

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

**História evolutiva de uma espécie de *Passiflora* da Mata  
Atlântica**

ANA LUÍZA RAMOS CAZÉ

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

Orientadora: Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre, Setembro de 2012.

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal no Rio Grande do Sul. As reações de sequenciamento e genotipagem foram realizadas no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Fontes Financiadoras:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS)

Ao André

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Loreta Brandão de Freitas, por todo apoio durante essa caminhada, por ter me recebido no laboratório, por todos os ensinamentos e o constante incentivo para não desistir jamais. Muito obrigada!! Sou muito grata a ti, por tudo.

Agradeço imensamente aos colegas do LEM, com os quais compartilhei as alegrias quando o PCR funcionava e as lágrimas quando tudo dava errado, vocês foram extremamente importantes durante todo esse período: Aline, Jeferson, Geraldo, Verônica, Carol, Ana, Maikel, Alice, Michel, Gustavo, Luis e em especial as companheiras de sempre Rak e Pri. Adoro vocês!!

Agradeço à minha família, que mesmo de longe sempre me dão apoio e acreditam em mim e não me deixaram desistir. A família Gondim que me “adotou” obrigada por todo amor e cuidado que sempre tiveram comigo, sem vocês eu não teria conseguido. Amo vocês, muito!

Aos amigos porto-alegrenses: Nati, Cacau, Max, Drico, Lia, Celso e Ana vocês são muito queridos!

Aos amigos de sempre e para sempre da Biodiversidade em Simbiose: Michelle, Beth, Gui, Renato, Augusto, Cecília, Thalita e Cajuzinho, a vida com vocês é mais divertida.

Agradeço aos professores e funcionários do PPGGM e à UFRGS pelo ensino de qualidade.

E por fim, a pessoa mais importante que sempre me incentivou e a que mais acreditou em mim e me deu força para fazer esse mestrado, mesmo quando tudo dava errado sempre me apoiava, eu sei que de alguma maneira tu estas comigo sempre, obrigada André!

## Sumário

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
CAPÍTULO 1: Introdução .....	8
1.1. O gênero <i>Passiflora</i> .....	9
1.2. A espécie <i>Passiflora ovalis</i> Vell ex Rommer .....	11
1.3. A Mata Atlântica .....	14
1.4. Estudos filogeográficos .....	18
1.5 Estudos moleculares em plantas .....	19
1.5.1. Marcadores de herança organelar cloroplastidial .....	20
1.5.2 Marcadores do genoma nuclear .....	21
1.5.3 Marcadores microsatélites .....	22
1.6 Objetivos .....	23
CAPÍTULO 2: Could the refuge theory and rivers acting as barrier explain the genetic variability distribution in Atlantic Rainforest plant species distributed in the sea level ? .....	25
CAPÍTULO 3: Isolation and characterization of microsatellite markers for <i>Passiflora contracta</i> .....	65
CAPÍTULO 4: Discussão Geral .....	72
Referências Bibliográficas (capítulos 1 e 4).....	80

## RESUMO

A Mata Atlântica está entre um dos ecossistemas mais ricos em biodiversidade do mundo. Os processos históricos e evolutivos que levaram a esta enorme diversidade permanecem pouco entendidos até os dias de hoje, o que suscita muitos estudos sobre a fauna e flora da região na busca de hipóteses que expliquem tamanha riqueza. Nesse contexto, utilizando uma espécie de *Passiflora* endêmica da Mata Atlântica, cuja distribuição está restrita às bordas de mata em áreas ao nível do mar, o presente estudo teve como objetivo caracterizar os padrões de variabilidade genética da espécie, bem como testar duas hipóteses que buscam explicar as possíveis causas da diversidade encontrada na Mata Atlântica, a Teoria dos Refúgios e a Hipótese de Rios como barreiras. Foram realizadas análises filogeográficas, utilizando marcadores moleculares dos genomas plastidial e nuclear, com amostras coletadas ao longo de toda a distribuição geográfica da espécie. Os resultados obtidos demonstraram que as populações da espécie encontram-se bastante estruturadas em virtude de baixo fluxo gênico, sem sinal de expansão populacional recente e com indícios de isolamento por distância. As análises realizadas com o marcador nuclear obtiveram resultados mais informativos em relação ao marcador plastidial, tendo sido observado um padrão Norte-Sul de distribuição geográfica na espécie. Foram encontrados três filogrupos e sua separação coincidiu com a posição dos rios Jequitinhonha e Doce, corroborando a hipótese de rios como barreiras contra o fluxo gênico para esta espécie. Os maiores índices de diversidade genética foram encontrados na região central da Bahia, região esta já reportada como possível área de refugio durante as oscilações climáticas do Quaternário, e embora nossos resultados apontem para uma diversificação mais antiga da espécie, ocorrida no Terciário, às áreas de refugio podem ter sido importantes na manutenção e preservação da diversidade já existente durante as alterações climáticas mais recentes. Como estratégia de conservação da espécie que habita um ecossistema já bastante fragmentado, sugerimos que as áreas prioritárias sejam as que possuem a maior diversidade genética, considerando-se também a existência de três grupos de diversidade genética distintos, representados pelos filogrupos encontrados. Este trabalho ainda fez uma importante contribuição para o entendimento da classificação taxonômica da espécie, reabilitando sua divisão em duas entidades taxonômicas distintas.

## ABSTRACT

The Atlantic Rainforest is one of the most species-rich ecoregions in the world. The factors concerning the historical origin and evolutionary processes that gave rise to such diversification and that promoted speciation in this ecosystem remains poorly understood. Many studies of fauna and flora have been conducted in this region with the aim of explaining such richness. In this context, this study aimed to characterize the patterns of genetic variability in a species of the *Passiflora* genus endemic to the Atlantic Rainforest and distributed exclusively at the sea level, in forest edges, and test two hypotheses that attempt to explain the possible causes of the diversity found in the Atlantic Rainforest: the refuge theory and riverine barrier hypothesis. The phylogeographic analyzes were performed using molecular markers of nuclear and plastid genomes, with samples collected throughout the geographic distribution of the species. The results showed that populations were structured possibly due to the low gene flow. There is also evidence of demographic stability without recent population expansion and evidence for isolation by distance. The nuclear marker dataset was more informative than the plastidial marker dataset, and showed the existence of a clear phylogeographical structure and the presence of three phylogeographic groups. It was observed that the separation of the three groups coincides to the location of the Jequitinhonha and Doce Rivers, corroborating the riverine barriers acting as barriers against gene flow in this species. The highest levels of genetic diversity were found in central Bahia, a region reported as a possible refugial area for other species during the climatic changes in the Quaternary, and although the results obtained in this study showed that the origin and diversification of this species was older, occurring during the Tertiary, the refugial area should have been very important for the maintenance of an already existing diversity throughout the climatic changes. As a conservation strategy for this species, which inhabits a extremely endangered ecosystem, we suggest that the locations presenting high genetic diversity levels and belonging to each one of the three phylogroups must be given high priority for conservation. In this work we have done an important contribution for the taxonomic classification of this species, recovering the two *taxa* condition to this geographic area.

# Capítulo 1

## Introdução



## 1.1 Gênero *Passiflora* L.

O gênero *Passiflora* L. foi estabelecido por Linnaeu, em 1735, pertence à família Passifloraceae e compreende aproximadamente 530 espécies, com novas espécies sendo frequentemente catalogadas (Nunes & Queiroz, 2007; Milward-de-Azevedo, 2008). Este é o gênero mais representativo da família (Hansen *et al.*, 2006).

A classificação taxonômica vigente para o gênero subdivide-o em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast.; *Decaloba* (DC.) Rchb.; *Passiflora* L. e *Deidamioides* (Harms) Killip (Feuillet & MacDougal, 2003). Esta classificação foi inicialmente baseada em caracteres morfológicos, tendo sido amplamente suportada pelos dados de filogenia molecular (Muschner *et al.*, 2003, 2012; Hansen *et al.*, 2006).

O gênero *Passiflora* é uma parte importante da flora Neotropical, apresentando maior diversidade na América Central e América do Sul. Apenas 22 espécies são nativas do Sudeste da Ásia, Austrália e Ilhas do Pacífico (Krosnick & Freudenstein, 2005; Hansen *et al.*, 2006). No Brasil, esse gênero compreende mais de 140 espécies nativas (Cervi, 2006), sendo o País considerado um dos maiores centros de diversidade genética do grupo (Melletti *et al.*, 2005; Tokuoka, 2012). Algumas espécies do gênero são utilizadas na alimentação, na produção de fitoterápicos e como plantas ornamentais (Hansen *et al.*, 2006).

Os representantes do gênero são geralmente trepadeiras herbáceas ou lianas lenhosas, as quais possuem gavinhas axilares. Algumas espécies, porém, possuem hábitos arbustivos podendo ser até mesmo árvores (Judd *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2006).

A classificação taxonômica das espécies do gênero *Passiflora* baseada em caracteres morfológicos torna-se bastante complexa em decorrência da enorme variedade e complexidade dos seus aspectos foliares e florais (Cervi & Rodrigues, 2010;

Yotoko *et al.*, 2011; Cutri *et al.*, 2012). Os tipos foliares incluem desde folhas com a presença de lâminas que podem ser finas, membranosas ou coriáceas e podem se apresentar inteiras (sem lóbulos) ou até mesmo conter nove lóbulos em uma mesma espécie (Ulmer & MacDougal, 2004). Toda essa diversidade foliar pode estar relacionada à pressão evolutiva exercida pelas borboletas do gênero *Heliconius*. Em folhas jovens, observa-se na sua porção apical a presença de estruturas que mimetizam os ovos ou as larvas de heliconídeos, o que seria uma estratégia de defesa contra a predação pelas lagartas que se alimentam apenas das folhas das passifloras (Feuillet & MacDougal, 2003).

Em relação aos aspectos florais, destacam-se as múltiplas séries de cores que vão desde flores brancas até vermelhas, a enorme variedade no tamanho das flores, a presença de uma corona de filamentos, o opérculo com diversas morfologias, a presença de cinco estames e órgãos reprodutivos unidos formando uma estrutura denominada androginóforo a qual, vale salientar, é uma característica que mantém a monofilia do gênero (Feuillet & MacDougal, 2003; Hansen *et al.*, 2006).

Devido à enorme diversidade de formas, cores e aromas, o gênero *Passiflora* atrai diversos tipos de polinizadores. A síndrome floral predominante é a melitofilia (polinização por abelhas), porém, em algumas espécies ocorrem a ornitofilia (polinização por aves), a esfingofilia (polinização por mariposas) e, mais raramente, a síndrome da quiropterofilia (polinização por morcegos) (Buzato & Franco, 1992; Feuillet & MacDougal, 2003). Os principais dispersores das sementes são as aves e os morcegos, porém alguns mamíferos frugívoros e pequenos roedores também já foram observados se alimentando dos frutos (Williams *et al.*, 2000; Koehler-Santos *et al.*, 2006a).

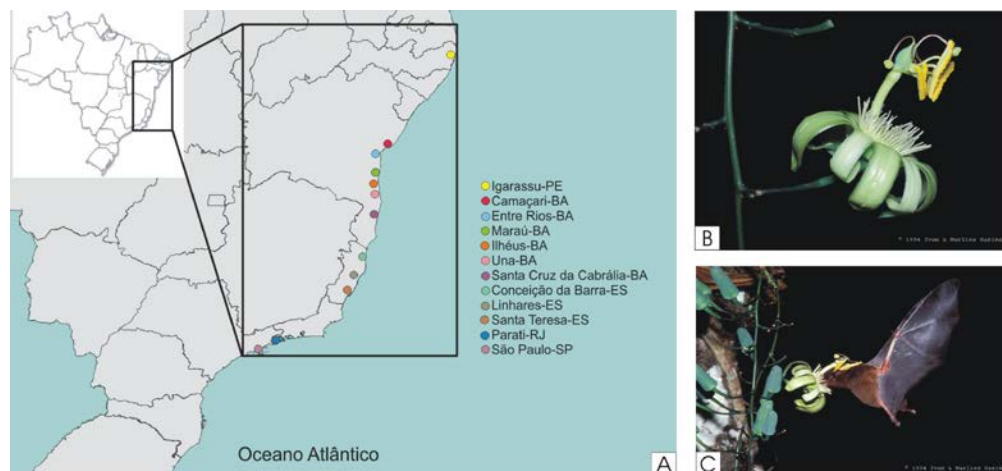
## 1.2 *Passiflora ovalis* Vell ex Rommer

A espécie *Passiflora ovalis* pertence ao subgênero *Deidamioides*, sendo este o menor subgênero em *Passiflora*, composto por apenas 13 espécies. Neste subgênero encontram-se as espécies que apresentam distribuição sul-americana, de ocorrência principalmente no noroeste da América do Sul, região considerada como o centro de diversidade de *Passiflora*, onde crescem diversas espécies com caracteres morfológicos diagnósticos considerados como basais evolutivamente para este grupo de plantas. O subgênero se caracteriza por apresentar, na maioria de suas espécies, flores que se originam diretamente a partir das gavinhas (Ulmer & MacDougal, 2004).

Inicialmente, a espécie *P. ovalis* foi descrita como parte da sessão *Tetrastylis* Barb. Rodr de *Passiflora* (Harms, 1897) e posteriormente foi elevada à condição de gênero independente sendo denominada *Tetrastylis ovalis* Vell Ex Romer. Somente em 2003, voltou a fazer parte do gênero *Passiflora*, subgênero *Deidamioides* (Feuillet & MacDougal, 2003; Muschner *et al.*, 2003). As características que distinguem essa espécie das demais passifloras são a presença de quatro estigmas e estiletos, quando a condição comum no gênero é a presença de apenas três dessas estruturas, além da posição inclinada do androginóforo.

*Passiflora ovalis* é uma espécie endêmica da Mata Atlântica (Cervi *et al.*, 2009), com hábito de trepadeira lenhosa, encontrada em bordas de floresta, em regiões de mata preservadas. Ocorre em áreas próximas ao litoral, desde o Estado de São Paulo até o Estado de Pernambuco (figura 1a). Apresenta inflorescência racemosa pendente, com as flores abrindo desde a base até o topo, podendo cada inflorescência conter até 20 flores. Os grãos de pólen são amarelos vívidos, as flores são brancas amareladas (figura 1b) e emitem um aroma muito forte que se assemelha ao odor de alho (Buzzato & Franco, 1992; Ulmer & MacDougal, 2004).

A espécie apresenta a rara síndrome da quiropterofilia (Buzzato & Franco, 1992), sendo suas flores visitadas pelos morcegos da espécie *Glossophaga soricina* (PALLAS) – Glossophaginae e *Rhinophylla pumilio* (PETERS) – Carollinae (figura 1c). As características como antese ao entardecer, fragrância muito forte semelhante ao cheiro de alho e a posição das anteras no botão são traços comuns a espécies polinizadas por morcegos. A forte fragrância presente durante os primeiros minutos da produção do néctar no momento da abertura das flores é importante para atrair os morcegos a longas distâncias, enquanto que a coloração das pétalas e sépalas e a posição das flores na inflorescência são importantes para atrair o morcego quando este se encontra próximo da flor (Buzzato & Franco, 1992).



**Figura 1:** a) Mapa com a distribuição geográfica das amostras coletadas; b) flor em detalhe, evidenciando as peças reprodutivas, a corona de filamentos e a curvatura das pétalas. Foto: Ivan & Marlies Sazima; c) morcego polinizador com destaque para o contato entre as anteras e o dorso do animal. Foto: Ivan & Marlies Sazima.

Merece destaque o fato de que as folhas de *P. ovalis* são utilizadas como alimento pelas lagartas do gênero de borboletas *Heliconius* (Brown, 1981). Para *Heliconius nattereri* esta é a única planta hospedeira e as fêmeas desta espécie de borboleta somente ovipositam nas extremidades das gavinhas ou nos meristemas

apicais, o que corresponde às regiões de maior crescimento e proliferação celular da planta. É importante destacar que uma planta que tem seus meristemas apicais predados dificilmente será capaz de produzir novos ramos ou flores (Williams & Gilbert, 1981).

Em 2004, Vitta & Bernacci sugeriram a separação da espécie em duas, baseados na diferenciação dos caracteres morfológicos presentes na estrutura da inflorescência e do indumento da semente e no fato de que as plantas que possuíam caracteres distintivos apresentavam distribuição disjunta. Para os referidos autores, as populações do norte da distribuição nos estados de Pernambuco, Bahia e Espírito Santo (~ 07 - 21° S) foram consideradas como *Passiflora contracta* Vitta & Bernacci, espécie que apresenta inflorescências racemiformes, com comprimento variando de 7 a 12 cm, sem pedúnculo floral e apenas um pedicelo articulado medindo de 1,3 a 2,7 cm. Essas estruturas dão à flor uma aparência séssil. As populações do sul da distribuição, encontradas nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (~ 21 - 25° S) foram mantidas como *Passiflora ovalis*, que apresenta inflorescências paniculiformes, bem maiores que as de *P. contracta*, com comprimento que pode ir desde 30 até 90 cm. Os pedúnculos nesta espécie são alongados, com comprimento entre 6 a 15 mm e apresentam de dois a três pedicelos articulados de 4 a 5,5 cm de comprimento. Porém, em 2006, Cervi sinonimizou *P. ovalis* e *P. contracta* sob o epíteto específico de *P. ovalis*, uma vez que para este autor as características florais que levaram Vitta & Bernacci (2004) a distinguir as duas espécies variam muito nas populações naturais e podem sofrer influências do ambiente, podendo ser tomadas como adaptações regionais. A classificação taxonômica vigente é a proposta por Cervi (2006) e foi adotada na realização do presente trabalho. Até o momento, nenhuma caracterização genética foi realizada comparando as duas formas e somente representantes do que seria a espécie *P. contracta* (Vitta & Bernacci, 2004) foram incluídos em análises moleculares sob o

nome de *P. ovalis* (Muschner *et al.*, 2003; 2012; Hansen *et al.*, 2006). Da mesma forma, as fotos apresentadas nas figuras 1b e 1c também são de representantes de *P. contracta* (sensu Vitta & Bernacci, 2004), mas classificadas como *P. ovalis*.

### 1.3 A Mata Atlântica

A origem da Mata Atlântica remonta há aproximadamente 65 milhões de anos atrás (MYA) (Colombo & Joly, 2010), após a separação continental entre a América do Sul e a África há cerca de 100 MYA (Hoorn *et al.*, 2010). O soerguimento dos Andes, no Neogeno, exerceu forte impacto na história do continente Sul americano, desempenhando papel fundamental na evolução e diversificação da flora neotropical, a qual também inclui a Mata Atlântica. O Neotrópico é a região mais rica em biodiversidade no mundo (Antonelli *et al.*, 2009), abrigando aproximadamente 37% das espécies da flora atual (Antonelli & Sanmartin, 2011).

A Mata Atlântica é a segunda maior região de floresta úmida das Américas (Oliveira Filho & Fontes, 2000; Tabarelli *et al.*, 2005) e uma das regiões ecológicas mais ricas em biodiversidade do planeta, sendo considerada o quinto *hotspot* do mundo, devido à sua riqueza de espécies, ao alto número de endemismos e à constante degradação que leva à perda do habitat (Myers *et al.*, 2000; Mittermeier *et al.*, 2005). Foram descritas nesta região cerca de 20.000 espécies de plantas, sendo aproximadamente 8.000 endêmicas. Uma das áreas de maior riqueza de espécies e endemismos na Mata Atlântica é a região que corresponde ao estado da Bahia, considerada como centro de diversidade para muitos grupos de plantas. É, portanto, uma importante área de preservação biológica (Martini *et al.*, 2007). Pela Constituição Federal Brasileira de 1988, a Mata Atlântica foi decretada como Reserva da Biosfera e pela UNESCO como Patrimônio Nacional da Humanidade.

O Domínio Atlântico, que representa o conceito *sensu lato* da Floresta Atlântica, foi estabelecido de acordo com a Lei Federal nº 11.428/2006 e considera como pertencentes à região da Mata Atlântica as formações Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista (também denominada de Mata de Araucárias), Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, bem como os manguezais, as vegetações de restingas, os campos de altitude, os brejos interioranos e os encraves florestais do Nordeste.

Originalmente, a Mata Atlântica cobria 1.500.000 km<sup>2</sup>, estendendo-se do leste do Paraguai, norte da Argentina e ao longo de toda a costa do Brasil, abrangendo 17 estados brasileiros. Atualmente restam apenas 7,9 % de remanescentes florestais com área superior a 100 hectares e, se forem considerados todos os fragmentos florestais acima de três hectares, tem-se um total de 11% (Fundação SOS Mata Atlântica, 2012).

A Mata Atlântica apresenta uma enorme heterogeneidade de condições ambientais, com amplitude de latitude que varia entre 6 a 30° S, com diferentes fitofisionomias ao longo da distribuição, composições florísticas variadas, diversas condições climáticas, bem como o solo, a topografia e a geomorfologia, que tiveram diferentes origens geológicas e foram moldados pelos eventos tectônicos do Terciário e pelas mudanças no nível do mar ocorridas no Quaternário (Oliveira-Filho & Fontes, 2000; Tabarelli *et al.*, 2005; Suguio *et al.*, 2005). Todo esse conjunto de fitofisionomias propicia um ambiente favorável para explicar a enorme biodiversidade encontrada na região.

Além de abrigar uma grande diversidade de fauna e flora, a Mata Atlântica também abriga uma complexa rede de bacias hidrográficas formada por importantes rios como o Paraná, o Tietê, o São Francisco, o Jequitinhonha, o Doce, o Paraíba do Sul, o Paranapanema e o Ribeira de Iguape. Esses rios têm papel fundamental como fonte de

alimento para a população humana, bem como para o desenvolvimento de atividades econômicas no País (Ministério do Meio Ambiente, 2007), além de serem importantes barreiras físicas para alguns grupos de espécies (Pellegrino *et al.*, 2005; Thomé *et al.*, 2010).

Baseado nos estudos palinológicos de Behling & Negrelle (2001), Behling, (2002) e Ledru *et al.* (2005) e de modelagens de nicho ecológico de Carnaval & Moritz (2008), Cabanne *et al.* (2008) propuseram que a Mata Atlântica seja separada em três regiões distintas: I - região norte da Floresta Atlântica, com alta estabilidade florestal na parte leste da costa e curtos períodos de expansão nas áreas atualmente cobertas por um tipo de vegetação de caatingas; II - uma região central, caracterizada pela estabilidade na parte leste e curtos períodos de instabilidade no oeste; e III - região sul com forte instabilidade, regressão e fragmentação seguida de expansão no Holoceno médio/tardio.

Muitos estudos filogeográficos relatam uma clara separação na distribuição das espécies localizadas na região norte daquelas localizadas na porção sul da Mata Atlântica. Esse padrão foi observado em estudos com animais e plantas (Harris *et al.*, 2005; Pellegrino *et al.*, 2005; Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011; Amaro *et al.*, 2012).

Os processos que levaram a toda essa diversidade encontrada na Mata Atlântica ainda não estão bem resolvidos. Sabe-se que processos geotectônicos, dinâmicas de rios, transgressões e regressões marinhas tiveram importância na formação do que se tem hoje como Mata Atlântica. Diversos estudos têm sido realizados nessa região no intuito de contribuir para a formação de um padrão que explique tamanha riqueza de espécies (Grazziotin *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010, Ribeiro *et al.*, 2010; Novaes, *et al.*, 2010; Thomé *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2011; entre outros). Algumas



das hipóteses mais investigadas são baseadas em modelos de especiação alopátrica e relacionam-se com eventos biogeográficos, como a teoria dos refúgios e a dos rios como barreiras (Moritz *et al.*, 2000). A teoria dos refúgios postula a existência de áreas que passaram por longos períodos de estabilidade climática, as quais apresentariam maior riqueza de espécies, pois teriam atuado como refúgios durante os períodos de oscilações climáticas do Quaternário e essas áreas teriam sido importantes para explicar os padrões de diversidade contemporânea (Haffer, 1969; Prance, 1978; Bennett & Provan, 2008). Em 2008, Carnaval & Moritz propuseram a existência de áreas de refúgio na região norte da Mata Atlântica. Já Wallace (1852) propôs a teoria dos rios atuando como barreira, sugerindo que uma das causas da diferenciação e diversificação observadas em *taxa* proximamente relacionados e entre populações de uma mesma espécie ocorreria devido à restrição de fluxo gênico provocada por barreiras físicas, como por exemplo, a existência de rios. Para algumas espécies, observou-se uma maior diferenciação genética entre as populações localizadas nas margens opostas de rios, levando a formular a hipótese de que os rios podem ser determinantes na delimitação do padrão de distribuição geográfica de espécies e responsáveis pelas quebras filogeográficas encontradas em espécies também da Mata Atlântica. Alguns exemplos que se enquadram nesta hipótese podem ser encontrados em Pellegrino *et al.* (2005), Lacerda *et al.* (2007), Thomé *et al.* (2010) e Ribeiro *et al.* (2010).

Desde o início da colonização do Brasil, a Mata Atlântica vem sendo alvo de desmatamento e degradação. Inicialmente, com a exploração do pau-brasil (Tonhasca, 2005) e mais recentemente através de atividades agrícolas, extração de madeira, pecuária, caça ilegal, superexploração de algumas espécies frutíferas, bem como para a plantação de espécies exóticas, além do crescente desmatamento para dar lugar às construções civis (Morellato & Haddad, 2000; Tonhasca, 2005). Atualmente, a Mata

Atlântica encontra-se bastante fragmentada com diversas porções abertas e pequenas manchas florestais isoladas. A destruição e fragmentação acarretam efeitos prejudiciais à biodiversidade da região, como a redução, o isolamento e até mesmo as extinções locais da fauna e flora (Morellato & Haddad, 2000; Lira *et al.*, 2003; Tabarelli *et al.*, 2005). Espécies que habitam regiões fragmentadas, geralmente, apresentam reduzida variabilidade genética, decorrentes do endocruzamento e dos efeitos da deriva genética principalmente, nas periferias de sua distribuição (Ellstrand & Elam, 1993; Tonhasca, 2005).

Embora já existam áreas de preservação da Mata Atlântica, elas não conseguem abranger todas as formações florestais. É necessário que sejam criadas unidades de conservação que englobem as regiões de maior diversidade. Daí a importância de estudos da fauna e da flora, os quais apontem as áreas com maior diversidade genética para que sejam consideradas prioritárias para a conservação (Ministério do Meio Ambiente, 2007).

#### **1.4 Estudos filogeográficos**

O termo filogeografia foi proposto pela primeira vez por Avise *et al.* (1987) e designa a área do conhecimento que tem como objetivo decifrar os componentes temporais e espaciais da estrutura das populações e interpretar os processos ecológicos e evolutivos que estão relacionados com os padrões de estruturação que podem ser observados nas populações atuais (Avise, 2000, 2009). Apesar de relativamente nova, a filogeografia tem sido bastante explorada, resultando em diversos estudos publicados nos últimos anos (Beheregaray, 2008; Avise, 2009).

A filogeografia é uma disciplina interativa, que abrange as áreas da genética de populações, filogenia molecular e biogeografia. Dispondo de quantidade adequada de

amostras para o estudo e de marcadores moleculares que sejam informativos é possível fazer inferências sobre hipóteses biogeográficas, história demográfica, processos de origem, evolução e manutenção da biodiversidade, bem como inferir como mudanças físico-ambientais e históricas podem ter influenciado na presente distribuição das espécies (Beheregaray, 2008).

Os primeiros marcadores moleculares utilizados em estudos filogeográficos foram os do DNA mitocondrial, devido à alta frequência de variação nucleotídica encontrada, o que é um dos pré-requisitos para a realização das análises filogeográficas (Avice, 2009). Em plantas, os marcadores mais utilizados são os de sequência de DNA, que podem ser os de herança organelar plastidial (cpDNA) uniparentais e também os de herança biparental nuclear (Beheregaray, 2008; Avice, 2009).

Com o avanço das técnicas moleculares utilizando o DNA e com o desenvolvimento de rigorosos métodos estatísticos, possibilidade de realizar refinadas análises computacionais, além da disponibilidade de incorporar nas análises dados geoespaciais e com o desenvolvimento de metodologias de modelagem, os estudos filogeográficos tem aumentado seu poder de resolução, traçando de uma maneira mais robusta os cenários históricos dos processos demográficos e evolutivos pelos quais passaram determinadas populações, além de testar hipóteses alternativas para os padrões de diferenciação populacional (Knowles, 2009; Strasburg & Rieseberg, 2010; Chan *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2012).

### **1.5 Marcadores moleculares**

Os marcadores moleculares são uma ferramenta importantíssima nos estudos evolutivos e tem apresentado grandes avanços nos últimos anos, sendo bastante úteis

para estudos de conservação, genética de populações, filogenias e filogeografia (Collevatti *et al.*, 2001; Schlötterer, 2004; Avise, 2009).

Neste contexto, para estudos filogeográficos, os marcadores moleculares mais utilizados são aqueles que são capazes de fornecer informações genealógicas (Avise, 1987). Em plantas, são bastante utilizados os marcadores de herança plastidial uniparental (cpDNA), em que diversas regiões podem ser amplificadas e analisadas em conjunto (Shaw *et al.*, 2005) e os marcadores nucleares de herança biparental, especialmente os espaçadores internos transcritos do DNA nuclear ribossomal - ITS (Alvarez & Wendel, 2003). Nos últimos anos, tem sido observada a crescente utilização, em conjunto, de classes distintas de marcadores moleculares, como os de herança uniparental (cpDNA e mtDNA) e biparental (microsatélites ou sequências nucleares), para condução de estudos filogeográficos (Beheregaray, 2008).

### **1.5.1 Marcadores de herança organelar plastidial**

Marcadores plastidiais são bastante úteis para inferir filogenias em níveis intergenéricos e interespecíficos (Shaw *et al.*, 2005). São de herança uniparental e, na maioria das vezes, não sofrem recombinação. Uma das vantagens desse tipo de marcador é que, por estarem em regiões não-codificadoras, eles apresentam maior variação do que as regiões codificadoras, por não estarem sob pressão seletiva (Liston *et al.*, 2007), além de apresentarem muitas mudanças microestruturais como as inserções e deleções (indels) que são consideradas como a maior força atuante na evolução das sequências não-codificadoras do DNA (Yamane *et al.*, 2006). Dentre as inúmeras regiões do cloroplasto, destaca-se o espaçador *trnS-trnG* (espaçador entre os genes *trnS*, que codifica o RNA transportador da Serina, e *trnG*, que codifica o RNA transportador da Glicina), que teve seus *primers* desenvolvidos por Hamilton, (1999). Diversos

trabalhos relatam a importância desta região plastidial por apresentar variação intra-específica suficiente para permitir estudos populacionais em diversos grupos de plantas, além de ser mais variável que outras regiões do cloroplasto (Xu *et al.*, 2000; Olson, 2002; Hamilton *et al.*, 2003). Por outro lado, alguns trabalhos alertam que o uso apenas de marcadores de cloroplasto podem ser ineficientes ou insuficientes em determinados estudos (McCauley, 1995).

### **1.5.2 Marcadores do genoma nuclear**

Regiões não-codificadoras de genomas nucleares também são bastante empregadas em estudos populacionais, sendo estes marcadores, preferencialmente, utilizados em estudos evolutivos em diversos grupos de plantas, nos quais se destacam os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (Baldwin *et al.*, 1995; Alvarez & Wendel, 2003; Feliner & Rosselló, 2007; Calonje *et al.*, 2009). As vantagens deste tipo de marcador são sua herança biparental, que o distingue dos marcadores organelares. Esse tipo de herança permite fazer inferências sobre casos passados de reticulações, eventos de especiação em híbridos, além de contar toda a história da espécie, o que não é possível somente com marcadores organelares (Xu, 2005). Outra vantagem é a sua universalidade, White *et al.* (1990) descreveram um conjunto de *primers* que amplificam esta região em muitos grupos de plantas e fungos, além da sua uniformidade intragenômica, decorrente de evolução em concerto e, principalmente, devido à alta variabilidade do marcador (Felliner & Rosselló, 2007).

O uso do marcador ITS tem obtido sucesso quando utilizado para inferir padrões filogeográficos em uma ampla gama de espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Koehler-Santos *et al.*, 2006b; Yamaji *et al.*, 2007). Mäder *et al.* (2010) em seu estudo com amostras representativas dos quatro subgêneros de *Passiflora*, encontraram grande

variação intra e interespecífica, utilizando sequências de ITS e ratificaram a utilidade deste marcador para estudos filogeográficos no gênero, estabelecendo regras para sua análise, codificação e utilização.

### **1.5.3 Marcadores microssatélites**

Uma das classes de marcadores moleculares que vem sendo frequentemente utilizada em estudos populacionais são os marcadores microssatélites. O DNA alvo é do tipo sequência simples repetida (SSRs) que consiste de pequenas sequências, com um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas ao longo do genoma, cerca de quatro a 60 vezes, podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras quanto em regiões não codificadoras dos genomas procarióticos e eucarióticos (Tóth *et al.*, 2000). As diferentes repetições encontradas podem ser perfeitas, quando não apresentam interrupção; imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; e compostas, quando duas ou mais repetições de microssatélites estão dispostas adjacientemente, e estas podem ser perfeitas ou imperfeitas (Zane *et al.*, 2002).

Uma das maneiras de obter os SSR é através da construção de uma biblioteca genômica enriquecida (Rassmann *et al.*, 1991). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são em geral bastante conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie e, em alguns casos, de espécies proximamente relacionadas, o que permite que uma vez encontrado o microssatélite, *primers* específicos sejam desenhados, permitindo a amplificação via PCR (Selkoe & Toonen, 2006).

Este tipo de marcador apresenta como característica principal, de grande importância em estudos populacionais e filogeográficos, a possibilidade de amplificar diversos *loci*, frequentemente multialélicos, de herança co-dominante e de fácil detecção por PCR (Pinto *et al.*, 2001). Também são caracterizados pelas altas taxas de mutação

que apresentam  $\mu = 5 \times 10^{-4}$  (Sia *et al.*, 2000; Whittaker *et al.*, 2003), sendo estas mais altas que no restante do genoma no qual se inserem (Jarne & Lagoda, 1996), o que provê uma excelente resolução para processos microevolutivos recentes ou em curso (Wang, 2010).

Inicialmente, esses marcadores eram utilizados apenas em estudos com humanos (Weber & May, 1989), posteriormente tendo sido incluídos em diversos estudos envolvendo plantas e animais, com diversas abordagens, por exemplo, populacionais, conservacionistas (Wright & Bentzen, 1994; Collevatti *et al.*, 2001; Selkoe & Toonen, 2006; Du *et al.*, 2010; Germain-Aubrey *et al.*, 2011; Sonah *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012), além de serem aplicados em estudos forenses (Lee *et al.*, 2011) e de epidemiologia molecular (Broza *et al.*, 2009).

## 1.6 Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os padrões de variabilidade genética da espécie *Passiflora ovalis*, testando as hipóteses de presença de áreas de refúgio na Mata Atlântica, propostas por Carnaval & Moritz (2008) e a de rios como barreiras ao fluxo gênico (Wallace, 1982). Para tanto foram realizadas análises filogeográficas usando marcadores moleculares dos genomas nuclear e plastidial.

Como objetivos específicos tivemos:

- Determinar os níveis de diversidade genética através dos espaçadores internos do DNA ribossomal nuclear (ITS) e do espaçador intergênico plastidial *trnS-trnG*;
- Estimar a distribuição da variabilidade genética intra e interpopulacional considerando os marcadores utilizados;
- Verificar a existência de linhagens diferenciadas e a presença de barreiras geográficas que possam separá-las;

- Desenvolver e validar marcadores microssatélites para a espécie de forma que possam ser utilizados na análise da dinâmica populacional e determinação do fluxo gênico entre as populações em estudos futuros;

- Contribuir para o conhecimento taxonômico do grupo.



## **CAPÍTULO 2:**

**Could the refuge theory and rivers acting as barrier explain the genetic variability distribution in Atlantic Rainforest plant species distributed in the sea level?**

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico “Molecular Ecology”.

1           Could the refuge theory and rivers acting as barrier explain the genetic variability  
2           distribution in Atlantic Rainforest plant species distributed in the sea level?  
3  
4

5           ANA LUIZA R. CAZÉ\*. THEONILDES S. NUNES#. LUCIANO P. QUEIROZ#.  
6           GERALDO MÄDER\*, SANDRO L. BONATTO<sup>£</sup> AND LORETA B. FREITAS\*

7  
8           \**Laboratory of Molecular Evolution. Genetics Department. Universidade Federal do Rio*  
9           *Grande do Sul. PoBox 15053. 91501-970 Porto Alegre. RS. Brazil;* # *Department of*  
10           *Biological Sciences. Universidade Estadual de Feira de Santana. Av. Universitária Km 3.*  
11           *Feira de Santana. BA. Brazil;* <sup>£</sup> *Laboratory of Genomic and Molecular Biology. Pontifícia*  
12           *Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Ipiranga 6681. 90610-001 Porto Alegre. RS.*  
13           *Brazil.*

14  
15           *Keywords:* Atlantic Rainforest; phylogeography; riverine barriers; refuge theory

16  
17           *Corresponding author:* Loreta B. Freitas. Ph.D. Genetics Department. UFRGS. PoBox  
18           15053. 91501-970 Porto Alegre. RS. Brazil. Tel: 55 51 3308-6731. Fax: 55 51 3308-9823.  
19           E-mail: loreta.freitas@ufrgs.br

20  
21           *Running title:* Phylogeography of Atlantic Rainforest species

## 22 **Abstract**

23           The Atlantic Rainforest is one of the most species-rich ecoregions in the world. The  
24 hypothesis concerning origin historical and evolutionary processes give rise to  
25 diversification and promoted speciation in this ecosystem remain poorly understood. In this  
26 context, using a *Passiflora* species, endemic from Atlantic Rainforest and distributed  
27 exclusively in the sea level, in forest edges, this study aimed to characterize the patterns of  
28 genetic variability and test two hypotheses that attempt to explain the possible causes of the  
29 genetic diversity found in the Atlantic Rainforest: the refuge theory and riverine barriers.  
30 The phylogeographic analyzes were performed using molecular markers of nuclear and  
31 plastid genomes, with samples collected throughout the geographic distribution of species.  
32 The results showed that populations were genetically structured and provided evidence of  
33 isolation by distance and demographic stability without evidence of recent population  
34 expansion. The nuclear ITS marker showed the existence of a clear phylogeographical  
35 structure and the presence of three phylogeographic groups. Interestingly the separation of  
36 the three groups coincides with the location of Jequitinhonha and Doce Rivers,  
37 corroborating the riverine barriers acting as barriers against gene flow in this species. The  
38 highest levels of genetic diversity were found in the same region reported for other species  
39 as a possible refuge area during the climatic changes of the Quaternary. Although this study  
40 showed that the origin and diversification of this species was older, the refuge area should  
41 have been very important to protect and to maintain the already existing diversity during  
42 such climatic changes. As strategies for the species conservation, we suggest that the  
43 locations presenting high genetic diversity levels and belonging to each one of the three  
44 phylogroups must be considered as priority for conservation.

## 45 **Introduction**

46           The tropical ecosystems are of longstanding interest to many Biology research  
47 fields. These areas are especially rich in species and the hypotheses concerning origin and  
48 evolutionary processes give rise to diversification and promote speciation in the Neotropic  
49 remains poorly understood (Moritz *et al.* 2000; Jaramillo *et al.* 2006; Pennington *et al.*  
50 2006; Dainou *et al.* 2010; Antonelli & Sanmartín 2011; Rull 2011). In the beginning, the  
51 most diversification observed in the Neotropic were attributed to concern just to Pleistocene  
52 events, but recent studies have reported that the events that led to diversification occurred  
53 in older periods (Hoorn *et al.* 2010). Many studies based on fossil pollen record and  
54 molecular phylogenies showed that the distribution and composition of vegetation in  
55 Neotropic were also deeply influenced by Tertiary events (Moritz *et al.* 2000; Jaramillo *et*  
56 *al.* 2006). Other studies, in fauna species, reported that the most speciation events predate  
57 the Quaternary in the tropical rainforest (Geurgas *et al.* 2008; Werneck *et al.* 2009; Patel *et*  
58 *al.* 2011).

59           The Atlantic Rainforest began its process of formation after South America was  
60 separating from Africa, between circa of 60 million years ago (MYA; Pennington *et al.*  
61 2006) and 65 MYA (Colombo & Joly 2010). Nowadays, this ecoregion represents a  
62 complex topographic area due to marine transgressions during interglacial periods,  
63 geotectonic processes and river dynamics that have affected the South American Continent  
64 (Suguio *et al.* 2005). Among the most important geotectonic processes, the Andes uplift  
65 during the Neogene had a profound impact on the history of the entire continent (Hoorn *et*  
66 *al.* 2010). Recent phylogenetic studies have shown that the Andean orogeny has played also  
67 a major role in the evolution of the Neotropical flora (Antonelli *et al.* 2009).

68           According Martins (2011), the Atlantic Rainforest presents strong seasonality, sharp  
69 environmental gradients and orographic-driven rainfall as a result of the winds from the  
70 tropical Atlantic Ocean action. Because these the Atlantic Rainforest is composed by open,  
71 mixed and closed evergreen, semi-deciduous and deciduous forests landscapes,  
72 interspersing patches of forest and open field areas. Atlantic Rainforest has been  
73 fragmented by anthropic actions in the last five centuries also and many open areas and  
74 patches of forest were isolated in consequence (Tabarelli *et al.* 2005).

75           The species that inhabit naturally fragmented areas generally present reduced  
76 genetic variability in the peripheries of their distribution and could offer evidences about  
77 the processes that modeled their evolutionary history. In Atlantic Rainforest this scenario  
78 was described from paleopalynological data and has been supported by molecular evidences  
79 (Graziotin *et al.* 2006; Lorenz-Lemke *et al.* 2010; Novaes *et al.* 2010; Thomé *et al.* 2010;  
80 Ribeiro *et al.* 2010; Pinheiro *et al.* 2011).

81           Phylogeographic and population genetics studies should provide valuable  
82 information about the diversity patterns and population structure. According Beheregaray  
83 (2008) the phylogeography is a young, vigorous and interactive field of study that has  
84 grown in recent years, but needs more improvements in tropical areas, particularly in  
85 Neotropic. Some of the most investigated hypotheses to explain the great diversity in the  
86 Neotropic were based on models of allopatric speciation (Moritz *et al.* 2000) and are related  
87 to biogeographic events as the refuge theory (proposed initially by Haffer 1969) and  
88 riverine barrier (proposed by the first time by Wallace 1852).

89           The refuge theory is defined as the presence of areas of long-term climate stability  
90 that often have high species richness and have been considered important in modeling  
91 diversity and contemporary patterns biological (Haffer 1969; Prance 1978; Graham *et al.*

92 2006; Bennet & Provan 2008). Previously, the refuge theory just focused in the Quaternary  
93 events, although recently has been extend to Tertiary, in assumption that events in this  
94 period were of sufficient amplitude and duration to promote diversification and speciation  
95 (Simpson & Haffer 1978; Haffer 1997). Carnaval & Moritz (2008) proposed the presence  
96 of historical refuge in the Atlantic Rainforest. Their model describes different histories in  
97 north and south forest parts during the Quaternary and proposes there was a major refuge in  
98 the central and north areas.

99         Several phylogeographic studies have found a north–south split in species  
100 distribution along of Atlantic Rainforest (Harris *et al.* 2005; Pellegrino *et al.* 2005;  
101 Grazziotin *et al.* 2006; Cabanne *et al.* 2007; Carnaval *et al.* 2009; Fitzpatrick *et al.* 2009;  
102 Amaro *et al.* 2012). In relation to plant species, this split between two major groups has  
103 been reported for species predominantly associated with humid forest (Lorenz-Lemke *et al.*  
104 2005; Palma-Silva *et al.* 2009; Ribeiro *et al.* 2010).

105         The riverine barrier hypothesis states that rivers could be represent barriers to gene  
106 flow, promoting genetic differentiation of populations in the opposite riverbanks of the  
107 rivers (Wallace 1852). The presence of riverine barriers has been suggested by to play a  
108 significant role in delimiting the geographical distribution of species and generate  
109 phylogeographic breaks for species fauna in the Atlantic Rainforest (Pellegrino *et al.* 2005;  
110 Lacerda *et al.* 2007; Thomé *et al.* 2010).

111         In the present work our aim was to test the Atlantic Rainforest refuge and riverine  
112 barriers theories for explain the genetic diversity distribution in a forest associated plant  
113 species currently found at sea level. In this work we choose informative molecular markers  
114 to evaluate the genetic diversity from nuclear and plastidial genomes using a  
115 phylogeographic approach.

116 According Cervi (2006), *Passiflora ovalis* Vell Ex Romer spreads in Atlantic  
117 Rainforest (from ~ 07°S to 23°S latitude). The species is a woody climbing, endemic from  
118 Atlantic Rainforest that is found in the forest boards, at the sea level (Cervi *et al.* 2009).  
119 Several large rivers cross its distribution and high level of recent fragmentation and habitat  
120 loss are described for this geographical distribution range (Morellato & Haddad 2000;  
121 Tabarelli *et al.* 2005).

122

## 123 **Material and Methods**

### 124 *Plant material and DNA extraction*

125 Twelve collection sites were sampled (Fig. 1) covering the entire distribution range  
126 of the species, throughout the Atlantic Rainforest from 7°S to 23°S latitude (Table 1).

127 Genomic DNA was extracted from leaf tissue using the Nucleo Spin Plant II kit  
128 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's specifications.

129

### 130 *Marker amplification DNA sequencing*

131 Polymerase chain reaction (PCR) was employed to amplify the plastidial intergenic  
132 region *trnS-trnG* (Hamilton 1999) and the nuclear region *internal transcribed spacers* of  
133 *ribosomal DNA* sequences (Desfeux & Lejeune 1996). Amplifications were performed in a  
134 25µL volume containing 1X PCR Reaction Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 0.2  
135 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each primer, 1 U *Taq* Polymerase (Invitrogen) and  
136 20 ng template DNA. The amplification conditions for *trnS-trnG* were as follows: initial  
137 denaturation step at 94 °C for 3 min followed by 30 identical cycles of denaturation at 94  
138 °C for 1 min, annealing at 60 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, with a final

139 extension step at 72 °C for 10 min. For ITS the amplification conditions were the same,  
140 except for the annealing temperature which was 58 °C for 1.5 min. The PCR products were  
141 purified using the polyethyleneglycol precipitation method (Dunn & Blattner. 1987). The  
142 sequencing reactions were performed using the ET Terminator Kit (GE Healthcare  
143 Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) using a MegaBACE 1000 automatic machine (GE  
144 Healthcare Biosciences) following the manufacturer's protocols. Sequences were deposited  
145 in GenBank (access number: xxxx to xxxx).

146

#### 147 *Sequence alignment and genetic variability analysis*

148 Forward and reverse sequencing reads were analyzed for all of the individuals using  
149 Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Australia) and the alignment was  
150 performed using ClustalW (Thompson *et al.* 1997) as implemented in MEGA5 (Tamura *et*  
151 *al.* 2011) and manually edited. Contiguous insertion/deletion events (indel) were treated as  
152 single mutation events (Simmons & Ochoterena 2000).

153 Plastidial haplotypes and ITS sequence types were obtained with DnaSP 5.10.01  
154 software (Librado & Rozas 2009). Information about the alignment size; GC content;  
155 number of variable sites; haplotype (h) and nucleotide ( $\pi$ ) diversities (Nei 1987) were  
156 obtained with Arlequin 3.5 software (Excoffier & Lischer 2010).

157 Demographic history was investigated by Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's Fs  
158 (Fu 1997) neutrality tests and the Pairwise Mismatch distribution (Rogers & Harpending  
159 1992) which were performed also using Arlequin software to investigate the demographic  
160 history. The genetic diversity among collection sites was estimated by the Analysis of  
161 Molecular Variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) using  $\Phi$ -statistics by Arlequin software.



162 The evolutionary relationships among the haplotypes or sequence types were  
163 estimated using the Median-Joining method ( $\epsilon=0$ ; Bandelt *et al.* 1999) implemented in the  
164 Network 4.5.0.0 program (available at <http://www.fluxus-engineering.com>).

165 The geographic coordinates were obtained to evaluate the significance of the  
166 association among genetic and geographic distances and compared by Mantel test and  
167 Spatial Autocorrelation implemented in the Alleles in Space 1.0 software (Miller 2005)  
168 with a statistical significance tested by 1,000 random permutations.

169 Historical barriers against gene flow were identified using the Spatial Analysis of  
170 Molecular Variation (SAMOVA) performed in SAMOVA 1.0 software (Dupanloup *et al.*  
171 2002), that identifies geographically homogeneous groups of populations that are  
172 maximally differentiated from each other (the method attempts to maximize the proportion  
173 of total genetic variation among groups of populations,  $\Phi_{CT}$ ). We tested  $K = 2 - 12$  groups,  
174 corresponding to collection sites, and the most suitable  $K$  was defined by the  $\Phi_{CT}$  value  
175 compared to other data obtained.

176 Phylogeny and divergence times within the species were estimated using a Bayesian  
177 approach in BEAST v1.6.2 software (Drummond & Suchard 2010) based in nuclear dataset  
178 because it is highly informative in phylogenetic (Muschner *et al.* 2003) and  
179 phylogeographic approaches (Mäder *et al.* 2010) in the *Passiflora* genus. One run of  $10^8$   
180 chains was conducted, with sampling every 10,000 generations and 10% of the chains were  
181 discarded as burn-in. The settings used were the Yule tree prior, the HKY substitution  
182 model and the strict molecular clock (all parameters used are the most adequate to  
183 *Passiflora* species; Muschner *et al.* 2003, 2012; Mäder *et al.* 2010; Yotoko *et al.* 2011).  
184 The trees were summarized in TreeAnnotator version 1.6.2 in BEAST package. The  
185 substitution rate used for ITS was  $0.6 \times 10^{-9}$  (Kay *et al.* 2006). The sequence of *Passiflora*

186 *cirrhiiflora* Juss. which belongs to the same subgenus than *P. ovalis* was obtained from  
187 the GenBank (DQ458063) and was included as outgroup.

188

## 189 **Results**

### 190 *Sequences characterization*

191 The sequences characterization was concerning the collection sites from 7° S to 21°  
192 S latitude. See more information below.

193 The final dataset of ITS resulted in 610 base pairs (bp) alignment with about 64% of  
194 CG content and 10 different sequence types, with 21 polymorphic sites (18 substitutions  
195 and three indels). The heterozygotes sites were not included in the analysis according  
196 Mäder *et al.* (2010). The overall genetic diversity (h) overall of collection sites was  $0.889 \pm$   
197  $0.01$  and nucleotide diversity ( $\pi$ ) was  $0.010 \pm 0.005$ . The individuals collected in the  
198 location named ETR showed highest genetic diversity when compared to others (see Table  
199 2).

200 The plastidial marker (*trnS-trnG*) alignment was composed of 707 bp with ca. 25 %  
201 of GC content. The *trnS-trnG* presented nine haplotypes and 11 polymorphic sites (10  
202 substitutions and one indels). Haplotype diversity (h) overall obtained was  $0.687 \pm 0.034$   
203 and nucleotide diversity ( $\pi$ ) was  $0.005 \pm 0.003$ . The collection site named UNA showed the  
204 highest genetic diversity (see Table 2).

205

### 206 *Phylogenetic analyses*

207 The phylogenetic analyses using nuclear marker (ITS) dataset (Fig. 2a)  
208 demonstrated a clear separation of individuals sampled from locations named PAR and  
209 UBA (south of species distribution) in relation to those collected from locations IGA to

210 SAT (northern and central parts of species distribution), supported by high posterior  
211 probability (PP=1.0). This result corroborates to the median-joining network results to both  
212 markers dataset (see Fig.2b).

213 Because these molecular results (Fig. 2) coincided to the former proposition of  
214 species separation in two different taxa based on morphological characters proposed by  
215 Vitta & Bernacci (2004), we consider in the present study the existence of two sister  
216 species: *Passiflora contracta* Vitta & Bernacci (populations range from 7° S to 19° S  
217 latitude) and *Passiflora ovalis* (populations from 23° S latitude). All further analyses were  
218 concerning to the *P. contracta*. The dating obtained suggested that the ancestors of *P.*  
219 *ovalis* and *P. contracta* (Fig. 2a) arrived as soon as the separation between South America  
220 and Africa and after the beginning of Atlantic Rainforest formation ca. 57 MYA (41 – 75  
221 MYA) during the Eocene. In this period, the climatic conditions are described as excellent  
222 and favored the increase of diversity in the Neotropic, even related to a greater number of  
223 plant species (Jaramillo *et al.* 2006, Hoorn *et al.* 2010). The divergence time between these  
224 two groups were estimated to have occurred around 23 MYA (15 - 32 MYA). All time  
225 estimated here must be considered carefully because we used a general substitution rate, but  
226 are in accordance to independent works conducted on *Passiflora* divergence time  
227 (Muschner *et al.* 2012).

228

### 229 *Phylogenetic relationships of Passiflora contracta*

230 The Bayesian reconstruction based on nuclear sequences of ITS recovered three  
231 well-supported groups in *P. contracta* with a clear phylogeographic pattern discerned. The  
232 age estimated for the first diversification occurred ca. 16 MYA (10 - 24 MYA). The first  
233 group was composed by individuals from the northern-most region of the species

234 distribution named IGA, CAM, ETR, MAU, ILH and UNA (~7° S - 15° S latitude), with  
235 the estimated diversification time of circa 7 MYA; the second group, comprising the  
236 individuals collected in SCC, CBA and LIN sites (~18° S - 19° S latitude), with the  
237 diversification circa 6 MYA; and the third group consisting of individuals from STA  
238 location (~19° S latitude) in the southern boundary of the species distribution, with the  
239 diversification circa 8 MYA (see Fig. 3).

240

#### 241 *Genetic structure and population demography*

242 Median joining network for the ITS (Fig. 5) showed a striking geographic structure  
243 and suggested the existence of three phylogroups. These three groups were corresponded to  
244 those recovered by the phylogenetic Bayesian tree (Fig. 3). One group composed for  
245 individuals from location named IGA, CAM, ETR, MAU, ILH and UNA; a second group  
246 consisting for individuals from locations SCC, CBA and LIN; and the last group formed by  
247 the individuals from location STA, the southernmost part of species distribution. The  
248 collection sites that showed more than one sequence types were: ETR, UNA and SCC. The  
249 shared sequences were just observed in the locations of ETR and CAM (S1) and UNA, ILH  
250 and MAU (S6). The other locations showed exclusive sequences (see Table 1).

251 The network obtained with *trnS-trnG* sequences showed nine haplotypes (see Fig.  
252 4), but did not recovered the same relationships among the groups obtained with ITS,  
253 possibly due to shared ancestral polymorphism. The collection sites that showed more than  
254 one haplotype were: MAU, UNA, ILH and LIN. The shared haplotypes by more than one  
255 location were observed in the locations of IGA, ETR, CAM, UNA, ILH and MAU (H1);  
256 SCC, UNA, ILH, MAU, CBA and LIN (H2) (see Table 1).

257 The AMOVA analyses indicated a high level of genetic structure, with the most of  
258 the total genetic diversity due to differentiation among locations for  $\Phi_{ST}$ . For the nuclear  
259 marker was obtained significantly high value of  $\Phi_{ST} = 0.94$  ( $P < 0.001$ ) and for chloroplast  
260 region was obtained slightly lower value of  $\Phi_{ST} = 0.72$  ( $P < 0.001$ ), see Table 3. These  
261 values are higher than those of other studies in plants from the Atlantic Rainforest (for  
262 example: Ribeiro *et al.* 2010; Pinheiro *et al.* 2011).

263 The neutrality tests Tajima's D and  $F_s$  de Fu were non significant, to both markers,  
264 where to ITS the values were Tajima's D = 1.722 ( $P > 0.05$ ) and  $F_s$  de Fu = 5.453 ( $P >$   
265 0.02) and to *trnS-trnG* Tajima's D = 1.746 ( $P > 0.05$ ) and  $F_s$  de Fu = 2.306 ( $P > 0.02$ ),  
266 indicating the null hypothesis of demographic stability without evidence of recent  
267 population expansion. The pairwise mismatch distribution corroborated the neutrality tests  
268 presenting a multimodal distribution and thus rejecting population expansion model.

269 We detected the isolation by distance in the Mantel's test and the Spatial  
270 autocorrelation with both markers. With the ITS dataset, the Mantel's test showed positive  
271 correlation  $r = 0.44$  and Spatial autocorrelation  $V = 0.005$  and with the *trnS-trnG* data  $r =$   
272 0.28 and Spatial autocorrelation  $V = 0.002$ . Although the results obtained with plastidial  
273 marker have been smaller when compared to nuclear sequences, they still demonstrated  
274 significant relationship between geographic and genetic distances.

275 Finally, the SAMOVA approach detected three groups that were geographically  
276 homogenous and genetically differentiated from each other. The best k value was  $K=3$  ( $\Phi_{CT}$   
277 = 0.71), when  $k < 3$  the SAMOVA showed lower  $\Phi_{CT}$  values and  $k \geq 4$ , the SAMOVA  
278 showed similar values to  $\Phi_{CT}$  compared to the  $K = 3$ . The groups obtained by SAMOVA  
279 corresponded to the phylogroups recovered in the Median Joining network and in the  
280 Bayesian phylogenetic analyses (see Figs. 3 and 5) with ITS dataset.

281           Interestingly, when the geographic location groups were plotted over the map  
282 together the barriers found in SAMOVA (Fig. 1), we observed that the two barriers that  
283 promoted the separation of the three groups coincided to important Atlantic Coastal Rivers,  
284 the Jequitinhonha River (the first barrier, separating the location UNA - group 1 – from  
285 location SCC - group 2) and Doce River (the second barrier, which separated group 2 from  
286 the location STA - group 3).

287

## 288 **Discussion**

### 289 *Genetic diversity*

290           The genetic diversity here presented was high for both nuclear and chloroplast  
291 markers dataset. The values of genetic diversities obtained with the ITS were similar to  
292 those observed in other *Passiflora* species from Atlantic Rainforest, *P. elegans* and *P.*  
293 *actinia* (Lorenz-Lemke *et al.* 2005) and also for *P. alata* (Koehler-Santos *et al.* 2006).  
294 Mäder *et al.* (2010) also using ITS in other 23 *Passiflora* species, including species of the  
295 four subgenera, found just in three species values for genetic diversity higher or equal to  
296 those found in this study. The *trnS-trnG* showed similar values to those described in the  
297 literature obtained for other species of Atlantic Rainforest (Ramos *et al.* 2009; Novaes *et al.*  
298 2010; Ribeiro *et al.* 2010), already this was the first work in which this chloroplast region  
299 marker showed intraspecific variation in species of *Passiflora* genus. The pattern of  
300 haplotype structure of the network, the time estimated for diversification of the species by  
301 Bayesian analyses combined with the high diversity values obtained suggest that the  
302 species has an ancient evolutionary history (Avice. 2000).

303           The higher genetic diversity obtained was found in the same region that was  
304 reported in other studies about groups from the Atlantic Rainforest that presented high

305 diversity and endemism (Costa & Leite 2000; Cabanne *et al.* 2007, 2008; Carnaval *et al.*  
306 2009; Ribeiro *et al.* 2010; D' Horta *et al.* 2011). This pattern of diversity presented here by  
307 a plant species from the sea level showing high intrapopulation genetic variability and no  
308 evidence of population expansion is in agreement to that previously demonstrated by  
309 Carnaval and Moritz (2008), through paleoclimatic models that proposed that this region  
310 has been stable during long periods might be a refuge zone. These authors named this  
311 region as the Bahia refuge, considering animal species during the Quaternary climatic  
312 oscillations.

313         Although the results obtained in present study showed that the origin and  
314 diversification of *Passiflora contracta* species have occurred much earlier than the climatic  
315 changes in the Quaternary, the refuge proposed by Carnaval & Moritz (2008) should have  
316 been very important as a form of protection for maintenance of already existing diversity.  
317 This could be verified by the higher genetic variability found in the Bahia refuge region.

318

### 319 *Phylogeographic patterns*

320         The scenario presented by our data showed the existence of a clear  
321 phylogeographical structure and the presence of three phylogeographic groups. These  
322 groups were recovered and strongly supported by all analyses, including phylogeny,  
323 Median Joining network and by SAMOVA to the nuclear marker. So we hypothesized that  
324 the two rivers that cross the species geographic distribution would be one possible  
325 explanation for these phylogeographic breaks found in the present work, with the  
326 geographic position of the Doce and Jequitinhonha Rivers coinciding to the  
327 phylogeographic groups separation (see Fig. 1).

328 Both rivers proposed here have been reported in other studies in Atlantic Rainforest  
329 as possible barriers against the gene flow. The Doce River was observed as barrier in  
330 studies with passerines (Silva *et al.* 2004), small mammals (Costa & Leite 2000), butterflies  
331 (Brown 2005) and frogs species (Thomé *et al.* 2010) and the Jequitinhonha River was  
332 proposed in studies including passerines (Lacerda *et al.* 2007). Both rivers were remarked  
333 as barriers for plants (Ribeiro *et al.* 2010), lizards (Pellegrino *et al.* 2005) and passerines  
334 (Cabanne *et al.* 2007) species. This result corroborates the proposal by Wallace (1852) of  
335 riverine barriers such as limiting factor for geographical distribution of species and  
336 contributing to diversification among populations. In the phylogeographic structure here  
337 described we observed that the biggest genetic differentiation among locations occurred in  
338 the opposite sides of rivers than those on the same side of the Rivers and this is in  
339 agreement to the proposed model in which it is expected when the rivers were determinants  
340 of phylogeographic breaks within a particular species (Gascon *et al.* 2000; Thomé *et al.*  
341 2010; Gehring *et al.* 2012).

342 Furthermore, the estimate of diversification for the split among the three  
343 phylogroups may have occurred between 16 - 6.5 MYA, during the Miocene (see Fig. 2).  
344 This age is compatible to that was inferred to Tertiary sediments of the *Barreiras*  
345 *Formation* (Martin *et al.* 1993). Marquinez *et al.* (2009) estimated the divergence time  
346 between two subclades within *Drymis* as occurred about 15.5 – 18.5 MYA and this time  
347 coincide with the Andes uplift. In the late Miocene another period of rapid mountain uplift  
348 has occurred, especially in the Eastern Andes (Antonelli *et al.* 2009). Hoorn *et al.* (2010)  
349 reported that this same period of Andes uplift coincided to the diversification for many  
350 plant and animal genera. These events contributed to the environment changes observed in  
351 the Neotropic and may also have been associated with the diversification pattern here



352 presented. Secondly, Ribeiro (2006) also reported that the formation of these two major  
353 Rivers was dated to ancient ages in the Tertiary, compatible with those time estimates  
354 found in this study. Pelegrino *et al.* (2005) found similar estimated time for split of the  
355 major clades in *Gymnodactylus darwini* in Atlantic Rainforest in their study with these  
356 lizards, with the Doce and Jequitinhonha Rivers have had acted as putative barriers and  
357 contributed to patterns of genetic differentiation observed.

358 We also observed that the southernmost part of species distribution, that represents  
359 the third phylogroup, was the most distinct from the other groups. It could be due the long  
360 time of isolation. Moreover, these individuals were collected on the south of Doce River, in  
361 the region that is commonly reported as the boundary of the disjunction between northern  
362 and southern Atlantic Forest and where other authors described highly divergent groups of  
363 populations when compare south and north of the River (Pellegrino *et al.* 2005; Cabanne *et*  
364 *al.* 2007; Novaes *et al.* 2010). This seems suitable explanation to observed pattern  
365 differentiation in the STA location.

366 Our data support the riverine model and suppose that these two major Atlantic  
367 Coastal Rivers have acted as potential barriers against the gene flow, playing an important  
368 role generating diversification among locations and forming the phylogroups in *P.*  
369 *contracta* species. Given enough time, the isolation caused by a physical barrier limiting  
370 gene flow leads to an accumulation of genetic differentiation among groups of population  
371 (Hollatz *et al.* 2011) that could be the case of this species.

372 These results may contribute to the understanding of one of the evolutionary process  
373 related to the Atlantic Rainforest diversification. We observe that the age estimates are  
374 older than the Pleistocene and it reinforces the idea of that the diversification occurred in a  
375 variety scale and age. We recognized that climate changes and the events that occurred in

376 the Quaternary, especially in the Pleistocene, were important and contributed to  
377 diversification and speciation that were observed in several species from the Atlantic  
378 Rainforest, but we also postulated that it could be a very complex process that require the  
379 observation of the oldest periods as in the Tertiary period that also could be responsible for  
380 speciation events as was observed in many other examples (Costa 2003; Pellegrino *et al.*  
381 2005, 2011; Graziotin *et al.* 2006; Thomé *et al.* 2010; Hoorn *et al.* 2010; Antonelli &  
382 Sanmartin 2011; Patel *et al.* 2011).

383

#### 384 *Implications for conservation*

385       In attempting to preserve the genetic diversity of this species, it would be required  
386 design strategies that include the locations that have presented high genetic diversity levels,  
387 belonging to each one of the three phylogroups, must be considered as priority for  
388 conservation. In particular, those that are distributed in central region of Bahia refuge area  
389 that presented the highest levels of genetic diversity considering both nuclear and plastidial  
390 markers should be carefully preserved and could be considered as major priority for  
391 preservation focus.

392

#### 393 *Taxonomic considerations*

394       The results obtained using nuclear marker supported the presence of two  
395 independent species in the taxon named *P. ovalis* by Cervi (2006), corresponding to the  
396 description presented by Vitta and Bernacci (2004). Here we did not considered the  
397 possibility of another barrier against de gene flow, because the morphological traits  
398 supported the taxonomic proposition, that was not the case in relation to the phylogroup 3,

399 where all collected individuals presented the same morphology found in individuals from  
400 locations within phylogroups 1 and 2.

401

#### 402 ***Acknowledgments***

403 The authors thank AP Lorenz-Lemke and C Dutra for assistance in lab experiments and  
404 discussions. This project was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento  
405 Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
406 Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul  
407 (FAPERGS) and Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da  
408 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS).

409

#### 410 **References**

411 Amaro RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y, Carnaval AC (2012) Demographic  
412 processes in the montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from  
413 the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **62**,  
414 880–888.

415 Antonelli A, Nylander JAA, Persson C, Sanmartín I (2009) Tracing the impact of the  
416 Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proceedings of the National Academy of  
417 Sciences of the United States of America*, **106**, 9749-9754.

418 Antonelli A, Sanmartín I (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics?  
419 *Taxon*, **60**, 403–414.

420 Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University  
421 Press, Cambridge, MA, 447.

- 422 Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific  
423 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37- 48.
- 424 Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the  
425 challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular ecology*, **17**, 3754–74.
- 426 Bennett KD, Provan J (2008) What do we mean by “refugia”? *Quaternary Science*  
427 *Reviews*, **27**, 2449–2455.
- 428 Brown KS (2005) *Geological, evolutionary, and ecological bases of the diversification of*  
429 *Neotropical butterflies: implications for conservation*. In: *Tropical Rainforest: Past,*  
430 *Present and Future* (eds Bermingham E, Dick CW, Moritz C). University of Chicago  
431 Press, Chicago, 166–201.
- 432 Cabanne GS, Santos FR, Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus*  
433 (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in  
434 southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, 73–84.
- 435 Cabanne GS, d’ Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaki CY (2008) Nuclear and  
436 mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus*  
437 (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular*  
438 *Phylogenetics and Evolution*, **49**, 760–73.
- 439 Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current  
440 biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187-1201.
- 441 Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability  
442 predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, **323**, 785–  
443 789.

- 444 Cervi AC (2006) *O gênero Passiflora L, (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas*  
445 *após o ano de 1950. Adumbrationes ad Summæ Editionem*, **16**, 1.
- 446 Cervi AC, Bernacci L, Nascimento DS (2009) *Passifloraceae In Plantas da Floresta*  
447 *Atlântica* (eds Stehmann JR; Forzza RC; Salino A; Sobral M; Costa DP; Kamino LHY)  
448 1 ed: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 406-407.
- 449 Colombo AF, Joly CA (2010) Brazilian Atlantic Forest *lato sensu*: the most ancient  
450 Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change.  
451 *Brazilian Journal of Biology*, **70**, 697-708.
- 452 Costa LP, Leite YLR (2000) Biogeography of South American Forest Mammals:  
453 Endemism and Diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica*, **32**, 872-881.
- 454 Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of  
455 Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of*  
456 *Biogeography*, **30**, 71–86.
- 457 D’horta FM, Cabanne GS, Meyer D, Miyaki CY (2011) The genetic effects of Late  
458 Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an  
459 Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology*, **20**, 1923-35.
- 460 Dainou K, Bizoux JP, Doucet JL, Mahy G, Hardy OJ, Heuertz M (2010) Forest refugia  
461 revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread  
462 African tree with high colonization capacity *Milicia excels* (Moraceae). *Molecular*  
463 *Ecology*, **19**, 4462-4477.

464 Desfeux C, Lejeune B (1996) Systematics of Euromediterranean *Silene* (Caryophyllaceae):  
465 evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequence. *Comptes Rendus de*  
466 *l'Académie des Sciences*, **319**, 351-358.

467 Drummond AJ, Suchard MA (2010) Bayesian random local clocks or one rate to rule them  
468 all. *BMC Biology* **8**, 114.

469 Dunn IS, Blattner FR (1987) Sharons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination  
470 deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*,  
471 **15**, 2677-2698.

472 Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the  
473 genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571-2581.

474 Excoffier L, Smouse PE, Quattro M (1992) Analysis of molecular variance inferred from  
475 metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA  
476 restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.

477 Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to  
478 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*  
479 *Resources*, **10**, 564-567.

480 Fitzpatrick SW, Brasileiro CA, Haddad CFB, Zamudio KR (2009) Geographical variation  
481 in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in  
482 habitat stability. *Molecular Ecology*, **18**, 2877-2896.

483 Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,  
484 hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.

485 Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, da Silva MNF, Bogart JP, Lougheed SC, Peres CA,  
486 Neckel S, Boag PT (2000) Riverine barriers and the geographic distribution of  
487 Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*  
488 *States of America*, **95**, 13672–13677.

489 Gehring PS, Pabijan M, Randrianirina JE, Glaw F, Vences M (2012) The influence of  
490 riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*)  
491 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**, 618–632,

492 Geurgas S, Rodrigues MT, Moritz C (2008) The genus *Coleodactylus* (Sphaerodactylinae,  
493 Gekkota) revisited: a molecular phylogenetic perspective. *Molecular Phylogenetics and*  
494 *Evolution*, **49**, 92–101.

495 Graham CH, Moritz C, Williams SE (2006) Habitat history improves prediction of  
496 biodiversity in rainforest fauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
497 *United States of America*, **103**, 632–6.

498 Graziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL (2006) Phylogeography of the  
499 *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island  
500 colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, **15**, 3969–3982.

501 Haffer J (1997) Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview.  
502 *Biodiversity and Conservation*, **6**, 451–77.

503 Haffer J (1969) Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science*, **165**, 3889.

504 Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic  
505 regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521–523.

506 Harris EE, Gifalli-Iughetti C, Braga ZH, Koiffman CP (2005) Cytochrome b sequences  
507 show subdivision between populations of the brown howler monkey (*Alouatta guariba*)  
508 from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. *Neotropical Primates*, **13**, 16–21.

509 Hollatz C, Vilaça ST, Redondo RAF, Marmontel M, Baker CS, Santos FR (2011) The  
510 Amazon River system as an ecological barrier driving genetic differentiation of the pink  
511 dolphin (*Inia geoffrensis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, **102**, 812–827.

512 Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartín I,  
513 Sanchez-Meseguer A, Anderson CL, Figueiredo JP, Jaramillo C, Riff D, Negri FR,  
514 Hooghiemstra H, Lundberg J, Stadler T, Särkinen T, Antonelli A (2010) Amazonia  
515 through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity.  
516 *Science*, **330**, 927–31.

517 Jaramillo C, Rueda MJ, Mora G (2006) Cenozoic plant diversity in the Neotropics. *Science*,  
518 **311**, 1893-1896.

519 Kay KM, Whittall JB, Hodges SA (2006) A survey of nuclear ribosomal internal  
520 transcribed spacer substitution rates across angiosperms: an approximate molecular  
521 clock with life history effects. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 1–9.

522 Koehler-Santos P, Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB  
523 (2006) Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive  
524 species in southern Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*, **88**, 611-630.

525 Lacerda, DR, Marini, MA, Santos FR (2007) Mitochondrial DNA corroborates the species  
526 distinctiveness of the Planalto (*Thamnophilus pelzelni* Hellmayr, 1924), the Sooretama



527 (*T. ambiguus* Swainson, 1825) Slaty-antshrikes (Passeriformes: Thamnophilidae).  
528 *Brazilian Journal of Biology*, **67**, 873–882.

529 Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA  
530 polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.

531 Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM, Freitas LB (2005)  
532 Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P.*  
533 *elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany*, **95**, 799–  
534 806.

535 Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto  
536 SL, Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern  
537 South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia*  
538 (Solanaceae). *Molecular Ecology*, **19**, 5240-51.

539 Mäder G, Zamberlan PM, Fagundes NJR, Magnus T, Salzano FM, Bonatto SL, Freitas LB  
540 (2010) The use and limits of ITS data in the analysis of intraspecific variation in  
541 *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, **33**, 99-108.

542 Marquínez X, Lohmann LG, Salatino ML, Salatino A, González F (2009) Generic  
543 relationships and dating of lineages in Winteraceae based on nuclear (ITS) and plastid  
544 (rpS16 and *psbA-trnH*) sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **53**, 435–  
545 449.

546 Martin L, Suguio K, Flexor JM (1993) *As flutuações de nível do mar durante o*  
547 *Quaternário Superior e a evolução geológica de "deltas" brasileiros*. Boletim IG-USP:  
548 Publicação Especial, **15**, 1-186.

549 Martins FM (2011) Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the  
550 Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell  
551 us? *Biological Journal of the Linnean Society*, **104**, 499-509.

552 Miller MP (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of inter  
553 individual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, **96**, 722-724.

554 Morellato P, Haddad C (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, **32**,  
555 786-792,

556 Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an  
557 integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 533–  
558 563.

559 Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM Freitas  
560 LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae).  
561 *American Journal of Botany*, **90**:1229-1238.

562 Muschner VC, Zamberlan PM, Bonatto SL, Freitas LB (2012). Phylogeny, biogeography  
563 and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology* (in  
564 press).

565 Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*, New York, NY: Columbia University  
566 Press.

567 Novaes RML, De Lemos Filho JP, Ribeiro RA, Lovato MB (2010) Phylogeography of  
568 *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion  
569 towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America.  
570 *Molecular ecology*, **19**, 985–98.

- 571 Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barabará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009)  
572 Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea*  
573 (Bromeliaceae) a Neotropical forest species. *Heredity*, **103**, 503–512.
- 574 Patel S, Weckstein JD, Patané JSL, Bates JM, Aleixo A (2011) Temporal and spatial  
575 diversification of *Pteroglossus aracari* (Aves: Ramphastidae) in the neotropics: constant  
576 rate of diversification does not support an increase irradiation during the Pleistocene.  
577 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **58**, 105–115.
- 578 Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Yonenaga-Yassuda M, Sites JW (2005)  
579 Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex  
580 (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian  
581 Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 13–26.
- 582 Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Harris DJ, Yonenaga-Yassuda Y, Sites JW (2011)  
583 Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in  
584 the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links  
585 between the Atlantic Forest and Amazonia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **61**  
586 446–459.
- 587 Pennington RT, Richardson JE, Lavin M (2006) Insights into the historical construction of  
588 species-rich biomes from dated plant phylogenies, neutral ecological theory and  
589 phylogenetic community structure. *New Phytologist*, **172**, 605–616.
- 590 Pinheiro F, de Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S (2011)  
591 Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid

- 592 *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia.  
593 *Journal of Biogeography*, **38**, 1923–1935.
- 594 Prance GT (1978) Origin and evolution of Amazon flora. *Interciencia* **3**, 207-222.
- 595 Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2009) Phylogeographical structure of the  
596 Neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its  
597 relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of*  
598 *Heredity*, **100**, 206-216.
- 599 Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the  
600 coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a  
601 divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* **4** 225-246.
- 602 Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB (2010) Phylogeography of the  
603 endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history  
604 and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46-57.
- 605 Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of  
606 pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569.
- 607 Rull V (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and*  
608 *Evolution*, **26**, 508–13.
- 609 Silva JMC, De Sousa MC, Castelleti CHM (2004) Areas of endemism for passerine birds in  
610 Atlantic Forest South America. *Global Ecology and Biogeography*, **13**, 85– 93.
- 611 Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic  
612 analyses. *Systematics Biology*, **49**, 369-81.

613 Simpson BB, Haffer J (1978) Speciation patterns in the Amazonian forest biota. *Annual*  
614 *Review of Ecology and Systematics*, **9**, 497–518.

615 Suguio K, Angulo RJ, Carvalho AM, et al. (2005) *Paleoníveis do mar e paleolinhas de*  
616 *costa*. In: *Quaternário do Brasil*. (eds Souza CRG, Suguio K, Oliveira AMS, Oliveira  
617 PE). Ribeirão Preto: Holos, 114-129.

618 Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota MM (2005) Challenges and Opportunities for  
619 Biodiversity Conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology*, **19**,  
620 695–700.

621 Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA  
622 polymorphism. *Genetics*, **123**, 588-595.

623 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular  
624 Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood Evolutionary Distance and  
625 Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739. .

626 Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera F, Alexandrino J  
627 (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian  
628 Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **55**, 1018–31.

629 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX  
630 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality  
631 analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882.

632 Vitta FA, Bernacci LC (2004) A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis*  
633 (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. *Brittonia*, **56**, 89-  
634 95.

- 635 Wallace AR (1852) On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society*  
636 *of London*, **20**, 107–10.
- 637 Werneck FP, Giugliano LG, Collevatti RG, Colli GR (2009) Phylogeny, biogeography and  
638 evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata:  
639 Teiidae). *Molecular Ecology*, **18**, 262–278.
- 640 Yotoko KS, Dornelas MC, Togni PD, Fonseca TC, Salzano FM, Bonatto SL, Freitas LB  
641 (2011) Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues  
642 from *Passiflora*. *PLoS One*, **6**, e18212.

**Table 1:** The collection sites names, code name used in the main text, number of individuals analyzed per location and per nuclear and plastidial markers, respectively (N), geographical coordinates and sequence types and haplotypes with the respective numbers.

collection sites *	code name	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	geographical coordinates	sequence types	haplotypes
Igarassu - PE	IGA	15	16	7° 46' S 34° 56' W	S9 (15)	H1 (16)
Camaçari-BA	CAM	6	5	12° 40' S 38° 18' W	S1 (6)	H1 (5)
Entre Rios-BA	ETR	7	14	12° 52' S 39° 28' W	S1 (3)/S2 (4)	H1 (14)
Maraú-BA	MAU	6	12	14° 07' S 38° 59' W	S6 (6)	H1 (5)/H2 (5)/H7 (2)
Ilhéus-BA	ILH	9	13	14° 39' S 39° 04' W	S6 (9)	H1 (11)/H2 (2)
Una-BA	UNA	13	13	15° 11' S 39° 01' W	S5 (8)/S6 (5)	H1(2)/H2 (1)/H3 (3)/H4 (3)/H5 (2)/H6 (2)
Santa Cruz da Cabrália-BA	SCC	14	11	16° 9' S 38° 58' W	S3 (8)/S4 (6)	H2 (11)
Conceição da Barra-ES	CBA	11	7	18° 31' S 39° 47' W	S7 (11)	H2 (7)
Linhares-ES	LIN	7	13	19° 24' S 40° 28' W	S8 (7)	H2 (4)/H8 (9)
Santa Teresa-ES	STA	11	11	19° 55' S 40° 35' W	S10 (11)	H9 (11)
Parati-RJ	PAR	4	4	23° 18' S 44°44' W	S11 (1)/S13 (3)	H10 (4)
Ubatuba-SP	UBA	14	14	23° 27' S 45°09' W	S11 (6)/S12 (1)/S13 (6)/S14 (1)	H10 (14)
TOTAL		117	133			

\*Abbreviations correspond to Brazilian states as follows: PE = Pernambuco. BA= Bahia. ES= Espírito Santo. RJ= Rio de Janeiro. SP= São Paulo. N<sup>1</sup> = number of individuals analyzed to ITS; N<sup>2</sup> = number of individuals analyzed to *trnS-trnG*.

**Table 2:** Nucleotide ( $\pi$ ) and gene diversity ( $h$ ) observed in the collection sites of *P. contracta* with nuclear and chloroplast markers

<b>marker</b>	<b>code name</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b><math>h</math></b>
<b>ITS</b>	ETR	$0.0047 \pm 0.0032$	$0.5714 \pm 0.1195$
	UNA	$0.0008 \pm 0.0008$	$0.5275 \pm 0.0638$
	SCC	$0.0008 \pm 0.0008$	$0.5128 \pm 0.0822$
<b><i>trnS-trnG</i></b>	UNA	$0.0058 \pm 0.0034$	$0.8846 \pm 0.0507$
	ILH	$0.0027 \pm 0.0018$	$0.2821 \pm 0.1414$
	MAU	$0.0052 \pm 0.0032$	$0.6818 \pm 0.0786$
	LIN	$0.0006 \pm 0.0006$	$0.4615 \pm 0.1096$

Collection sites IGA, CAM, MAU, CBA, LIN and STA were monomorphic to ITS; locations named IGA, CAM, ETR, SCC, CBA and STA were monomorphic to *trnS-trnG*.



**Table 3:** The AMOVA results with *trnS-trnG* and ITS markers.

marker	source of variation	df	sum of squares	variance components	percentage of variation	$\Phi_{ST}$
<i>trnS-trnG</i>	<b>among populations</b>	10	164.43	1.4	72.28	<b>0.72</b>
	within populations	114	61.6	0.54	27.72	
ITS	<b>among populations</b>	9	283.54	3.2	94.98	<b>0.94</b>
	within populations	89	15.07	0.16	5.02	

P<0.001

### Figure legends:

Fig. 1. Map indicating the collections sites of *Passiflora ovalis* and the presence of two Rivers that were putative barriers for the species.

Fig. 2. a) A Bayesian tree indicating the divergence times to *P. ovalis* based on ITS dataset. The estimated ages in MYA were plotted in side of the branches. The posterior probability was plotted above the branches. b) A median joining network based on ITS and *trnS-trnG* dataset showing the species separation, the *P. ovalis* species were showed with green dashes. The mutational events were shown with dashes. The colors painted corresponding to the collection sites.

Fig. 3. A Bayesian phylogenetic tree showing the relationships among the populations of *P. contracta* with phylogeographical pattern of distribution, the formation of three well supported groups were indicated in the side of the tree. The code name, correspond to the collection sites were indicated in the side of the branches. The geological time scale was shown in the bottom. The posterior probability was plotted above the branches. The divergence time to the phylogroups was shown in the side of the branches.

Fig. 4. The median-joining network obtained using the information about *trnS-trnG* marker. The colors painted were correspondent to the collection sites of the *P. contracta* species. The circles size is proportional to the haplotype frequency and the mutational events were shown in the network as dashes.

Fig.5. The median-joining network obtained using the information about ITS marker. The colors correspond to the collection sites of the *P. contracta* described in the map. The dashed line indicates the correspondent phylogroups in Figure 3. The circles size is proportional to the haplotype frequency and the mutational events were show in the network as dashes.

Figure 1:

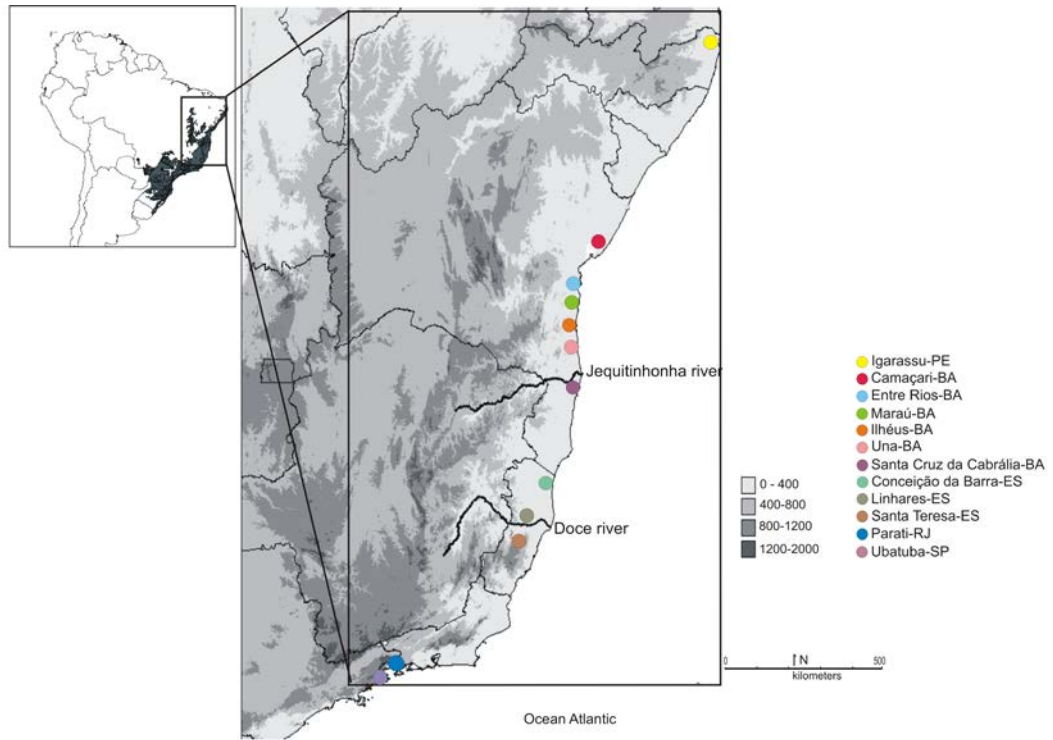


Figure 2 a:

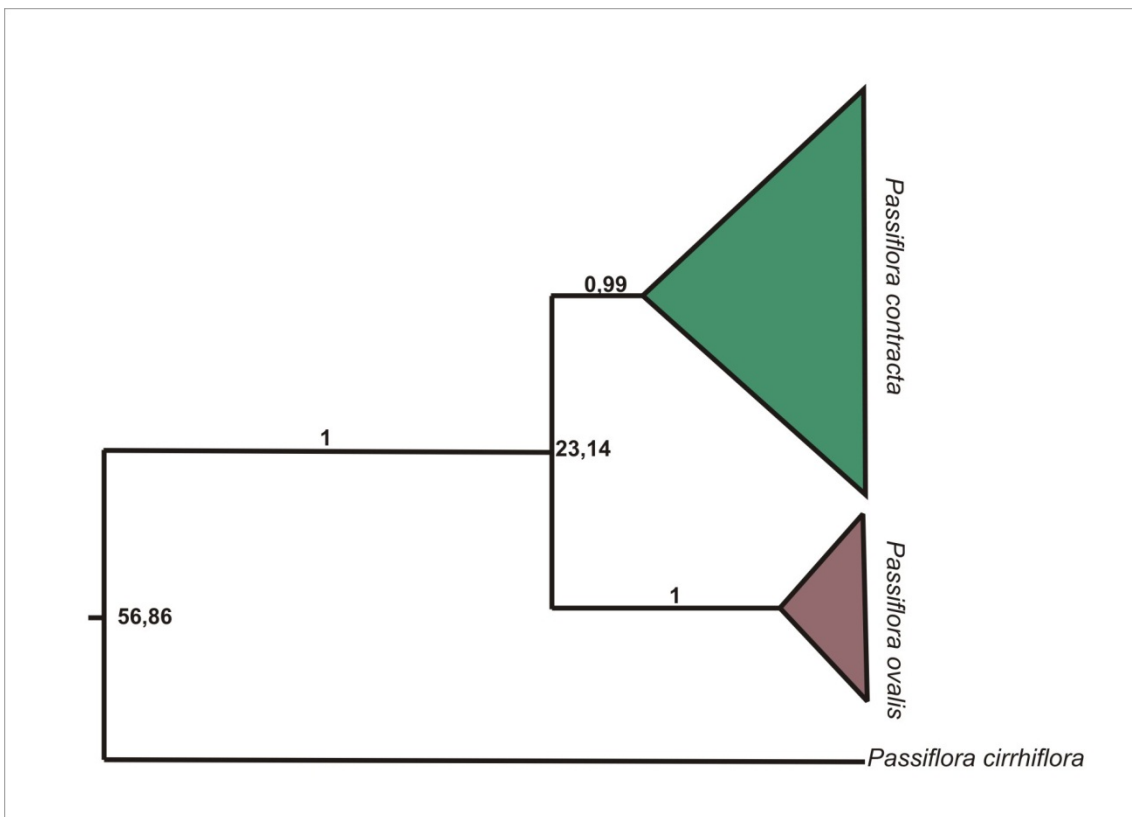


Figure 2 b:

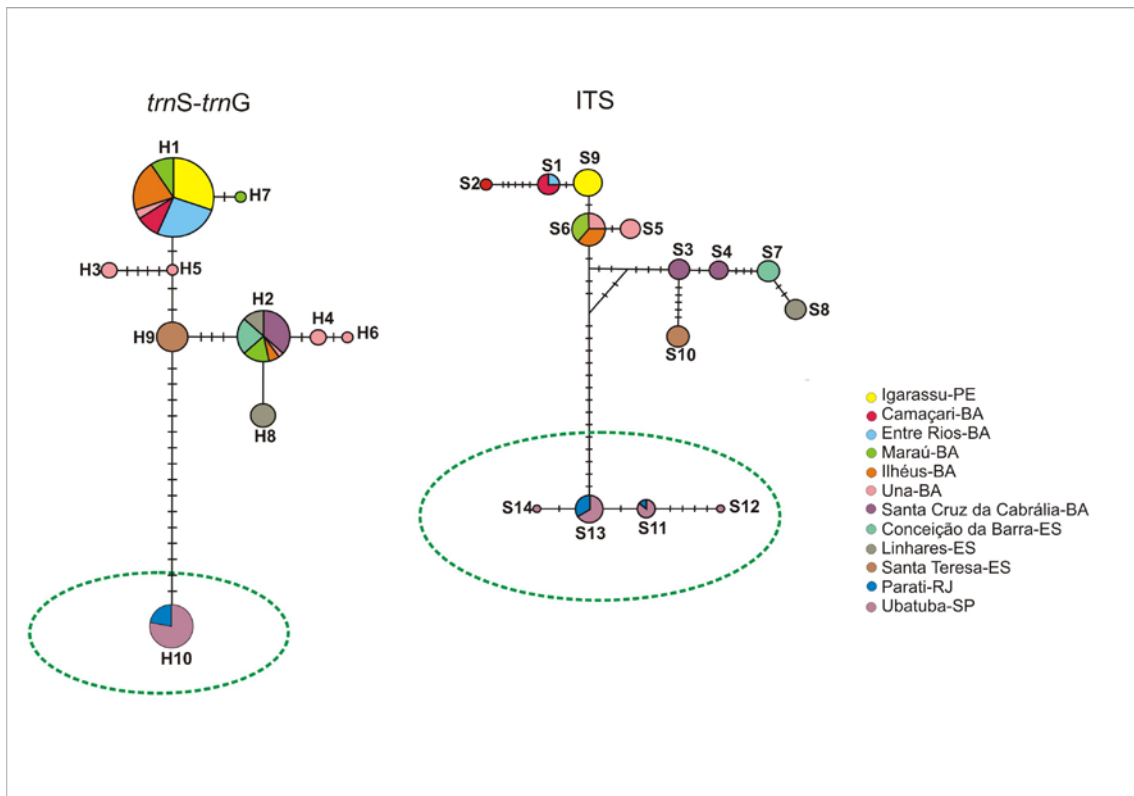


Figure 3:

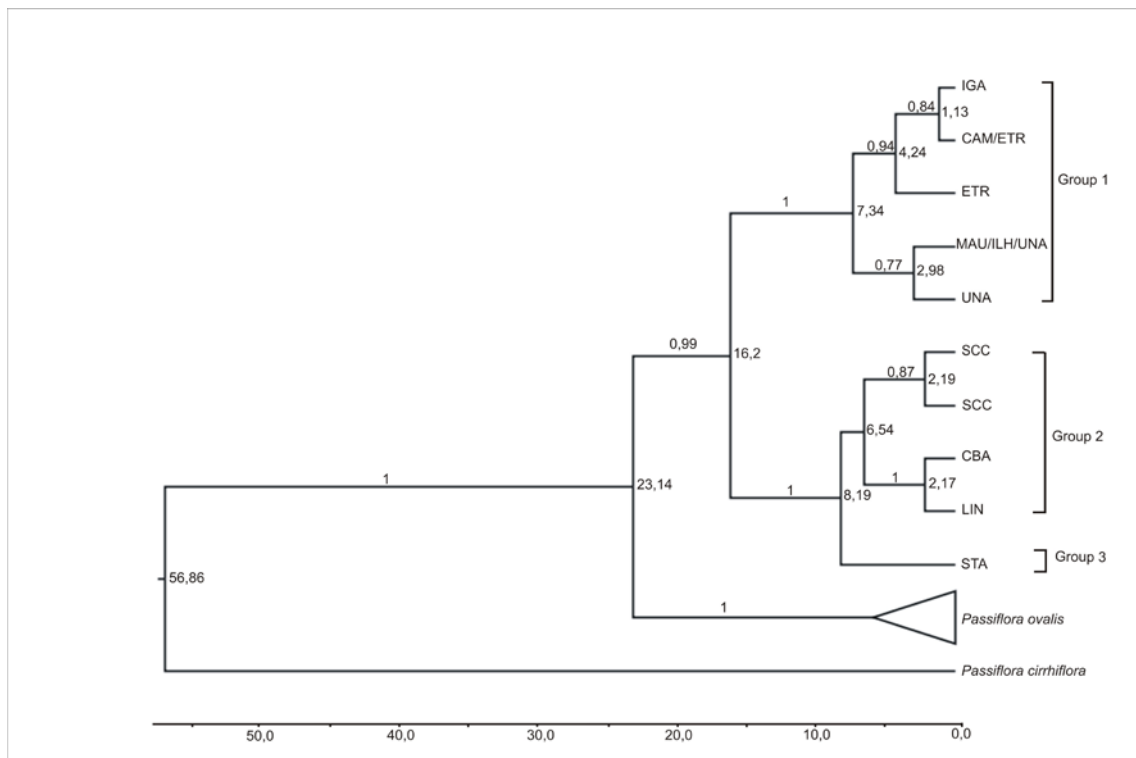


Figure 4:

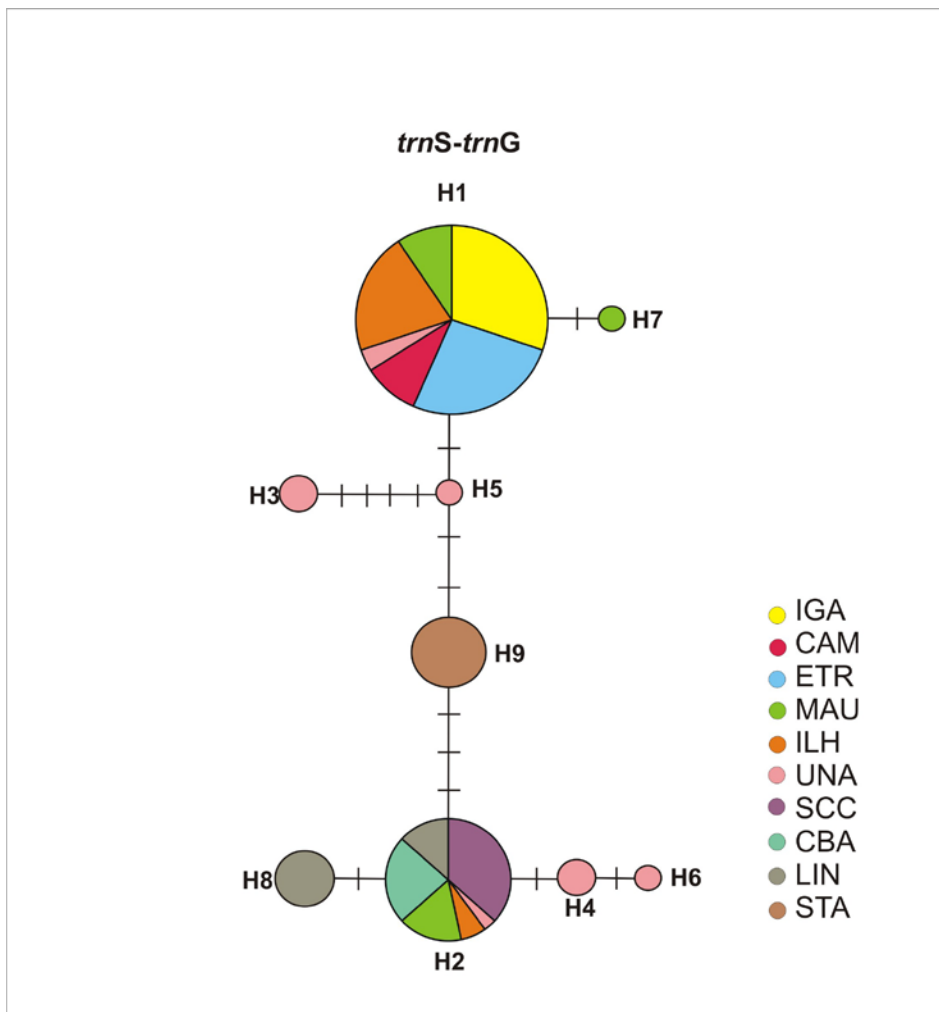
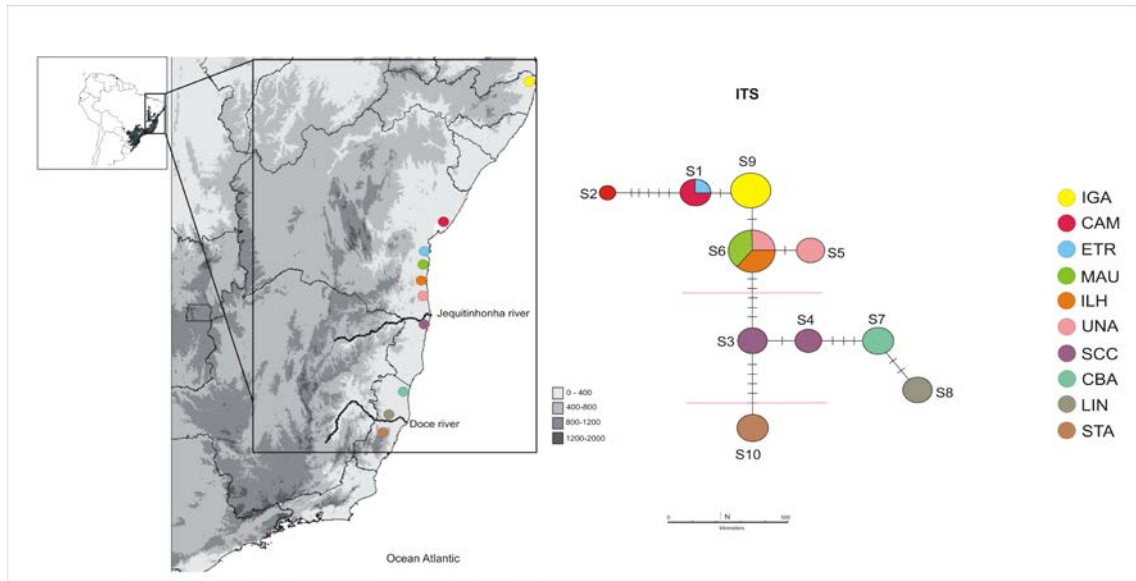


Figure 5:





## CAPÍTULO 3

### **Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for *Passiflora contracta***

Artigo publicado no periódico “International Journal of Molecular Science – IJMS”

Short Note

## Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for *Passiflora contracta*

Ana Luíza R. Cazé<sup>1,†</sup>, Raquel A. Kriedt<sup>1,†</sup>, Luciano B. Beheregaray<sup>2</sup>, Sandro L. Bonatto<sup>3</sup> and Loreta B. Freitas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Evolution, Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, PO Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil;

E-Mails: analuizacaze@gmail.com (A.L.R.C.); raquelkriedt@yahoo.com (R.A.K.)

<sup>2</sup> Molecular Ecology Laboratory, School of Biological Sciences Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide 5001, Australia; E-Mail: luciano.beheregaray@flinders.edu.au

<sup>3</sup> Laboratory of Genomic and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil; E-Mail: slbonatto@pucrs.br

† These authors contributed equally to this work.

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: loreta.freitas@ufrgs.br; Tel.: +55-51-3308-6731; Fax: +55-51-3308-9823.

Received: 27 August 2012; in revised form: 7 September 2012 / Accepted: 8 September 2012 /

Published: 12 September 2012

---

**Abstract:** *Passiflora contracta* Vitta (Passifloraceae) is an endemic species of the Atlantic Rainforest, one of the most species-rich ecoregions in the world, although extremely endangered. We have developed an enriched microsatellite library in order to fine-scale studies of the genetic structure of *P. contracta*. Twelve pairs of microsatellite primers were designed, and seven loci were successfully amplified and characterized by genotyping two wild populations of *P. contracta*. All seven loci were polymorphic, with an average number of alleles found being 4.8 and 5 per population. The cross-species transferability was tested using sister species *Passiflora ovalis* Vell. Ex Roemer. The development of these markers will contribute to the studies of population genetics in *P. contracta* as well as future studies

concerning diversity patterns in the Atlantic Rainforest, and may also help to establish strategies for the conservation of this species.

**Keywords:** nuclear microsatellites; *Passiflora contracta*; conservation genetics

---

## 1. Introduction

*Passiflora contracta* Vitta (Passifloraceae) is an endemic species of the Atlantic Rainforest, one of the most species-rich ecoregions in the world. Originally covering 15% of Brazil, this endangered ecosystem has been reduced to less than 8% of its coverage. Despite the anthropic interference, the Atlantic Rainforest still harbors impressively high levels of endemism and diversity [1], characteristic of areas of long-term climate stability, also known as refugia [2]. Although refugia have been proposed in the Atlantic Rainforest [3], these have not been tested by studies of the intraspecific plant genetic diversity due to the lack of information on the genetic diversity of the Atlantic Forest's vegetation. *P. contracta* is an excellent species for such a study. This woody vine is distributed along the coast of Brazil, ranging from the Pernambuco to Espírito Santo states (~07–21°S latitude) [4]. The species is characterized by its chiropterophily syndrome, which is not a common feature in the Passifloraceae family [5].

The identification of high-resolution genetic markers within *P. contracta* is an important step to develop fine-scale investigations of endemism-rich ecosystems and is also an interesting tool for testing the refugia hypothesis. Therefore, the aim of this study was to develop and characterize microsatellite markers in *P. contracta* and to test their transferability to its sister species, *Passiflora ovalis* Vell. Ex Roemer (Passifloraceae).

## 2. Results and Discussion

A total of seven of the 12 primer pairs were successfully amplified; all of them were polymorphic and presented alleles in the expected size range for the two wild populations: Linhares-ES (19°24'S, 40°28'W) and Maráu-BA (14°07'50"S, 38°59'55"W) (Table 1). The characteristics of the microsatellite loci and variability measures across the two wild populations are described in Table 2. The number of alleles per population ranged from two to nine (Linhares) and from three to eight (Maráu). The average alleles found for each population was 5 and 4.8, respectively. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.31 to 0.84 (Linhares), and 0.38 to 0.67 (Maráu). Two loci, PC6F7 (Linhares) and PC7H11 (Maráu), showed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium ( $p < 0.007$ ). These findings may be a consequence of the high inbreeding in both populations, which could result from habitat fragmentation since species populations are small and, in general, restricted to preserved areas. Alternatively, the HWE deviation could be due to null alleles, which were indicated by MICRO-CHECKER 2.2.3 for the deviating loci (PC6F7) of the Linhares population, and also for the deviating loci (PC7H11) of the Maráu population. Null alleles were not detected for the remaining loci. One pair of loci (PC5E11 and PC6G11) showed significant linkage disequilibrium for the Linhares population after Bonferroni correction ( $p <$

0.002). However, with no additional information, the physical linkage of the loci cannot be distinguished from disequilibrium due to population processes as nonrandom mating [6].

The transferability of the markers to the sister species *P. ovalis* was tested for all 12 primer pairs, and showed a low efficiency, with just two loci (PC6G11 and PC7H11) being amplified. This result reinforces the differentiation between these species that were previously considered as a single one.

Table 1. Characteristics of seven microsatellite markers for *Passiflora contracta*. For each locus, the name, repeat motif, primer sequence, labeling dye, annealing temperature (Ta), allele size range (bp) and GenBank accession number are shown.

Locus	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Dye	Ta (°C)	Size (bp)	Genbank
PC5E11	(AC) <sub>7</sub> (AG) <sub>6</sub>	F:CTGGTCTTGGATTGTCCTTTG R:CAAAGTAACTGGTGAGCTTAGGG	FAM	54	158–170	JX575753
PC6E8	(GT) <sub>8</sub>	F:TTGCAAATGATAACAAAACACG R:TATCTCGGATTCCCAAACC	FAM	53	165–181	JX575754
PC6G11	(GA) <sub>10</sub>	F:ACTGGAAGTCAAACGGTGAG R:GGTGGCTCGAAATTCAAATC	FAM	52	207–229	JX575755
PC7H11	(CTT) <sub>13</sub>	F:TGAAATCCCTGTTGTGTGACTC R:TCCTGAGGGGAGCTGTAGTG	FAM	53	169–175	JX575759
PC6D6	(CT) <sub>9</sub>	F:TTTTTGTGAAGGTAATTTGTCA R:CATGTTGCCTCCATGTTTGA	FAM	50	162–168	JX575757
PC7C12	(AC) <sub>7</sub>	F:TGAAATCCCTGTTGTGTGACTC R:TCCTGAGGGGAGCTGTAGTG	FAM	55	179–195	JX575758
PC6F7	(CT) <sub>8</sub>	F:AACGCATTTTTTCAGTTTCTGC R:TGAGACTCCCATTCACCAAG	FAM	53	230–248	JX575756

**Table 2.** Characterization of microsatellite loci indicating number of alleles per locus (A); expected ( $H_E$ ) and observed ( $H_O$ ) heterozygosity for the two analyzed populations, Linhares-ES (19°24'S, 40°28'W) and Maraú-BA (14°07'50"S, 38°59'55"W), of *Passiflora contracta*.

<i>Passiflora contracta</i>						
locus	Linhares-ES			Maraú-BA		
	A	$H_E$	$H_O$	A	$H_E$	$H_O$
PC5E11 <sup>#</sup>	6	0.82011	0.64286	5	0.63678	0.60000
PC6E8	2	0.31452	0.37500	5	0.46508	0.55556
PC6G11 <sup>#</sup>	4	0.37619	0.44444	8	0.58571	0.44444
PC7H11	3	0.60484	0.75000	3	0.65238	0.38889 *
PC6D6	4	0.64368	0.53333	4	0.64308	0.53846
PC7C12	7	0.79637	0.68750	5	0.67137	0.56250
PC6F7	9	0.84135	0.41176 *	4	0.57619	0.50000
mean	5			4.8		

<sup>#</sup> disequilibrium linkage after Bonferroni correction to Linhares-ES population ( $p < 0.002$ ); \* deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $p < 0.007$ ).

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Microsatellite-Enriched Library Construction and Isolation of Microsatellite Markers

Genomic DNA was extracted from an individual of *P. contracta* using the Nucleo Spin Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and the repetitive motifs were isolated using an enrichment technique [7] in which the genomic DNA was digested with *RsaI* and *HaeIII* and the resulting fragments were linked to two oligonucleotide adaptors. Biotinylated oligonucleotide probes (dGT)<sub>10</sub>, (dGA)<sub>10</sub>, (dAGAT)<sub>10</sub>, (dAACT)<sub>10</sub>, and (dACAT)<sub>10</sub> were hybridized with the digested DNA and selectively restrained by streptavidin magnetic particles (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The selected DNA fragments were eluted in 25 µL ultra pure water and amplified by PCR in a total volume of 50 µL. Reactions were conducted with 50 ng of eluted DNA, 1× Colourless GoTaq Reaction Buffer (Promega), 200 mM dNTPs (Promega), 40 pmol of “oligo adapter A” as primer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 U of GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). The PCR conditions were as follows: An initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 1 min and extension at 72 °C for 2 min, with a final extension at 72 °C for 5 min. The enriched library was purified using an UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA), linked to the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

and transformed into One Shot TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen). The plasmid DNA was PCR-amplified using 16 pmol M13(-20) forward and M13(-40) (Sigma-Aldrich), reverse primers, 2.5 U GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega), 200  $\mu$ M of each dNTP (Promega), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1 $\times$  GoTaq Colourless Reaction Buffer (Promega), and 1  $\mu$ L of transformed cells grown in 100  $\mu$ L liquid broth LB. The PCR conditions were as follows: An initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 3 min, with a final extension at 72 °C for 5 min. A total of 163 positive PCR fragments were purified and sequenced using a MegaBACE™ 1000 automated sequencer (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA), following the DYEnamic™ ET terminator sequencing premix kit with terminal fluorescent labeled protocol according to the conditions were as follows: 4  $\mu$ L of DYEnamic™ ET terminator sequencing premix, 5  $\mu$ M of forward/reverse primer, 40 ng of purified PCR products, and ultra pure water to complete a 10  $\mu$ L volume. This reaction was submitted to 95 °C for 20 s, 50 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. A total of 23 clones presented perfect unique microsatellites, but only 12 were suitable for primer design using Primer 3 software [8].

### 3.2. Genotyping and Data Analysis

The primers were tested for amplification in two wild populations of *P. contracta* species, Linhares-ES (19°24'S, 40°28'W),  $n = 20$  and Maraú-BA (14°07'50"S, 38°59'55"W),  $n = 20$ , and 10 individuals of *P. ovalis* were tested for cross-amplification. The amplifications were performed in a 15  $\mu$ L reaction containing ~10 ng template DNA, 1 $\times$  Taq Platinum reaction buffer (Invitrogen), 200  $\mu$ M each dNTP (Invitrogen), 2 pmol FAM fluorescently labeled M13(-21) primer [9] and reverse primer, 0.4 pmol forward primer with a 5'-M13(-21) tail, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), and 0.5 U Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen). The PCR conditions for SSR were as follows: An initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at primer-specific temperatures (50–55 °C) see (Table 2) for 45 s, and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 15 min. The repeat motif, primer sequences, labeling dye, annealing temperature (Ta °C), and allele size range in base pair, with the M13 tail included, of each primer pair are listed in Table 1.

The fragments were analyzed using MegaBACE™ 1000, based on the ET-ROX 550 size ladder (GE Healthcare). The fragment length and microsatellite genotyping were determined using GENETIC PROFILER 2.0 (GE Healthcare). The allele numbers, expected and observed heterozygosity, Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), and genotypic disequilibrium analyses were performed using ARLEQUIN version 3.5 [10] and FSTAT [11]. MICRO-CHECKER 2.2.3 [12] was used to test for null alleles.

## 4. Conclusions

The development of polymorphic microsatellite markers will contribute to the population genetic studies of *P. contracta*, particularly with regard to comparative studies of diversity patterns in the Atlantic

Rainforest. These markers may also help to establish strategies for the conservation of priority population groups of this species that inhabits an extremely endangered ecosystem.

## Acknowledgments

We thank CNPq, FAPERGS and the ARC for financial support and grants.

## References

1. Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **2000**, *403*, 853–858.
2. Prance, G.T. Origin and evolution of Amazon flora. *Interciencia* **1978**, *3*, 207–222.
3. Carnaval, A.C.; Moritz, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J. Biogeogr.* **2008**, *35*, 1187–1201.
4. Vitta, F.A.; Bernacci, L.C. A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. *Brittonia* **2004**, *56*, 89–95.
5. Buzato, S.; Franco, A.L. *Tetrastylis ovalis*: A second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Syst. Evol.* **1992**, *181*, 261–267.
6. Hedrick, P.W. *Genetics of Populations*, 3rd ed.; Jones, Bartlett Publishers: Boston, MA, USA, 2005; p. 737.
7. Beheregaray, L.B.; Möller, L.M.; Schwartz, T.S.; Chao, N.L.; Caccone, G. Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. *Mol. Ecol. Notes* **2004**, *4*, 330–332.
8. Rozen, S.; Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols*; Krawetz, S., Misener, S., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2000; pp. 365–386.
9. Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragment. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 233–234.
10. Excoffier, L.G.L.; Lischer, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* **2010**, *10*, 564–567.
11. Goudet, J. FSTAT ver 1.2: A computer program to calculate *F*-Statistics. *J. Hered.* **1995**, *86*, 485–486.
12. Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. Micro-checker ver2.2.3: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **2004**, *4*, 535–538.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## **CAPÍTULO 4**

### **Discussão Geral**



O trabalho aqui apresentado teve como principais objetivos a caracterização da variabilidade genética da espécie *Passiflora ovalis*, através de uma análise filogeográfica, testando as hipóteses de áreas de refugio propostas por Carnaval & Moritz (2008) e a de rios como barreiras proposta inicialmente por Wallace (1982). Além disso, foi proposto o desenvolvimento e validação de *loci* de microssatélites específicos, que serão muito úteis em estudos populacionais futuros, envolvendo aspectos como estrutura populacional e fluxo gênico, os quais poderão auxiliar no estabelecimento de programas de proteção à espécie.

Até o desenvolvimento deste estudo, nenhum outro havia abordado a variabilidade genética nesta espécie e apenas amostras coletadas no estado do Espírito Santo (Brasil) haviam sido incluídas em estudos de filogenia molecular, inicialmente tratadas como *Tetrastylis ovalis* (Muschner *et al.*, 2003) e posteriormente como *Passiflora ovalis* (Hansen *et al.*, 2006; Muschner *et al.*, 2012).

A distribuição geográfica proposta para a espécie de acordo com a taxonomia vigente (Cervi, 2006) previa sua ocorrência desde o estado de São Paulo até o estado de Pernambuco, sempre em bordas de mata, em áreas de relativa preservação e ao nível do mar. Porém, os primeiros resultados obtidos a partir das análises Bayesianas e das relações filogenéticas inferidas através do método *median-joining network*, com o uso do marcador nuclear em particular, mas amplamente corroborados pelos dados de cloroplasto, indicaram, com alto grau de suporte de confiabilidade, uma clara separação entre as amostras coletadas nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro em relação àquelas coletadas no restante da distribuição (ver figura 2 a e b artigo 1). Tais achados corroboraram a proposição taxonômica feita por Vitta & Bernacci (2004), que afirmava a existência de duas espécies, *P. contracta* e *P. ovalis*, separadas por marcadores morfológicos e relacionadas à distribuição geográfica das amostras. Esta separação em

duas espécies foi refutada por Cervi (2006) que argumentou serem os caracteres usados na separação muito sujeitos às alterações ambientais, passíveis de grande variabilidade intra-populacional e que, portanto, representariam variabilidade adaptativa. Sendo assim, apesar de termos coletado amostras de acordo com a distribuição proposta por Cervi (2006) para *P. ovalis*, analisamos os padrões filogeográficos referentes somente ao que agora reabilitamos como espécie *P. contracta*. Este foi o primeiro trabalho envolvendo caracterização genética destas *taxa* e confirmou sua separação em duas espécies válidas. Desta forma, além dos objetivos gerais inicialmente propostos, este trabalho acabou constituindo uma importante contribuição para a classificação taxonômica destas espécies.

Outro resultado importante foi em relação aos marcadores moleculares utilizados. Até então, somente o marcador nuclear ITS havia sido usado para estimar a variabilidade genética intra-populacional em espécies silvestres de *Passiflora* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Koehler-Santos *et al.*, 2006b; Mäder *et al.*, 2010) e alguns marcadores de microssatélites para as espécies com interesse econômico (Oliveira *et al.*, 2005; Pádua *et al.*, 2005; Cerqueira-Silva *et al.*, 2012). Este foi o primeiro estudo a obter sucesso com uma região de cloroplasto (*trnS-trnG*), embora deva-se fazer a ressalva que esta foi a única espécie do subgênero *Deidamioides* a ser testada até o momento.

Como já previsto por Mäder *et al.* (2010), o marcador nuclear ITS foi bastante informativo quanto ao padrão de estruturação filogeográfica da espécie. O mesmo não foi observado em relação ao marcador plastidial que, apesar de ter apresentado certo grau de variação, esta não foi comparável ao que já havia sido identificado em outras espécies de plantas (por exemplo, Novaes *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010). Além disso, o marcador uniparental, contrariamente ao que era esperado em decorrência de seu

modo de herança, não foi capaz de recuperar o mesmo padrão de estruturação filogeográfica observado em relação a ITS (ver artigo 1 figura 4). Uma explicação possível envolve a retenção de polimorfismo ancestral observada nas diferentes áreas onde os indivíduos foram coletados, mas pode também ser explicada pela dinâmica evolutiva do marcador ITS em espécies de *Passiflora* (Mäder *et al.*, 2010), os tempos de geração, o fluxo gênico entre as populações e a forma de reprodução e dispersão da espécie para os quais não se tem conhecimento.

Nossas análises estimaram o surgimento da espécie em torno de 56 MYA, o que remonta ao período Terciário, no Eoceno. Esta idade coincide com os resultados já reportados em outros estudos em que houve um aumento considerável na diversidade do Neotrópico com o surgimento de um grande número de espécies de plantas, especialmente favorecidas pelas excelentes condições climáticas do período (Jaramillo *et al.*, 2006; Hoorn *et al.*, 2010). A estimativa do primeiro evento de diversificação remonta ao Mioceno, há aproximadamente 16 MYA. Este período de diversificação relaciona-se diretamente com o período de soergimento dos Andes, que exerceu forte impacto na formação do Neotrópico e contribuiu fundamentalmente para a enorme diversidade encontrada nesta região (Antonelli *et al.*, 2009). Já é sabido que os processos de diversificação estão fortemente ligados aos eventos climáticos e tectônicos e que a história geológica da América do Sul é relevante para compreender as origens da diversidade encontrada atualmente (Hoorn *et al.*, 2010; Antonelli & Sanmartin, 2011).

O padrão filogeográfico observado para a espécie indicou em relação ao marcador nuclear que as populações se encontram bastante estruturadas, com maior contribuição da variabilidade interpopulacional, decorrente provavelmente de baixo fluxo gênico, o que também indica que as populações permaneceram isoladas por um

longo tempo. Também se observou que as populações se encontram estáveis, sem qualquer sinal evidente de expansão demográfica, com indícios de isolamento por distância. Tal padrão pode ser explicado em parte com os escassos conhecimentos que se tem sobre a biologia reprodutiva da espécie (Ulmer & MacDougal, 2004) e com a situação de degradação observada no ambiente ocupado pela espécie (Tabarelli *et al.*, 2005). Sendo polinizada por morcegos de pequeno a médio porte (Buzzato & Franco, 1992) e tendo suas sementes dispersas por animais de pequeno porte, altamente dependentes da integridade da floresta para sua manutenção, entende-se o baixo fluxo gênico observado entre as diferentes localidades de coleta de amostras. Estes aspectos poderão ser amplamente testados quando da utilização dos marcadores de microsatélites aqui descritos forem empregados na estimativa de fluxo gênico e na caracterização das populações. Novamente, permanece em aberto uma explicação para os resultados observados em relação ao marcador plastidial e diferentes análises deverão ser conduzidas na tentativa de elucidar o padrão observado. Muschner *et al.* (2006) relataram a ocorrência de dois modos de herança organelar no gênero *Passiflora*, mas não estudaram espécies do subgênero *Deidamioides*. No trabalho de Hansen *et al.* (2007) os autores descrevem herança paterna (via pólen) para o cloroplasto em outra espécie de *Deidamioides*. Se esta for a regra neste subgênero, *P. contracta* teria a herança dos marcadores plastidiais dependente apenas do fluxo de pólen, o que depende da capacidade de dispersão do polinizador, o qual neste caso estaria completamente vulnerável à integridade da vegetação circundante. De toda a forma, nota-se a influência da fragmentação do habitat para a variabilidade genética desta espécie.

Um dos objetivos centrais do presente estudo foi testar a hipótese de áreas de refúgio proposta por Carnaval & Moritz (2008), onde é predito que áreas que permaneceram estáveis por longos períodos de tempo, durante as oscilações climáticas

ocorridas principalmente no Quaternário, abrigariam um maior número de espécies e estas apresentariam maior diversidade genética. Estes autores encontraram, através de modelagem de nicho e sua comparação com dados genéticos, uma grande área na região central do estado da Bahia, que teria sido uma área de refúgio. Os resultados aqui descritos para *P. contracta* corroboram esta proposição, sendo a região central da Bahia a localidade onde os maiores índices de diversidade genética foram encontrados. Desta forma, é possível que esta região possa ter atuado como refúgio também para *P. contracta*.

Todas as análises aqui desenvolvidas indicaram a existência de três filogrupos, formando um padrão norte-sul de distribuição geográfica. Observou-se que a separação dos filogrupos coincide com a existência de dois rios, o Jequitinhonha e o Doce. Levantamos a hipótese de que estes rios possam ter atuado como barreiras limitantes do fluxo gênico entre as populações, o que corroboraria a teoria de rios como barreiras proposta por Wallace (1852) para explicar os padrões encontrados em grupos de macacos na Amazônia, e também se estende para estudos em diversos grupos de animais e plantas da Mata Atlântica e até mesmo de outras regiões do Neotrópico (Pelegriño *et al.*, 2005; Thome *et al.*, 2010; Gehering *et al.*, 2012). E, especificamente em *P. contracta*, os rios parecem ter sido importantes barreiras que restringiram o fluxo gênico e que contribuíram para as quebras filogeográficas encontradas na espécie.

Os nossos resultados sugerem que o padrão de estruturação filogeográfica encontrado para *P. contracta* pré-data o Quaternário, sendo o período da primeira diversificação estimado como tendo ocorrido durante o Terciário, o que corrobora a construção de um cenário mais abrangente em termos de acontecimento de eventos que levaram à diversificação atual. Neste sentido, temos a proposição de Moritz *et al.* (2000) de que não devemos atentar apenas para os eventos do Quaternário, pois os eventos

mais antigos também tiveram sua contribuição para a enorme diversidade encontrada no Neotrópico. Visto que, diversificação e especiação são processos complexos que levaram a construção da exuberante quantidade de espécies observadas e que estes só podem ser explicados se uma escala de tempo e espaço mais abrangente for levada em consideração (Geurgas *et al.*, 2008; Werneck *et al.*, 2009; Hoorn *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011), este estudo vem trazer mais um forte argumento para esta discussão. Com a crescente utilização de metodologias modernas, com a inclusão de dados geo-espaciais, modelagem de nicho ecológico e envelopes climáticos, mais ferramentas tem sido agregadas na tentativa de iluminar um cenário que possa explicar, senão todos pelo menos parte deles, os processos que levaram à diversificação genética das espécies e a grande riqueza biológica do Neotrópico.

No exemplo aqui apresentado, ainda é possível salientar que os eventos do Quaternário também tiveram sua importância e não devem ser negligenciados, pois a existência de áreas de que atuaram como refúgio, durante períodos de oscilações climáticas, descritas para tantas espécies animais e vegetais em regiões total ou parcialmente sobrepostas (Carnaval & Moritz, 2008; Palma-Silva *et al.*, 2009; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010), e no caso da *P. contracta*, o refúgio pode ter atuado como um forte mecanismo de proteção e manutenção da diversidade já existente na espécie.

Além da descrição dos padrões evolutivos encontrados nesta espécie em particular, o presente trabalho vem contribuir para a construção de iniciativas visando à preservação da Mata Atlântica. Mesmo sendo detentor de uma enorme diversidade, este é um ecossistema extremamente degradado e fragmentado e as espécies endêmicas desta região sofrem sérios riscos de extinção, com as populações encontradas em áreas fragmentadas, com fortes restrições ao fluxo gênico, o que acarreta em aumento do endocruzamento e diminuição da variabilidade genética (Ellstrand & Elam, 1993; Lira,

*et al.*, 2003; Tonhasca, 2005). Assim, corroborando outros estudos, adicionamos mais um ótimo exemplo e reforçamos a sugestão de estabelecer como prioritárias para conservação as áreas de mais alta diversidade genética. No caso específico de *P. contracta*, ainda sugerimos que sejam considerados os três filogrupos, que correspondem a conjuntos diferentes de diversidade genética.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (capítulos 1 e 4)

- Alvarez I and Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* 29: 417- 434.
- Amaro CR, Rodrigues MT, Yonenaga-yassuda Y and Carnaval AC (2012) Molecular Phylogenetics and Evolution Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Mol Phylogenet Evol* 62: 880–888.
- Antonelli A, Nylander JAA, Persson C and Sanmartín I (2009) Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 106: 9749-9754.
- Antonelli A and Sanmartín I (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60: 403–414.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA and Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. MA. 447pp.
- Avise, J. C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *J Biogeogr* 36: 3–15.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS and Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 82:247-277.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17: 3754-3774.
- Behling H and Negrelle RRB (2001) Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, southern Brazil, during the late Quaternary. *Quat Res* 56: 383–389.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177: 19–27.
- Bennett KD and Provan J (2008) What do we mean by “refugia”? *Quat Sci Rev* 27-28: 2449–2455.
- Brown KS (1981) The biology of *Heliconius* and related genera. *Annu Rev Entomol* 26: 427-456.
- Broza YY, Danin-Poleg Y, Lerner L, Valinsky L, Broza M, and Kashi Y (2009) Epidemiologic study of *Vibrio vulnificus* infections by using variable number tandem repeats. *Emerg Infect Dis* 15: 1282–1285.
- Buzato S and Franco AL (1992) *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Syst Evol* 181: 261-267.



Cabanne GS, Santos FR and Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biol J Linn Soc Lond* 91: 73–84.

Cabanne GS, d' Horta FM, Sari EHR, Santos FR and Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Mol Phylogenet evol* 49: 760–73.

Calonje M, Martín-Bravo S, Dobeš C, Gong W, Jordon-Thaden, Kiefer C, Kiefer M, Paule J, Schmickl R and Koch MA (2009) Noncoding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Syst Evol* 282: 257–280.

Carnaval AC and Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J Biogeogr* 35: 1187–1201.

Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT and Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785–789.

Cervi AC (2006) O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summæ Editionem* 16: 1.

Cervi AC, Bernacci LC and Nascimento DS (2009) Passifloraceae In Stehmann JR; Forzza RC; Salino A; Sobral M; Costa DP; Kamino, LHY (eds) *Plantas da Floresta Atlântica*, 1 ed: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 406–407 pp.

Cerqueira-Silva CBM, Santos ESL, Souza AM, Mori GM, Oliveira EJ, Corrêa RX and Souza AP (2012) Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). *Am J Bot* e170–e172.

Cervi, AC and Rodrigues WA (2010) Nomenclatural and taxonomic review of Passifloraceae species illustrated and described by Vellozo in *Flora Fluminensis*. *Acta bot bras* 24: 1109–1111.

Chan LM, Brown JL and Yoder AD (2011) Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. *Mol Phylogenet Evol* 59: 523–537.

Collevatti RG, Grattapaglia D and Hay JD (2001) High resolution micro-satellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86: 60–67.

Colombo AF and Joly CA (2010) Brazilian Atlantic Forest *lato sensu*: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Braz J Biol* 70: 697–708.

Cutri L, Nave N, Ami MB, Chayut N, Samach A and Dornelas MC (2012) Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. *Mech Dev* [Epub ahead of print].

Du X, Chen Z, Li W, Tan Y, Lu J, Zhu X, Zhao T, Dong G and Zeng L (2010) Development of Novel Microsatellite DNA Markers by Cross-Amplification and Analysis of Genetic Variation in Gerbils. *J Hered* 101: 710-716.

Ellstrand NC and Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217-242.

Feliner GN and Rosselló JA (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mol Phylogenet Evol* 44: 911-919.

Feuillet C and MacDougal JM (2003) A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13: 34-38.

Fitzpatrick SW, Brasileiro CA, Haddad CFB and Zamudio KR (2009) Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol Ecol* 18: 2877–2896.

Fundação SOS Mata Atlântica (2012) A Mata Atlântica. Disponível em: [www.sosma.org.br](http://www.sosma.org.br). Acesso em 12 de Agosto de 2012.

Germain-Aubrey CC, Soltis PS, Soltis DE and Gitzendanner MA (2011) Microsatellite marker development for the federally listed *Prunus geniculata* (Rosaceae). *Am J Bot* 98:e58-60.

Geurgas S, Rodrigues MT and Moritz C (2008) The genus *Coleodactylus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revisited: a molecular phylogenetic perspective. *Molecular Phylogenet Evol* 49: 92–101.

Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S and Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol* 15: 3969–3982.

Gehring PS, Pabijan M, Randrianirina J E, Glaw F and Vences M (2012) The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*) *Mol Phylogenet Evol* 64: 618–632.

Haffer J (1969) Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science* 165: 3889.

Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol Ecol* 8: 521-523.

Hamilton MB, Braverman JM and 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. *Mol Biol Evol* 20:1710-1721.

Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi A and Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Syst Bot* 31: 138–150.

Hansen AK, Escobar LK, Gilbert LE and Jansen RK (2007) Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae):

implications for phylogenetic studies. *Am J Bot* 94: 42–46.

Harms H (1897) Passifloraceae. In: A. Engler & K. Prantl (eds) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Nachträge 2–4 (I)*. W. Engelmann, Leipzig, 253-256 pp.

Harris EE, Gifalli-Iughetti C, Braga ZH and Koiffman CP (2005) Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler monkey (*Alouatta guariba*) from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. *Neotrop Primates* 13: 16–21.

Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartín I, Sanchez-Meseguer A, Anderson CL, Figueiredo JP, Jaramillo C, Riff D, Negri FR, Hooghiemstra H, Lundberg J, Stadler T, Särkinen T and Antonelli A (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330: 927–31.

Jaramillo C, Rueda M J and Mora G (2006) Cenozoic Plant Diversity in the Neotropics. *Science* 311: 1893-1896.

Jarne P and Lagoda P J L (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11: 424 - 429.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA and Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, XVI, 464 pp.

Knowles LL (2009) Statistical Phylogeography. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40: 593–612.

Koehler-Santos P, Lorenz-Lemke AP, Salzano FM and Freitas LB (2006a) Ecological-evolutionary relationships in *Passiflora alata* from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Biol* 66: 809-816.

Koehler-Santos P, Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006b) Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. *Biol J Linn Soc Lond* 88:611-630.

Krosnick SE and Freudenstein JV (2005) Monophyly and Floral Character Homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). *Syst Biol* 30: 139–152.

Lacerda DR, Marini MA and Santos FR (2007) Mitochondrial DNA corroborates the species distinctiveness of the Planalto (*Thamnophilus pelzelni* Hellmayr, 1924), the Sooretama (*T. ambiguus* Swainson, 1825) Slaty-antshrikes (Passeriformes: Thamnophilidae). *Braz J Biol* 67: 873–882.

Ledru MP, Rousseau DD, Cruz FW, Riccomini C, Karmann I and Martin L (2005) Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic rainforest region and interhemispheric comparison. *Quat Res* 64: 444– 450.

Lee EJ, Jin GN, Lee KL, Han MS, Lee YH and Yang MS (2011) Exploiting Expressed Sequence Tag Databases for the Development and Characterization of Gene-Derived

Simple Sequence Repeat Markers in the Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.) for Forensic Applications. *J Forensic Sci* 56: 1131–1135.

Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA and Provan J (2003) Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Mol Ecol* 12: 3219–3225

Liston A, Parker-Defeniks M, Syring JV, Willyard A and Cronn R (2007) Interspecific phylogenetic analysis enhances intraspecific phylogeographical inference: a case study in *Pinus lambertiana*. *Mol Ecol* 16: 3926–3937.

Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM and Freitas LB (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Ann Bot* 95: 799–806.

Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mader G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL and Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Mol Ecol* 19: 5240–51.

Mäder G, Zamberlan PM, Fagundes NJR, Magnus T, Salzano FM, Bonatto SL and Freitas LB (2010) The use and limits of ITS data in the analysis of intraspecific variation in *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Genet Mol Biol* 33: 99–108.

Martini AMZ, Fiaschi P, Amorim AM and Paixão JLD (2007) A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest. *Biodivers Conserv* 16: 3111–3128.

McCauley DE (1995) The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends Ecol Evol* 10: 198–202.

Meletti LMM, Soares-Scot MD, Bernacci LC and Passos IRS (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. *In*: Faleiro FG, Junqueira NTV and Braga MF (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético* Embrapa Cerrados, Planaltina, 55–78.

Milward-de-Azevedo MA (2008) Three new species of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae) from Brazil. *Brittonia* 60: 310–31.

Ministério do Meio Ambiente (2007) Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade brasileira: Atualização – Portaria MMA nº 9, 23 de Janeiro de 2007. Ministério do Meio Ambiente, Secretária de biodiversidade e florestas. Série biodiversidade, 31. Brasília. 328pp.

Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J and Fonseca GAB (2005) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Washington: Conservation International, 392pp.

Morellato P and Haddad C (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786–792.

- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ and Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annu Rev Ecol Syst* 31: 533–563.
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM and Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae) *Am J Bot* 90:1229-1238.
- Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Vecchia M, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006) Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenera. *Genetica* 128:449–453
- Muschner VC, Zamberlan PM, Bonatto SL and Freitas LB (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae) *Genet Mol Biol* (in press).
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB and Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Novaes RML, de Lemos-Filho JP, Ribeiro RA and Lovato MB (2010) Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Mol Ecol* 19: 985–98.
- Nunes TS and Queiroz LP (2007) A new species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) from Brazil. *Acta Bot Bras* 21:2.
- Oliveira-Filho AT and Fontes MAL (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Camargo LEA, Fungaro MHP and Vieira MLC (2005) Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Mol Ecol Notes* 5: 331–333.
- Olson ME (2002) Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int J Plant Sci* 163:51–65.
- Pádua JG, Oliveira EJ, Zucchi MI, Oliveira GCX, Camargo LEA and Vieira MLC (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae) *Mol Ecol Notes* 5: 863–865.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barabará T, Bered F and Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- Patel S, Weckstein JD, Patané JSL, Bates JM and Aleixo A (2011) Temporal and spatial diversification of *Pteroglossus aracari* (Aves: Ramphastidae) in the neotropics: constant rate of diversification does not support an increase in radiation during the pleistocene. *Mol Phylogenet Evol* 58: 105–115.

Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY and Sites JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc Lond* 85: 13–26.

Pinheiro F, de Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C and Cozzolino S (2011) Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *J Biogeogr* 38: 1923–1935.

Pinto LR, Vieira MLC, Souza AP and Souza JCL (2001) Isoenzimas e Microsatélites In *Plantas Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 20: 16-19.

Prance GT (1978) Origin and evolution of Amazon flora. *Interciencia* 3: 207-222.

Quiroga MP, Pacheco S, Alizia LRM, and Premoli AC (2012) Shrinking Forests under Warming: Evidence of *Podocarpus parlatorei* (pino del cerro) from the Subtropical Andes. *J Hered* ess031.

Rassmann K, Schlötterer C and Tautz D (1991) Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12: 113-118.

Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS and Lovato MB (2010) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46-57.

Selkoe KA and Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9: 615-629.

Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5: 63-69.

Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farne SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling E and Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92: 142-166.

Sia EA, Butler CA, Dominska M, Greenwell P, Fox TD and Petes TD (2000) Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 250-255.

Sonah H, Deshmukh RK, Sharma A, Singh VP, Gupta DK, Gacche RN, Rana JC, Singh NK and Sharma TR (2011) Genome-Wide Distribution and Organization of Microsatellites in Plants: An Insight into Marker Development in *Brachypodium*. *Plos one* 6:e21298

Strasburg JL and Rieseberg LH (2010) How Robust Are “Isolation with Migration” Analyses to Violations of the IM Model? A Simulation Study *Mol Biol Evol* 27: 297-310.

Suguio K, Angulo RJ, Carvalho AM, et al. (2005) Paleoníveis do mar e paleolinhas de costa. In: Souza CRG, Suguio K, Oliveira and Oliveira PE, eds. Quaternário do Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 114-129.

Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC and Hirota MM (2005) Challenges and Opportunities for Biodiversity Conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conserv Biol* 19: 695–700.

Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera F and Alexandrino J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Phylogenet Evol* 55: 1018–31.

Tokuoka T (2012) Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *J Plant Res* 125:489–497

Tonhasca A (2005) Ecologia e história natural da Mata Atlântica. Rio de Janeiro, Interciência, 197 pp.

Tóth, G, Gáspari, Z and Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Res* 10: 967-981.

Ulmer T and MacDougal JM (2004) *Passiflora*: Passionflowers of the World. Portland OR. pp 430.

Vitta FA and Bernacci LC (2004) A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. *Brittonia* 56:89-95.

Wallace AR (1852) On the monkeys of the Amazon. *J Zool (Lond.)* 20: 107–10.

Wang IJ (2010) Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Mol Ecol* 19: 2605–2608.

Wang Y, Qin Y, Du Z and Yan G (2012) Genetic diversity and differentiation of the endangered tree *Elaeagnus mollis* Diels (*Elaeagnus* L.) as revealed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Biochem Syst Ecol* 40: 25–33.

Weber JL and May PE (1989) Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-396.

Werneck FP, Giugliano LG, Collevatti RG and Colli GR (2009) Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Mol Ecol* 18: 262–278.

White TJ, Burns T, Lee S and Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California. pp 315-322.

Whittaker JC, Harbord RM, Boxall N, Mackay I, Dawson G and Sibly RM (2003) Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics* 164: 781-787.

Williams KS and Gilbert LE (1981) Insects as selective agents on plant vegetative morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. *Science* 212: 467-469.

Williams PA, Karl BJ, Bannister P and Lee WG (2000) Small mammals as potential seed dispersers in New Zealand. *Austral Ecol* 25: 523-532.

Wright JM and Bentzen P (1994) Microsatellites: Genetic markers of the future. *Rev Fish Biol Fisher* 4: 384-388.

Xu DH, Sakai AJ, Kanazawa M, Shimamoto A and 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. *Theor Appl Genet* 101:724–732.

Xu J (2005) The inheritance of organelle genes and genomes: Patterns and mechanisms. *Genome* 48:951-958

Yamaji H, Fukuda T, Yokoyama J, Pak J-H, Zhou C-Z, Yang C-S, Kondo K, Morota T, Takeda S, Sasaki H and Maki M (2007) Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol* 44:863-884.

Yamane K, Yano K and Kawahara T (2006) Pattern and Rate of Indel Evolution Inferred from Whole Chloroplast Intergenic Regions in Sugarcane, Maize and Rice DNA Res 13: 197-204.

Yotoko KS, Dornelas MC, Togni PD, Fonseca TC, Salzano FM, Bonatto SL and Freitas LB (2011) Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. *PLoS One* 6: e18212.

Zane L, Bargelloni L and Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11: 1-16.