

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética

Filogeografia de *Passiflora ovalis*

Caroline Gross Dutra

Orientadora: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Co-orientadora: Dra. Aline P. Lorenz-Lemke

Trabalho apresentado como requisito para obtenção
do grau de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Porto Alegre, Novembro de 2008

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS
- Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Programa Especial em Taxonomia – PROTAX (MCT/CNPq/CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS).

AGRADECIMENTOS

À Dra. Loreta Brandão de Freitas pela orientação deste trabalho, por ter me mostrado o maravilhoso mundo da genética e evolução, pelas conversas quando tudo parecia que nada ia dar certo e pelos ensinamentos que levarei para minha vida profissional.

À Dra. Aline Pedroso Lorenz-Lemke por toda ajuda no laboratório, na confecção dos resumos de congressos e SICs, pela paciência infinita de me fazer entender todas as estatísticas.

Às minhas colegas de graduação e também amigas Raquel, Tielli, Pakisa e Aline Ramos, com as quais compartilhei cada momento de dificuldades e de vitórias ao longo de três anos no laboratório.

Aos colegas de laboratório Jéferson, Geraldo e Pri, aos quais sempre pude recorrer quando surgiam as dúvidas e que sempre me ajudaram em tudo.

À minha família por todo apoio desde o início, vocês participaram de todas as alegrias e decepções ao longo da graduação, inclusive a Darinha!

Ao Clênio pelas conversas descontraídas, cadinhos lavados em época de pulverizações, pelos branquinhos e quindins que levava de sobremesa!

Aos colaboradores deste trabalho.

Ao Diego por todo amor, compreensão e companheirismo nos finais de semana anteriores às provas e entregas de trabalhos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade.

Às Instituições e Fontes Financiadoras.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1 O gênero <i>Passiflora</i> L.	4
1.2 A espécie <i>Passiflora ovalis</i>	5
1.3 A Mata Atlântica.....	7
1.4 Filogeografia.....	10
1.5 Os marcadores utilizados.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	15
3.1 Coletas.....	15
3.2 Extração de DNA.....	16
3.3 Amplificação das seqüências.....	17
3.4 Purificação dos produtos de PCR com PEG.....	19
3.5 Seqüenciamento automático.....	19
3.6 Análise das seqüências de DNA.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Caracterização dos marcadores.....	22
4.1.1 Variabilidade de ITS.....	23
4.2 Distribuição espacial da variabilidade genética.....	25
4.2.1 Padrão espacial da variação no marcador <i>trnS-trnG</i>	26
4.2.2 Padrão espacial da variação no marcador ITS.....	27
4.3 Estrutura populacional.....	27
4.4 Barreiras biogeográficas.....	33
4.5 Perspectivas.....	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. Introdução

1.1 O gênero *Passiflora* L.

A família Passifloraceae é atualmente dividida em duas tribos: Paropsiae, com seis gêneros no Velho Mundo, África e Madagascar, e Passifloraceae com quatorze gêneros dos quais cinco no Novo Mundo e nove no Velho Mundo (Escobar, 1988). No Brasil, os gêneros encontrados são *Passiflora* L., *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Tetrastylis* Barb.Rodr. Este último foi reconhecido por Feuillet & MacDougal (2003) como uma seção pertencente ao gênero *Passiflora*, sendo reconhecidos, atualmente, apenas três gêneros no País.

O gênero *Passiflora* é composto por 525 espécies, exibindo uma alta diversidade de estruturas florais e vegetativas e uma complexa taxonomia, as quais incluem muitas seções e séries. Apresentam-se como trepadeiras herbáceas ou lenhosas e também como ervas e arbustos. Estruturas especializadas como nectários extra-florais e gavinhas são características comuns entre as espécies de *Passiflora*. No entanto, são outras características mais marcantes que reúnem estas espécies em um mesmo gênero: sua corona de filamentos, cinco estames e órgãos reprodutivos unidos formando uma estrutura denominada androginóforo (Ulmer & McDougal, 2004).

É possível observar um alto grau de heterofilia entre alguns representantes do gênero. Podem apresentar folhas de lâminas inteiras até pentalobadas em uma mesma espécie. Essa diversidade de formas foliares é uma estratégia de defesa (mimetismo) contra predação, principalmente por lagartas (Ulmer & McDougal, 2004). Já a diversidade de estruturas florais pode ser resultado de seleção natural na qual estariam fortemente envolvidos seus agentes polinizadores como fatores seletivos (Koschnitzke, 1993). Há várias classes de animais que são agentes polinizadores de *Passiflora*. Estes, por sua vez, são atraídos por um conjunto de características florais especializadas que

caracterizam a síndrome floral da planta. Em *Passiflora*, a síndrome floral predominante é a melitofilia, sendo grande parte das espécies polinizadas por abelhas. Também ocorrem as síndromes da ornitofilia (beija-flores), quiropterofilia (morcegos) e esfingofilia (mariposas) (Koschnitzke, 1993; Varassin & Silva, 1999). A dispersão das sementes em *Passiflora* é realizada frequentemente por aves, morcegos e também por mamíferos de pequeno porte, que são atraídos pelo cheiro agradável e pela coloração dos frutos.

1.2 *Passiflora ovalis* Vell. Ex Roemer

A espécie *Passiflora ovalis* Vell. Ex Roemer pertence ao subgênero *Deidamioides*. Em *Natürlichen Pflanzenfamilien* (Harms, 1897) foi criada a seção *Tetrastylis*, onde a espécie passou a ser nomeada de *Tetrastylis ovalis*. Esta espécie foi separada das demais de *Passiflora* por apresentar quatro estigmas e estiletos, enquanto que nas outras espécies a condição comum é encontrar três de cada uma destas estruturas. Além desta característica, seu androginóforo é inclinado. No entanto, estas características não são suficientes para separá-la em um gênero distinto, pois também são encontradas em outras espécies de *Passiflora* (Vitta & Bernacci, 2004). Cerca de 2% das espécies de *Passiflora* são polinizadas por morcegos, como é o caso de *P. ovalis* (Figura 1). As características que definem sua síndrome de quiropterofilia são sua coloração branca, flores zigomórficas, concentração de açúcar no néctar e a grande quantidade de pólen em grandes anteras. Outras características como antese noturna e a posição inclinada das anteras são clássicos da síndrome de quiropterofilia (Buzato & Franco, 1992).



Figura 1. a) Flor de *Passiflora ovalis* em detalhe; b) Flor de *P. ovalis* sendo visitada por morcego do gênero *Anoura*.

Passiflora ovalis ocorre em áreas de Mata Atlântica, próximas ao litoral, desde o estado de São Paulo até o estado de Pernambuco. Vitta e Bernacci (2004) sugeriram que estas populações localizadas em diferentes regiões deveriam ser consideradas como espécies diferentes devido a diferenças na estrutura de suas flores. Populações do norte da distribuição (Espírito Santo, Bahia e Pernambuco) seriam consideradas por estes autores como *Passiflora contracta*, enquanto as populações do sul (São Paulo e Rio de Janeiro) seriam *Passiflora ovalis*. *P. contracta* apresenta inflorescências racemiformes (7 a 12 cm de comprimento), não possuem pedúnculo floral, pedicelo articulado (de 1,3 a 2,7 cm de comprimento) o que dá uma aparência sésil à flor. *Passiflora ovalis* apresenta inflorescências paniculiformes (30 a 90 cm de comprimento), pedúnculos alongados (6 a 15 mm de comprimento) e dois a três pedicelos articulados de 4 a 5,5 cm de comprimento. Em 2006, Cervi sinonimizou *P. ovalis* e *P. contracta*, uma vez que para este autor as características florais que distinguem as duas espécies variam muito nas populações naturais e que estas estruturas podem sofrer influências do ambiente. Desta forma, os indivíduos analisados no presente estudo foram considerados como *P. ovalis*.

1.3 A Mata Atlântica

O surgimento da Mata Atlântica está intimamente ligado à origem da Cordilheira dos Andes, quando a placa de Nazca, localizada na costa oeste da América do Sul se deslocou para o leste e colidiu com a placa sul-americana, cujo movimento vinha no sentido contrário. A placa de Nazca mergulhou sob a placa sul-americana, resultando no levantamento desta última (Kious & Tilling, 1996). Como resultado, houve o soerguimento da placa sul-americana na porção leste do continente com força suficiente para erguer o complexo cristalino. Este soerguimento provocou fraturas e conseqüente elevação do terreno em diferentes níveis seguido de afundamento de blocos de rochas, criando as ladeiras íngremes, as quais caracterizam a Serra do Mar (Almeida, 1976). Durante 80 milhões de anos, o processo de erosão causado pelas chuvas e ventos causou o acúmulo de sedimentos ao longo da costa, dando origem então à planície litorânea. Especialmente durante o Quaternário (últimos 1,8 milhões de anos), a planície litorânea foi ciclicamente alterada por avanços e recuos do mar devido a flutuações no clima global. Esta região fisiogeográfica, tão dinâmica no passado recente, compõe um dos principais habitats da Mata Atlântica (Tonhasca, 2005).

Desde o início da colonização européia no Brasil no século XVI, a Mata Atlântica tem sido alvo de intenso desmatamento. Estima-se que atualmente restem cerca de 8% de remanescentes florestais desta formação (Morellato & Haddad, 2000). A área originalmente ocupada por Mata Atlântica abrange aproximadamente 15% do território nacional e está entre os biomas mais ricos em biodiversidade. Segundo Myers *et al.* (2000), a Mata Atlântica está entre os cinco maiores *hotspots* do mundo em termos de endemismo. A Bahia é a área com maior nível de endemismos, cerca da metade das espécies de árvores e diversas espécies de animais são consideradas raras e ameaçadas de extinção (Primack & Rodrigues, 2001).

Segundo Tonhasca (2005), o bioma Mata Atlântica é composto por diferentes formações fitoecológicas, as quais incluem a Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica *sensu stricto*), a Floresta Estacional Semi-Decidual, a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas e campos de altitude. Devido à extensiva utilização de seus recursos e ao amplo desmatamento para o cultivo de monoculturas agrícolas e pastagens, a fragmentação da Mata Atlântica vem aumentando, trazendo efeitos prejudiciais à biodiversidade da região, como a redução, o isolamento e até mesmo as extinções locais de espécies da fauna e da flora.

A Mata Atlântica é hoje considerada patrimônio natural nacional e biológico da humanidade. Entre os mais importantes benefícios para a população brasileira, podemos destacar o sistema de controle de erosão e poluição, reservatório de água e fonte de renda através da exploração do ecoturismo. Hoje, aproximadamente 46% dos municípios do Brasil estão em áreas originalmente ocupadas pela Mata Atlântica (Tonhasca, 2005), favorecendo o desmatamento e conseqüentemente a fragmentação da floresta.

A destruição e a fragmentação de habitats e a conseqüente redução e isolamento populacional aumentam os efeitos de deriva genética e de endocruzamento. A diversidade genética é bastante influenciada por estes dois eventos, pois leva estas populações a uma perda de heterozigotos e uma maior diferenciação entre as populações (Ellstrand & Elam, 1993). A deriva genética é um processo natural nas populações, ocorrendo em populações grandes e pequenas. No entanto, quando a população é muito pequena a freqüência dos alelos pode variar de uma geração para outra, pois dependerá da reprodução aleatória entre os indivíduos (Primack & Rodrigues, 2001). Em casos que as populações estão separadas por alguma barreira ou mesmo isoladas pela distância, o fluxo gênico pode ser interrompido, pois as chances das sementes serem dispersadas e

alcançar outras populações são menores. Estes fatores que elevam o nível de endocruzamentos e a fixação de alelos deletérios acabam colocando em risco a sobrevivência das espécies (Lutz *et al.*, 2000).

O desmatamento traz consigo várias alterações físicas, entre elas a fragmentação da mata. Além de ameaçar a biodiversidade da região, este aumenta o efeito de borda, ou seja, a influência de habitats alterados ao seu redor. Um fragmento de mata é na verdade uma amostra do seu ecossistema e a distribuição natural em manchas dos organismos vai determinar a presença ou ausência de determinada população neste fragmento. De acordo com o seu tamanho, haverá uma influencia maior ou menor de fatores externos, como temperatura, vento, chuvas, entre outros (Scariot *et al.*, 2003). Por serem regiões de menores extensões, as áreas de floresta fragmentada são mais acessíveis aos seres humanos, tornando-se vulneráveis às ações destruidoras de caça, desmatamento, introdução do gado e queimadas (Laurance & Bierregaard, 1997). A atividade madeireira na região de Una, no estado da Bahia está diretamente ligada ao processo de fragmentação nos dias atuais. Características como área do fragmento, distância de outras áreas e tempo de isolamento não foram suficientes para que fossem explicadas as modificações na riqueza de espécies de árvores e arbustos, e também na estrutura da comunidade, os quais tiveram diferenças significativas ao estudar fragmentos grandes (maior que 1000 hectares) e pequenos (menor que 100 hectares) na região de Una. Mas, ao comparar fragmentos grandes e recentes com fragmentos pequenos e antigos, o principal responsável por estas modificações foi a intensa extração de madeira, a qual ocorreu com maior frequência nos fragmentos menores e mais antigos (Scariot *et al.*, 2003). Este é um fator importante, pois com o corte seletivo de madeira, há uma maior abertura do dossel da floresta ocasionando uma menor

abundancia em espécies menos tolerantes a maior luminosidade (Nascimento & Laurance, 2006).

Em estudo com particularidades regionais de mamíferos (Costa *et al.*, 2000) e comunidades de plantas arbóreas (Oliveira Filho & Fontes, 2000), foi proposto uma divisão ecológica da floresta ombrófila em duas regiões, as quais compreendem o sul da Bahia e o norte do Rio de Janeiro. Carnaval & Moritz (2008) testaram padrões filogeográficos através da diversidade de dados publicados de mtDNA de alguns táxons. Entre eles *Marmosops incanus*, *Bradypus variegatus*, *Gymnodactylus darwini*, e *Phyllomys pattoni*. Foi encontrada uma quebra filogeográfica para estas espécies, as quais mostraram uma alta diversidade molecular ao sul do Rio Doce. Espera-se que mais estudos na região confirmem esta possível barreira, levando em consideração centros de endemismo em seus domínios (Tonhasca, 2005).

1.4 Filogeografia

Os métodos filogeográficos oferecem um modo de determinar os processos atuais e históricos que influenciam a presente distribuição da variabilidade genética do organismo em estudo (Avice, 2000). A filogeografia estuda os princípios e os processos envolvidos na distribuição geográfica de linhagens gênicas, principalmente entre e dentro de espécies relacionadas. O termo filogeografia foi proposto pela primeira vez por Avice *et al.* em 1987 e tem como foco os componentes espaciais e temporais da estrutura das populações, inferindo os prováveis processos evolutivos e ecológicos envolvidos (Behegaray, 2008).

Espécies que possuem uma ampla distribuição geográfica podem ser constituídas de populações que ocupam ramos diferentes de uma árvore filogenética. Esta estruturação filogeográfica pode refletir longos períodos de ausência de fluxo gênico

(Avice, 1994). Já espécies que não apresentam estruturação populacional filogeográfica, provavelmente tiveram histórias de vida em que havia dispersão e fluxo gênico a longas distâncias (Avice, 2000).

1.5 Os marcadores utilizados

Os marcadores moleculares escolhidos neste trabalho são vastamente utilizados em estudos filogenéticos e filogeográficos. Os mais comuns hoje para este tipo de estudo são regiões do DNA que apresentam polimorfismos neutros, ou seja, que não afetam a sobrevivência do organismo. Marcadores atualmente utilizados que promovem facilmente as informações genealógicas incluem os genomas organelares e as regiões não-codificadoras do DNA ribossomal nuclear (Strand *et al.*, 1997).

Genomas organelares são ótimas ferramentas em estudos evolutivos, pois não sofrem recombinação e sua herança é uniparental. Regiões não-codificadoras são relativamente mais variáveis por não serem alvo de seleção e assim, tendem a evoluir de forma mais acelerada do que os genes. Mutações do tipo substituição nucleotídica e inserção/deleção apresentam taxas muito parecidas, o que acelera a divergência destas sequências (Clegg & Zurawski, 1991; Gielly & Taberlet, 1994).

O uso de seqüências de DNA plastidial (cpDNA) tem sido uma ferramenta muito importante em estudos de filogenia e filogeografia. A utilização de regiões não-codificantes de cpDNA aumenta a cada dia e é hoje amplamente utilizada em estudos de filogenia, tanto em nível intergenérico como interespecífico. A tecnologia do seqüenciamento de DNA foi um grande passo na área molecular, pois tornou viável os estudos comparativos entre genes de cpDNA (Shaw *et al.*, 2005) bem como entre as regiões não-codificantes e regiões de DNA nuclear. Em 1999, Hamilton desenhou os *primers* para o espaçador entre os genes *trnS* (que codifica a proteína transportadora de

serina) e *trnG* (que codifica a proteína transportadora de glicina). Pelo fato das porções codificadoras possuírem regiões bastante conservadas, é possível amplificar o espaçador utilizando *primers* universais. Em estudos posteriores foi demonstrado que este marcador molecular é altamente variável e mais informativo que outros marcadores de cpDNA (Hamilton, 1999; Xu *et al.*, 2000; Olson, 2002; Sakai *et al.*, 2003; Perret *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2003).

Regiões não-codificadoras de genomas nucleares também são bastante empregados em estudos populacionais, por oferecerem uma amostra alternativa para verificar variações intraespecíficas em estudo de plantas (Strand *et al.*, 1997). No genoma nuclear são mais utilizadas as sequências de ITS 1 e ITS 2 (espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear), os quais são bastante apropriados para estudos evolutivos dentro de espécies devido a seus níveis de variação (Felinier & Rosselló, 2007). Estas regiões possuem diferentes taxa de mutação e, por esta razão, suas milhares de cópias são bastante úteis em estudos de filogenia e filogeografia. O DNA ribossomal nuclear (nrDNA) apresenta mais de mil cópias organizadas em *tanden* em diferentes regiões do genoma. As seqüências 18 S, 5,8 S e 26 S são separadas por estes espaçadores, as quais são transcritas, mas não são incorporadas ao transcrito maduro. Estes espaçadores se localizam entre os genes 18 S e 26 S e flanqueiam a região 5,8 S do DNA ribossomal nuclear (Baldwin *et al.*, 1995). O esquema da unidade de repetição do DNA ribossomal nuclear está representado na Figura 2.

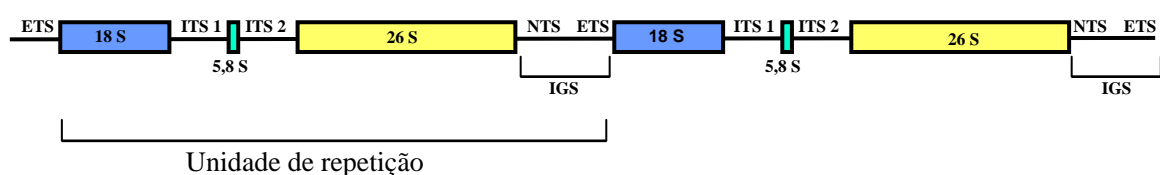


Figura 2. Esquema de posicionamento das regiões ITS 1 e ITS 2.

Uma das vantagens de utilizar seqüências de ITS é a sua herança biparental. Além desta característica, também se verifica uma uniformidade intragenômica, devido à homogeneização das cópias dentro de um mesmo *locus*. Isto ocorre através de um processo de evolução em concerto de homogeneização intra-específica das seqüências de DNA de uma dada família (Zimmer *et al.*, 1980; Elder & Turner, 1995), cuja ocorrência é de modo e tempo diferentes de acordo com a espécie. Por isso os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal podem apresentar variações interespecíficas, intrapopulacionais e também intraindividuais. Estas variações podem ocorrer pela homogeneização ainda não completa das cópias devido à hibridização recente, presença de pseudogenes que ocorre quando há uma não-funcionalidade de *loci* duplicados do DNA ribossomal, ausência de recombinação sexual ou presença em cromossomos não homólogos (Zhang & Sang, 1999). Quando as regiões de ITS 1 e ITS 2 não estão completamente homogeneizadas, é possível observar um padrão ambíguo nas seqüências, onde mais de um nucleotídeo são observados no mesmo sítio.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os padrões de variabilidade genética de populações de *Passiflora ovalis* localizadas nos estados da Bahia e do Espírito Santo através da análise de marcadores moleculares dos genomas nuclear e plastidial.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar os níveis de diversidade dos espaçadores internos do DNA ribossomal nuclear (ITS) e do espaçador intergênico plastidial *trnS-trnG*;
2. Estimar a distribuição da variabilidade genética intra e interpopulacional considerando os marcadores utilizados;
3. Avaliar o relacionamento filogenético entre as populações amostradas;
4. Verificar a existência de linhagens diferenciadas e a presença de barreiras geográficas que possam separá-las.

3. Materiais e Métodos

3.1 Coletas

O material analisado foi coletado ao longo da Mata Atlântica, nos estados da Bahia e de Espírito Santo. Foram coletadas folhas jovens, as quais foram colocadas em sílica gel para o dessecamento. Para cada população foi confeccionada uma exsicata e depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. Através do sistema de posicionamento global (GPS) foram obtidas as informações de coordenadas geográficas.

Foram coletadas folhas de 207 plantas de 10 populações, sendo sete da Bahia e três do Espírito Santo (Figura 3). O material da população de Santa Teresa (ES) foi coletado e enviado por Leonardo Lutz, professor da Universidade Católica de Santa Teresa (ES) e o restante foi coletado e enviado por Teonildes Sacramento Nunes e Luciano Paganucci de Queiroz, pesquisadores da Universidade Estadual de Feira de Santana. As informações das plantas analisadas estão apresentadas na Tabela 1.

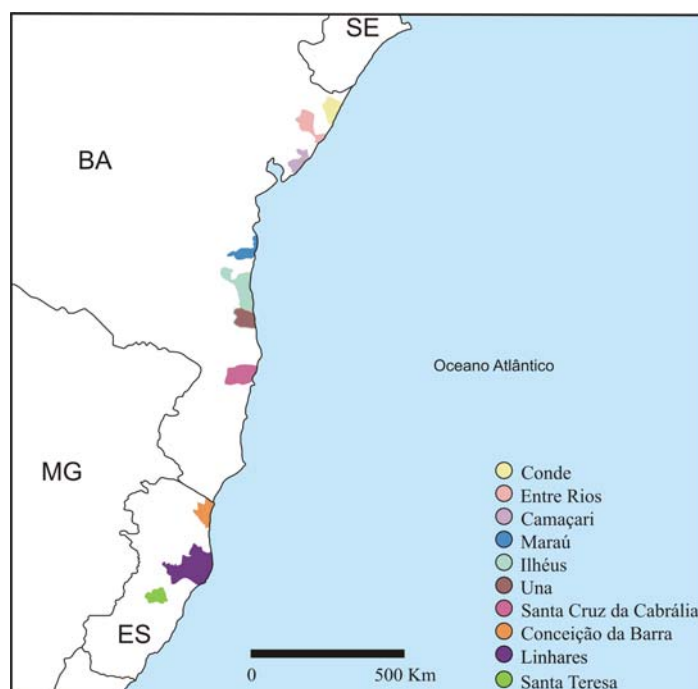


Figura 3. Localização dos municípios onde foram coletadas as populações analisadas de *Passiflora ovalis*.

Tabela 1. Informações das plantas analisadas.

Localização	Nº de plantas analisadas	latitude	longitude
Entre Rios/BA	4	11° 47' 52"S	37° 32' 21"W
Conde/BA	14	12° 52' 03"S	39° 28' 10"W
Camaçari/BA	5	12° 40' 26"S	38° 18' 04"W
Santa Cruz da Cabrália/BA	7	14° 07' 50"S	38° 59' 55"W
Una/BA	4	14° 39' 22"S	39° 04' 20"W
Ilhéus/BA	7	15° 11' 16"S	39° 01' 36"W
Maraú/BA	5	16° 09' 49"S	38° 58' 08"W
Conceição da Barra/ES	6	18° 31' 18"S	39° 47' 26"W
Linhares/ES	4	19° 24' 00"S	40° 28' 00"W
Santa Teresa/ES	11	19° 55' 53"S	40° 35' 42"W
Total	67		

3.2 Extração de DNA

No laboratório, as folhas já secas foram pulverizadas com nitrogênio líquido e estocadas a -18°C. O DNA foi extraído com a utilização da técnica de Roy *et al.* (1992) como descrito abaixo:

- 20 mg de material pulverizado;
- Adição de 600 µl de tampão de extração (100 mM TRIS-HCL; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoetanol; 2% PVP 40), 60 µl de β-mercaptoetanol e 6 µl de Proteinase K (10 mg/ml);
- Incubação a 65°C por 30 minutos;
- Emulsão com 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1);
- Centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm;
- Recolhimento da fase aquosa e estimativa do seu volume;
- Precipitação do DNA com um volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio;
- Armazenamento por 24 horas em freezer (-18°C);
- Centrifugação por 20 minutos e descarte do sobrenadante;

→ Lavagem do “pellet” com 200 µl de etanol 70% e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos;

→ Eluição do “pellet” em 200 µl de água ultra-pura estéril e 2 µl de RNase (10 mg/ml).

Os produtos de extração foram testados através de eletroforese horizontal aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e o gel visualizado em transiluminador de luz UV.

3.3 Amplificação das seqüências

Os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS) e o espaçador intergênico plastidial *trnS-trnG* foram amplificados através de PCR (*polimerase chain reaction*). As PCRs foram realizadas em termociclador automático MJ Res. Inc., com protocolo padrão adaptado para cada marcador (Quadros 1 e 2).

Quadro 1. Protocolo utilizado para realização de PCR do marcador *trnS-trnG*.

Reação	
H ₂ O	13,05 µl
Tampão 10X	2,5 µl
dNTP (2mM)	2,5 µl
<i>primer trnS</i> (2µM)	2,5 µl
<i>primer trnG</i> (2µM)	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl
Taq (5un/µl)	0,2 µl
Condições de amplificação	
94°C → 3 min	
94°C → 1 min	} 30 ciclos
60°C → 1 min	
72°C → 1 min	
72°C → 10 min	
Seqüência dos <i>primers</i> (Hamilton, 1999)	
<i>Primer trnS</i> 5' AGA TAG GGA TTC GAA CCC TCG GT 3'	
<i>Primer trnG</i> 5' GTA GCG GGA ATC GAA CCC GCA TC 3'	

Quadro 2. Protocolo utilizado para realização de PCR do marcador ITS.

Reação	
H ₂ O	10,55 µl
Tampão 10X	2,5 µl
dNTP (2mM)	2,5 µl
<i>primer</i> 75 (2µM)	2,5 µl
<i>primer</i> 92 (2µM)	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl
DMSO	2,5 µl
Taq (5un/µl)	0,2 µl
Condições de amplificação	
94°C → 3 min	
94°C → 1 min	} 30 ciclos
58°C → 1 min e 30 seg	
72°C → 1 min	
72°C → 10 min	
Seqüência dos <i>primers</i> (White <i>et al.</i> 1990)	
<i>Primer</i> 75 5' TAT GCT TAA ACT CAG CGG G 3'	
<i>Primer</i> 92 5' AAG GTT TCC GTA GGT GAA C 3'	

Para testar as PCRs foram aplicados 2,5 µl de produto de PCR + 2 µl de BFB (com glicerol 20%). As amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e o gel visualizado em transiluminador de luz UV.

3.4 Purificação dos produtos de PCR com PEG

Os produtos de PCR foram purificados por precipitação dos *primers* e dNTPs não incorporados à reação utilizando polietilenoglicol 20% (PEG) segundo o protocolo de Dunn & Blattner (1987) descrito abaixo.

→ Adição de igual volume de PEG 20% (p/v) ao produto de PCR e homogeneização;

→ Incubação a 37°C por 30 minutos;

- Centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos;
- Descarte cuidadoso do sobrenadante;
- Adição de 125 µl de EtOH 80% gelado. Incubação por 1 minuto e centrifugação por 2 minutos;
- Descarte do sobrenadante;
- Repetição dos passos 5 e 6, porém agora com EtOH absoluto;
- Evaporação do EtOH residual a 70°C por 10 minutos;
- Ressuspensão do produto de PCR em 15 µl de água pura estéril e incubação á temperatura ambiente por 12 horas.

3.5 Seqüenciamento automático

O seqüenciamento das regiões amplificadas por PCR foi realizado em seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences), de acordo com os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamicTM ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente. A reação de seqüenciamento foi preparada conforme a descrição no Quadro 3 e feita diretamente nas placas de seqüenciamento.

Quadro 3. Protocolo utilizado para realização da reação de seqüenciamento.

Reação	
<i>DYEnamicTM ET terminator sequencing premix</i>	4 µl
Produto de PCR purificado	40 ng
<i>Primer</i>	5 µl
Água estéril até completar	10 µl
<i>DYEnamicTM ET terminator sequencing premix</i>	4 µl
Condições de amplificação	
95° → 20 seg	} 35 ciclos
50° → 5 seg	
60° → 1 min	

3.6 Análise das seqüências de DNA

As seqüências foram lidas e corrigidas no programa Chromas 2.33 (disponível no *site* www.technelysium.com.au). Utilizando o programa PHASE 1.0 (Stephens *et al.*, 2001) foram determinados os tipos de seqüências para ITS. No programa Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) as seqüências foram alinhadas automaticamente e o alinhamento obtido foi corrigido manualmente, quando necessário, no programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997) e no programa DnaSP 4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003), foram gerados os haplótipos. Através do programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) foram verificados o tamanho do alinhamento, o conteúdo de CG (guaninas e citosinas), o número de sítios variáveis, os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_S de Fu (Fu, 1996), a *mismatch distribution* (Rogers & Harpending, 1992) e a análise de variância molecular (AMOVA). Os índices de diversidade haplotípica (calcula a probabilidade de escolher aleatoriamente dois haplótipos diferentes na amostra) e nucleotídica (calcula a probabilidade de que dois sítios homólogos aleatórios sejam diferentes na amostra) também foram gerados no programa Arlequin. O relacionamento filogenético entre as seqüências foi inferido com o auxílio do programa *Network* 4.5.0.0 (disponível no *site* <http://www.fluxus-engineering.com>) através do método de *median joining* (Bandelt *et al.*, 1999). As coordenadas geográficas das populações estudadas foram analisadas no programa GPS TrackMaker versão 13.3.349 (disponível no *site* <http://www.gpstm.com>). Através do programa *Alleles in Space* 1.0 (Miller, 2005) foram realizados os testes de Mantel, Análise de Autocorrelação Espacial e Teste de Barreiras através do Algoritmo de Monmonier. Para definir grupos de populações que são geograficamente homogêneos e que se diferenciam geneticamente uns dos outros, foi utilizado o programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002) e, como subproduto desta análise, pudemos inferir também possíveis barreiras ao fluxo

gênico entre grupos. Foram testados os cenários para dois, três e quatro grupos e para cada teste os índices de fixação relacionados foram calculados (Φ_{CT} = índice de variação entre os grupos, Φ_{ST} = índice de variação intrapopulacional e Φ_{SC} = índice de variação dentro das populações). A escolha do cenário mais provável foi feita levando-se em conta a relação entre os índices e a coerência com outros dados.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos marcadores

Foram analisadas dez populações de *P. ovalis*, sete da Bahia e três do Espírito Santo. Foram obtidas 67 seqüências do espaçador *trnS-trnG* e 49 dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS). Os indivíduos da população de Conde (BA) não foram analisados com o marcador ITS, pois é possível que estes indivíduos apresentem uma mutação no sítio de anelamento dos *primers*, uma vez que seu DNA amplifica muito bem para marcadores plastidiais, mas não amplifica com a utilização dos *primers* para ITS. A caracterização das seqüências, os polimorfismos encontrados e os índices de diversidade haplotípica/genotípica e nucleotídica estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização da variabilidade genética dos marcadores *trnS-trnG* e ITS

	<i>trnS-trnG</i>	ITS
n° de indivíduos analisados	67	49
n° de haplótipos/tipos de seqüências	5	8
tamanho do alinhamento	681 pb	608 pb
variação do tamanho da seqüência	680 - 681	606 - 608
% CG	25	64
diversidade haplotípica/genotípica +/- desvio padrão	0,6965+/-0,0309	0,8584 +/- 0,0119
diversidade nucleotídica +/- desvio padrão	0,0053+/-0,0030	0,0112 +/- 0,0059
n° transições	1	6
n° transversões	6	9
indels (1pb)	1	3

Neste trabalho os índices de diversidade em *P. ovalis* foram semelhantes aos outros estudos com o gênero *Passiflora*. Lorenz-Lemke *et al.* (2005) encontram para *Passiflora actinia* valores de diversidade nucleotídica semelhantes aos deste trabalho em relação ao marcador ITS. Neste mesmo estudo, o valor de diversidade nucleotídica encontrado para *Passiflora elegans* foi bem mais baixo comparado ao de *P. actinia*,

devido a um evento de gargalo de garrafa recente seguido por expansão populacional. Para *Passiflora alata* também foram encontrados valores de diversidade nucleotídica e haplotípica (Koehler-Santos *et al.*, 2006) correspondentes aos de ITS para *P. ovalis*, os quais também foram altos. Segundo Avise (2000), a comparação entre a diversidade nucleotídica e haplotípica é uma forma simples de inferir uma história demográfica geral. Os altos valores de diversidade encontrados para *P. ovalis* no marcador *trnS-trnG* (plastidial) e ITS (nuclear) sugerem que *P. ovalis* possui uma história evolutiva bastante antiga.

Trabalhos realizados com espécies de outras famílias, com histórias evolutivas mais recentes, mostram valores de diversidade mais baixos quando é analisado o marcador plastidial *trnS-trnG*. Os baixos valores indicam um crescimento populacional acelerado a partir de uma população ancestral de pequeno porte. Isto leva a formação de muitos haplótipos, mas com poucas diferenças entre elas (Avise, 2000). Em *Calibrachoa heterophylla* (Solanaceae), Mäder (2008) encontrou valores de diversidade nucleotídica menores que os obtidos aqui. Ramos (2008) obteve para *Petunia intergrifolia* (gênero irmão de *Calibrachoa*) valores igualmente baixos.

4.1.1 Variabilidade de ITS

Uma vez que ITS é um marcador nuclear, o termo haplótipo não se aplica aos diferentes tipos de seqüências encontrados, pois este se refere a genomas haplóides. Portanto, neste trabalho as diferentes seqüências encontradas foram tratadas como tipos de seqüências. Entre os sítios polimórficos encontrados em ITS, 18 % eram ambíguos, ou seja, apresentavam mais de um nucleotídeo na mesma posição (comparação na Figura 4). Apesar de representarem uma porção significativa da variabilidade deste marcador, os sítios ambíguos não foram utilizados nas análises. Como em *Passiflora* a

região ITS está presente em diferentes *loci* (Melo & Guerra, 2003), não podemos confirmar se estes sítios ambíguos são heterozigotos, ou seja, se representam ou não a presença de diferentes cópias localizadas no mesmo *locus*.

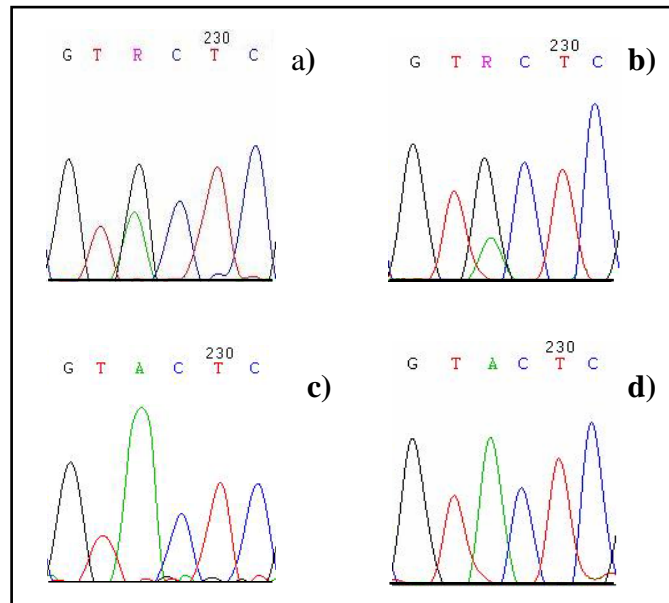


Figura 4. Fragmentos de cromatogramas mostrando o sítio 228 de ITS no indivíduo oval95, a) *primer* 75, b) *primer* 92; e oval79 c) *primer* 75, d) *primer* 92. R=A+G.

A presença de polimorfismos intraindividuais encontrados no seqüenciamento de ITS (os sítios heterozigotos) são um indicativo de evolução em concerto incompleta. Vários fatores podem interferir no tempo de homogeneização, como o número de cópias das seqüências e número de cromossomos que esta região é encontrada, além da localização dos *loci* no cromossomo e taxa de permuta no DNA entre os cromossomos (Quijada *et al.*, 1998). A variabilidade de ITS em *P. actinia* corresponde a 57% dos polimorfismos ambíguos e de 75 % em *P. elegans* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Lorenz-Lemke, 2006). Esta variabilidade também foi encontrada em *P. alata*, na qual de 85 plantas, 48 apresentaram variabilidade intraindividual devido aos sítios heterozigotos (Koehler-Santos, 2005; Koehler-Santos *et al.*, 2006). Para que duas diferentes cópias de ITS evoluam dentro de um indivíduo, há três maneiras: 1) as duas cópias estão

presentes, caracterizando uma hibridização recente; 2) a evolução em concerto pode se dar de forma unidirecional, conduzindo á perda de uma cópia e fixação de outra; 3) evolução em concerto que leva a um novo tipo de ITS, o qual é uma mistura das duas seqüências originais (Koch *et al.*, 2003).

4.2 Distribuição espacial da variabilidade genética

Com ambos os marcadores (*trnS-trnG* e ITS) foi possível observar que as populações apresentam uma diferenciação na freqüência e no relacionamento das seqüências encontradas e que há uma variação clinal na diversidade genética. As *networks* geradas para o marcador *trnS-trnG* e para ITS estão representadas na Figura 5.

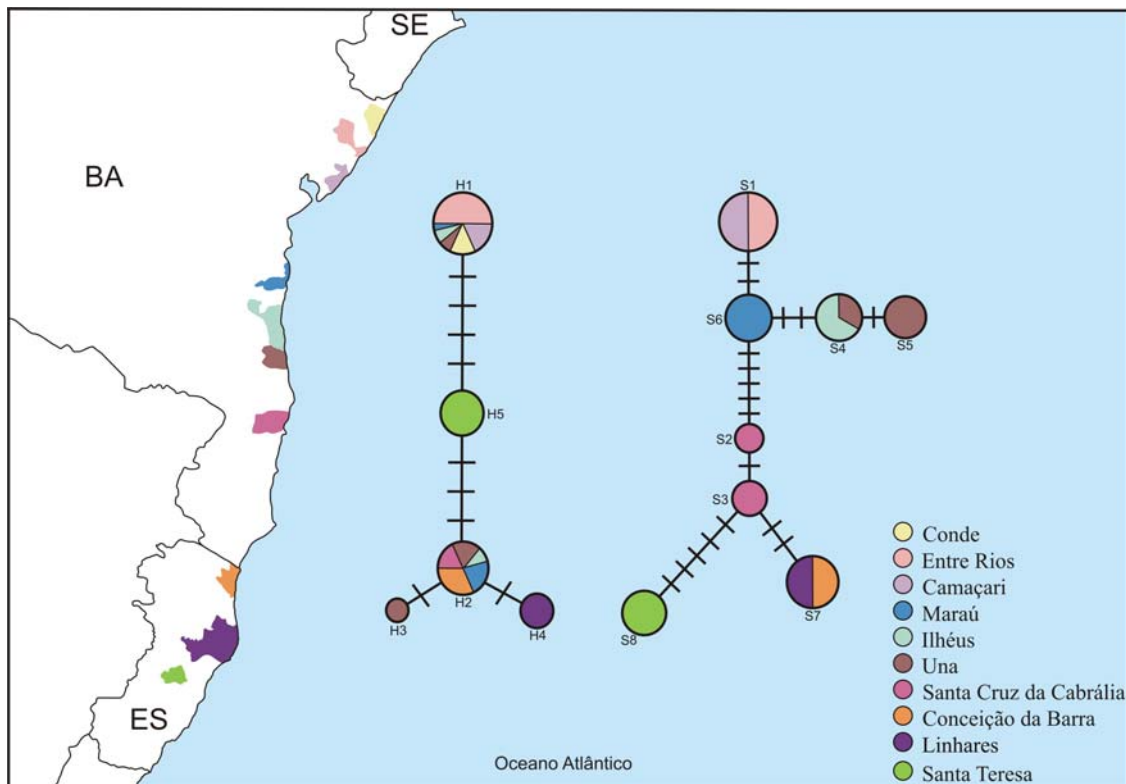


Figura 5. Localização geográfica dos municípios onde foram coletadas as populações analisadas de *Passiflora ovalis*. À esquerda está o resultado da análise de *median-joining network* obtido com as seqüências de *trnS-trnG* (H1-H5). À direita, está o resultado da análise de *median-joining network* obtido com as seqüências de ITS (S1-S8).

4.2.1 Padrão espacial da variação no marcador *trnS-trnG*

As populações de Conde (H1), Entre Rios (H1), Camaçari (H1), Santa Cruz da Cabrália (H2), Conceição da Barra (H2), Linhares (H4) e Santa Teresa (H5) não apresentaram variação intrapopulacional no marcador do cpDNA, apenas um haplótipo foi detectado em cada uma delas. Nas populações de Maraú, Ilhéus e Una encontrou-se uma maior variabilidade: haplótipo (H1) que também ocorre ao norte, (H2) que também ocorre ao sul e (H3), que só aparece em Una (Figura 6). As populações de Maraú, Ilhéus e Una foram as únicas que apresentaram mais de um haplótipo de cpDNA. Interessantemente, esses haplótipos como, por exemplo, (H1) e (H2), estão distantemente relacionados na *network*. O grande número de mutações (6 sítios) entre esses haplótipos indica um isolamento histórico e sugere que a presença destas na mesma população seja resultado de contato secundário entre essas linhagens diferenciadas. O haplótipo (H5) é o que mais se diferencia do restante, por três mutações em relação a (H2) e quatro em relação a (H1). Os haplótipos (H3) e (H4) se diferenciam do restante por apenas uma mutação cada. A *network* gerada para *trnS-trnG* não apresentou um padrão geográfico no relacionamento filogenético entre os haplótipos.

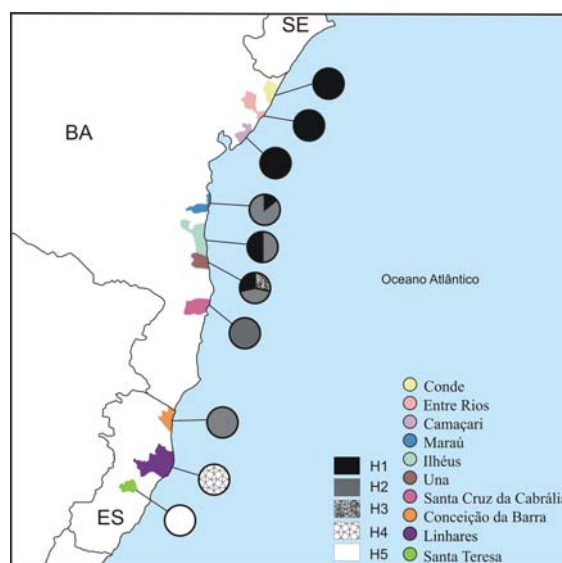


Figura 6: Frequências haplotípicas de *trnS-trnG*.

4.2.2 Padrão espacial da variação no marcador ITS

As populações de Entre Rios e Camaçari, ao norte, compartilharam a mesma seqüência (S1). Marau (S6), Una (S5), Santa Cruz da Cabrália (S2 e S3) e Santa Teresa (S8) apresentaram seqüências exclusivas. A seqüência (S4) foi encontrada nas populações de Ilhéus e Una e a (S7) nas populações de Conceição da Barra e Linhares. Apenas as populações de Una (S4 e S5) e Santa Cruz da Cabrália apresentaram mais de um tipo de seqüência. O relacionamento entre as seqüências apresenta um claro padrão norte-sul de distribuição, sendo possível detectar uma considerável diferença entre as seqüências presentes em Santa Cruz da Cabrália e as encontradas ao norte e entre a seqüência de Santa Teresa e as demais.

A maioria dos tipos de seqüências é diferente por um ou dois sítios. Podem ser reconhecidos dois grupos de seqüências diferenciadas por cinco sítios, um formado pelas seqüências (S1, S4, S5 e S6) e outro pelas seqüências (S2, S3, S7 e S8).

4.3 Estrutura populacional

A distribuição da variabilidade genética intra e interpopulacional foi estimada através da análise da variância molecular (AMOVA) e do cálculo dos índices de fixação F_{ST} (considera apenas as diferenças relacionadas com a freqüência das seqüências nas populações) e Φ_{ST} (considera as diferenças relacionadas com a freqüência das seqüências nas populações e o nível de divergência entre elas). O marcador plastidial apresentou índices de fixação altos e significativos, $F_{ST} = 0,80^{p<0,001}$ e $\Phi_{ST} = 0,79^{p<0,001}$, assim como o nuclear, $F_{ST} = 0,87^{p<0,001}$ e $\Phi_{ST} = 0,98^{p<0,001}$. A grande diferença entre os índices F_{ST} e Φ_{ST} calculados para ITS indica que a grande divergência encontrada entre algumas seqüências pertencentes a populações distintas eleva consideravelmente os

níveis de diversidade interpopulacional detectados. Nas Tabelas 3 e 4 estão detalhados os valores resultantes da análise de AMOVA.

Tabela 3. Resultados da análise da variância molecular (AMOVA) - F_{ST}

		graus de liberdade	soma dos quadrados	componentes da variância	porcentagem da variância	F_{ST}
<i>trnS-trnG</i>	Entre populações	09	18,652	0,30601	80,1	0,801
	Dentro das populações	57	04,333	0,07602	19,9	
ITS	Entre populações	08	36,376	0,42208	87,7	0,877
	Dentro das populações	89	05,257	0,05907	12,3	

Tabela 4. Resultados da análise da variância molecular (AMOVA) - Φ_{ST}

		graus de liberdade	soma dos quadrados	componentes da variância	porcentagem da variância	Φ_{ST}
<i>trnS-trnG</i>	Entre as populações	09	94,286	1,5417	78,67	0,786
	Dentro das populações	57	23,833	0,41813	21,33	
ITS	Entre as populações	08	323,641	3,79924	98,47	0,984
	Dentro das populações	89	05,257	0,05907	1,53	

Testes realizados para comparar o relacionamento entre os haplótipos e sua distribuição geográfica demonstram que há uma grande estruturação genética entre as populações. O baixo fluxo gênico foi demonstrado com AMOVA, evidenciando maior diversidade genética entre as populações. Foi possível detectar que as populações apresentam uma diferenciação na frequência das seqüências encontradas e que há uma variação clinal na diversidade genética. Foram encontrados haplótipos exclusivos da região norte e extremo sul da Bahia sendo compartilhados entre as populações de Marau, Ilhéus e Una analisando o marcador plastidial. Com o marcador nuclear também

é possível verificar uma maior diversidade de seqüências nestas mesmas populações. Para esta região da Bahia o mesmo padrão foi visto em estudos com espécies típicas de Mata Atlântica. Dados de mtDNA combinados á características morfológicas foram realizados com *Bothrops pradoi* e esta variação clinal também foi encontrada na região que fica entre o norte do Espírito Santo e sul da Bahia (Puerto *et al.*, 2001).

Os testes de Mantel e de Autocorrelação Espacial indicaram uma forte influência do isolamento pela distância na variabilidade das seqüências. O teste de Mantel mostrou correlação significativa (Figuras 7 e 8) entre as distâncias genética e geográfica para *P. ovalis* analisando os dois marcadores separadamente (*trnS-trnG* $r = 0,45$ $p < 0,001$; ITS $r = 0,82$ $p < 0,001$).

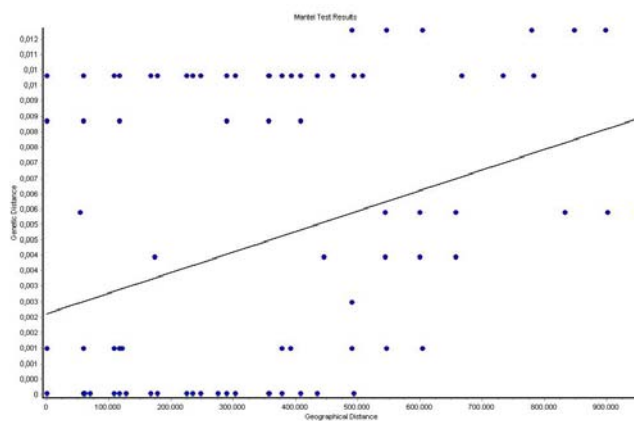


Figura 7. Gráfico do Teste de Mantel para *trnS-trnG*

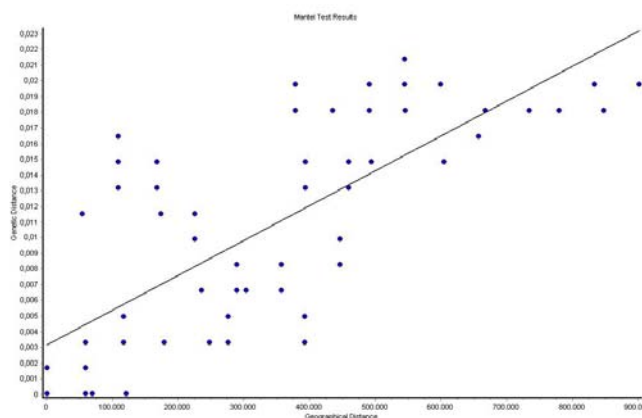


Figura 8. Gráfico do Teste de Mantel para ITS

Assim como o teste de Mantel, o teste de Autocorrelação Espacial indicou o efeito do isolamento pela distância. Para o marcador *trnS-trnG* o valor de V foi $0,00240^{p<0,05}$ e para ITS $0,00632^{p<0,05}$, indicando que a variabilidade de A_y (distância genética média entre indivíduos que estão na classe de distância y) entre as classes de distância não é aleatória. Com o marcador *trnS-trnG* é possível verificar um aumento significativo da distância genética em relação a média a partir de 654.480 metros e no ITS a partir de 461.065 metros. Os gráficos de Autocorrelação Espacial de *trnS-trnG* e ITS estão representado na Figuras 8 e 9, respectivamente.

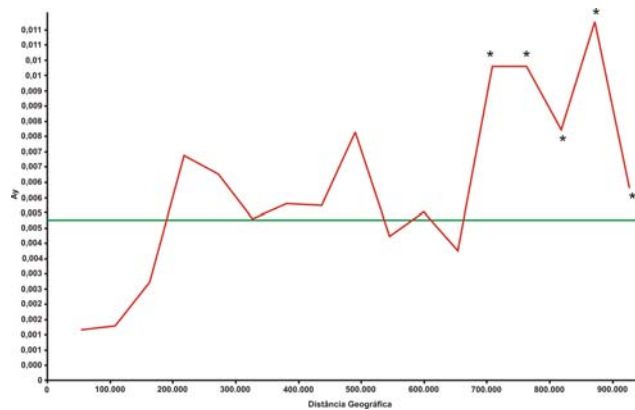


Figura 8. Gráfico da análise de Autocorrelação Espacial para *trnS-trnG*. Linha verde = distância genética média. Estão marcados com (*) os valores estatisticamente maiores que a distância genética média. Foram utilizadas 17 classes de distância para uma melhor definição do gráfico.

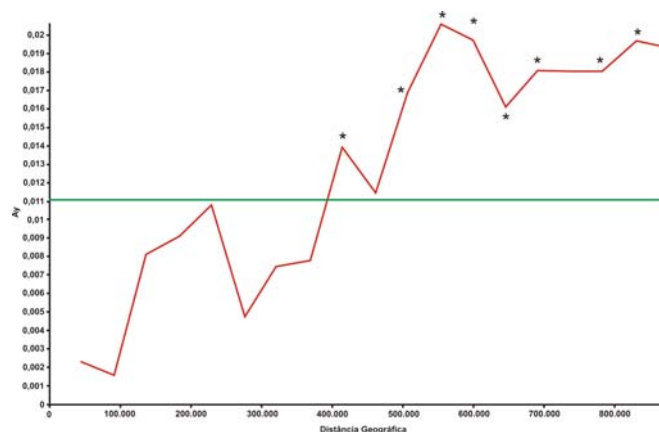


Figura 9. Gráfico da análise de Autocorrelação Espacial para ITS. Linha verde = distância genética média. Estão marcados com (*) os valores estatisticamente maiores que a distância genética média. Foram utilizadas 19 classes de distância para uma melhor resolução do gráfico.

Os testes de neutralidades D de Tajima e F_S de Fu não apresentaram desvio significativo da expectativa neutra das mutações, não havendo indício de alterações demográficas recentes. Para o marcador *trnS-trnG* os índices estimados foram $D = 2,767$ $p=0,99$ e $F_S = 5,834$ $p=0,96$; e para ITS foram $D = 2,734$ $p=0,99$ e $F_S = 9,039$ $p=0,96$. A distribuição do número de diferenças observadas entre as seqüências tomadas par a par (*pairwise mismatch distribution*), corroborou os testes de neutralidade, não havendo sinal de expansão demográfica recente. Ambos os marcadores apresentaram um padrão multimodal de distribuição observada (Figura 12), estatisticamente diferente do simulado para expansão populacional recente (padrão unimodal).

O Teste de Mantel apresentou uma correlação entre distância genética e distância geográfica. O valor significativo da análise de Autocorrelação Espacial corrobora este resultado. Com o aumento da distância geográfica, a distância genética também aumenta. Para a espécie *P. actinia* a qual tem sua distribuição ao sul da Mata Atlântica (Paraná, Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul), esta diversidade não está relacionada com a distância geográfica (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o padrão de isolamento destas populações se dá pela distância por se tratar de uma espécie antiga e também pelos processos históricos de fragmentação da Mata Atlântica que possibilitaram a diferenciação entre as populações. Para o subgênero *Deidamioides* ainda não foram realizados estudos sobre a herança do cloroplasto (materna ou paterna), mas acredita-se que seja de forma uniparental, como na maioria das espécies de *Passiflora*. Em espécies hermafroditas, é observado que mitocôndrias e cloroplastos são herdados juntos através de um único tipo sexual de gameta, e na maioria das angiospermas geralmente se dá via semente (Dumolin-Lape`gue *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2002; Petit & Vendramin, 2007).

A concordância de análises filogeográficas sugere que esta região da Mata Atlântica, nos estados do Espírito Santo e Bahia, atuou como refúgio para espécies tipicamente florestais durante as épocas glaciais, por isso concentra maiores índices de diversidade genética. Esta maior diversidade é encontrada em uma maior concentração na porção sul do estado da Bahia, assim como foi visto aqui na análise de ambos os marcadores. Carnaval & Moritz (2008) observou uma diversidade genética de mtDNA maior na costa da Bahia do que em outras localidades. O padrão encontrado com *P. ovalis* também indica que suas populações passaram por períodos de isolamento, provavelmente durante as épocas glaciais quando havia a fragmentação da Mata Atlântica. Alternativamente, no caso do presente estudo a grande variabilidade genética observada nesta região, indicada pelo maior número de haplótipos para o marcador plastidial e de tipos de seqüência para o nuclear, poderia ser explicada por contato secundário (eventos de hibridação recentes) entre indivíduos de populações que divergiram em alopatria no passado. Algumas espécies de morcegos apresentam uma área maior de forrageio a qual é determinada pela abundância de seu alimento preferencial. Mesmo pequenos fragmentos florestais são importantes para estes polinizadores devido a oferta de recursos dos quais estes animais precisam. A disposição espacial destes fragmentos também pode auxiliar estes polinizadores na exploração de toda a paisagem (Bianconi *et al.*, 2006).

Durante o Quaternário, áreas com Mata Atlântica aumentaram e diminuíram inúmeras vezes devido aos períodos glaciais e interglaciais (Vuillemier, 1971; Charles-Dominique *et al.*, 1998). As mudanças paleoambientais ocorridas neste período tiveram uma grande importância na estruturação atual das distribuições geográficas de espécies da Mata Atlântica (Behling & Negrelle, 2001). Além da temperatura e da umidade, a Mata Atlântica teve sua estrutura transformada pelas variações do nível do mar, sendo

as transgressões marinhas a razão primária para que o seu desenvolvimento durante o período fosse fragmentado. No Quaternário, durante as eras interglaciais, as populações mais próximas ao litoral eram extintas devido às transgressões marinhas, restando aquelas que se situavam em terras mais altas. Nas eras glaciais, o mar regredia e as populações sobreviventes se expandiam, possibilitando o cruzamento entre elas. Alterações nas taxas de migração, fragmentação e o isolamento de populações possibilitam e transformam o fluxo gênico entre as populações e podem levar à diferenciação genética entre elas (Salomon, 2001). A presença de seqüências exclusivas do norte da Bahia e do Espírito Santo reforça esta hipótese. Quando as populações permanecem pequenas e isoladas por muitas gerações, há uma perda de alelos ocasionada pela deriva genética. Isto leva à redução dos níveis de variabilidade genética intrapopulacional (Barrett & Kohn, 1991; Young *et al.*, 1996).

Ribeiro *et al.* (2005) ao comparar populações de *Dalbergia nigra* situadas em dois fragmentos de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais observaram que a população que sofria mais com as perturbações antropogênicas tinha menor variabilidade genética. Segundo Young *et al.* (1996), o fluxo gênico em populações remanescentes pode ser influenciado devido aos efeitos da fragmentação sobre os agentes polinizadores e dispersão de sementes. A fragmentação da Mata Atlântica está também diretamente relacionada à estrutura populacional de morcegos. As populações de morcegos vêm diminuindo devido às modificações de seus habitats causadas pela ação antrópica e perturbações relacionadas à fragmentação da mata (Faria, 2006).

4.4 Barreiras biogeográficas

Para detectar possíveis barreiras biogeográficas que limitem o fluxo gênico entre as populações, foram utilizados o Algoritmo de Monmonier (programa *Alleles in Space*)

e para avaliar a formação de grupos geograficamente homogêneos foi utilizado o programa SAMOVA 1.0. Foi testada primeiramente, com os dois marcadores, a existência de uma barreira geográfica e dois grupos. A AMOVA comparando os grupos apresentou valores de índice Φ_{CT} para *trnS-trnG* de $0,67499^{<0,001}$ e $0,64403^{<0,001}$ para ITS. Quando testadas duas barreiras e três grupos, foram obtidos os seguintes valores: $\Phi_{CT} = 0,75882^{<0,001}$ para *trnS-trnG* e $\Phi_{CT} = 0,65238^{<0,001}$ para ITS. Todos os valores obtidos foram significativos. Com o aumento do número de grupos para quatro, o valor de Φ_{CT} não se alterou significativamente, devido aos agrupamentos cada vez menores e mantendo os mesmos índices de diferenças entre eles. Então, foi considerado como mais provável a formação de três grupos, por este apresentar uma maior coerência com os haplótipos obtidos que pertencem ao diferentes grupos, além do alto valor de Φ_{CT} . Dentre os resultados obtidos para o marcador plastidial, 75,88% da variação observada foi entre os grupos; 83,53% correspondente a variação entre as populações; e 31,74% a variação dentro das populações. Em relação ao marcador nuclear, a variação entre os grupos foi de 65,23%; entre as populações a variação foi de 98,73%; e dentro das populações de 96,36%. O valor de variação intrapopulacional (Φ_{SC}) manteve-se alto para ITS, provavelmente devido á maior variabilidade encontrada neste marcador, o que não é visto para *trnS-trnG* (com variabilidade menor em relação a ITS). O primeiro grupo é constituído pelas populações de Entre Rios, Camaçari, Conde, Maráu, Ilhéus e Una, o segundo formado pelas populações de Santa Cruz da Cabrália, Conceição da Barra e Linhares e o terceiro grupo formado apenas pela população de Santa Teresa.

Entre as barreiras inferidas, uma delas separa geneticamente as populações do primeiro grupo já mencionado da população de Santa Cruz da Cabrália. Atualmente, esta barreira coincide com o Rio Jequitinhonha (Figura 10). A outra barreira inferida

separa a população de Santa Teresa do restante das populações do Espírito Santo, que nos dias de hoje se localiza no Rio Doce (Figura 11).

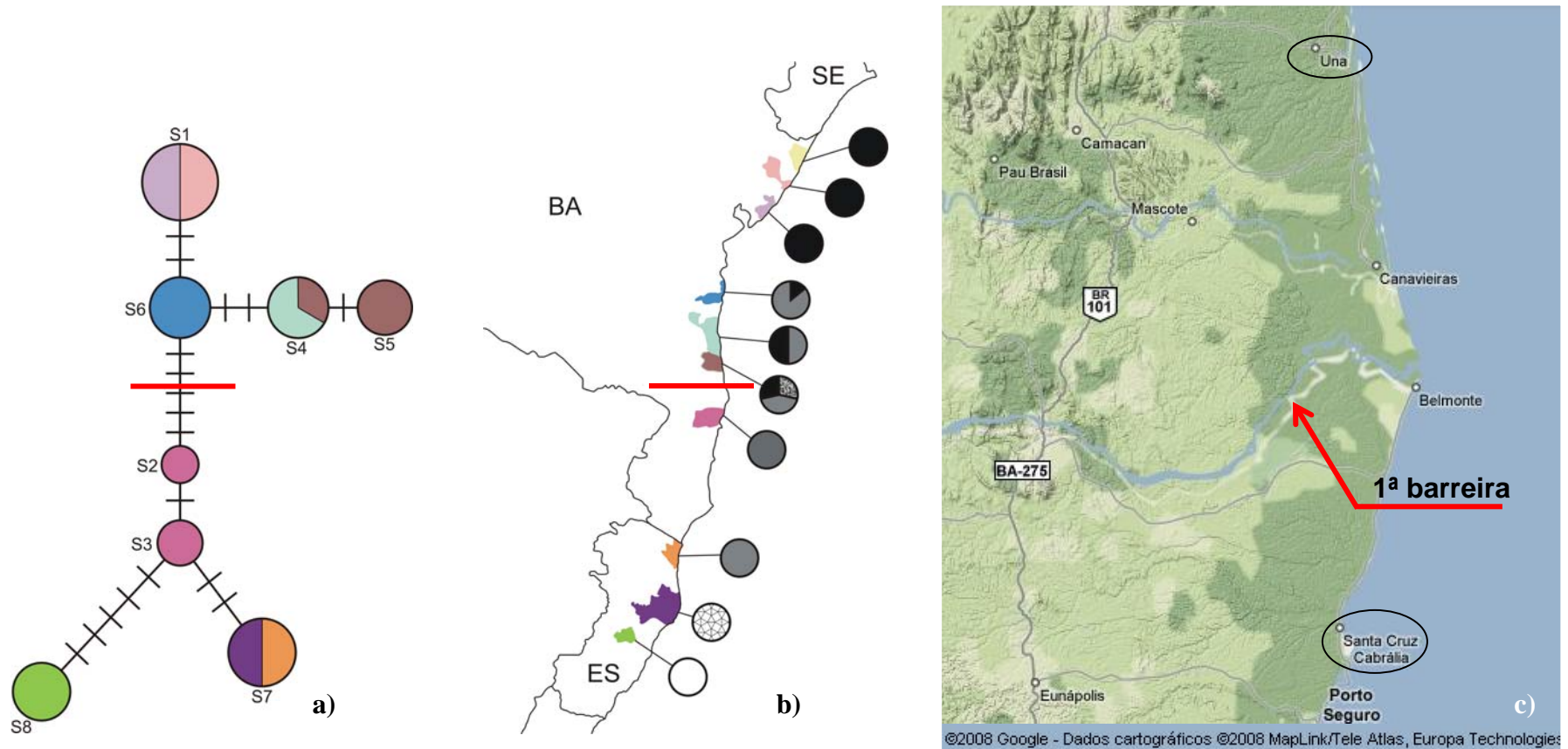


Figura 10. a) *network* de ITS; b) freqüências dos haplótipos de cpDNA e c) mapa com a localização atual da bacia do Rio Jequitinhonha (BA). Linha vermelha indica a posição da primeira barreira inferida a partir dos resultados do Algoritmo de Monmonier.

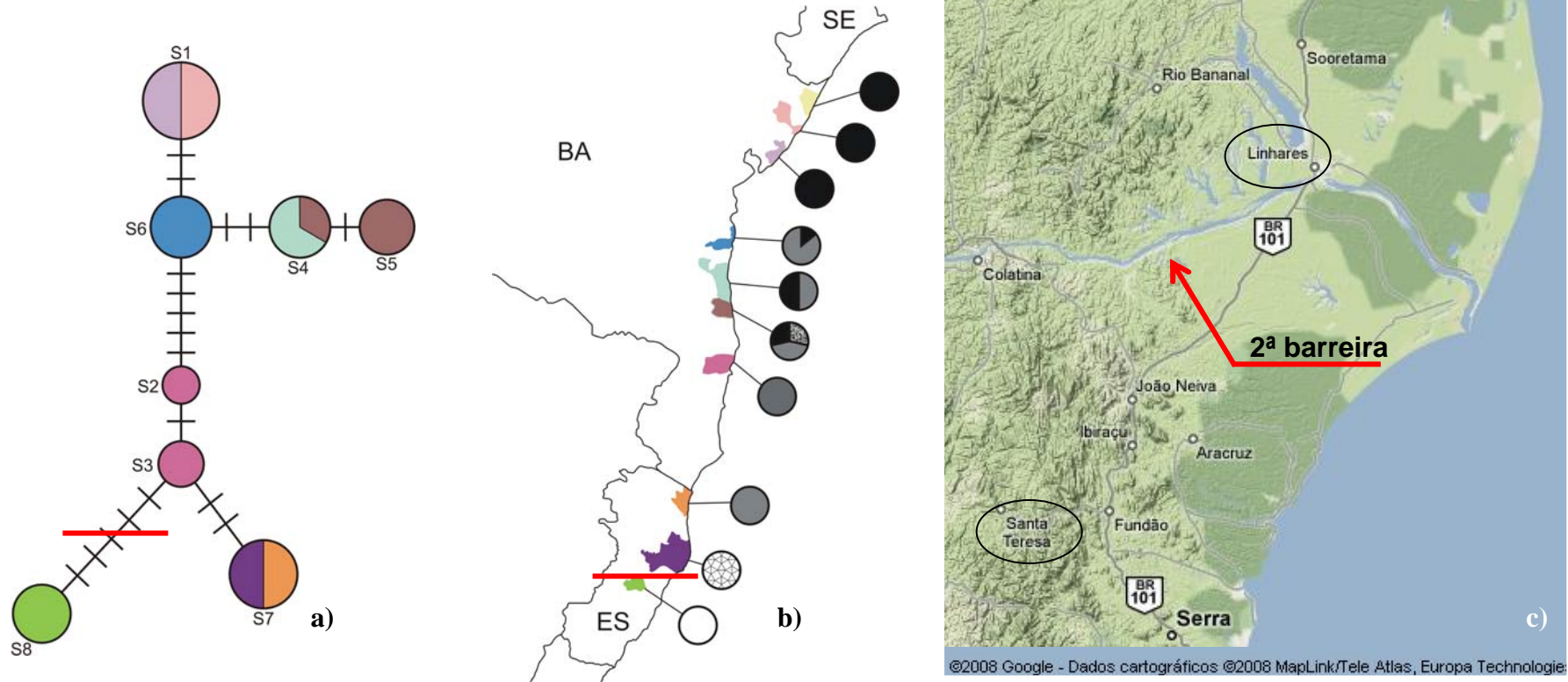


Figura 11. a) *network* de ITS; b) freqüências dos haplótipos de cpDNA e c) mapa com a localização da bacia do Rio Doce (ES). Linha vermelha indica a posição da segunda barreira inferida a partir dos resultados do Algoritmo de Monmonier.

O Teste de Barreiras através do Algoritmo de Monmonier (AIS) detectou duas barreiras em ambos os marcadores. É possível observar que há uma maior similaridade genética entre as populações de Santa Cruz da Cabralia e Conceição da Barra, quando analisado o marcador plastidial. Quanto ao marcador nuclear, a população de Santa Cruz da Cabralia está distante geneticamente de Una (BA) por seis passos mutacionais, enquanto que em relação á Conceição da Barra e Linhares (ambas do Espírito Santo) esta distância é de apenas dois passos mutacionais. Uma possível barreira ao fluxo gênico entre Santa Cruz da Cabralia e as outras populações da Bahia é o rio Jequitinhonha. Este rio pode estar servindo de barreira por possuir grandes dimensões, dificultando as visitas do mesmo polinizador entre as populações. Pellegrino *et al.* (2005), observaram que o Rio Jequitinhonha juntamente com o Rio Doce, poderiam estar atuando como barreiras ao fluxo gênico de *Gymnodactylus darwini*, com um papel importante na diversificação entre as populações. Aqui neste trabalho, o Rio Doce também parece ser uma barreira ao fluxo gênico, separando a população de Santa Teresa de todas as outras. Cabanne *et al.* (2007) encontraram o mesmo padrão filogeográfico para *Xiphorhynchus fuscus*. Em estudo de filogeografia de *Bothrops jararaca* o Rio Doce não foi considerado uma barreira efetiva entre as populações, as quais não apresentavam diversificação genética (Grazziotin *et al.*, 2006).

4.5 Perspectivas

Com este trabalho, foi possível explicar de uma maneira geral a dinâmica populacional de *P. ovalis* nos estados da Bahia e Espírito Santo. No entanto, é de grande importância avaliar dúvidas relacionadas a possível separação em duas espécies distintas. Como perspectivas para este trabalho, pretendemos ampliar as amostras com

populações de São Paulo e Rio de Janeiro para combinar as análises a fim de esclarecer questões sobre a taxonomia da espécie utilizando este mesmo tipo de abordagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Almeida FFM (1976) The system of continental rifts bordering the Santos Basin, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 48: 15-26.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avice JC (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York, 511p.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. MA. 447p.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS & Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48. Programa disponível na *website* (<http://WWW.fluxus-engineering.com>).
- Barrett SCH & Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. New York: Oxford University Press, pp 3–30.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17: 3754-3774.
- Behling H & Negrelle RRB (2001) Tropical Rain Forest and climate dynamics of the Atlantic Lowland, Southern Brazil, during the late quaternary. *Quaternary Res* 56: 383-389.
- Bianconi GV, Mikich SB & Pedro WA (2006) Movements of bats (Mammalia, Chiroptera) in Atlantic Forest remnants in southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23: 1199–1206
- Buzato S & Franco AL (1992) *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 181: 261-267.
- Cabanne GS, Santos FR, & Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91:73-84.
- Carnaval AC & Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.
- Cervi AC (2006) O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summæ Editionem* 16: 1.
- Charles-Dominique P, Blanc P & Larpin D (1998) Forest perturbations and biodiversity during the last ten thousand years in French Guyana. *Acta Oecologica*, 19: 295–302.

- Clegg MT & Zurawsky G (1991) Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: Present status and future prospects. In: Molecular systematics of plants (eds Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ) Chapman and Hall London pp. 1-13.
- Costa LP, Leite YLR, Fonseca GAB & Fonseca MT (2000) Biogeography of South American Forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 872-881.
- Dumolin-Lape`gue S, Pemonge MH & Petit RJ (1998) Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1321-1331.
- Dunn IS & Blattner FR (1987) SharoNS 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research* 15: 2677-2698.
- Dupanloup I, Schneider S & Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-81.
- Elder JF. Jr & Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quaternary Review Biology* 70: 297-320.
- Ellstrand NC & Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Escobar LK (1988) Passifloraceae. Flora de Colombia. Universidade Nacional de Colombia 10: 1-138.
- Excoffier L, Laval G & Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Faria D (2006) Phyllostomid bats of a fragmented landscape in the north-eastern Atlantic forest, Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 22: 531-542.
- Feliner GN & Rosselló JA (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 911-919.
- Feuillet C & MacDougal JM (2003) A new infageneric of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13:34-38.
- Fu YX (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* 143: 557-570.
- Gielly L & Taberlet P (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11: 769-777.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, & Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15: 3969-3982.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521-523.
- Hamilton MB, Braverman JM & Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in

- New World species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1710-1721.
- Harms H (1897) Passifloraceae.. In: A. Engler & K. Prantl, editors. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Nachträge 2–4 (I)*. W. Engelmann, Leipzig. pp 253–256
- Kious WJ & Tilling RI (1996) *The dynamic earth: the story of plate tectonics*. United States Geological Services, U S Government Printing Office, Washington, DC, USA.
- Koch MA, Dobes C, Mitchell-Olds T (2003) Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* 20: 338-350.
- Koehler-Santos P (2005) *Estrutura Populacional, Filogeografia e Evolução de Passiflora alata Curtis (Passifloraceae) no Estado do Rio Grande do Sul*. Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Koehler-Santos P, Lorenz-Lemke A, Muschner VC, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 611–630.
- Koschnitzke C (1993) *Morfologia e biologia floral de cinco espécies de Passiflora L. (Passifloraceae)*. Dissertação de Mestrado Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo.
- Laurance WF & Bierregaard RO Jr (1997) *Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities*. Chicago University Press, Chicago 616p.
- Lorenz-Lemke (2006) *Especiação de plantas no Sul do Brasil: os casos de Passiflora e Petunia*. Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM & Freitas LB (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany* 95: 799-806.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology* 15: 4487-4497.
- Lutz E, Schneller J & Holderegger R (2000) Understanding population history for conservation purposes; population genetics of *Saxifraga aizoides* (Saxifragaceae) in the lowlands and lower mountains north of the Alps. *American Journal of Botany* 87: 583-590.
- Mäder G (2008) *Filogeografia e variabilidade genética de Calibrachoa heterophylla (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae)*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Melo NF de & Guerra M (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309–316.

- Miller MP (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Moreira CD, Gmitter JW, Huang S & Ortega VM (2002) Inheritance of organelle DNA sequences in *Citrus-Poncirus* intergeneric cross. *Journal of Heredity* 93: 174-178.
- Morellato P & Haddad C (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786-792.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB & Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nascimento HEM & Laurance WF (2006) Efeitos de área e de borda sobre a estrutura florestal em fragmentos de floresta de terra-firme após 13-17 anos de isolamento. *Acta Amazonica* 36: 183-192.
- Nicholas KB & Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. Programa disponível na *website* (www.psc.edu/biomed/genedoc).
- Oliveira Filho AT & Fontes MAL (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Olson ME (2002) Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales). *Systematic Botany* 27:55-73.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY & Sites KW Jr (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13-26.
- Perret M, Chautems A, Spichiger R, Kite G & Savolainen V (2003) Systematics and evolution of tribe Sinningiecae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analysis of six plastid DNA regions and nuclear ncpGS. *American Journal of Botany* 90: 445-460.
- Petit RJ & Vendramin GG (2007) Phylogeography of organelle DNA in plants: an introduction. In Weiss S, Ferrand N (eds) *Phylogeography of southern European refugia*. Kluwer, New York 377p.
- Primack RB & Rodrigues E (2001) *Biologia da conservação*. Editora Vida, Londrina, 328p.
- Puerto G, Salomão MG, Theakston RDG, Thorpe RS, Warrel DA & Wüster (2001) Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae) *Journal of Evolutionary Biology* 14: 527-538.
- Quijada A, Liston A, Delgado P, Vázquez-Lobo A & Alvarez-Buylla ER (1998) Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 539-544.
- Ramos AM (2008) História evolutiva de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*. Trabalho de Conclusão do Curso de bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Ribeiro RA, Ramos ACS, Lemos Filho JP & Lovato MB (2005) Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany* 95: 1171–1177.
- Rogers AR & Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Roy A, Frascaria N, Mackay J & Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 173-180.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X & Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sakai M, Kanazawa A, Fujii A, Thseng FS, Abe J & Shimamoto Y (2003) Phylogenetic relationships of the chloroplast genomes in the genus *Glycine* inferred from four intergenic spacer sequences. *Plant Systematics and Evolution* 239: 29-54.
- Scariot A, Freitas SR, Neto EM, Nascimento MT, Oliveira LC, Sanaiotti T, Sevilha AC & Villela DM (2003) Fragmentação de ecossistemas: causas e efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Denise Marçal Rambaldi, Daniela América Suárez de Oliveira (orgs.). Brasília: MMA/SBF 510p.
- Shaw J, Lickei EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE & Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- Salomon M (2001) Evolutionary biogeography and speciation: essay on a synthesis. *Journal of Biogeography* 28: 13-27.
- Stephens M, Smith NJ & Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.
- Strand AE, Leebens-Mack J & Milligan BG (1997) Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. *Molecular Biology* 6: 113-118.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882. Programa disponível na *website* (<ftp://ftp-igbmc.u-trasbg.fr/pub/clustalx>).
- Tonhasca JR A (2005) *Ecologia e história natural da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro, Interciência, 197p.
- Ulmer T & MacDougal JM (2004) *Passiflora: Passionflowers of the World*. Tportland OR. 430p.
- Varassin IG & Silva AG (1999) A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em vegetação de restinga. *Rodriguésia* 50: 5-17.
- Vitta FA & Bernacci LC (2004) A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. *Brittonia* 56:89-95.

- Vuilleumier BS (1971) Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science* 173: 771–779.
- White TJ, Burns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*, p.315-322, Academic Press, San Diego, California.
- Xu DH, Sakai AJ, Kanazawa M, Shimamoto A & Shimamoto Y (2000) Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 101:724-732.
- Young A, Boyle T & Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413–418.
- Zhang D & Sang T (1999) Physical mapping of ribosomal RNA genes in Paeonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent in situ hybridization for phylogeny and concerted evolution. *American Journal of Botany* 86: 753-740.
- Zimmer EA, Martin SL, Beverley SM, Kan YW & Wilson AC (1980) Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77: 2158-2162.

*De acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Genética para citações bibliográficas no periódico *Genetics and Molecular Biology*.