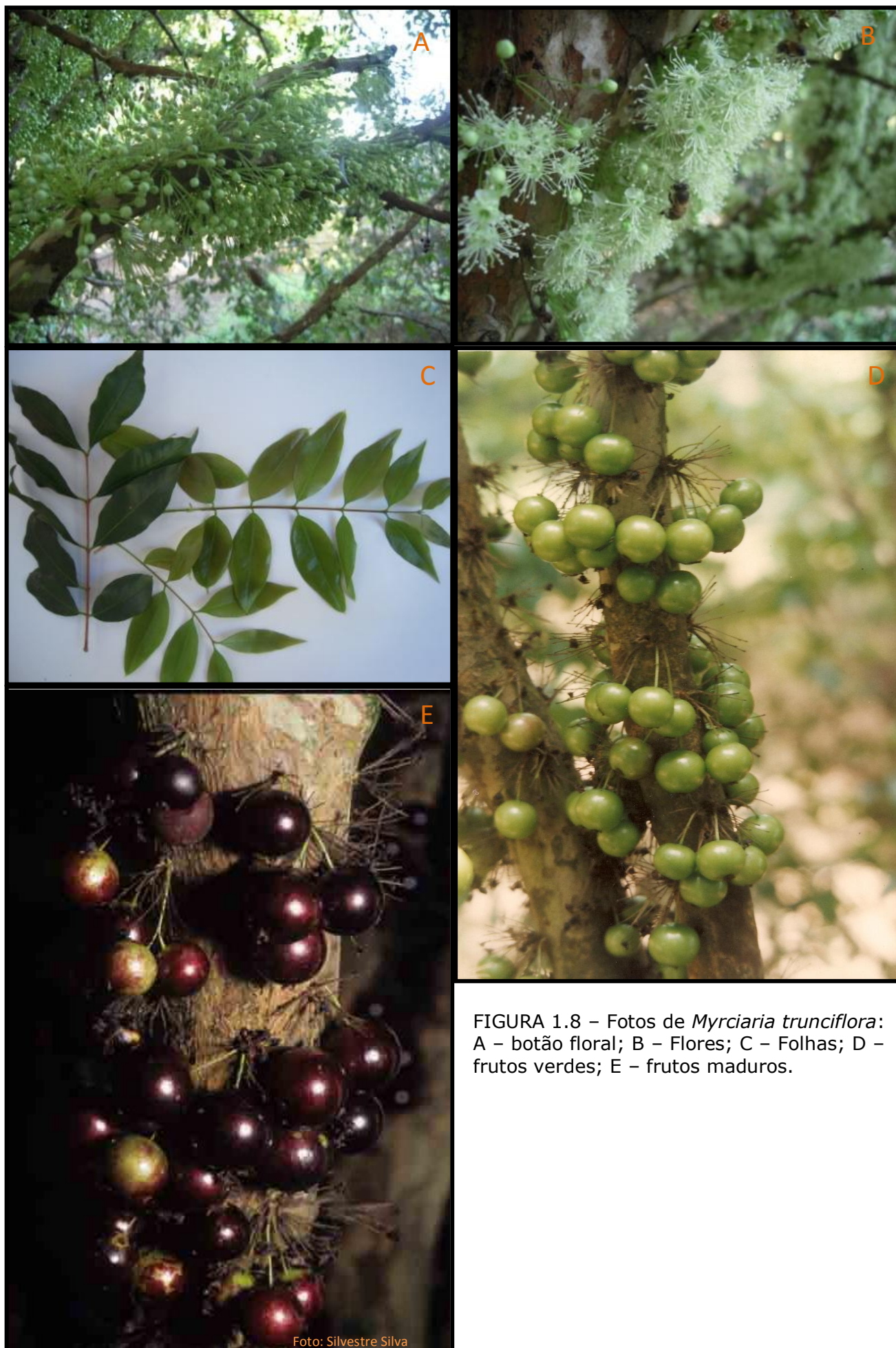


FIGURA 1.8 – Fotos de *Myrciaria trunciflora*: A – botão floral; B – Flores; C – Folhas; D – frutos verdes; E – frutos maduros.



FIGURA 1.9 – A – Flores de *Myrciaria cauliflora* logo após a antese; B – Flores de *M. cauliflora* 5 horas após a antese.



FIGURA 1.10 – *Apis mellifera* coletando pólen em *Myrciaria* sp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J. E. & FREITAS, B. M. 2006. Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Revista Ciência Agronômica* 37(2): 216-220.
- BARROSO, G. M. 1991. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 2.
- BAWA, K. S. 1983. Patterns of Flowering in Tropical Plants. *Annual Missouri Botanical Garden* 68: 301-322.
- BENCKE, S. C. & MORELLATO, L. P. C. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 269-275.
- BENEVIDES, C. R. 2006. Biologia Floral e Polinização de Passifloraceae Nativas e Cultivadas na Região Norte Fluminense-RJ. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 81p.
- BRASIL. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Normas Climatológicas: 1961-1990. Brasília, DF: SPI/Embrapa. 84 p.
- COSTA, C. B. N. 2007. Mecanismos de isolamento reprodutivo em espécies simpátricas: biologia reprodutiva de *Chamaecrista* (Leguminosae-Caesalpinoideae) em Mucugê, Bahia. Dissertação de Mestrado. Feira de Santana, BA. 160p.
- COYNE, J. A. & Orr, H. A. 2004. Speciation. Sunderland: Sinauer.
- DAFNI, A.; KEVAN, P. G. & HUSBAND, B. C. (eds.). 2005. Practical Pollination Ecology. Cambridge: Cambridge University Press. 590p.
- GRESSLER, E.; PIZO, M. A. & MORELLATO, L. P. C. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29(4): 509-530.
- KEARNS C. A. & INOUE D. W. 1993. Techniques for Pollination Biologists. Colorado University Press, Niewot, Colorado. 583p.
- LANDRUM, L. R. & KAWASAKI, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.

LUGHADHA, E. N. & PROENÇA, C. E. B. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: 480-503.

MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H. & TOLEDO, V. A. A. 2004. Abelhas visitantes nas flores da jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.) e produção de frutos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 26(1): 1-4.

MALERBO-SOUZA, D. T.S.; TOLEDO, V. A. A. & NOGUEIRA-COUTO, R. H. 1991. Polinização entomófila em jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). *Ciência Zootécnica, Jaboticabal* 6: 3-5.

MAUÉS, M. M. & COUTURIER, G. 2002. Biologia Flora e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25 (4): 441-448.

MODRO, A. F. H.; MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P. & MEIRA-NETO, J. A. A. 2007. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(8): 1057-1065.

MORELLATO, L. P. C & LEITÃO-FILHO, H. F. 1996. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian Forest. *Biotropica* 28: 180-191.

NEWSTROM, L. E.; FRANKIE, G. W. & BAKER, H. G. 1994. A new classification for plant based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26: 141-159.

PROENÇA, C. E. B. & GIBBS, P. E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytologist* 126: 343-354.

RAGUSO, R. A. 2001. In: *Cognitive ecology of pollination: animal behavior and floral evolution*. Cambridge University Press.

SILVA, A. L. G. da & PINHEIRO, M. C. B. 2007. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botânica Brasileira* 21(1): 235-247.

TALORA, D. C. & MORELLATO, P. C. 2000. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 23(1): 13-26.

## Capítulo 2

# SISTEMA REPRODUTIVO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE JABUTICABEIRAS (*Myrciaria* spp., Myrtaceae)

## RESUMO

Este trabalho buscou investigar o sistema reprodutivo de quatro espécies em simpatria de *Myrciaria* spp. (*Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria coronata* e *Myrciaria trunciflora*), utilizando tratamentos de polinização cruzada interespecíficos e relacionar a distância genética de uma coleção *ex situ* de jabuticabeiras, com o objetivo de identificar possíveis mecanismos de isolamento reprodutivos pós-zigótico. Foram realizados experimentos para analisar a biologia reprodutiva e a capacidade de cruzamentos interespecíficos entre *M. trunciflora* x *M. cauliflora* e *M. jaboticaba* x *M. coronata*. A distância genética foi identificada através de marcadores moleculares tipo RAPD, para todas as 71 plantas existentes na coleção estudada correspondentes a 18 táxons distintos, incluído, pelo menos 5 espécies descritas. Os tratamentos reprodutivos realizados nos mostram que as jabuticabeiras são plantas autocompatíveis e que não há apomixia. Os cruzamentos bidirecionais de polinização entre *M. trunciflora* x *M. cauliflora* e entre *M. jaboticaba* x *M. coronata*, produziram pegamentos de 22 a 27% além de frutos abortados precocemente. As sementes resultantes foram colocadas para germinar logo após à colheita e todos os cruzamentos produziram plântulas normais evidenciando a falta de barreiras genéticas entre as espécies testadas. Esta compatibilidade de intercruzamentos pode ser explorada no melhoramento genético, visando à transferência de caracteres de interesse em genótipos agronomicamente superiores. Foi encontrada pouca diferenciação genética entre os diferentes táxons, sugerindo que a similaridade genética não é compatível com a similaridade morfológica e os principais caracteres de valor taxonômico são polimórficos dentro do gênero.

Palavras-chave: jaboticaba, isolamento reprodutivo, compatibilidade, RAPD.

## ABSTRACT

This work intended to investigate the reproductive system of four sympatric species of *Myrciaria* spp. (*Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*, *Myrciaria coronata* and *Myrciaria trunciflora*) using inter-yew pollination treatment and to relate the genetic distance of one jaboticaba tree *ex situ* population, in order to identify possible postzygote reproductive isolation mechanisms. Reproductive biology treatments and interspecific crossing were realized between *M. trunciflora* x *M. cauliflora* and *M. jaboticaba* x *M. coronata*. The genetic distance was identified through the molecular markers such as RAPD. The reproductive treatments performed showed us that the jaboticaba plants are self-compatible. The bidirectional crossing of intertaxa pollination between *M. trunciflora* x *M. cauliflora* and between *M. jaboticaba* x *M. coronata*, produces gluing of 22% to 27% and presented also a precociously aborted fruits proportion. The jaboticaba tree does not presented parthenogenesis formed fruits. The resultant seeds were placed to germinate just after the picking and in all the crossings normal plantule were produced becoming evident the lack of genetic barriers among the tested species. This characteristic can be explored through genetic improvement, aiming at transferring the interest characters in agronomical superior genotype. Genetic difference associated to intertaxa crossing compatibility was rarely found, suggesting that the genetic similitude is not compatible with the morphologic similitude and that the taxonomic value of main characters is polymorphic in the gender.

Keywords: jaboticaba, reproductive isolation, compatibility, RAPD.



## INTRODUÇÃO

O conhecimento do sistema reprodutivo é essencial para um entendimento do padrão de fluxo gênico, da relação planta-polinizador e da diversidade genética dentro e entre populações (Bawa, 1974), sendo de primordial importância para o entendimento do processo evolutivo das plantas e sua persistência na natureza (Bawa, 1974; Richards, 1997 e Kearns & Inouye, 1993). As barreiras ao fluxo gênico são definidas como mecanismos de isolamento reprodutivo pré e pós-zigóticos (Grant, 1963; Stebbins, 1970 e Dobzansky 1973) e são essenciais no processo de especiação.

A aplicação da genética nos estudos de conservação visa o entendimento da estrutura genética das populações e, para tanto, são necessárias informações básicas sobre a biologia reprodutiva da espécie investigada, além de estudos fenotípicos. O sistema reprodutivo das plantas é consequência de características reprodutivas próprias e, também, de suas interações com o meio ambiente (Dafni *et al.*, 2005).

Estudos investigando sistemas reprodutivos dentro de populações são raros (Ratnayake *et al.*, 2006). Um dos estudos mais abrangentes sobre sistema reprodutivo de espécies florestais foi realizado por Bawa (1974) na Costa Rica. Foi considerado um total estimado de 130 espécies arbóreas, com o seguinte resultado: 14% autocompatíveis; 54% auto-incompatíveis; 22% dióicas e 10% monóicas. Foram também investigadas 34 espécies de 88 espécies hermafroditas que ocorriam na área de estudo, quanto à autocompatibilidade e à auto-incompatibilidade. Entre estas 34 espécies, 27 eram auto-incompatíveis e 7 auto-compatíveis. O autor discutiu sobre o significado evolutivo dos sistemas de cruzamento e, enquanto a prevalência da polinização cruzada em plantas tropicais mantém a variabilidade genética, o mesmo autor concluiu que a

autopolinização pode ocorrer como uma alternativa à pressão de seleção e uma estratégia eficaz para garantir a reprodução.

O trabalho de Proença & Gibbs (1994) foi o primeiro estudo mais amplo sobre biologia reprodutiva de Myrtaceae neotropicais publicado. O estudo foi conduzido no cerrado e foram estudadas oito espécies de Myrtaceae (*Eugenia dysenterica*, *Siphoneugena densiflora*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Camponesia pubescens*, *Camponesia velutina*, *Myrcia linearifolia*, *Myrcia rhodosepala* e *Psidium firmum*). Todas as espécies estudadas foram polinizadas por abelhas e dentre as quatro espécies de árvores três foram consideradas auto-incompatíveis (*Blepharocalyx salicifolius*, *Campomanesia velutina* e *Siphoneugena densiflora*), pois não produziram frutos quando autofecundadas, e apenas uma espécie (*Eugenia dysenterica*) produziu o mesmo número de frutos após fecundação cruzada ou autofecundação.

A jabuticabeira é uma planta nativa da América do Sul (Morton, 1987) e tem sofrido grande erosão genética devido à expansão da agricultura e desmatamento. A manutenção de uma coleção de plantas vivas é uma das estratégias internacionais para deter a elevada perda de biodiversidade, garantindo-se a conservação de espécies ameaçadas em ambientes protegidos. Por ser uma frutífera de ciclo longo e possuir frutos muito perecíveis pós-colheita, a jabuticabeira tem sido uma espécie pouco estudada. Segundo Donadio (2000), algumas espécies encontram-se restritas a coleções e correm o risco de extinção, pois possuem ocorrência restrita a áreas sujeitas ao desmatamento. Os pomares domésticos de jabuticaba ajudam na manutenção de variedades, porém, a preferência por espécies produtivas e com boas características para consumo, também pode causar perda de variabilidade genética. Lorenzi *et al.*(2006) nos alertam para o plantio quase exclusivo de determinadas cultivares mais produtivas em detrimento de outras e

observam a valiosa contribuição de colecionadores de frutíferas para a preservação de nossos recursos genéticos.

Além disso, pouco se conhece sobre a taxonomia das jabuticabeiras e assim como outras Myrtaceae, há uma grande dificuldade quanto à classificação, devido à semelhança de diversas características. McVaugh (1968), citado por Barroso (1991), descreveu como é difícil e tedioso o trabalho de classificação das Myrtaceae americanas e desde seu trabalho, pouco tem sido feito e vários gêneros continuam com limites ambíguos (Landrum & Kawasaki, 1997).

A jabuticabeira é uma planta pouco conhecida geneticamente e estudos envolvendo marcadores moleculares tipo RAPD podem ser úteis na identificação de acessos de um banco de germoplasma (Costa, 2003). Em seu trabalho realizado em Jaboticabal, Costa (2003), além de testar diferentes protocolos para extração de DNA, buscou associação entre marcadores genéticos e morfológicos. Apesar de ter conseguido associação com a maioria dos genótipos, algumas plantas não conseguiram ser agrupadas, mostrando a necessidade de definição dos caracteres morfológicos para distinção entre as espécies.

Os marcadores moleculares têm sido frequentemente utilizados em estudos sobre diversidade e estrutura genética populacional (Zucchi, 2002) e, estes dados, associados a dados geográficos e ecológicos, têm permitido estabelecer relações de grande valor tanto para a manutenção de bancos de germoplasma *ex situ* como *in situ* (Cansian, 2003).

Morfologia floral similar, compartilhamento dos mesmos polinizadores e semelhança na época de floração pode ocasionar fluxo gênico entre as espécies, como foi discutido no capítulo 1, assim como uma estreita base genética pode levar à formação de híbridos em táxons simpátricos.

Neste contexto, o objetivo deste estudo é investigar o sistema reprodutivo de espécies em simpatria de *Myrciaria* spp. utilizando tratamentos de polinização cruzada, identificar possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo pós-zigótico e identificar as estratégias das diferentes espécies para manutenção de sua integridade taxonômica. O trabalho buscou identificar também o grau de distância genética entre os todos os diferentes táxons da população.

Este estudo utilizou como modelo uma população *ex situ* de jabuticabeiras, em Minas Gerais, com 71 plantas de 18 diferentes táxons de diversos estados brasileiros. Dentre as espécies que serão abordadas neste estudo, a *Myrciaria coronata* e *M. jaboticaba* ocorrem em simpatria no Vale do Rio Doce, Minas Gerais, enquanto que no sul do estado ocorrem em simpatria a *M. coronata* e *M. trunciflora* (Marco Lacerda, informação pessoal). A *M. cauliflora* já foi encontrada em simpatria com outras espécies que não foram incluídas neste trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho proposto foi realizado por um ano entre março de 2008 e fevereiro de 2009, em população *ex situ* de jabuticabeiras de aproximadamente 40 anos, localizado no município de Coqueiral, região do Sul de Minas Gerais, Brasil (45°27'58" de latitude, 21°14'74" de longitude e 817m de altitude). Esta coleção conta com 71 plantas e possui exemplares de vários táxons de jabuticabeira, originários de vários estados brasileiros. O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen, definido como subtropical, com inverno seco e verão úmido. Registra temperatura média anual de 19,4°C e precipitação anual em torno de 1.500mm (Brasil, 1992). O entorno da área é formado por matas ciliares e um grande número de espécies florestais e frutíferas, nativas e exóticas. Há também área de plantio de café e pastagens próximos.

## Tratamentos de polinização

Para os estudos de biologia reprodutiva, bem como os cruzamentos controlados foram escolhidas aleatoriamente de 3 a 6 plantas de cada espécie (*Myrciaria cauliflora*, *M. jaboticaba*, *M. coronata* e *M. trunciflora*).

Apomixia: os estames foram retirados antes da abertura da flor, na fase de pré-antese, com ajuda de uma lupa de cabeça e, em seguida, a flor foi ensacada para observação da ocorrência do desenvolvimento do fruto sem fecundação.

Autopolinização manual (autogamia): os grãos de pólen das anteras foram transferidos para o estigma da mesma flor, com a utilização de pinças e, posteriormente, ensacadas com copos de plástico e fixadas com fita crepe ao redor do tronco até o desenvolvimento dos frutos.

Autopolinização espontânea: os indivíduos foram ensacados em fase de botão e observados até a frutificação.

Para as flores abertas à visitação foram marcados trechos dos troncos das árvores, com a utilização de lã colorida, e suas flores foram contadas e observadas até o desenvolvimento dos frutos.

Polinização cruzada: foram realizados cruzamentos interespecíficos entre *M. trunciflora* x *M. cauliflora* e *M. jaboticaba* x *M. coronata*. Os tratamentos de polinização foram realizados com as espécies citadas devido à sobreposição de floração destas espécies. Após a execução dos tratamentos, as flores foram ensacadas em copos plásticos, identificados e acompanhadas até o desenvolvimento dos frutos. Os tratamentos de polinização foram realizados no período da manhã devido a maior oferta de pólen. As sementes resultantes destes cruzamentos foram colocadas para germinar em saquinhos.

## **Material Genético**

A análise genética foi realizada nas 71 plantas da coleção, a fim de verificar a variabilidade genética da população, utilizando-se marcadores genéticos de DNA tipo RAPD. Uma amostra de jameiro rosa (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry - Myrtaceae) foi utilizada como grupo externo. O DNA genômico foi obtido a partir de folhas jovens. O método de extração utilizado foi o CTAB (Lodhi *et al.*, 1994) com modificações. O material genético foi coletado em campo e mantido etiquetado e sob congelamento até o momento da extração do DNA. As plantas foram devidamente marcadas com placas de identificação.

## **Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Instituto de Biologia da UFBA – Campus de Ondina. As folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubos de micro centrífuga de 2 ml. Em seguida foi adicionado 1 ml de tampão de extração CTAB (2% de CTAB; 1 M tris-HCL pH 8,0; 1,4M NaCl; 0,5M EDTA e 1% PVP) e 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol e colocado em banho-maria a 63°C por 60 min. Após este período foi adicionado 700  $\mu$ l de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitando-se lentamente os tubos e centrifugado a 12.000 rpm por 15min, à temperatura de 30°C. O sobrenadante (600  $\mu$ l) foi transferido para outro tubo, onde, em seguida foi adicionado 2/3 do volume (350  $\mu$ l) de isopropanol. O material foi agitado lentamente e levado ao congelador por 1 hora, para precipitação do DNA. Após esse tempo, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet (DNA) foi seco e lavado com etanol a 76% gelado. Após 5 min a solução foi descartada e as paredes novamente secas. O DNA foi

dissolvido em 50 µl de TE (1,0 mM Tris HCl; 0,5 mM EDTA Ph 8,0) e armazenado em congelador a -20°C.

### **Quantificação do DNA genômico**

As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose a 0,8%, com tampão TBE 1X (0,045M tris-borato e 2,0 mM EDTA) e comparadas a 4 concentrações de DNA de padrões previamente conhecidos (Low DNA Mass Ladder). Utilizou-se 2µl de DNA, 7µl de água bidestilada e 3µl de Tampão de Amostra (Ficall 400; EDTA 500mM pH 8,0; Azul de Bromofenol; Xilene Cianole e água).

As amostras a serem utilizadas no RAPD foram diluídas em TE, de modo a conter 10ng/µl de DNA e armazenadas a -20°C.

### **Análise RAPD**

Esta etapa do trabalho foi conduzida no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados 12 primers de 10 bases de sequência arbitrária, desenvolvidos pela Operon Technologies (TABELA 2.1). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient 5331, programado para os ciclos conforme TABELA 2.2.

Para cada reação de PCR foram utilizados 2,25 µl de DNA e 9,76 µl do mix (4,49 µl de água bidestilada; 1,0 µl de tampão; 0,66 µl de dNTP; 2,25 µl de primer; 0,96 µl de *Taq* diluente e 0,4 µl de *Taq* DNA polimerase), obtendo-se 12,01 µl de volume final. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,4%, com eletroforese em tampão TBE 1X a uma voltagem de 100 v por aproximadamente 2,5h. Após este período o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta Fotodyne. O resultado foi documentado através de fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

TABELA 2.1. Primers utilizados e suas respectivas sequências de bases arbitrárias.

Iniciadores Operon	Sequências
AL 01	TGT GAC GAC G
AL 03	CCC ACC CTT G
AL 04	ACA ACG GTC C
AL 05	GAC TGC GCC A
AL 07	CCG TCC ATC C
AL 10	AAG GCC CCT G
AL 15	AGG GGA CAC C
AL 16	CTT TCG AGG G
AL 20	AGG AGT CGG A
AX 05	AGT GCA CAC C
AX 06	AGG CAT CGT G
AX 17	TGG GCT CTG G

TABELA 2.2 - Programa de amplificação utilizado no termociclador.

Passos	Temperatura (°C)	Tempo
1	94	2 minutos
2	94	15 segundos
3	35	30 segundos
4	72	1 minuto
5	Repetir 39x os passos de 2 a 4	
6	72	7 minutos
7	10	finalização

Com os dados obtidos pelas análises do gel de RAPD, foi montada uma matriz binária, onde as bandas polimórficas foram analisadas quanto a sua ausência ou presença, utilizando-se o número "1" para presença de banda e o número "0" para ausência de banda. As amostras que tiveram falha no gel foram identificadas pelo número "-1". Os dados foram transferidos para o programa Excel e analisados através do software Past versão 1.81 (Hammer *et al.*, 2001). Foi obtida uma matriz de similaridade genética, utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard.



## RESULTADOS

### Experimentos de polinização

Os resultados dos experimentos realizados para o estudo do sistema reprodutivo encontram-se na tabela 2.3.

As jaboticabeiras não apresentaram frutos formados por apomixia, ou seja, produção de frutos e sementes com embriões viáveis sem a ocorrência de fecundação em nenhuma das espécies testadas (TABELA 2.3).

TABELA 2.3 - Percentual de frutificação oriunda das polinizações experimentais de apomixia, autopolinização espontânea, autopolinização manual e polinização aberta natural nas quatro espécies de jaboticabeiras. Coqueiral, Minas Gerais.

Espécies	% de frutos formados							
	Apomixia	N	Autopolinização espontânea	N	Autopolinização manual	N	Polinização aberta	N
<i>M. coronata</i>	0%	12	17%	41	33%	6	-	-
<i>M. jaboticaba</i>	0%	8	45%	101	0%	3	44%	135
<i>M. trunciflora</i>	0%	19	8%	41	0%	20	32%	60
<i>M. cauliflora</i>	0%	10	8,6%	58	0%	5	38,5%	88

No tratamento reprodutivo realizado para o teste de autopolinização espontânea, as flores ensacadas antes de sua abertura, em todas as quatro espécies, produziram frutos normais, demonstrando certa autocompatibilidade entre os táxons.

Nos experimentos de autopolinização manual, *Myrciaria coronata* obteve resultado de 33% de pegamento. Para as outras espécies o resultado obtido foi de 0%, provavelmente, devido a algum erro na execução dos tratamentos.

Os cruzamentos bidirecionais de polinização interespecífica entre *M. trunciflora* x *M. cauliflora* e entre *M. jaboticaba* x *M. coronata*, produziram pegamentos de 22 a 27%, conforme tabela 2.4,

que apresenta também a proporção de frutos que foram abortados precocemente.

TABELA 2.4 - Percentual de frutificação oriunda das polinizações experimentais interespecíficas em *Myrciaria* spp. Coqueiral, Minas Gerais.

Cruzamentos realizados	Resultados			N
	Nº frutos desenvolvidos	Frutos abortados	Ñ houve formação de frutos	
<i>M. coronata</i> ♀ x <i>M. jaboticaba</i> ♂	8 (22%)	14 (39%)	14 (39%)	36
<i>M. jaboticaba</i> ♀ x <i>M. coronata</i> ♂	4 (27%)	0 (0%)	11 (73%)	15
<i>M. trunciflora</i> ♀ x <i>M. cauliflora</i> ♂	8 (27%)	7 (23%)	15 (50%)	30
<i>M. cauliflora</i> ♀ x <i>M. trunciflora</i> ♂	5 (23%)	2 (9%)	15 (68%)	22

Em todos os cruzamentos realizados houve formação de frutos, com uma ou mais sementes, não fugindo ao normalmente encontrado nos frutos destas espécies. As sementes foram colocadas para germinar logo após à colheita e de todos os cruzamentos foram produzidas plântulas normais (TABELA 2.5).

TABELA 2.5 - Percentual de germinação das sementes resultantes das polinizações experimentais interespecíficas em *Myrciaria* spp. Coqueiral, Minas Gerais.

Cruzamento	Germinou	N
<i>M. coronata</i> ♀ x <i>M. jaboticaba</i> ♂	25%	12
<i>M. jaboticaba</i> ♀ x <i>M. coronata</i> ♂	100%	6
<i>M. trunciflora</i> ♀ x <i>M. cauliflora</i> ♂	92%	13
<i>M. cauliflora</i> ♀ x <i>M. trunciflora</i> ♂	63%	11

## Marcadores RAPD

Para a análise dos marcadores moleculares foram testados 12 primers, porém, apenas 8 proporcionaram confiabilidade (AL03, AL04, AL05, AL07, AL13, AL15, AX05 E AX06) e foram analisados, sendo que os 4 primers que não apresentaram eficiência na amplificação, não puderam ser analisados. Os 8 primers analisados geraram 37 bandas polimórficas e apenas as bandas mais intensas foram consideradas. Na FIGURA 2.1 temos o dendrograma formado.

Foram excluídos da análise genética cinco genótipos de jabuticabeira por não apresentarem uma quantidade suficiente de ampliações, portanto a análise foi realizada em apenas 66 genótipos de jabuticabeira e 1 de jambeiro rosa. Os subgrupos formados apresentaram divergência genética em torno de 50%.

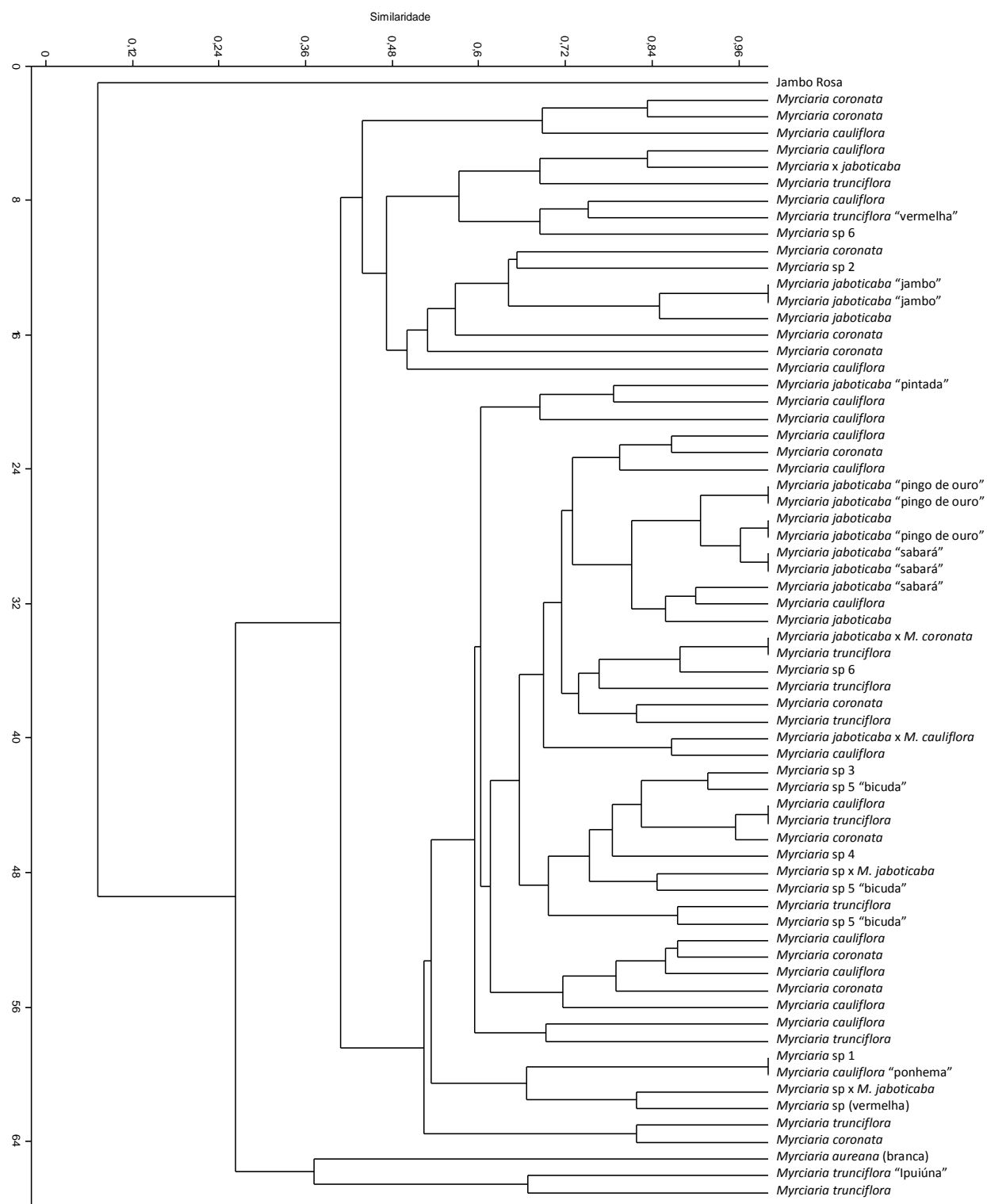


FIGURA 2.1 - Dendrograma de similaridade genética, obtido através do coeficiente de Jaccard, de 66 genótipos de jaboticabeiras e 1 jambeiro rosa.

## DISCUSSÃO

O sistema reprodutivo investigado mostrou que as jabuticabeiras são plantas autocompatíveis, pois as flores produziram frutos mesmo após terem sido ensacadas em fase de botão e não produzem frutos por apomixia. Além disso, são comuns em pomares domésticos, jabuticabeiras plantadas isoladamente e com produção normal de frutos. Apesar de serem autocompatíveis, como evidenciado neste trabalho, segundo Morton (1997) as jabuticabeiras plantadas solitariamente são menos produtivas do que quando plantadas em grupos, indicando que a polinização cruzada incrementa a produção de frutos. Isto fica evidenciado, quando comparamos os resultados dos experimentos de polinização espontânea e polinização aberta (controle).

A polinização aberta produziu pegamento de 44%, 32% e 38,5% para as espécies *Myrciaria jaboticaba*, *M. trunciflora* e *M. cauliflora*, respectivamente, enquanto que a autopolinização espontânea obteve pegamento de 17%, 8% e 8,6% para os táxons, *Myrciaria coronata*, *M. trunciflora* e *M. cauliflora* respectivamente. Com exceção de *M. jaboticaba*, a porcentagem de polinização aberta foi alta, quando comparada com a polinização espontânea. Este incremento da produtividade nos experimentos de polinização aberta evidencia a importância dos polinizadores para esta cultura.

Conforme apresentado no capítulo anterior, as abelhas pousam diretamente sobre as anteras das flores das jabuticabeiras e caminham rapidamente sobre as flores, coletando os grãos de pólen de toda a inflorescência. Este comportamento, além de promover a autopolinização, pode ser favorável a geitonogamia. Conforme descrito por Lughadha & Proença (1996), esse fenômeno é comum em espécies de Myrtaceae, que possuem flores pequenas e com floração concentrada em poucos dias.

A morfologia floral das flores das jabuticabeiras, analisada no capítulo 1, também se mostrou favorável à autopolinização, pelos estames numerosos e voltados para o centro da flor. A autopolinização é uma estratégia eficaz para garantir o sucesso da polinização e, também, uma grande vantagem em locais com deficiência de polinizadores (Bawa, 1974). Segundo Lughadha & Proença (1996), o número de espécies da subfamília Myrtoideae que são autocompatíveis assemelha-se ao das espécies que são incompatíveis. Aproximadamente 20% das plantas superiores são predominantemente autocompatíveis, sendo que a polinização cruzada ocasional nestas espécies possui consequências importantes (Kearns & Inouye, 1993), como incremento da produção e manutenção da variabilidade genética.

Alves & Freitas (2006), em estudo sobre agentes polinizadores da goiabeira (*Psidium guajava* L. – Myrtaceae), encontraram a abelha *Apis mellifera* como a polinizadora mais eficiente para a cultura da goiabeira, principalmente, devido às visitas mais demoradas e por promoverem a queda de grãos de pólen no estigma. Além disso, os autores observaram que o período de pastejo ocorreu durante as primeiras horas do dia, ou seja, horário de maior disponibilidade de alimento no pomar.

Neste estudo, as quatro espécies estudadas quanto à biologia floral, partilham os mesmos polinizadores e a época de florescimento é coincidente conforme visto no capítulo anterior, podendo também favorecer a polinização cruzada e aumentando a variabilidade genética da população. Os tratamentos manipulativos de polinização mostraram compatibilidade interespecífica existente entre as jabuticabeiras (TABELA 2.4). Em todos os experimentos realizados, houve formação de frutos normais e frutos pequenos e mal formados. Ocorreu variação entre 22 a 27% de formação de frutos normais. Esta taxa pode ser considerada alta, quando comparada à taxa de

pegamento da polinização aberta (controle), que não ultrapassou 44%.

As sementes oriundas dos tratamentos manipulativos germinaram normalmente, evidenciando a formação de híbridos. Porém, a não formação de frutos e a formação de frutos não desenvolvidos completamente podem ser resultado de certo grau de incompatibilidade genética ou barreiras pós-zigóticas parciais entre as espécies (FIGURA 2.2).

Entretanto, para assegurar a viabilidade de um híbrido, um parâmetro importante é a sua fertilidade, uma vez que, muitas vezes, diferenças no número cromossômico ou a falta de homologia entre eles acarreta em esterilidade. Os estudos citogenéticos em *Myrciaria* são escassos. Em trabalho de caracterização citogenética, Silveira *et al.* (2006) encontraram números divergentes para a quantidade de cromossomos em duas espécies de jaboticabeira. Em *Myrciaria cauliflora* foi encontrado  $2n=22$  e em *Myrciaria trunciflora*,  $2n=48$ . Costa (2004), que analisou 19 espécies de três gêneros de Mytaceae, incluindo se as espécies *Myrciaria delicatula*, *M. dubia*, *M. tenella*, *Myrciaria sp.*, *Plinia cauliflora* (= *M. cauliflora*) e *Plinia glomerata*, mostra que o número básico da família é  $x = 11$  e todas as espécies de *Myrciaria* e *Plinia* foram diplóides, embora poliplóides tenham sido encontrados no gênero *Eugenia*. Assim, o resultado encontrado por Silveira *et al.* (2006) para *Myrciaria trunciflora* foi considerado surpreendente, com  $2n=48$ . Apesar deste relato, os experimentos de polinização cruzada entre *M. trunciflora* e *M. cauliflora* produziram frutos normais com sementes viáveis.

Ainda que mecanismos de isolamento pós-zigóticos como esterilidade ou degenerescência do híbrido sejam confirmados no futuro, a compatibilidade de cruzamentos mostrada neste trabalho remete a uma possível pequena diferenciação genética e o isolamento seria atribuído principalmente ao isolamento geográfico. No entanto,

existem espécies ocorrendo em simpatria na natureza e, também, em cultivos.

Conforme relatado por M. Lacerda (informação pessoal), *Myrciaria jaboticaba* e *M. coronata* ocorrem em simpatria no Vale do Rio Doce, Minas Gerais. Neste trabalho, estas espécies foram hibridizadas e houve formação de frutos normais. Dessa forma, podemos inferir que a inexistência de isolamento pré ou pós-zigóticos entre eles pode levar a produção de híbridos em áreas de ocorrência natural. Algumas populações podem estar sendo observadas no caminho para o processo de especiação. Elas são parcialmente diferenciadas, possuem algum tipo de isolamento e são de difícil classificação (Frankham *et al.*, 2008).

A diferenciação genética entre as espécies de jabuticabeiras nos poucos estudos realizados com o gênero, todos utilizando o marcador de RAPD, mostraram pouca diferenciação entre as espécies, uma vez que formaram clados agrupando poucas plantas (Pereira, 2003), evidenciando uma base genética comum entre todas as jabuticabeiras (Costa, 2003).

Neste trabalho, da mesma forma encontramos uma clara falta de definição dos grupos taxonômicos. Os agrupamentos de diferentes níveis de similaridade genética entre os táxons estudados, não correspondem às classificações taxonômicas.

Analisando o dendrograma obtido neste trabalho (FIGURA 2.1), pode-se notar a grande divergência genética entre os táxons, em torno de 50%, inclusive nos táxons classificados como semelhantes, resultado este, semelhante ao apresentado por Costa (2003). Isto pode ser reflexo da dificuldade de classificação do gênero *Myrciaria*, e indica uma necessidade de definição das características morfológicas efetivamente discriminantes para as espécies. Com base nos resultados obtidos, podemos sugerir que os principais caracteres de valor taxonômico são polimórficos dentro do gênero.



As plantas utilizadas nos cruzamentos interespecíficos tiveram resultados diferentes em relação à distância genética, onde tanto plantas que foram agrupadas e plantas que ficaram em clados diferentes tiveram resultados semelhantes. Como todos os cruzamentos tiveram resultados de pegamentos em torno de 25%, isto significa que a divergência genética não influenciou a capacidade de cruzamento.

Na análise genética foi utilizada uma amostra de jambeiro rosa (*Syzygium malaccense* – Myrtaceae) como grupo externo. Como podemos observar no dendrograma, esta planta aparece distante geneticamente das demais jaboticabeiras, conforme esperado. Podemos notar, também, que algumas plantas pertencentes à mesma espécie, como por exemplo, de *Myrciaria jaboticaba* (*M. jaboticaba* “jambo”, “sabará” e “pingo de mel”) e *Myrciaria* sp “bicuda” foram agrupadas num clado comum, indicando que a técnica pode ser útil na caracterização da variabilidade genética de populações.

Além disso, neste estudo foram realizadas análises de DNA de 71 plantas originadas de vários estados brasileiros e, dentre estas plantas foram identificados 18 táxons diferentes, mostrando assim, a grande diferença morfológica e diversidade genética desta coleção. A capacidade de intercruzamento evidenciada neste trabalho pode ser explorada no melhoramento genético da espécie, visando a transferência de caracteres de interesse presentes em algum genótipo agronomicamente superior.



FIGURA 2.2 - Fruto em início de formação referente ao cruzamento entre *Myrciaria coronata* x *Myrciaria jaboticaba*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J. E. & FREITAS, B. M. 2006. Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Revista Ciência Agronômica* 37(2): 216-220.
- BARROSO, G. M. 1991. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 2.
- BAWA, K. S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* 28: 85-92.
- BRASIL. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Normas Climatológicas: 1961-1990. Brasília, DF: SPI/Embrapa. 84 p.
- CANSIAN, R. L. 2003. Variabilidade genética de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hill) do Brasil, visando a conservação da espécie. Tese de Doutorado. Universidade de São Carlos, São Carlos, SP. 82p.
- COSTA, I. R. 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 80p.
- COSTA, J. R. V. da. 2003. Uso de marcadores morfológicos e moleculares do tipo RAPD em jaboticabeiras (*Myrciaria* spp.). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP. 59p.
- DAFNI, A.; KEVAN, P.G. & HUSBAND, B. C. (eds.). 2005. *Practical Pollination Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press. 590p.
- DOBZANSKY, T. 1973. *Genética do processo evolutivo*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo.
- DONADIO, L. C. 2000. Jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg]. Jaboticabal: FUNEP, 55p.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. & BRISCOE, D. A. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Sociedade Brasileira de Genética: Editora SBG, 262 p.

GRANT, V. 1963. The Origin of adaptations. New York: Columbia University Press. 606p.

HAMMER, Ø; HARPER, D. A. T. & RYAN, P. D. 2001. Past: Paleontological Statistical software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica*, v. 4, p. 1-9. Disponível em: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>

KEARNS C. A. & INOUE D. W. 1993. Techniques for Pollination Biologists. Colorado University Press, Niewot, Colorado. 583p.

LANDRUM, L. R. & KAWASAKI, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F. & REISCH, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13.

LORENZI, H.; BACKER, L.; LACERDA, M. & SARTORI, S. 2006. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas. São Paulo. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 640p.

LUGHADHA, E.N. & PROENÇA, C. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: 480-503.

MORTON, J. 1987. Jaboticabas. p. 371-374. In: *Fruits of warm climates*. Julia F. Morton, Miami, FL.

PEREIRA, M. 2003. Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de jaboticabeiras (*Myrciaria* spp.). Tese de Doutorado. Piracicaba, SP. 86p.

PROENÇA, C. E. B. & GIBBS, P. E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytologist* 126: 343-354.

RATNAYAKE, R. M. C. S.; SU, Y. C. F.; GUNATILLEKE, I. A. U. N.; WIJESUNDARA, D. S. A. & SAUNDERS, R. M. K. 2006. Reproductive biology of two sympatric species of *Polyalthia* (Annonaceae) in Sri Lanka. II. Breeding Systems and population genetic structure. *International Journal of Plant Sciences* 167(3):495-502.

RICHARDS, A. J. 1997. *Plant Breeding Systems*. London: Chapman & Hall. 529p.

SILVEIRA, F. T.; ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F. & MORO, J. R. 2006. Caracterização citogenética em duas espécies do gênero *Myrciaria*. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 6(2): 327-333.

STEBBINS, G. L. 1970. *Processos de Evolução Orgânica*. São Paulo: Polígono e Edusp. 255p.

ZUCCHI, M. I. 2002. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP. 130p.

## CONCLUSÃO GERAL

- Os táxons de jabuticabeira estudados em Minas Gerais apresentam floração anual e florescem, principalmente, no início da estação chuvosa. Com exceção de *Myrciaria aureana* e *Myrciaria* sp 1 (Vermelha) que tiveram floração extemporânea.
- A morfologia floral se mostrou similar entre as quatro espécies analisadas: *Myrciaria coronata*, *Myrciaria trunciflora*, *Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba*.
- A abelha *Apis mellifera* foi considerada a principal polinizadora da frutífera, apresentando comportamento pilhador e procurando a planta para coleta de pólen, principal recurso floral.
- As espécies de jabuticabeiras são autocompatíveis, porém com certa taxa de polinização cruzada, e não produzem frutos por apomixia. Apesar da autocompatibilidade as flores que receberam os visitantes florais obtiveram maior sucesso reprodutivo.
- Não foi encontrado isolamento pré-zigótico temporal ou mecânico entre as espécies *Myrciaria coronata*, *Myrciaria trunciflora*, *Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba*. Nos cruzamentos realizados entre *M. trunciflora* x *M. cauliflora* e *M. jaboticaba* x *M. coronata* houve formação de frutos com sementes viáveis, indicando a inexistência de isolamento pós-zigótico entre eles e, também, frutos pequenos e mal formados, podendo ser resultado de certa incompatibilidade genética.
- Todos os genótipos analisados através dos marcadores moleculares tipo RAPD demonstraram a estreita base genética das jabuticabeiras e a necessidade de definição de padrões para caracterização botânica das espécies. Este limiar estreito se mostra como um grande desafio para os taxonomistas e indica que a taxonomia das jabuticabeiras deve ser revista.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALBORES-ORTIZ, O. & SOSA, V. 2006. Polinización de dos especies simpátricas de *Stelis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta Botanica Mexicana* 74: 155-168.

ALVES, J. E. & FREITAS, B. M. 2006. Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Revista Ciência Agronômica* 37(2): 216-220.

ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. & THOMAZ, L. D. 2004. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). *Revista Brasileira de Botânica* 27(2): 349-361.

BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P. de & LOPES, G. K. B. 2005. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(9): 899-909.

BARROSO, G.M. 1991. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 2.

BAWA, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* 28: 85-92.

BAWA, K. S. 1983. Patterns of Flowering in Tropical Plants. *Annual Missouri Botanical Garden* 68: 301-322.

BAWA, K.S.; KANG, H. & GRAYUM, M.H. 2003. Relationships among time, frequency, and duration of flowering in tropical rain forest trees. *American Journal of Botany* 90(6): 877-887.

BENCKE, S.C. & MORELLATO, L.P.C. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 269-275.

BENEVIDES, C. R. 2006. Biologia Floral e Polinização de Passifloraceae Nativas e Cultivadas na Região Norte Fluminense-RJ. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 81p.

BRASIL. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Normas Climatológicas: 1961-1990. Brasília, DF: SPI/Embrapa. 84 p.

BRIGGS, B. C. & JOHNSON, L. A. S. 1979. Evolution in the Myrtaceae-evidence from inflorescence structure. Proc. Linn. Soc. New South Wales 102: 157-256.

BRUNA, S.; GIOVANNINI, A. de; BENEDETTI, L.; PRINCIPATO, M. C. & RUFFONI, B. 2006. Molecular analysis of *Salvia* spp. through RAPD markers. Acta Horticulturae (ISHS) 723:157-160.

CANSIAN, R. L. 2003. Variabilidade genética de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hill) do Brasil, visando a conservação da espécie. Tese de Doutorado. Universidade de São Carlos, São Carlos, SP. 82p.

CASTRO, G. 2007. Turismo em volta da árvore – Sabores do Brasil. O Sulco: 18-19.

COSTA, C. B. N. 2007. Mecanismos de isolamento reprodutivo em espécies simpátricas: biologia reprodutiva de *Chamaecrista* (Leguminosae-Caesalpinioideae) em Mucugê, Bahia. Dissertação de Mestrado. Feira de Santana, BA. 160p.

COSTA, C. B. N., LAMBERT, S. M., BORBA, E. L. & QUEIROZ, L. P. de. 2007. Post-zigotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae – Caesalpinioideae). Annals of Botany 99: 625-635.

COSTA, I. R. 2004. Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 80p.

COSTA, J. R. V. da. 2003. Uso de marcadores morfológicos e moleculares do tipo RAPD em jaboticabeiras (*Myrciaria* spp.). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP. 59p.

COYNE, J. A. & Orr, H. A. 2004. Speciation. Sunderland: Sinauer.

CRUZ, A. V. M. & KAPLAN, M. A. C. 2004. Estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Macromoleculares. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense.

DAFNI, A.; KEVAN, P.G. & HUSBAND, B. C. (eds.). 2005. Practical Pollination Ecology. Cambridge: Cambridge University Press. 590p.

DOBZANSKY, T. 1973. Genética do processo evolutivo. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo.



DONADIO, L. C. 2000. Jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg]. Jaboticabal: FUNEP, 55p.

FAEGRI, K. & van der PIJL, L. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press. Oxford-New York. 243p.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. & BRISCOE, D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética: Editora SBG, 262 p.

FUTUYMA, D. J. 1992. Biologia Evolutiva. 2ª ed. Ribeirão Preto. Editora da SBG. 631p.

FUTUYMA, D. J. 2002. Evolução, Ciência e Sociedade. São Paulo: Editor de Livros, SBG. 46p.

GRANT, V. 1963. The Origin of adaptations. New York: Columbia University Press. 606p.

GRANT, V. 1971. Plant Speciation. New York: Columbia University Press. 435p.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A. & MORELLATO, P.C. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. Revista Brasileira de Botânica 29(4): 509-530.

HAMMER, Ø; HARPER, D. A. T. & RYAN, P. D. 2001. Past: Paleontological Statistical software package for education and data analysis. Palaentologia Electronica, v. 4, p. 1-9. Disponível em: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>

HODGES, S. A. & ARNOLD, M. L. 1994. Floral and ecological isolation between *Aquilegia formosa* and *Aquilegia pubens*. Evolution 91: 2493-2496.

KEARNS C. A. & INOUE D. W. 1993. Techniques for Pollination Biologists. Colorado University Press, Niewot, Colorado. 583p.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P. & LOVATO, M. B. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. Lundiana 3(2): 87-92.

LANDRUM, L. R. & KAWASAKI, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F. & REISCH, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13.

LORENZI, H. 1998. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, v.1, 352p.

LORENZI, H.; BACKER, L.; LACERDA, M. & SARTORI, S. 2006. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas. São Paulo. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 640p.

LUGHADHA, E.N. & PROENÇA, C. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: 480-503.

MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H. & TOLEDO, V. A. A. 2004. Abelhas visitantes nas flores da jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.) e produção de frutos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 26(1): 1-4.

MALERBO-SOUZA, D. T.; TOLEDO, V. A. A. & NOGUEIRA-COUTO, R. H. 1991. Polinização entomófila em jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). *Ciência Zootécnica, Jaboticabal* 6: 3-5.

MARCHIORI, J. N. C. & SOBRAL, M. 1997. Dendrologia das angiospermas – Myrtales. Editora da UFSM, Santa Maria. 304p.

MATTOS, J. R. de. 1983. Frutíferas Nativas do Brasil: Jaboticabeiras. Porto Alegre, RS. 92p.

MAUÉS, M. M. & COUTURIER, G. 2002. Biologia Flora e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25 (4): 441-448.

MEIRA-NETO, J. A. A. & MARTINS, F. R. 2002. Composição florística de uma floresta estacional semidecidual Montana no município de Viçosa – MG. *Revista Árvore*, 26(4): 437-446.

METTLER, L. E. 1969. Population Genetics and Evolution. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

METTLER, L. E. & GREGG, T. G. 1973. Genética de Populações e Evolução. Polígono, São Paulo, 262p.

MODRO, A. F. H., MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P. & MEIRA-NETO, J. A. A. 2007. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42(8): 1057-1065.

MORELLATO, L. P. C. & LEITÃO-FILHO, H.F. 1996. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian Forest. Biotropica 28: 180-191.

MORELLATO, L. P. C.; TALORA, D. C.; TAKAHASI, A.; BENCKE, C. C., ROMERA, E. C. & ZIPPARRO, V. B. 2000. Phenology of Atlantic rain forest trees – a comparative study. Biotropica 32 (4b): 811-823.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M. de & SANTOS, T. S. dos. 1983. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern brazilian wet forest. Biotropica, 15: 68-70.

MORTON, J. F. 1987. Jaboticabas. P. 371–374. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL.

NEWSTROM, L. E.; FRANKIE, G. W. & BAKER, H. G. 1994. A new classification for plant based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. Biotropica 26: 141-159.

OLIVEIRA, A. L. de; BRUNINI, M. A.; SALANDINI, C. A. R. & BAZZO, F. R. 2003. Caracterização tecnológica de jaboticabas 'Sabará' provenientes de diferentes regiões de cultivo. Revista Brasileira de Fruticultura 25 (3): 397-400.

PEIXOTO, A. L. & GENTRY, A. 1990. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). Revista Brasileira de Botânica 13: 19-25.

PEREIRA, M. 2003. Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de jaboticabeiras (*Myrciaria* spp.). Tese de Doutorado. Piracicaba, SP. 86p.

PEREIRA, R. Revista Saúde é Vital. Ed. Abril 2005 nº 259. [http://saude.abril.com.br/edicoes/0259/nutricao/conteudo\\_87702.shtml](http://saude.abril.com.br/edicoes/0259/nutricao/conteudo_87702.shtml)

PIGATO, S. M. P. C. & LOPES, C. R. 2001. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio de marcadores moleculares RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. Scientia Forestalis 60: 135-148.

PROENÇA, C. E. B. & GIBBS, P. E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytologist* 126: 343-354.

RAGUSO, R. A. 2001. In: *Cognitive ecology of pollination: animal behavior and floral evolution*. Cambridge University Press.

RATNAYAKE, R. M. C. S.; SU, Y. C. F.; GUNATILLEKE, I. A. U. N.; WIJESUNDARA, D. S. A. & SAUNDERS, R. M. K. 2006. Reproductive biology of two sympatric species of *Polyalthia* (Annonaceae) in Sri Lanka. II. Breeding Systems and population genetic structure. *International Journal of Plant Sciences* 167(3):495-502.

RICHARDS, A. J. 1997. *Plant Breeding Systems*. London: Chapman & Hall. 529p.

ROMAGNOLO, M. B. & SOUZA, M. C. de. 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 Botânica Brasileira*, São Paulo, v. 18, n. 3.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. & CARPENTIERI-PÍPOLO, V. 2002. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(1): 15-22.

SARGENT, R. D. 2004. Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 603-608.

SILVA, A. L. G. da & PINHEIRO, M. C. B. 2007. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botânica Brasileira* 21(1): 235-247.

SILVEIRA, F. T.; ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F. & MORO, J. R. 2006. Caracterização citogenética em duas espécies do gênero *Myrciaria*. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 6(2): 327-333.

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. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 462p.

SOBRAL, M. 1985. Alterações Nomeclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). *Boletim do Museu Botânico de Curitiba* 63: 1-4.

SOUZA, J. S.; ESPÍRITO-SANTO, F. D. B.; FONTES M. A. L.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. de & BOTEZELLI, L. 2003. Análise das

variações florísticas e estruturais da comunidade arbórea de um fragmento de floresta semidecídua às margens do rio Capivari, Lavras-MG. *Revista Árvore*, Viçosa, MG 27(2): 185-206.

STEBBINS, G. L. 1970. *Processos de Evolução Orgânica*. São Paulo: Polígono e Edusp. 255p.

TALORA, D. C. & MORELLATO, P. C. 2000. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 23(1): 13-26.

TANG, L. L. ; YU, Q. ; SUN, J. F. & HUANG, S. Q. 2007. Floral traits and isolation of three sympatric *Aquilegia* species in the Qinling Mountains, China. *Plant Systematics and Evolution* 267: 121-128.

TYAGI, A.P. 2002. Chromosomal pairing and pollen viability in *Rhizophora mangle* and *Rhizophora stylosa* hybrids. *South Pacific Journal of Natural Science* 20: 1-3.

VILELA, G. F. 1998. *Variações naturais de Caryocar brasiliense Camb. (Cariocaraceae): fenológicas, genéticas e de valores nutricionais de frutos*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Florestais. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 88p.

WERNECK, M. S.; PEDRALLI, G.; KOENIG, R. & GIESEKE, L. F. 2000. Florística e estrutura de três trechos de uma floresta semidecídua na Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto, MG. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 97-106.

ZUCCHI, M. I. 2002. *Análise da estrutura genética de Eugenia dysenterica DC utilizando marcadores RAPD e SSR*. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP. 130p.