

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO II – BIO 99002

Semestre 2001/2



**EVOLUÇÃO E ECOLOGIA DE DUAS ESPÉCIES DE MARACUJÁS NATIVOS DO RIO GRANDE DO SUL:**

***Passiflora caerulea* e *P. tenuifila* (PASSIFLORACEAE).**



**Autor: Nicolás O. Mega**

**Orientador: Loreta B. de Freitas**

**Trabalho apresentado como conclusão de curso para  
obtenção do título de Bacharel na área Molecular,  
Celular e Funcional do Curso de Ciências Biológicas**



*“Quanto maior é o número  
de problemas em que  
pensamos, maior é o perigo  
de compreendemos nenhum”*

**(John Amos Comenius, 1592-1670)**

*“A imaginação é uma das mais altas  
prerrogativas do Homem”*

**(Charles Darwin, 1809-1882)**

## Agradecimentos

Depois de escrever todas as páginas de um trabalho como este, entrando madrugadas à dentro, parece fácil agradecer a tudo e a todos os responsáveis pelo feito...mas não é! Acho que devo começar pela minha orientadora, Loreta B. Freitas que, depois de muito puxar as minhas orelhas e de exercitar sua paciência, acabou acreditando que este trabalho ficaria bom e que eu conseguiria terminar ele à tempo.

Devo agradecer a algumas pessoas que me ajudaram com suporte intelectual, onde minhas capacidades e conhecimentos pareciam terminar: Talita, pelo grande empurrãozinho com o SPSS; Sídia, pelas sucessivas consultas, dicas e sugestões (várias!) de testes estatísticos; Sandro, pelas dicas com os programas e índices; Valéria, pela ajuda com a análise filogenética, com o PAUP e pela incessante tentativa de solucionar o problema com o nosso Macintosh velhinho; Aldo e Karen, pelas idéias de testes baseados em genética ecológica; Cervi, por me tirar certas convicções malucas da cabeça; Loreta, pelas sugestões com as técnicas de laboratório; Aline, pelas coletas e por ceder as fotos das passifloras; Anderson, pelas planilha de cálculo das distâncias geográficas, e Nelson, por me explicar "pequenos" detalhes da genética de populações, pelas discussões e principalmente por me tirar dúvidas nas horas de desespero.

Tenho que lembrar também dos parceiros de campo e das pessoas que perderam um pouquinho do seu tempo lembrando em trazer uma ou duas folhinhas dos maracujás que estudei. Isso foi muito importante e aumentou bastante o número de localidades que consegui amostrar.

Não posso esquecer de mencionar também os colegas de laboratório, que são vários! A vocês eu devo um bocado, pois foram vocês os responsáveis por me ensinar como as coisas operam realmente dentro de um laboratório, por de trás dos níveis da ciência, dentro das relações de poder que se estabelecem entre as pessoas. Mesmo assim, obrigado pelos momentos de distração e conversa.

É uma obrigação mencionar os amigos, melhor, irmãos, Wadie e Anderson, ecléticos e chatos como eu, mas que me entendem e sempre se mostraram disponíveis para um bate-papo. O apoio e o ânimo de vocês foi fundamental! Quanto aos colegas de futebol, obrigado pela diversão. As boladas, caneladas e contingências do jogo podem, às vezes, machucar, mas aliviam um estresse danado! Como alguém já disse, "o que seria de um pesquisador sem um futebolzinho de vez em quando?"

Tenho que agradecer também a Dana que, por cima do meu ombro, foi a primeira a ler estas linhas que escrevi. O apoio incondicional, companheirismo, a tolerância dos últimos meses (haja paciência!) e fé no meu potencial (sempre maior do que a minha própria) foram os fatores que mantiveram de pé até o fim.

Em relação a minha família, tenho que admitir: vocês sempre foram o alicerce que me sustentou, principalmente quando as coisas não andaram bem. Eu não teria conseguido chegar até aqui se não fosse

pelos “PhDs” Ricardo e Mara Mega, e pelo “Mestre” Martín Mega e pela “IC” Mayra Mega. O amor e força de vocês me manteve de cabeça erguida.

Devo muito, também, ao Aldo, por ter me estendido a mão quando mais precisei: quando as coisas perderam o rumo e a razão de ser. O rumo que assumo daqui para frente, é, de certa forma, uma semente plantada por ele.

Finalizando, agradeço as agências e programas de fomento que possibilitaram a realização deste projeto: PRONEX, FINEP, CNPq/PIBIC, FAPEIGS e PROPESQ-UFRGS.

Bom, este é o fim, ou melhor, o começo.

À vocês todos, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
1.1. Histórico.....	8
1.2. A família Passifloraceae e o gênero Passiflora.....	8
1.3. Filogenia do Gênero Passiflora.....	13
1.3.1 Sistemática clássica vs. sistemática molecular.....	13
1.3.2 <i>Passiflora caerulea</i> vs. <i>Passiflora tenuiflora</i> .....	13
1.4. O Estado do Rio Grande do Sul.....	14
1.4.1. Fisionomia.....	14
1.4.1.1. A Serra do Sudeste.....	14
1.4.1.2. A Campanha do Sudoeste.....	15
1.4.1.3. A Depressão Central.....	15
1.4.1.4. A Costa Rio-Grandense.....	16
1.4.1.5. O Planalto Meridional.....	16
1.4.2. Fitogeografia e fitossociologia.....	17
1.4.3. A origem das formações vegetais.....	19
1.4.3.1. O contingente Austral-Antártico (Sudoeste) .....	21
1.4.3.2. O contingente do Chaco-Pampeano (Noroeste).....	22
1.4.3.3. O contingente do Brasil Central (Norte).....	22
1.4.3.4. O contingente da Costa Atlântica (Nordeste).....	23
1.4.4. O grupo Passiflora.....	24
1.5. Marcadores moleculares na biologia de populações.....	24
1.5.1. Histórico.....	24
1.5.2. RAPD – PCR (Random Amplified Polymorphic DNA).....	26
1.6. Caracteres morfológicos e ecológicos.....	28
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Morfologia comparada e filogenia morfológica.....	31
3.2. Mapas de distribuição.....	32
3.3. Dados ecológicos (clima e solo) .....	32

3.4. Variabilidade genética e molecular.....	33
3.4.1. Extração de DNA.....	33
3.4.2. Teste de extração.....	34
3.4.3. RAPD-PCR.....	34
3.4.4. Análise dos dados.....	35
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1. Morfologia Comparada.....	38
4.1.1. <i>Passiflora caerulea</i> : características.....	38
4.1.2. <i>Passiflora tenuifila</i> : características.....	40
4.1.3. Peculiaridades.....	41
4.1.4. Filogenia das Passifloras que ocorrem no Rio Grande do Sul.....	41
4.2. Mapas de Distribuição.....	43
4.3. Dados Ecológicos.....	47
4.4. Variabilidade genética e molecular .....	49
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
5.1. Filogenia Molecular vs. Morfologia.....	54
5.2. Ecologia vs. Distribuição.....	55
5.3. Diversidade Genética.....	56
5.4. Considerações Históricas.....	58
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>
<b>7. APÊNDICE.....</b>	<b>67</b>

## INTRODUÇÃO:

### 1.1 Histórico:

O nome '*passiflora*', dado formalmente por Linnaeus em 1696, deriva das palavras latinas '*Flos Passionis*' (flor da paixão), que se referem à paixão de Jesus Cristo (Cervi, 1997). Tal nome foi usado durante muitos anos e, provavelmente, foi atribuído a estas plantas pelos primeiros missionários que chegaram à América, após as viagens de Cristovão Colombo. Estes missionários, no seu desejo de catequizar os índios, foram influenciados pelo fé, tanto que pareceu verdadeira a visão de que uma flor daquele Continente contivesse os sinais da Paixão (Vecchia, 2001).

O Padre missionário Giacomo Bosio, no 'Tratado da Crucificação de Nosso Senhor' de 1610, tinha descrito os símbolos da Paixão de Cristo presente nas flores de *Passiflora*. Segundo o autor, os três pregos são representados pelos três estigmas; a coroa de espinhos pela coroa de filamentos; as cinco pétalas e as cinco sépalas simbolizam os dez apóstolos que se mantiveram fiéis a Jesus Cristo; o androginóforo recorda a coluna da flagelação, sendo as gavinhas a representação dos açoites, enquanto as cinco anteras seriam as cinco chagas de Cristo (Vecchia, 2001).

Guglielmo Betto, em seu livro 'Il frutti tropicali in Itália' cita um trabalho de Pietro Antonio Michiel, publicado entre 1553 e 1565, nos quais a *Passiflora* já era cultivada na Itália (Betto, 1982). Estas trepadeiras tinham grande importância na Europa na primeira metade do século XVII. Particularmente, *P. caerulea* tinha um destaque maior, tanto que foi naturalizada em diversos lugares da Europa, especialmente no centro meridional da Itália (Vecchia, 2001).

### 1.2. A família Passifloraceae e o gênero *Passiflora*:

A família Passifloraceae é muito conhecida por sua variedade de formas, cores e beleza. De fato, são muito atrativas por serem flores originais, às vezes até mesmo bizarras, que oferecem boas frutas e um repertório de cores e aromas (MacDougal, 2001). Até mesmo as folhas são particulares, já que elas têm freqüentemente formas incomuns e colorações pitorescas. Observando com atenção estas plantas, elas surpreendem pela multiplicidade, diversidade, e extravagância das variadas estruturas.

O gênero *Passiflora*, na classificação botânica atualmente aceita, é o grupo típico da família

Passifloraceae (ordem Passiflorales, Tribo Passifloreae). A família Passifloraceae contém mais de 600 espécies distribuídas em 18 gêneros (Judcl *et al.*, 1999), entre eles *Passiflora*, *Adenia*, *Modecca*, *Gynopleura*, *Ophiocaulon*, *Smeathmannia* e *Dilkea*. Destes, o gênero *Passiflora* é o mais importante e abundante. Só ele compreende cerca de 465 espécies, quase todas adaptadas ao comportamento de trepadeira e escandescente. Existem contudo arbustos, árvores, plantas herbáceas perenes e anuais. Algumas são ainda objeto de controvérsia entre os taxonomistas quanto à classificação correta e definitiva (Vecchia, 2001).

Os híbridos são muitos, graças ao número alto de espécies que podem ser combinadas entre si, sugerindo que o processo de hibridação pode ter tido um papel importante na especiação de *Passiflora*. Existe ainda um bom número de espécies desconhecidas que estão sendo descobertas nas zonas impenetráveis dos Andes ou nas florestas inexploradas da América do Sul.

O centro de origem geográfica da maior parte das passifloras é a América centro-meridional, particularmente as vastas zonas tropicais e pequenas zonas subtropicais, que vão da cordilheira dos Andes até as costas do oceano Atlântico. Nações ricas nestas plantas são: Brasil, Venezuela, Costa Rica, Nicarágua, Guatemala, Colômbia, Equador, Bolívia, México, Guiana, Peru, Paraguai, Argentina, Honduras e Jamaica. Algumas espécies, em número muito limitado, são de ocorrência natural nos Estados Unidos, Austrália e Ásia.

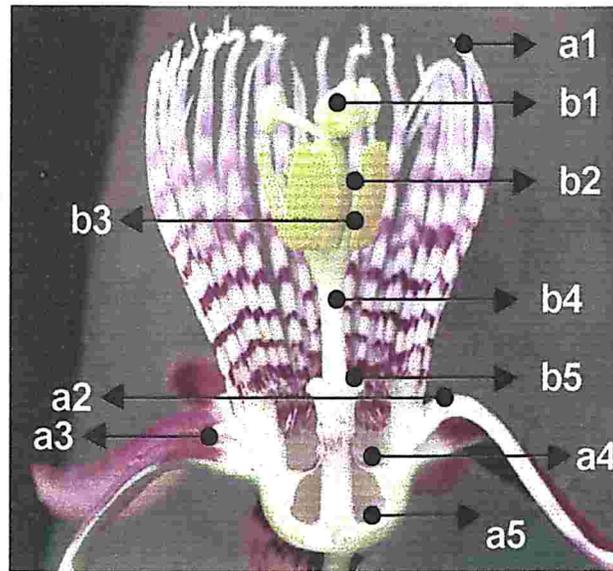
A classificação atual divide o gênero *Passiflora* em 24 subgêneros, cada um deles subdividido em seções (Vecchia, 2001). Sua classificação é complexa devido ao número elevado de espécies que evoluíram e sofreram dispersão em várias direções (Escobar, 1988; MacDougal, 1994; Cervi, 1997).

As flores de *Passiflora* têm características e estruturas sem igual no mundo vegetal (figura 1). Elas possuem filamentos florais (corona), o que é uma condição apomórfica do grupo (Cervi, 1997). São normalmente hermafroditas, escandescentes e solitárias; raramente se reúnem em pares (*P. biflora*), racemos (*P. racemosa*) ou cachos.

As dimensões florais variam bastante, como é evidenciado nas pequenas flores de *P. suberosa* (5 - 6 mm) e nas grandes flores de *P. quadrangularis* (12 - 15 cm).

Partindo do pedúnculo da flor, que normalmente tem origem ao longo do fuste, nas axilas das folhas, se encontram três brácteas. Às vezes elas são amplas e vistosas e de cor contrastante em comparação às flores, apresentado, freqüentemente, glândulas nectaríferas particulares (nectários extra-florais). *P. foetida*, por exemplo, possui grandes brácteas filamentosas, delicadamente subdivididas, que exalam um odor típico (Cervi, 1997). A presença, posição e forma das brácteas são elementos diagnósticos

importantes para que uma *Passiflora* seja classificada em um determinado subgênero.



**Figura 1:** corte longitudinal da flor de *P. alata*, indicando as estruturas típicas das flores do gênero *Passiflora*: a1) coroa de filamentos; a2) pétala (corola); a3) sépala (cálice); a4) opérculo; a5) límen; b1) estigma; b2) ovário; b3) antera; b4) coluna do androginóforo (modificada de MacDougal & Jørgensen, 2001)

O cálice da flor apoia as sépalas, as pétalas, a coroa de filamentos e a coluna do androginóforo. Esta última estrutura também é apomórfica, sustentando o ovário, as anteras e os estigmas. A forma do cálice tubular é diversa nos variados subgêneros. Por exemplo, no subgênero *Tacsonia* o cálice é muito prolongado, enquanto que nos outros ele é menor. Dentro do cálice de muitas espécies existe o anel do nectário, de onde se origina o androginóforo. Na base deste, é encontrado o límen que, em contraste ao opérculo da coroa de filamentos nas espécies que não são providas deste, fecha a cavidade do cálice. A coluna do androginóforo continua até os cinco filamentos que sustentam as anteras, produtoras de pólen; logo após aparece o ovário, que forma os frutos e protege os embriões. A flor termina com três estigmas, que são os receptores do pólen.

Externamente, o cálice continua nas cinco sépalas. Ela são dotadas, quase sempre, na face inferior, de uma nervura externa, de resistência, e de um gancho apical. São normalmente verdes na face ventral e de cor semelhante à das pétalas na face dorsal.

As cinco pétalas se alternam com as sépalas e completam o perianto da flor. São quase sempre muito vistosas, maiores e de coloração mais intensas do que as sépalas. Em algumas espécies as pétalas estão reduzidas (ou ausentes) em comparação às sépalas, modificando a simetria típica de estrela de dez pontas para uma estrela de cinco pontas (*P. cinnabarina*).

Originária da parte central da corola, e localizada sobre as pétalas, há a corona de filamentos. Esta estrutura é muito variável em forma, dimensões e cores dentro das variadas espécies. Contudo, sua função não é somente estética. Ela serve como um sistema que favorece a atração dos insetos polinizadores, que identificam padrões visuais. Outras funções da corona são: proteger o androginóforo da ação dos animais que visitam as flores e servir de campo de pouso para insetos polinizadores. Os filamentos são às vezes dispostos em muitas séries, podendo superar, em longevidade, as pétalas. Em muitos casos, são pigmentados alternadamente com cores contrastantes, de modo que se obtém um efeito pictórico semelhante a círculos concêntricos. Partindo da base, são afilados para o ápice e freqüentemente se enrolam uns nos outros. O número deles normalmente é muito grande, chegando em alguns casos a centenas (*P. tenuifila*).

As frutas de *Passiflora* são originadas em um ovário súpero, sendo normalmente bagas; raros são os casos do fruto ser uma cápsula (*P. capsularis*). O tegumento do fruto imaturo é cartáceo e verde claro, mas durante a maturação pode mudar de cor. Amarelo, violeta, azul, negro, padrões listrados ou variegados são os aspectos mais comumente encontrados. A forma dos frutos varia entre tipos esféricos, ovóides a alongados. As dimensões variam desde frutas pequenas como ervilhas (*P. suberosa*) até grandes frutas do tamanho de ovos de ema (*P. quadrangularis*). O interior da fruta é constituído por uma polpa gelatinosa (arilo) que contém as sementes. Muitas *Passifloras* produzem frutos comestíveis que apresentam propriedades farmacêuticas. Por este motivo, algumas espécies são cultivadas comercialmente, entre elas *P. antioquiensis*, *P. coccinea*, *P. edulis*, *P. laurifolia*, *P. ligularis*, *P. maliformis*, *P. membranacea*, *P. mixta*, *P. mollissima*, *P. nitida*, *P. vitifolia*, e *P. alata*.

As sementes das *Passiflora* são cordiformes, escuras, rugosas e com testa grossa. Medem normalmente menos de 0.5 cm de comprimento por 0.25 cm de largura. A germinação na natureza é dependente do tipo de solo, das condições de umidade e, em muitos casos, da época do ano. A germinação e o crescimento da plântula são favorecidos por uma temperatura que fique ao redor de 25°C.

A filotaxia das *Passiflora* é alterna, com as folhas sendo muito variáveis em forma, consistência, dimensões e aspecto. Vão desde as mais simples, com um único lóbulo (normalmente lanceoladas), para aquelas bilobadas ou com número de lóbulos maior. No último caso, os lóbulos são sempre díspares (três, cinco, sete, nove, etc.). Somente algumas espécies apresentam folhas de formas variáveis e anômalas (*P. heterofolia*), podendo ter quatro lóbulos (*P. seemannii*). As dimensões das folhas variam de alguns poucos milímetros (*P. gracillima*) a quase um metro (*P. gigantifolia*).

As folhas, normalmente, são providas de estípulas na zona do acoplamento do pecíolo ao fuste. Em

algumas espécies, as estípulas são originais e particulares, tanto que elas têm as bordas profundamente dentadas (*P. hahnii*, *P. guatemalensis*) e formas pouco usuais.

O pecíolo da folha, quase sempre, é provido de glândulas nectaríferas dispostas em pares e em número variado (glândulas do pecíolo ou extra-florais). Certas espécies não apresentam glândulas no pecíolo (*P. misera*). A posição, a forma e o número destas glândulas são um importante elemento identificativo. De fato, freqüentemente, espécies aparentemente iguais podem ser distinguidas pelas diversas glândulas do pecíolo ou, ainda, por seu número. Em alguns casos, as glândulas estão separadas do pecíolo foliar por um breve pedúnculo, que as torna semelhante a ovos de certas borboletas. Este último aspecto tem sido descrito como um processo co-evolutivo entre as espécies ovopositoras e suas plantas hospedeiras (Willians & Gilbert, 1981).

Embora as relações filogenéticas destes dois grupos não sejam perfeitamente coincidentes (Futuyma, 1992), evidências indicam que alguns lepidópteros da família Nymphalidae (tribo Heliconiine) foram um dos poucos grupos de herbívoros que desenvolveram defesas adaptativas contra os alcalóides e outros compostos secundários das *Passiflora*. Como reflexo deste processo, algumas espécies evoluíram defesas especiais contra borboletas do gênero *Heliconius*, tais como pelos em forma de gancho, que imobilizam larvas recém eclodidas (Gilbert, 1971), e estruturas que imitam os ovos. Esta última característica exibe um processo adaptativo: como as fêmeas de algumas espécies de *Heliconius* tendem a não ovopositar em plantas que já possuam ovos, com o objetivo de reduzir a competição a que é exposta sua descendência. Isso reduz a postura de ovos nas plantas hospedeiras que apresentam tais estruturas (Gilbert, 1971).

As espécies de *Passiflora* podem ter ainda folhas coloridas, apresentando bandas amarelas (*P. trifasciata*, *P. apetala*, *P. boenderi*), coloração avermelhada (*P. marmorata* e *P. organensis*) ou em tons arroxeados (*P. suberosa*, *P. caerulea*, *P. macroneii*) ou, ainda, com variação verde claro (*P. coriacea*).

O aparelho radicular, por sua vez, é proporcional ao tamanho da trepadeira. Às vezes as raízes são carnosas e delas se distribuem brotos radicais ao redor da planta de mãe. Algumas espécies produzem raízes tuberosas (*P. tuberosa*) ou caules nodosos abaixo do nível do solo (*P. suberosa*).

### 1.3. Filogenia do Gênero *Passiflora*

#### 1.3.1. Sistemática clássica vs. sistemática molecular

A sistemática clássica, baseada em morfologia, tem sido usada a muitos tempo na comparação e classificação das espécies. Usando esta abordagem, diversos trabalhos já exploraram a classificação sistemática das espécies do gênero *Passiflora* (Escobar, 1988; Killip, 1938; Sacco, 1980; Cervi, 1997; entre outros). Todos autores concordam em certos pontos, que são os mais evidentes; contudo onde a morfologia falha como caracter sistemático, surgem as dúvidas.

Devido a grande complexidade de estruturas vegetativas e florais, acabam surgindo problemas relacionados à delimitação dos subgêneros, seções e séries. Killip (1938), propôs que o gênero fosse dividido em 22 gêneros. Escobar (1988) e MacDougal (1994) sugeriam modificações neste sistema, pois certos grupos seriam pouco definidos e apresentariam fraco suporte filogenético. Atualmente, são propostos 23 subgêneros para *Passiflora* (Cervi, 1997), enquanto que MacDougal & Feuillet (2000) sugerem a utilização de apenas quatro.

A sistemática molecular, baseada em dados genéticos, tem sido pouco usada para explorar as relações filogenéticas dentro do gênero. Estudos recentes têm explorado aspectos citogenéticos (de Mello *et al*, 2001), dados de RFLP (Sánchez *et al* 1999) e seqüências de DNA de marcadores nucleares e cloroplasmáticos (Muschner, 2001) e oferecem uma fonte alternativa de análise para os problemas encontrados com a abordagem clássica. Estes dados exibem grande suporte filogenético e, quando combinados com a morfologia, aumentam seu poder de resolução.

#### 1.3.2. *Passiflora caerulea* vs. *Passiflora tenuifila*

Apesar de existirem certas controvérsias dentro do gênero *Passiflora*, a sistemática clássica não encontra muita dificuldade em classificar as espécies *Passiflora caerulea* e *P. tenuifila*. Ambas pertencem ao subgênero *Passiflora* e fazem parte da série *Lobatae* (Killip, 1938; Cervi, 1997). Os resultados de Muschner (2001) com marcadores moleculares nucleares e de cloroplasto confirmam a similaridade entre elas, o que as torna particularmente interessantes. A análise com diferentes marcadores moleculares indicando um íntimo parentesco entre elas, possivelmente, reflete uma origem evolutiva bastante relacionada, mas ainda pouco esclarecida.

No início do seu desenvolvimento, ambas são muito semelhantes, de forma que muitas vezes não é possível identificá-las. À medida que o desenvolvimento da planta avança, as características particulares de cada uma se tornam mais evidentes, sendo praticamente inconfundíveis no período reprodutivo, ou seja, quando as flores surgem, ou mesmo quando os frutos se fazem presentes. Contudo, este aspecto não é característico somente de *P. caerulea* e *P. tenuifila*, mas de praticamente todas as espécies de *Passiflora* incluídas na série Lobatea. Quando bem desenvolvidas, é possível reconhecer cada uma das espécies através de seu aspecto vegetativo, já que a planta apresenta caracteres morfológicos maduros diagnósticos.

#### **1.4. O Estado do Rio Grande do Sul**

##### **1.4.1. Fisionomia**

Segundo Rambo (1956), o Rio Grande do Sul apresenta cinco grandes regiões fisionômicas:

###### **1.4.1.1. A Serra do Sudeste**

Conhecida geologicamente como escudo rio-grandense (ou escudo cristalino), abrange a região montanhosa situada em continuação ao litoral e que fica a oeste das lagoas Mirim e dos Patos. Esta região forma um triângulo de 44.000 km<sup>2</sup>, cujos vértices se apoiam na lagoa dos Patos, em Jaguarão e São Gabriel.

Orograficamente, esta região apresenta zonas de taludes marginais (zona noroeste da Serra) e de divisores de água (na porção sudeste), onde a média de altitude fica em torno dos 200 m. Desta forma, tem-se um gradiente de altitude que começa em cerca de 11 m acima do nível do mar, em Jaguarão, e termina com altitudes superiores a 600 m, na localidade de Caçapava do Sul.

A natureza geo-histórica da Serra do Sudeste data da era de formação do Continente (Pré-Cambriano), quando o assoalho da atual América se formou. Este processo gerou um grande bloco de granito que, por ser de natureza ígnea e originário da fusão de materiais, resfriou-se e se solidificou dentro do interior da crosta terrestre. Com o passar dos anos, o desgaste e a destruição das camadas superiores fez com que a formação aparecesse na superfície (João A. Jarenkow, comunicação pessoal).

Desta formação, aproximadamente 90% das rochas são graníticas e originárias do derramamento que formou os primeiros continentes, enquanto os outros 10% correspondem a xistos cristalizados.

#### **1.4.1.2. A Campanha do Sudoeste**

Ocupa o quadrante sudoeste do Estado, sendo caracterizada, basicamente, pela formação de uma paisagem plana, acidentada por raras serras de pouca altura, e por fazer parte da bacia do Uruguai.

Os limites geográficos desta formação são: a leste, o divisor de águas entre a bacia Atlântica e o Rio Uruguai; ao norte, o talude do Planalto Sul-Brasileiro; a oeste, o Rio Uruguai; e ao sul, a Coxilha de Sant'Ana (fronteira com o República Oriental do Uruguai).

As altitudes da região variam de 75 m a 300 m, sendo que a média fica abaixo dos 150 m acima do nível do mar.

A geo-história da região data do período Permo-Triássico. As formações permianas e triássicas ocorrem juntas, porém é possível separar a zona onde prevalece um tipo ou outro: as permianas começam na porção ocidental da Serra do Sudeste e se estendem até Livramento; enquanto que as triássicas iniciam um pouco além de Livramento, sobem em direção a São Francisco de Assis e acompanham a borda da Serra Geral.

#### **1.4.1.3. A Depressão Central**

É a menor de todas as regiões naturais do RS, sendo seu nome devido ao fato de ser essencialmente uma baixada fluvial localizada entre as demais regiões do Estado. Ela se mantém em altitudes acima do nível do mar, podendo também ser definida naturalmente pelas formações adjacentes e não por sua geologia.

A região é delimitada pela Campanha, a oeste; pela Serra do Sudeste, ao sul; pela Serra Geral, ao norte; e pela Costa Atlântica, a leste. Os três primeiros limites geográficos citados não são perfeitamente definidos, de forma que muitas formações intermediárias entre a Depressão e formações adjacentes são consideradas como parte da Depressão (p/ ex.: cordões de elevações areníticas em degraus na encosta da Serra Geral).

Em termos de relevo, a região não possui sistemas próprios, estando encerrada entre as encostas das serras ao norte e ao sul. Assim, a altitude da região varia de 10 m de altitude, próximo a Porto Alegre,

até os 100 m, a oeste. As maiores altitudes são encontradas em tabuleiros ocasionais, podendo chegar a 300 m,

A geo-história da Depressão Central é basicamente a mesma da Campanha. A diferença existente entre elas é que as formações permianas e triássicas não se sucedem no sentido leste-oeste, mas no sentido sul-norte.

#### **1.4.1.4. A Costa Rio-Grandense**

Estende-se desde a Barra do Chuí, ao sul, até a foz do Rio Mampituba, ao norte, em Torres. Ela possui cerca de 620 km de extensão, praticamente sem grandes recortes na costa. Em termos de área, ela apresenta 15.000 km<sup>2</sup> de superfície, sem levar em consideração as formações lacustres; com estas últimas adicionadas, temos uma área correspondente a 9,5% da área total do Estado, cerca de 30.000 km<sup>2</sup>.

A zona costeira não apresenta elevações além daquelas pertencentes às dunas e morros de areia, nos locais mais próximos ao mar. Contudo, nas zonas de Torres e de Osório as altitudes podem chegar a 66 m e 36 m, respectivamente.

A origem da Costa do RS é bastante recente, sendo a atual configuração de origem quaternária. Em épocas passadas, o nível do mar sofreu algumas variações, fazendo com que sedimentos arenosos fossem sendo depositados e retirados sistematicamente, a cada alteração do nível do mar. Assim, o nível do mar já foi mais elevado, chegando até a base da Serra Geral, como ocorre em praticamente todo o resto da Costa Atlântica do Brasil.

Os motivos do retrocesso do litoral e dos processos de formação da Costa atual devem-se, basicamente, a fatores que se configuraram após o último evento de glaciação. Os quatro fatores básicos são: tamanho da plataforma continental, abundância de areias, direção predominante dos ventos e configuração peculiar da Costa primitiva.

#### **1.4.1.5. O Planalto Meridional**

É limitado ao sul e a leste pelo talude do Planalto, enquanto que a oeste e ao norte pelo Rio Uruguai. Na região oeste, a transição entre a Campanha e o Planalto é praticamente imperceptível; na porção norte, a divisão é meramente política, já que em Santa Catarina a paisagem continua a mesma.

Orograficamente, o Planalto se destaca por apresentar as maiores altitudes do RS e também por

um notável gradiente de altitudes, que aumenta no sentido oeste-leste. Neste gradiente, as cotas de altitude mais baixas são registradas em torno dos 250 m, junto ao Rio Uruguai, e as mais altas em torno de 1.300 m, em Bom Jesus.

A origem do Planalto data de um período anterior ao terciário (provavelmente do triássico ou início do jurássico), quando uma grande falha geológica foi reativada e possibilitou o derramamento de basalto ao longo de vários anos.

Ao contrário das outras quatro regiões, o Planalto não é facilmente definido, já que faltam os critérios de distinção adotados nas outras regiões. Além do mais, existe uma distinção grande entre os extremos leste e oeste da região; estas características distintas se misturam inúmeras vezes em trechos relativamente curtos, o que torna não natural a classificação desta zona com uma região fisionômica única.

Para uma classificação mais detalhada, porém ainda arbitrária, o Planalto poderia ser dividido em três zonas diferentes: Alto Uruguai, Planalto Central e Planalto Nordeste.

#### **1.4.2. Fitogeografia e fitossociologia**

O Rio Grande do Sul (RS) é conhecido como sendo um Estado agro-pastoril por excelência, com uma fisionomia vegetal de grandes áreas de cultivo e campos de criação (Irgang, 1983). Em um passado incerto, anterior a ocupação européia, a situação eram certamente diferente. Dados de Bettiol & Maslak (1973) avaliaram uma cobertura florestal de 43% em relação à área total do Estado. Rambo (1956) estima que 46,6% (131.986 km<sup>2</sup>) da área total do RS são campos, enquanto que 34,27% (98.327 km<sup>2</sup>) são de florestas. Os 19,27% restantes, equivalentes a 54.975 km<sup>2</sup>, pertencem as demais formações encontradas no Estado. Mais recentemente, dados de satélites e de ecologia da paisagem apontam que o RS fora originalmente coberto por 26,62% de vegetação florestal, enquanto que a vegetação campestre teria ocupado 50,83% do Estado (Teixeira, 1986).

Desta forma, o RS estava coberto com uma maior quantidade de florestas, sendo a área de campos menor do que é hoje. Atualmente, cerca de 6% da área do Estado é coberta com florestas (Irgang, 1983), 60% são campos (Mohrdieck, 1980) e a porcentagem restante pertencente a plantações e outras formações ecológicas

Uma avaliação retroativa dos remanescentes da vegetação do Estado, combinada com as teorias que levam em conta dados climáticos e edáficos, pressupõe que o Rio Grande do Sul possui um clima vegetacional de floresta (Schultz, 1957) e que exista uma tendência natural de avanço das matas sobre os

campos (Rambo, 1956). Assim, qualquer área de terra que esteja abandonada sempre tende a uma vegetação de maior porte, fazendo exceção às áreas onde os fatores de solo não permitem (clímax edáfico). Basicamente, os fatores edáficos limitantes à presença de certas espécies vegetais são: profundidade do solo, capacidade de retenção de água, disponibilidade de nutrientes e toxidez edáfica (Brady, 1989).

O primeiro esquema importante da vegetação do Rio Grande do Sul foi publicado por Lindman (1906), que descreveu aspectos estruturais e ecológicos das principais formações vegetais do Estado. Contudo, seu sistema de classificação era incompleto, sem maiores preocupações com nomenclatura e com terminologias que atualmente caíram em desuso, como "mata virgem" e "prado uliginoso" (Waechter, 2000).

Nas duas edições da Fisionomia do Rio Grande do Sul (Rambo, 1942, 1956), a vegetação aparece subordinada as cinco grandes regiões fisionômicas descritas anteriormente: Costa Rio-Grandense, Serra do Sudeste, Campanha do Sudoeste, Depressão Central e Planalto Meridional. Uma compilação das terminologias usadas pelo autor proporciona uma ampla visão de tipologias vegetacionais nativas, embora o sistema seja deficiente em relação à padronização da nomenclatura.

Esquemas ou sistemas subsequentes de classificação vegetal, como os de Barreto (1973) e Porto (1978), seguem a linha dos propostos para o Brasil como um todo, alguns anos antes ou na mesma época (Veloso, 1962; Andrade-Lima, 1966 e Romariz, 1974). A vantagem dos sistemas de Barreto (1973) e Porto (1978) é que incorporam expressões regionais.

O sistema brasileiro proposto pelo IBGE foi utilizado por Teixeira (1986) para a folha mais austral do Brasil, que inclui quase todo o Rio Grande do Sul (exceto a parte norte) e o extremo sudeste de Santa Catarina. Um aspecto duvidoso é a repartição dos campos limpos sul-rio-grandenses em três grandes formações diferentes: savana (planalto, escudo), savana estépica (em torno da cuesta do Haedo) e estepe (maior parte da campanha). O sistema do IBGE foi também utilizado para a descrição da vegetação do Sul do Brasil por Leite & Klein (1990) e, com algumas modificações, por Leite (1995).

Apesar do descuido com a nomenclatura, o sistema de Rambo (1942, 1956) ainda é muito empregado em estudos vegetacionais pela sua praticidade na visualização das regiões fisionômicas e dos domínios vegetacionais.

As formações fitossociológicas naturais dentro do Rio Grande do Sul podem ser caracterizadas basicamente como florestais ou campestres, sendo que ocorrem também pequenas quantidades de cerrados, banhados, campos alagadiços e vegetação litorânea (Rambo, 1956 e Schultz, 1957).

A ocorrência geográfica das formações citadas apresentam um padrão no sentido sul-norte. No sul,

prevalecem os campos. No norte, há equilíbrio entre o campo e as florestas; estes se distribuem dentro do lento declive no sentido oeste, passando pelo Planalto Nordeste, Central e pelo Alto Uruguai, de maneira que as formações do norte invadem as formações da campanha ao longo do Rio Uruguai (Rambo, 1956).

De modo geral, as formações florestais do RS incluem a mata tropical pluvial perenifólia da costa Atlântica (Mata Atlântica), mata subtropical com araucária, mata tropical perenifólia do Alto Uruguai e matas mistas da Depressão Central e Serra do Sudeste (Irgang, 1983).

As formações campestres do RS incluem, simplificada, os campos de Cima da Serra, campos do Planalto Médio, campos da Depressão Central, campos da Campanha, encosta do Sudeste e Litoral Sul (Mohrdeck, 1980).

Atualmente, podem ser identificadas sete regiões fitossociológicas definidas no Rio Grande do Sul: Savana, Estepe, Savana Estépica, Floresta Ombrófila, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual e Floresta Ombrófila Densa. Além destas regiões, existem duas zonas arbitrariamente definidas que estão sob condições especiais: Áreas de Formações Pioneiras e Áreas de Tensão Ecológica (Teixeira, 1986)

#### **1.4.3. A origem das formações vegetais**

As plantas vasculares, pela aquisição evolutiva de elaborados tecidos de condução de água, atualmente dominam a maioria dos ecossistemas terrestres, tanto em termos de biomassa vegetal como em riqueza taxonômica (Raven, 1996). Padrões de distribuição podem ser reconhecidos em diferentes grandezas do espaço geográfico e diferentes níveis da hierarquia taxonômica. Portanto, inúmeros padrões podem ser detectados segundo os objetivos de um pesquisador. Embora os limites de distribuição de dois *taxa* dificilmente apresentem uma sobreposição exata, diversas áreas de distribuição podem coincidir de modo a evidenciar o efeito de diferentes fatores ou processos de diferenciação (Waechter, 2000).

A parte da Fitogeografia que estuda os padrões de distribuição é ocasionalmente denominada de Areografia (Walter & Straka, 1970). Duas importantes fontes de informação para estudos areográficos são as revisões taxonômicas e os inventários florísticos. As revisões taxonômicas normalmente incluem, além de chaves para identificação de gêneros e espécies, dados precisos sobre áreas de ocorrência, em geral documentadas com coletas depositadas em herbários. Os inventários florísticos relacionam listas das espécies observadas em um determinado local ou região, muitas vezes incluindo dados sobre floração, ambiente e forma biológica (Waechter, 1998).

Os principais padrões de distribuição comumente discutidos em Fitogeografia, independente da escala de abordagem, são o endêmico e o disjuncto. Endemismos são padrões restritos a uma determinada área, independente da escala de trabalho. Deste modo, pode-se falar em um gênero endêmico da Serra do Itatiaia, do sudeste do Brasil, da região Neotropical ou do Continente Americano. Disjunções são padrões descontínuos no espaço geográfico, podendo igualmente ser reconhecidas em diferentes escalas. As disjunções entre reinos e subreinos florísticos são as mais importantes, pois constituem tipos de elementos florísticos. Um terceiro tipo importante de padrão é o amplo, também aplicável a qualquer escala de trabalho. A distribuição ampla em todo o mundo, ou pelo menos em regiões tropicais e temperadas de todos os continentes, constitui o elemento cosmopolita.

Padrões endêmicos e disjunctos podem se originar por meio de diversos processos biológicos e geográficos, ou quase sempre através da interação de ambos. Espécies endêmicas podem representar uma diferenciação evolutiva recente, que ainda não teve tempo para ampliar sua área de ocorrência (neoendemismos) ou resultar de um longo e amplo processo de extinção, permanecendo apenas uma pequena área de sobrevivência (paleoendemismos). Espécies disjunctas, por sua vez, podem se originar a partir de esporos ou sementes que eventualmente atingem médias ou longas distâncias (dispersão), ou pelo surgimento de barreiras geográficas que provocam extinção em áreas intermediárias (vicariância). Neste caso, a separação geográfica de uma espécie pode, ao longo do tempo, dar origem a duas espécies, ou mesmo a gêneros diferentes (Futuyma, 1992).

Para a região sul do Brasil, a severidade dos processos geológicos e geomorfológicos que deram origem as diferentes divisões regionais do relevo, seguido pelas grandes mudanças paleoclimáticas no Quaternário, época em que as atuais angiospermas se expandiram, são fatores determinantes que explicam a diversidade biológica encontrada no Rio Grande do Sul (Porto & Menegat, 2002).

O Brasil apresenta uma flora essencialmente tropical, como aliás seria de esperar para um país cujo território se insere na maior parte em latitudes intertropicais, mas nem sempre foi assim. A origem e diversidade da flora encontrada no sul do Brasil apresenta contingentes preferenciais de colonização (figura 2). Diversos trabalhos têm reconhecido diferentes componentes principais de espécies vegetais do Rio Grande do Sul, principalmente os trabalhos de Rambo (1954 e 1956). Pelo menos quatro diferentes rotas migratórias de plantas superiores foram estabelecidas, através da colonização de terras não exploradas anteriormente ou pela sucessão da flora que tinha sido estabelecida sobre diferentes condições climáticas e geomorfológicas (Porto & Menegat, 2002). Os remanescentes vegetais, que ainda podem ser vistos hoje em dia, e os registros geológicos são as evidências que permitem reconstruir a evolução e a dinâmica da

conquista dos ambiente terrestres pelas plantas.



Figura 2: Mapa de vegetação da América do Sul (zonas coloridas) e rotas migratórias de plantas superiores que foram estabelecidas no Rio Grande do Sul (setas). Os tipos de vegetação e rotas estão indicados na figura (retirado de Porto & Menegat, 2002)

#### 1.4.3.1. O contingente Austral-Antártico (Sudoeste):

Esta leva migratória é originária da porção mais temperada da América do Sul, na região da Patagônia e Andes. Segundo Rambo (1956), esta flora migratória vinda do sul constituía um complexo de espécies que migraram a partir de refúgios meridionais e carregaram elementos Austrais-Antárticos para o Estado.

A origem da migração dos elementos Austrais-Antárticos remanescentes dos campos do Planalto

data dos períodos secos e frios do início do Pleistoceno. Posteriormente, durante os períodos onde houve um aumento de umidade, estes campos foram parcialmente substituídos por algumas espécies florestais, tais como *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) (Porto & Menegat, 2002). Outras gêneros conhecidos, e de mesma origem geográfica, se espalharam por algumas zonas do interior do Rio Grande do Sul, como, por exemplo, *Podocarpus*, *Drymis*, *Fuschia* e *Gunnera* (Rambo, 1954).

#### **1.4.3.2. O contingente do Chaco-Pampeano (Nordeste):**

Compreende espécies migratórias oriundas do Chaco chileno e do Pampa argentino, que invadiram o Rio Grande do Sul pela porção oeste do Estado (Porto & Menegat, 2002). Sua migração para o Estado ocorreu em épocas anteriores à expansão das matas tropicais Atlântica e do Paraná-Uruguaí (Rambo, 1950), tendo ocorrido em época próxima à expansão do elemento Austral-Antártico, durante o terciário e início do quaternário.

São poucos os elementos florísticos deste contingente presente atualmente no Estado. As espécies apresentam características xerofíticas e geralmente ocorrem em localidades montanhosas, ou semidesérticas (Rambo, 1954).

#### **1.4.3.3. O contingente do Brasil Central (Norte):**

Este contingente corresponde à leve migratória que invadiu o Estado pelas porções norte e noroeste, trazendo componentes florísticos de uma grande área do Brasil Central (cerrado), juntamente com elementos da periferia da Amazônia (Porto & Menegat, 2002). Destes dois componentes, a flora do Brasil Central teria contribuído com uma grande quantidade de espécies campestres, enquanto que o número de espécies florestais teria sido menor. Por outro lado, a flora Amazônica teria contribuído basicamente com espécies florestais, sem praticamente nenhuma contribuição de elementos campestres (Rambo, 1951 e 1954). Estes elementos unidos foram os responsáveis pela composição da atual Mata da bacia do Paraná-Uruguaí.

A rota migratória do Brasil Central é marcadamente caracterizada pela massa florestal que se estende ao longo da bacia do Paraná-Uruguaí. Rambo (1956) afirma que a invasão dos elementos florestais deste contingente datam do período Quaternário, constituindo o componente florístico mais recente do Rio Grande do Sul. Isso também é evidenciado por fatos registrados antes da expansão da fronteira agrícola do



Estado. Como o Rio Grande do Sul é o limite sul da distribuição da vegetação tipicamente tropical (Waechter, 1998), e apresenta um clímax climático florestal, as manchas de florestas esparsas e áreas de sucessão ecológica encontradas mais ao sul indicam que o processo de migração ainda não chegou ao seu apogeu (Rambo, 1954, 1956), mas foi retardado pela ação do homem. Finalmente, o gradiente de diversidade decrescente, no sentido norte-sul, reforça este fato (Rambo, 1951).

Algumas poucas espécies deste contingente também estão presentes nas matas de galeria, que acompanham os cursos dos rios, invadindo o interior do Estado (Porto & Menegat, 2002).

#### **1.4.3.4. O contingente da Costa Atlântica (Nordeste):**

Assim como o contingente do Brasil Central, esta leva migratória também compõe o elemento florístico mais recente no Rio Grande do Sul, sendo datada também do Quaternário (Rambo, 1951 e 1954). Em contraste com o contingente anterior, as espécies que migraram pela Costa Atlântica são originárias de uma área menor, compreendida entre São Paulo e Espírito Santo e localizada nas imediações da Serra da Mantiqueira.

Apesar da área de dispersão ser menor que a anterior, a diversidade vegetal encontrada na atual Mata Atlântica é maior do que a da sua correspondente no interior do Estado (Rambo, 1954). Esta característica pode ser atribuída aos elevados níveis de umidade e temperatura do clima local (Porto & Menegat, 2002).

A exemplo do que ocorre com a Mata da bacia do Paraná-Uruguaí, as evidências apontam para o fato de que a expansão da Mata Atlântica também não alcançou o seu apogeu de dispersão e presença no Rio Grande do Sul. Além do mais, a regressão do atual limite sul da Mata Atlântica teria ocorrido, basicamente, pela degradação ambiental. (Bruno E. Irgang, comunicação pessoal)

Estas duas rotas migratórias estão, de certa forma, relacionadas. Contudo, dois fatores teriam dificultado a dispersão da flora tropical pela rota migratória da Costa Atlântica, quando comparada com a rota do Brasil Central: a evolução da Costa Rio-Grandense e a presença da Porta de Torres.

As sucessivas alterações do nível do mar no período Terciário-Quaternário caracterizaram a evolução da Costa Rio-Grandense. As regressões e invasões marítimas poderiam ter criado corpos-d'água que constituíram verdadeiras barreiras geográficas para a dispersão das espécies (Rambo, 1954). A Porta de Torres, uma estreita faixa de terra de poucos quilômetros entre o Litoral e a escarpa do Planalto Meridional (Serra Geral), poderia ter limitado a dispersão das espécies por constituir um corredor de passagem a levas

migratórias de organismos oriundos de zonas tropicais mais setentrionais (Rambo, 1950).

Poucas espécies deste contingente também estão presentes nas Matas de Galeria e nas Matas de Encosta do Planalto, invadindo porções do interior do Estado (p/ ex. palmitero, *Euterpe edulis* – Arecaceae).

#### 1.4.4. O grupo *Passiflora*

Apesar da grande diversidade de espécies do gênero *Passiflora* em nível global, a maior parte delas está concentrada na América do Sul (ver item 1.2). No Brasil, a maior diversidade é encontrada no Centro-Oeste, sendo a região Sul a com menor número de representantes (Cervi, 1997).

No Rio Grande do Sul, estão representadas somente 15 espécies de *Passiflora*, sendo elas: *P. actinia*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. eichleriana*, *P. edulis*, *P. elegans*, *P. foetida*, *P. misera*, *P. morifolia*, *P. organensis*, *P. suberosa*, *P. tricuspis* e *P. tenuifila*. Destas espécies, *P. alata* é considerada subespontânea (Mondin, 2001).

Estas espécies apresentam distribuição variável e preferências ecológicas diversas, sendo algumas tipicamente florestais (p/ ex. *P. actinia*, *P. elegans*); mas a grande maioria das espécies são de ocorrência campestre ou florestal, aparecendo tanto em bordos de mata como em campos-sujos (Killip, 1938; Sacco, 1980; Cervi, 1997).

Levando em consideração que o Rio Grande do Sul apresenta uma grande diversidade fisionômica (item 1.4.1), as populações das diferentes espécies poderiam apresentar diferenciações, adaptativas ou não, típicas de cada região. Estas diferenças poderiam distinguir geneticamente as subpopulações, ou ainda evidenciar aspectos relativos à história evolutiva de cada região.

### 1.5. Marcadores moleculares na biologia de populações

#### 1.5.1. Histórico

Na história da biologia evolutiva, os primeiros estudos que fizeram inferências sobre as origens e relações entre os organismos vivos estavam basicamente fundamentados nos estudos de aspectos morfológicos (Lamarck, 1809; Darwin, 1859; Haeckel, 1866). Esta técnica, de grande importância, permitiu,

em muitos casos, que questões sobre a origem e evolução das espécies fossem estabelecidas. Em outros casos, contudo, as respostas não foram obtidas com clareza ou, ainda, geraram mais dúvidas.

Com o desenvolvimento científico e tecnológico ao longo dos anos, muitas metodologias de análise foram surgindo e permitiram acessar informações sobre os organismos que não eram percebidas diretamente. Neste campo, notáveis estudos foram realizados buscando as informações contidas nos fósseis (Hennig, 1966; entre outros). Durante os anos 1960, o estabelecimento de métodos matemáticos e algoritmos, auxiliados pelo avanço computacional, permitiram realizar análises envolvendo um grande número de dados complexos. Dentre esses dados, os aspectos celulares, particularmente aqueles contidos nas moléculas, tornaram-se uma grande fonte de informações. Esta maneira de obter informações ficou conhecida como biologia molecular. Assim, dúvidas antigas puderam ser analisadas sobre um outro ponto de vista (Matioli, 2001).

Para a biologia de populações e para a genética, o desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu que informações primárias sobre a constituição dos organismos e suas unidades básicas de herança, os genes, contidos no DNA, pudessem ser observados.

Os primeiros estudos genéticos, que usaram técnicas moleculares, foram baseados em análises indiretas do genoma, determinando padrões de proteínas e enzimas (Lewontin & Hubby, 1966.). Mais modernamente, a biologia molecular desenvolveu métodos especiais para obter as informações diretamente do DNA, tais como a *PCR* (Polymorphism Chain Reaction – Mullis e Faloona, 1987), o seqüenciamento de DNA (Sanger *et al.*, 1977), a aplicação de conjuntos de sondas de *PCR* evolutivamente conservados, de *loci* hipervariáveis, de microssatélites, entre outros. Estas inovações, associadas ao surgimento de poderosas análises e programas de computadores, relativamente fáceis de usar, causaram um grande impacto na biologia de populações (Sunnuck, 2000).

Como a história natural do DNA resulta em um caminho de informações para as espécies, já que as seqüências diferem entre os organismos, o estabelecimento de conexões entre as variações genéticas permite que se façam inferências sobre suas histórias evolutivas. Tais variações genéticas diferem ao longo do genoma das espécies, uma vez que diferentes regiões do DNA apresentam distintas taxas de evolução (Small *et al.*, 1998). Isso ocorre porque existe pressão de seleção diferente entre as distintas regiões do genoma.

Regiões que não codificam proteínas podem sofrer grandes alterações sem que sofram pressão seletiva (Schmidt & Schilling, 2000). Por outro lado, regiões codificadoras são biologicamente funcionais, sofrendo assim grande pressão seletiva (Small *et al.*, 1998). Assim, seqüências não codificadoras, que são

menos conservadas que as codificadoras, podem ser usadas em estudos taxonômicos baseados em *taxa* mais intimamente ligados (p/ ex. gêneros e subgêneros); enquanto que seqüências codificadoras podem ser usadas em análises que envolvam *taxa* evolutivamente mais distantes (p/ex. classes e famílias).

Tipicamente, os marcadores moleculares refletem características herdáveis dos organismos, que podem apresentar múltiplos estados (alelos) para cada caráter (*locus*) (Sunnucks, 2000). Como a variação genética é organizada hierarquicamente, os dados podem ser ordenados e analisados.

Os dados obtidos de diferentes alelos e a relação entre eles pode ser usada de diversas formas, como por exemplo para estimar a variabilidade inter e intrapopulacional, ou ainda reconstituir a contingência histórica e espacial de algum grupo de organismos (Schmidt & Schilling, 2000; Standford *et al.*, 2000; Schnabel & Wendel, 1998; Bell & Patterson, 2000; Hansen *et al.*, 2000; Esselman *et al.*, 2000; Fischer & Matthies, 1998; Ayres & Ryan, 1999; Aguirre-Panther *et al.*, 2000, entre outros).

Porém, os marcadores moleculares não podem ser usados como coringas, ou seja, para qualquer situação. A escolha de um marcador deve vir das propriedades do mesmo, bem como do objetivo do estudo. Pontos que são variáveis entre os diferentes marcadores são: sensibilidade, detecção multi-loco ou loco-simples, produção de genealogias e acesso às freqüências alélicas, rapidez de desenvolvimento e projeção dos dados, acessibilidades ao DNA nuclear ou organelar, caráter dominante ou co-dominante, conectibilidade de dados entre estudos e visão da variabilidade geral do alvo da pesquisa (Sunnucks, 2000).

Desta forma, os marcadores moleculares surgiram como uma potente ferramenta para responder questões biológicas de maneira mais eficiente, contribuindo amplamente nas investigações ligadas à biologia evolutiva, populacional e conservacionista. Esta contribuição é ainda mais poderosa quando integrada com a biologia ambiental e ecológica.

### 1.5.2. RAPD – PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*):

*Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) tem sido descrito como um método simples e fácil para detectar polimorfismos, baseando-se na amplificação de segmentos aleatórios de DNA com iniciadores simples e de seqüência nucleotídica arbitrária (Williams *et al.*, 1990).

Nesta técnica, o DNA genômico é submetido a uma PCR (reação em cadeia da polimerase), adicionando apenas um pequeno oligonucleotídeo de seqüência aleatória em cada reação. Tipicamente, na análise padrão de RAPD, cada iniciador (do inglês *primer*) contém 10 bases, onde 60-70% delas são G + C. Além disso, eles não possuem extremidades auto-complementares (Pérez, 1998). Assim, um produto de

amplificação do DNA é gerado para cada região genômica que se torna flanqueada por um par de sítios de ligação dos iniciadores, que se encontrem em orientação oposta e que não estejam mais distantes do que 5 kb um do outro.

A maioria dos polimorfismos é detectada pela ausência ou presença de produtos de amplificação, e é causada pela incapacidade do iniciador em reproduzir um dos fragmentos complementares da fita de DNA de alguns indivíduos. Esta incapacidade se deve ao fato de existirem diferenças nos sítios de reconhecimento dos iniciadores, expressas pela distinta seqüência de nucleotídeos, ou ainda por inserções e deleções nos fragmentos existentes entre os locais onde os iniciadores se ligam (Williams *et al*, 1990).

Este método apresenta muitas vantagens sobre outros métodos de análise de fragmentos de DNA. Estas vantagens são refletidas pela rapidez e relativo baixo custo, por poder ser usado com pequenas quantidades de DNA, por ser aplicável a pequenos números amostrais, por ser adaptável a genomas desconhecidos e, ao contrário dos outros métodos de análise de fragmentos de DNA (RFLP, AFLP, microssatélites, etc.), por ser eficiente na detecção de polimorfismos em todos os tipos de seqüências.

Entre as múltiplas aplicações dos RAPDs, encontram-se a genética de populações (Fischer & Matthies, 1998; Ayres & Ryan, 1999), a taxonomia (Smith *et al.*, 1994; Esselman *et al.*, 2000), a determinação de paternidade (uso forense), o mapeamento genético (Ouedraogo *et al.*, 2002), a ecologia ambiental (Heibel, 1999), a ecologia evolutiva (Hansen *et al.*, 2000; Jordano & Godoy, 2000; Arafah *et al.*, 2000) e a conservação biológica (Sun & Wong, 2001).

Contudo, este método tem certas limitações. Inicialmente, a natureza da variação encontrada usando RAPD não é bem compreendida (Hedrick, 1992), de forma que o uso destes dados para construir filogenias e para a determinação de paternidade requer cuidados que ainda permanecem alvo de debates (Smith *et al.*, 1994). Possíveis motivos para esta incerteza vêm do fato da não-especificidade dos iniciadores ao DNA molde, que geraria baixa reprodutibilidade de certos fragmentos de DNA amplificado em uma amostra. Além disso, a repetibilidade é sensível a pequenas mudanças nas condições das reações de PCR, tais como o tipo de polimerase usado, concentração do DNA molde, concentração de magnésio e variações nas temperaturas do PCR, bem como no modelo do termociclador utilizado para amplificar os fragmentos. (Williams *et al*, 1990; Ellsworth *et al*, 1993 ; Schweder *et al*, 1995; Pérez, 1998). Mesmo assim, muitos autores argumentam que, quando as amplificações são refeitas, mantendo constantes as condições iniciais, a maioria dos fragmentos são repetidos (Williams *et al*, 1990); porém, alguns estudos reportam que existe baixa reprodutibilidade no sistema (Pérez, 1998).

Estes fragmentos, em muitos casos, têm sua análise e interpretação dificultadas por razões inerentes à

metodologia utilizada (Lander, 1989; Lynch, 1990). Muitos fragmentos de intensidade grande são gerados para cada iniciador, sendo estes formados por agrupamentos heteroduplex de produtos amplificados (Ayliffe *et al*, 1994) ou por artefatos secundários da técnica (Hadrys *et al*, 1992; Riedy *et al*, 1992 )

Apesar das limitações, o RAPD-PCR pode constituir uma ferramenta muito útil para a biologia de populações, desde que certos cuidados sejam tomados. Seu uso como ferramenta no estudo de variações naturais das populações tem sido amplamente utilizado, com sucesso, por potencialmente identificar grupos de indivíduos relacionados e mostrar a relação existente entre variação genética, a distância geográfica e a história evolutiva (Fischer & Matthies, 1998; Ayres & Ryan, 1999, Hansen *et al.*, 2000; Esselman *et al.*, 2000; Aguirre-Planter *et al.*, 2000; entre outros).

Sua grande utilidade vem do fato de ser um marcador molecular do tipo '*fingerprint multi-locó*'. Estes marcadores fornecem uma grande quantidade de dados por unidade analisada, já que acessam a variação entre muitos loci simultaneamente. Os dados obtidos, os fragmentos de DNA, não necessariamente se traduzem em medidas clássicas da genética de populações, e portanto devem ser assumidos como alelos dominantes (Zivotovsky, 1999; Sunnucks, 2000). Assim, dependendo do modelo e das suposições assumidas, deve-se usar diferentes estimativas matemáticas.

Para descrever a estrutura e a diversidade genética de uma população, usa-se o número de fragmentos de DNA amplificados que são compartilhados entre indivíduos (Sun & Wong, 2001; Jordano & Godoy, 2000; Arafeh *et al.*, 2002; Zivotovsky, 1999). A premissa básica é que indivíduos que têm um ancestral comum mais recente compartilham mais fragmentos do que os indivíduos menos aparentados. Por analogia, populações subdivididas terão maiores níveis de compartilhamento de fragmentos entre indivíduos da mesma subpopulação do que quando comparados com representantes de outras subpopulações (Stewart & Excoffier, 1996).

## **1.6. Caracteres morfológicos e ecologia**

Grande parte do que pode ser observado em termos de morfologia, ecologia, bioquímica e fisiologia reflete as adaptações que evoluíram ao longo dos anos e que capacitam o organismo a sobreviver diante das grandes contingências que o cercam. Entretanto, a totalidade dos fatores que influenciam a atividade de um organismo pode ser difícil de ser definida (Futuyma, 1992).

A visão de que toda a evolução é decorrente de seleção natural faz parte de uma abordagem que é

chamada de “adaptacionismo”. De acordo com esta visão, todas as características que uma espécie apresenta possuem razões adaptativas de existirem. No entanto, Lewontin & Gould (1979) argumentam que nem todas as características visíveis de uma espécie são adaptativas, sendo estas, muitas vezes, frutos do acaso ou da contingência histórica. Isso também pode ser observado em nível molecular, onde a maioria das alterações ocorridas nas seqüências do DNA não apresentam valor adaptativo. Estas características neutras seriam, então, fixadas nas populações naturais, através de deriva genética, ou carreadas adiante por outros aspectos das espécies que são passíveis de seleção (Kimura, 1981 e 1982).

Nessa intrincada e longa discussão, o estudo das características das espécies, bem com os aspectos do meio que as cercam, são de extrema importância para que a contingência histórica seja compreendida. Por séculos, a morfologia tem sido a principal ferramenta para explicar a diversidade biológica encontrada na Terra. As obras de Linnaeus (*Systema Naturae*, 1735; *Species Plantarum*, 1753), desenvolveram sistemas hierárquicos que estabeleciam arranjos e categorizações da diversidade de formas vivas, sendo independentes da teoria evolutiva e atribuídas a Deus. Este sistema prevaleceu por muitos anos, até que diversos autores (Lamarck, 1809; Darwin, 1859; Haeckel, 1866; revisado por Mayr, 1983) produziram um sistema de classificação baseado em relações filogenéticas, o que mudou drasticamente a visão sobre como os grupos taxonômicos surgiram.

Contudo, inicialmente, este processo era baseado em poucos critérios objetivos e não diferia muito da classificação dada por especialistas de grupos particulares de *taxa* (Hillis, 1996). Esta situação começou a mudar no último século, particularmente nas últimas décadas, quando o significado e o enfoque evolutivo da morfologia passou a ser acessado, não somente através de sistemática clássica, mas também indiretamente. O uso de marcadores moleculares, fisiológicos e bioquímicos revolucionou este campo e, desde então, a sistemática filogenética tem esclarecido muitos aspectos ainda obscuros e levantado questões não estudadas.

Porém, a sistemática molecular não resolveu todos os problemas de classificação, mas provocou uma grande controvérsia dentro da biologia, que inclui a discussão dos valores relativos de importância dos dados morfológicos e moleculares (Fitzsimmons, 1997). Atualmente, ambas as abordagens têm sido consideradas como de valor e confiabilidade iguais, sendo utilizadas conjuntamente em estudos de sistemática (Hansen *et al.*, 2000; Andreasen & Bremer, 2000; Weiblen, 2000).

Por sua vez, o ambiente ecológico constitui também uma importante ferramenta no estudo da contingência histórica e evolutiva. Ele inclui tanto fatores bióticos como abióticos, que podem fornecer uma gama de informações sobre as interações existentes em seu ambiente e sobre a história evolutiva das

espécies.

As condições climáticas, salinidade, disponibilidade de água e nutrientes e outras características físico-químicas são importantes para as espécies; as interações com os demais organismos que rodeiam o seu ambiente também são igualmente importantes (Ricklefs, 1996). O que varia de espécie para espécie são quais os componentes ambientais que mais importam para sua existência e como estas espécies usam estes recursos. A preferência ecológica ou o modo de vida variam porque a história evolutiva de cada espécie também é particular.

Assim, espécies e ambiente alteram um ao outro de maneira recíproca. As espécies não são componentes passivos vulneráveis ao destino externo, mas são participantes ativos de uma relação dinâmica e mútua (Futuyma, 1992) que reflete os passos que conduziram à condição atual.

## 2. OBJETIVOS:

Tendo em vista as características fisiológicas e florísticas do Estado, o objetivo geral do presente estudo é contribuir para o esclarecimento de algumas questões ligadas à origem evolutiva e ecologia das espécies *Passiflora caerulea* e *P. tenuifila* no Rio Grande do Sul:

Objetivos específicos:

- Contribuir para o conhecimento das preferências ecológicas das duas espécies
- Aumentar o conjunto de dados referentes a distribuição das espécies
- Construir mapas da ocorrência natural das espécies dentro das diferentes províncias fisiológicas do RS
- Estimar a estrutura populacional de ambas através da análise de RAPD-PCR
- Estudar as características climáticas e edáficas do Estado e sua relação com as espécies em estudo
- Comparar os caracteres morfológicos das duas espécies com as demais espécies do gênero que se encontram no RS

Questões a serem respondidas com o presente estudo:

- Como estas espécies se relacionam em termos de morfologia em relação as outras *Passiflora* presentes no Rio Grande do Sul?

- Qual a distribuição geográfica das espécies alvo do estudo no Rio Grande do Sul, no Brasil e na América?
- Os fatores climáticos e edáficos são limitantes à distribuição destas espécies no RS?
- A diversidade genética e os padrões populacionais estimados refletem padrões regionais de adaptação das espécies às diferentes regiões fisionômicas do RS?
- As questões citadas acima explicam a história evolutiva das duas espécies no Estado?

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS:

#### 3.1. Morfologia comparada e filogenia morfológica

Inicialmente, as características morfológicas individuais de cada uma das duas espécies em estudo foram descritas separadamente. Os dados das estruturas morfológicas e suas características foram obtidos de diversas fontes literárias e de exemplares de herbário, bem como através de observações a campo. Nesta etapa, foram consideradas relevantes para a análise as características e peculiaridades dos seguintes caracteres morfológicos: caule, estípulas, folhas, glândulas, pedúnculos, brácteas, sépalas, pétalas, corona, opérculo, órgãos reprodutivos, fruto e semente. Informações ecológicas relevantes, tais como período de floração e de formação dos frutos, hábitat e hábito (preferências ecológicas) foram coletadas e comparadas.

Esta análise permitiu que as características mais informativas para distinção entre as duas espécies fossem selecionadas e organizadas para construir uma filogenia baseada em marcadores morfológicos. Inicialmente, 106 caracteres ecológicos e morfológicos discretos de *P. caerulea*, *P. tenuifila* e de outras 14 espécies de *Passiflora* de ocorrência natural no RS foram então selecionados. Destes, 90 caracteres, com dois a nove estados, foram evolutivamente informativos na análise filogenética (apêndice 1) e foram usados na análise final.

A análise foi realizada com o programa *PAUP\** versão 4.0b para computadores *Power Macintosh* (Swofford, 1998). Sob o critério de otimização de máxima parcimônia, procuras "*Branch-and-Bound*" foram conduzidas de acordo com os ajustes padrão do *PAUP\**, exceto que 10000 replicações aleatórias seqüenciais foram usadas. Todos os caracteres foram pesados igualmente. Foram selecionadas as árvores mais parcimoniosas e, a partir destas, foram construídas árvores de senso semi-estrito, senso-estrito,

"Adams" e "Majority-Rule". A análise de consistência dos agrupamentos filéticos foi realizada por reamostragens ("Bootstrap") e envolveu procura "Branch-and-Bound" com 100 replicações.

### 3.2. Mapas de distribuição

Os mapas de distribuição geográfica de *P. caerulea* e de *P. tenuifila* do Rio Grande do Sul foram montados a partir das coordenadas geográficas dos indivíduos que tiveram sua presença registrada em herbários, referências bibliográficas ou observações de campo. Espécimes e exemplares cultivados foram desconsiderados. Foram suprimidos da análise indivíduos que tiveram sua presença registrada nas mesmas localidades.

As coordenadas dos espécimes observados foram geoposicionadas manualmente em carta geográfica de projeção policônica (escala 1:1.300.000) e, posteriormente, sobrepostas a mapa geosatelital (LANDSAT TM -5) para construção do mapa de localização dos espécimes observados. O mapa das zonas de ocorrência de ambas espécies no RS foi obtido a partir do primeiro mapa, sendo os limites definidos através dos pontos extremos de ocorrência das espécies em estudo.

### 3.3. Dados ecológicos

Os dados climáticos para cada um dos indivíduos utilizados na construção dos mapas de distribuição foram obtidos a partir das curvas climáticas descritas no Atlas Climatológico do Brasil: reedição de mapas selecionados (1969). Foram consideradas relevantes para a situação ecológica das espécies as seguintes variáveis: temperatura média, amplitude térmica, índice de continentalidade de Johannsson, índice de oceanidade de Kerner, umidade relativa do ar, índice de aridez de Knoche, dias de chuva, número de meses úmidos (30-50 mm), número de meses chuvosos (>100 mm), precipitação total (mm), nebulosidade, insolação média, evaporação e tipo de clima (Köppen).

Informações dos tipos básicos de solos predominantes, descritos para o RS, para cada um dos pontos de amostragem (registro dos indivíduos), foram utilizados na construção dos mapas de distribuição e foram coletadas do mapa de solos (Moser, 1990). Foram considerados relevantes os dados referentes à composição básica do solo (rocha de origem).

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS versão 8.0, de modo que as variáveis isoladas foram comparadas entre as duas espécies. As variáveis quantitativas foram analisadas isoladamente por teste "t" e por teste "F" para duas amostras independentes. Estes testes comparam, respectivamente, a diferença entre as médias das duas mostras e entre as variâncias das mesmas. As variáveis qualitativas foram analisadas por teste  $\chi^2$ , que mede o grau de discrepância entre o conjunto de frequências observadas (O) e o conjunto de frequências esperadas (E) segundo determinada hipótese. Como os resultados obtidos para cruzamento de dados que apresentem duas categorias e que possuem duas variáveis dependentes (2x2) não se aproximam suficientemente da distribuição teórica, foi necessário utilizar a correção de Yates.

### 3.4. Variabilidade genética e molecular

#### 3.4.1. Extração de DNA

Folhas de 59 indivíduos de *P. caerulea* e 22 *P. tenuifolia*, coletadas em campo no período de 14 de outubro a 12 de agosto de 2001, em diversas localidades do Rio Grande do Sul, foram inicialmente desidratadas em sílica gel, estocadas a temperatura ambiente e posteriormente maceradas com nitrogênio líquido. O pó das folhas foi então preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. O DNA genômico total de cada indivíduo foi extraído usando um protocolo modificado a partir do método de Roy *et al.* (1992). Os passos deste protocolo são:

- 1) Colocar em um tubo de 1,5 ml uma quantidade de tecido macerado equivalente a um volume de 0,1 ml.
- 2) Adicionar 600 $\mu\text{l}$  de tampão de extração de DNA; 60 $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol; 6 $\mu\text{l}$  de proteinase K (10mg/ml)
- 3) Incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos
- 4) Emulsionar com 300 $\mu\text{l}$  de fenol e 300 $\mu\text{l}$  de clorofórmio e agitar levemente
- 5) Recolher a fase aquosa (fase superior) e agitar até ficar homogênea
- 6) Estimar o volume e acrescentar 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e igual volume ( $\approx 600\mu\text{l}$ ) de isopropanol gelado. Agitar levemente a mistura e deixar a  $5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

- 7) Centrifugar por 20 minutos a 14.000 rpm.
- 8) Desprezar o sobrenadante e inverter os tubos sobre papel absorvente, deixando-os assim por 10 minutos.
- 9) Eluir o DNA em 200µl de água e 2µl de RNase.
- 10) Deixar os tubos a 37°C por 24 horas.
- 11) Estocar os DNAs a -20°C.

Os DNAs obtidos foram quantificados por eletroforese, utilizando como padrão o DNA do fago  $\lambda$  (100ng/µl, 75ng/µl, 50ng/µl e 25ng/µl).

### 3.4.2. Teste de extração

As extrações de DNA foram testadas através de eletroforese ( $U = 100V$ ) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 5mM. O gel foi observado em transiluminador sob luz ultravioleta, de modo que foram considerados de boa qualidade os DNAs que apresentaram um padrão eletroforético homogêneo, de alto peso molecular, e que não apresentassem traços de RNA. Foram incluídos na análise somente DNAs considerados de boa qualidade por estes critérios.

### 3.4.3. RAPD-PCR

Inicialmente foi testado um conjunto de 20 iniciadores arbitrários (Operon Technologys Inc.), dos quais 11 foram selecionados para a análise por apresentarem resultados reproduzíveis, claros e informativos. Seus códigos e seqüências são apresentados na tabela 1.

Após diversos testes, as reações de amplificação foram otimizadas e padronizadas. Assim, as reações foram preparadas em volumes de 25 µl, contendo: 1µl de DNA molde ( $\approx 25$  ng/µl); 16,8 µl de água deionizada estéril; 0,7 µl de  $MgCl_2$  50 mM; 2,5 µl de tampão *CENBIOT*<sup>TM</sup> 10X; 2,5 µl de dNTP 2 mM; 1 µl de iniciador a 0,2 µM ; e 2,5 unidades de *TaqDNA polimerase CENBIOT*<sup>TM</sup>.

As análises preliminares indicaram que a incidência de contaminação nos controles negativos dos PCR diminuía se o material não sensível à radiação ultravioleta (UV) utilizado para a amplificação fosse esterilizado. Desta forma, antes da preparação da mistura para cada PCR, todos os materiais e reagentes não sensíveis foram submetidos à irradiação com luz UV-C (germicida) durante 15 min, a fim de eliminar

possíveis DNAs contaminantes. Posteriormente, a preparação das reações foi conduzida em capela de fluxo laminar.

Tabela 1: Iniciadores arbitrários de RAPD-PCR utilizados na análise populacional de *P. caerulea* e *P. tenuifila*

Iniciador	Seqüência
OPA – 4	5' AATCGGGCTG 3'
OPA – 5	5' AGGGGTCTTG 3'
OPA – 7	5' GAAACGGGTG 3'
OPA – 8	5' GTGACGTAGG 3'
OPA – 9	5' GGGTAACGCC 3'
OPA – 10	5' GTGATCGCAG 3'
OPA – 15	5' TTCCGCACCC 3'
OPA – 17	5' GACCGATTGT 3'
OPA – 18	5' AGGTGACCGT 3'
OPA – 19	5' CAAACGTCGG 3'
OPA – 20	5' GTTGCGATCC 3'

As condições térmicas para amplificação que mostraram melhores resultados foram: (A) desnaturação a 94°C (3 min); (B) 46 ciclos de desnaturação a 94°C (60 s), anelamento a 36°C (60 s), extensão a 72°C (60 s); (C) extensão final de 72°C (5 min). Os produtos de PCR sofreram eletroforese (90-100 V) em gel de agarose 1,5% com uso de tampão TBE 1X (Tris 90 mM, EDTA 0,5 M, Ácido Bórico 90 mM). A coloração foi feita com brometo-de-etídio 5 mg/ $\mu$ l, sendo os géis visualizados em transiluminador de UV e fotografados com *Kodak Digital Camera DC40*. Foi considerado alelo todo e qualquer fragmento nítido durante a visualização.

Após a padronização das condições de PCR e escolha dos iniciadores, 28 indivíduos de *P. caerulea* e 22 de *P. tenuifila* foram analisados (tabela 2). Estes foram escolhidos por serem, *a priori*, potencialmente mais informativos que os demais quanto à variação genética populacional do Rio Grande do Sul, já que eram oriundos de diversas regiões do Estado e poderiam conter aspectos geneticamente interessantes quanto a diversidade geográfica esperada.

#### 3.4.4. Análise dos dados

Para a análise dos resultados, a presença ou ausência dos fragmentos foi codificada de forma binária (0/1) em uma matriz de dados. A relação entre os indivíduos foi determinada pelo método de

matriz de distância, sendo que a abordagem utilizada envolveu o cálculo do índice de similaridade genética de Nei & Li (1979), baseada nas frequências alélicas obtidas a partir do marcador (estimativa baseada nas frequências dos marcadores), conforme Arafeh (2002). Segundo esta metodologia, o coeficiente de similaridade de Nei & Li conta o número de fragmentos comuns dividido pelo número total de fragmentos encontrados entre duas amostras pareadas.

Tabela 2: Códigos e dados complementares dos 50 indivíduos usados na análise com marcadores tipo RAPD-PCR. Na coluna das localidades, as “,” separando duas sentenças indicam informações adicionais do ponto de coleta; os “-” indicam percursos. Na coluna das populações, os códigos especificados significam, respectivamente: CA (Campanha Gaúcha), DC (Depressão Central), PC (Planície Costeira), PL (Planalto Meridional), SG (Serra Geral), SS (Serra do Sudeste) e n/c (não considerada população devido ao pequeno número amostral)

Espécie	Código do Indivíduo	Localidade	Código da População	
<i>P. caerulea</i>	C1	Lavras do Sul	SS	
	C2	Pedra do Segredo	SS	
	C3	Passo do Rio Ilário	SS	
	C6	BR 290, Km 270	DC	
	C7	Guaritas	SS	
	C10	Morro Santana	DC	
	C15	Guaíba	DC	
	C16	Alpes de São Francisco de Paula	PL	
	C18	Reserva do Taim	PC	
	C19	São José, Flores da Cunha	SG	
	C21	RS 694, Km 5	CA	
	C22	FLONA, São Francisco de Paula	PL	
	C24	Rota do Sol, Km 30	SG	
	C25	Rota do Sol, Km 38	SG	
	C26	Santa Maria	DC	
	C28	São José, Santa Maria	DC	
	C29	Canguçu	PL	
	C31	Taquara – Gramado	SG	
	C32	Linha Brasil	SG	
	C33	Canela – Morro Pelado	SG	
	C36	UFRGS, Campus do Vale	DC	
	C37	Águas Claras, Viamão	PC	
	C41	Recanto de Portugal, Pelotas	PC	
	C44	Horto Florestal da UFPEL	PC	
	C48	Otávio Rocha – Parque da Gruta	SG	
	C49	Barragem de Caxias do Sul	SG	
	C51	Nova Pádua – Belvedere Sonda	SG	
	C59	BR 293, Km 356	CA	
	<i>P. tenuifila</i>	T1	trilha p/ Porto Garcia, Km 5, Turvo	PL
		T2	trilha p/ Porto Garcia, Km 7, Turvo	PL
		T3	Pedra do Segredo	n/a
		T4	Petrópolis, Porto Alegre	DC
		T5	Petrópolis, Porto Alegre	DC
T6		Horto Florestal Barba Negra	DC	
T7		Porto Garcia, Turvo	PL	
T8		Horto Florestal Barba Negra	DC	
T9		Braga	PL	
T10		Porto Alegre	DC	
T11		Santa Maria	DC	
T12		Trilha p/ Salto do Yucumã, Turvo	PL	
T13		Tapes – Arambaré	PC	
T14		Pelotas	PC	
T16		Nova Pádua – Belvedere Sonda	SG	
T17		RS 122, Km 98,5	SG	
T18		Tapes – Arambaré	PL	
T19	Tapes – Arambaré	PL		
T20	Eldorado – Guaíba	DC		
T21	Eldorado – Guaíba	DC		
T22	Eldorado – Guaíba	DC		
T23	Parque Marinha, Porto Alegre	DC		

A matriz de distância genética entre os indivíduos estudados foi calculada utilizando o programa PAUP\* (versão 4.0b) para computadores *Power Macintosh* (Swofford, 1998). Os valores de distância foram submetidos à análise fenética usando a metodologia de "Neighbor-Joining" no programa TREECON para Windows (Van De Peer, & De Wachter, 1994). A árvore filogenética resultante foi submetida a análise de consistência de agrupamentos filéticos por re-amostragem, usando 1000 replicações.

As análises estatísticas dos padrões de RAPD foram realizadas utilizando os programas RAPDFST (Black, 1997) e POPGENE32 (Yeh *et al*, 1997), sendo ambas baseadas nas seguintes suposições: (i) os fragmentos de RAPD comportam-se como marcadores dominantes diplóides, sendo presente (amplificado) ou ausente (não amplificado); (ii) fragmentos coincidentes representam *loci* homólogos; e (iii) *loci* polimórficos são herdados à moda Mendeliana, com se fossem de origem nuclear;

Usando o primeiro programa, duas metodologias de abordagem diferentes foram empregadas para estimar a perda de heterozigotidade por geração ( $F_{st}$ ) e as taxas de migração efetivas ( $N_m$ ) dentro das subpopulações (intraespecífica) e entre as populações (interespecífica). A primeira metodologia é baseada na equação de Wright (1931), descrita como:  $F_{st} = 1/(4N_m + 1)$ , e mede a redução de heterozigotidade dentro das populações devido a eventos aleatórios de deriva genética. Neste método, os padrões de subdivisão populacional são acessados utilizando um modelo de população estruturada com ilhas isoladas, assumindo a existência de um número infinito de subpopulações (ilhas) com o mesmo tamanho efetivo, sem estrutura geográfica, e que podem trocar uma proporção de migrantes por geração (Jordano & Godoy, 2000). Esta equação é computada pelo programa como:  $F_{st} = \text{Variância}(p)/(p \text{ médio}(1 - p \text{ médio}))$ ; onde "p" é a frequência de um alelo (0/1) em um *locus* de RAPD e "p médio" é frequência média ponderada entre todas subpopulações. Assim, este  $F_{st}$  é uma taxa da variância observada na frequência de um alelo entre subpopulações em relação a sua máxima variância populacional. A segunda metodologia computa o índice  $\theta$  (theta), descrito por Weir & Cockerham (1984), que se trata de um  $F_{st}$  corrigido para mostras pequenas e desiguais, bem como para pequenos números amostrais e populações finitas.

Para estas duas metodologias, as estimativas da diversidade interespecífica baseadas nas estatísticas F necessitam de que certas suposições fossem assumidas: (i) existe fluxo gênico entre as duas espécies, uma vez que dados de campo indicam que *P. caerulea* pode hibridar, em ambientes naturais, com outras espécies pertencentes ao subgênero *Passiflora*, inclusive *P. tenuifila* (Armando C. Cervi, comunicação pessoal); (ii) os híbridos produzidos são férteis (informação desconhecida); (iii) produzem descendentes também viáveis (informação desconhecida); e (iv) contribuem para a estrutura genética da população.

Usando o segundo programa, as estimativas da diversidade intraespecífica e interespecífica foram calculadas assumindo que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), conforme Arafah (2002). Foram utilizados os seguintes índices: (1) a porcentagem de *loci* polimórficos dentre todos os *loci* obtidos (P%); (2) a heterozigozidade parcial esperada ( $H_e$ ) (Nei, 1978); e (3) o índice de diversidade fenotípica de Shannon ( $I_{sh}$ ) (Lewontin, 1972). Em contraste ao  $H_e$ ,  $I_{sh}$  não considera realmente que as populações estejam em EHW.

As correlações entre a distância genética e a geográfica nas populações das duas espécies foram realizadas através do teste de Mantel (1967), utilizando o programa MANTEL versão 2.0 (Liedloff, 1999). Este teste é um procedimento estatístico que permite medir o coeficiente de correlação entre duas matrizes, podendo-se manter uma terceira matriz constante. Para o atual estudo, foi utilizada somente a correlação entre duas matrizes de distância: uma genética (dos marcadores) e outra geográfica (entre as coordenadas geográficas pontos de localização dos indivíduos amostrados).

## 4. RESULTADOS:

### 4.1. Morfologia Comparada

#### 4.1.1. *Passiflora caerulea*: características

**Espécie:** *Passiflora caerulea*.

**Nome popular:** maracujá-de-cobra, maracujá-azul, flor da paixão azul.

**Hábito:** herbácea, em raros casos escandescente (interior de mata).

**Caule:** subangulares; estriados; cavados.

**Estípulas:** semi-ovais; aristadas no ápice.

**Folhas:** aristadas ou mucronadas; raramente dentadas, denticuladas ou subinteiras; 5-palmadas (ocasionalmente 3, 7 ou 9); lobadas em 2/3 do seu comprimento ou próximo à base; cordadas; membranosas. As folhas são verdes-escuras e se perdem no outono.

**Glândulas:** 2 a 4 glândulas por pecíolo; estriadas.

**Pedúnculos florais:** 3-7 cm de comprimento, geralmente sólidos.

**Brácteas:** ovais a ovado-oblongas, ao redor do ápice; localizadas na base da flor; membranosas; e

verde-pálidas.

**Tubo do cálice:** flores com mais de 10 cm, em forma de copo.

**Sépalas:** lanceo-oblongas; obtusas no ápice; subcoriáceas; externamente verdes e brancas ou rosas por dentro; apresenta quilhas dorsais.

**Pétalas:** oblongo-obtusas; membranáceas; brancas, rosas, levemente violáceas ou ainda azuladas.

**Corona:** 4 séries, com as duas mais externas ficando mais escassas da metade para o topo (6 mm), São mais longas do que as pétalas; filiformes; radiadas; azuis no ápice, branco no meio e púrpura na base. As duas séries internas (1-2 mm) são eretas, brancas e púrpura no ápice. (Nota: as cores e os padrões concêntricos das mesmas na coroa desta espécie apresentam diversas formas que são, possivelmente, variáveis de região para região). Os filamentos da coroa podem ser ainda azul-celeste ou azul-robusto, podendo ou não serem variegados.

**Opérculo:** membranoso no terço superior do seu comprimento; branco; filamentos abaxiais; filamentos longos; eretos; púrpura escuro.

**Órgãos reprodutivos:** límen cupuliforme; branco; localizado ao redor da base do androginóforo; crenulado; ovário ovóide ou subgloboso.

**Fruto:** ovóide ou subgloboso; 6 cm de comprimento; 4 cm de diâmetro; laranja ou amarelo; apresenta geralmente grande quantidade de polpa de coloração avermelhada; odor suave e sabor muito doce. Alguns tipos de frutos amarelados são comestíveis, mas não especialmente deliciosos. Os frutos se formam precocemente no verão e tardiamente no outono (de janeiro a abril), suportando temperaturas mínimas que variam de 1 até 4°C, com sementes disponíveis.

**Semente:** obcordadas ou cunetadas; 15 mm de comprimento e 3,5 a 4 mm de largura; reticuladas; superfície com sulcos côncavos em padrões que variam de levemente arredondados a muito irregulares. A germinação ocorre mais facilmente se a umidade for grande e constante, bem como se a temperatura for mantida entre 21-24°C.

**Floração:** de outubro a fevereiro no hemisfério sul (nativas) e de maio até novembro no hemisfério norte (exóticas). As flores desenvolvem-se livremente quando crescem em uma localização ensolarada. Suportam temperatura mínima de 8°C, sempre floridas.

**Habitat:** heliófita, procurando se abrigar em posições aquecidas na orla da mata, capoeiras e margem de rios (na orla da mata é seletiva higrofila)

**Observações:** As flores são construídas nos brotos jovens; possuem fragrância suave e apresentam dimensões que variam de 7-11 cm. O tamanho da planta adulta varia de 41 à 83 cm, enquanto

que as dimensões máximas atingidas por ela ficam entre 4,60 m e 9,20 m. No verão, esta planta trepadeira tem crescimento rápido (até 9 m) mantendo-se sempre-viva ou semi-sempre-viva; no inverno a planta raramente cresce. Nesta última estação, ela resiste ao frio intenso, já que perdeu a maioria de suas folhas durante o outono.

**Origem e distribuição:** Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina e Bolívia. Atualmente está naturalizada em regiões tropicais por todo o mundo, principalmente na Europa.

#### 4.1.2. *Passiflora tenuifila*: características

**Espécie:** *Passiflora tenuifila*.

**Nome popular:** maracujá-de-cobra ou maracujá-branco.

**Hábito:** escandescente.

**Caule:** cilíndrico; estriado; subangular nas porções jovens.

**Estípulas:** foliáceas (podendo atingir grandes medidas); semi-oblongas ou subreniformes; agudas e mucronadas no ápice; arredondadas na base; glaucescentes na face abaxial.

**Folha:** trilobadas; lóbulos oblongos; obtusos e mucronados no ápice; glândulas serrilhadas no sinus; o lóbulo médio estreita-se na base; cordadas ou subpeltadas na base; com cinco nervuras; glaucescentes na face abaxial; apresenta grande pecíolo com glândulas.

**Glândulas:** pecíolos com 2-6 glândulas; dispersas ou subopostas.

**Pedúnculos florais:** delgados; articulados próximo ao ápice.

**Brácteas:** verticiladas; cordado-ovadas; agudas e mucronadas no ápice; persistentes; glaucescentes em ambas as extremidades; margem inteira.

**Tubo do cálice:** tubo pateliforme.

**Sépalas:** linear-oblongas; obtusas no ápice; carinadas e com uma arista foliácea na face abaxial; verdes na face abaxial, com a margem alvecente e alvas na face adaxial; cartáceas.

**Pétalas:** linear-oblongas; obtusas no ápice; alvecentes.

**Corona:** quatro séries de filamentos; as exteriores capilares, as internas filiformes; alvas e com aspecto plumoso em alguns casos.

**Opérculo:** membranáceo; plicado.

**Orgãos reprodutivos:** límen cupuliforme; envolvendo frouxamente a base do androginóforo; ovário ovóide; glaucescente; glabro.

**Fruto:** subgloboso, globoso ou tipicamente em formato de gota d'água; amarelo quando maduro; glabro; apresenta pouca quantidade de poupa amarelada que possui odor forte, levemente desagradável e sabor adocicado; possui mesocarpo com câmaras. Os frutos são formados de outubro a abril.

**Semente:** obovadas; alveoladas; testa reticulada e eixo levemente curvado.

**Floração:** floresce de outubro a abril.

**Habitat:** heliófita; seletiva higrófila; raramente encontrada em capoeiras, matas abertas e capões dos campos.

**Origem e distribuição:** Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia

#### 4.1.3. Peculiaridades

Alguns dados observados em campo sugerem que, em cada uma das regiões fisionômicas do Rio Grande do Sul, *P. caerulea* e *P. tenuifila* apresentam certas características florais e vegetativas particulares e que poderiam constituir diferenças regionais. Exemplos de variações locais observadas são: padrões de coloração das pétalas e da corona de filamentos, números de séries da corona, formato das folhas e a seleção preferencial de habitat. Estas características podem ser devidas a fatores genéticos peculiares das populações regionais, ou ainda devido a fatores ambientais locais.

A exemplo do que acontece com as hortênsias (*Hydrangea macrophylla* – Saxifragaceae), a variação de coloração poderia ser devida, ainda, a fatores edáficos. Neste exemplo, o solo exibe um gradiente de transição de solos basálticos para solos graníticos (região da Serra Gaúcha, sentido N – S, respectivamente). Nesta região, a espécie exibe variação de tonalidade da inflorescência entre rosa e azul, dependendo do tipo de solo no qual a planta se encontra. Esta diferença ocorre basicamente em função do valor do pH do solo: solos de origem graníticas (pH > 7, básico) determinam inflorescências rosas e solos de origem basálticas (pH < 7, ácido) determinam inflorescências azuis (Sérgio L. C. Leite, comunicação pessoal).

#### 4.1.4. Filogenia das espécies de *Passiflora* que ocorrem no Rio Grande do Sul

Para os 90 caracteres morfológicos estudados e selecionados a partir da morfologia comparada (apêndice 1), que apresentaram de dois a oito estados cada, foram obtidas 14 árvores filogenéticas igualmente parcimoniosas. A partir destas filogenias, foram montadas árvores de consenso usando quatro

metodologias diferentes: senso semi-estrito, senso estrito, Adams e Majority-Rule. Por motivos de confiabilidade, foram escolhidas para discussão as árvores de Majority-Rule e senso estrito (figuras 3 e 4).

Observando a árvore de Majority-Rule, percebe-se que somente três grupos filéticos apresentaram porcentagens de ocorrência superiores a 50% (figura 3). Os agrupamentos que separam os subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*, bem como o ramo filético que agrupa *P. elegans* e *P. actinia*, apresentaram porcentagens de ocorrência de 100%, enquanto que o grupo formado por *P. amethystina* e *P. caerulea* apresentou porcentagem de ocorrência de 50%. Os demais ramos apresentaram porcentagens de ocorrência de 25%, não sendo filogeneticamente consistentes.

A análise de confiabilidade por re-arrastagem (*bootstrap*) da árvore de consenso senso estrito indica que, usando 90 caracteres, somente foram consistentes os agrupamentos que separam os subgêneros *Passiflora* e *Decaloba* (valor de *bootstrap* = 100), bem como foi consistente o ramo filético que agrupa *P. elegans* e *P. actinia* (valor de *bootstrap* = 77) (figura 4)

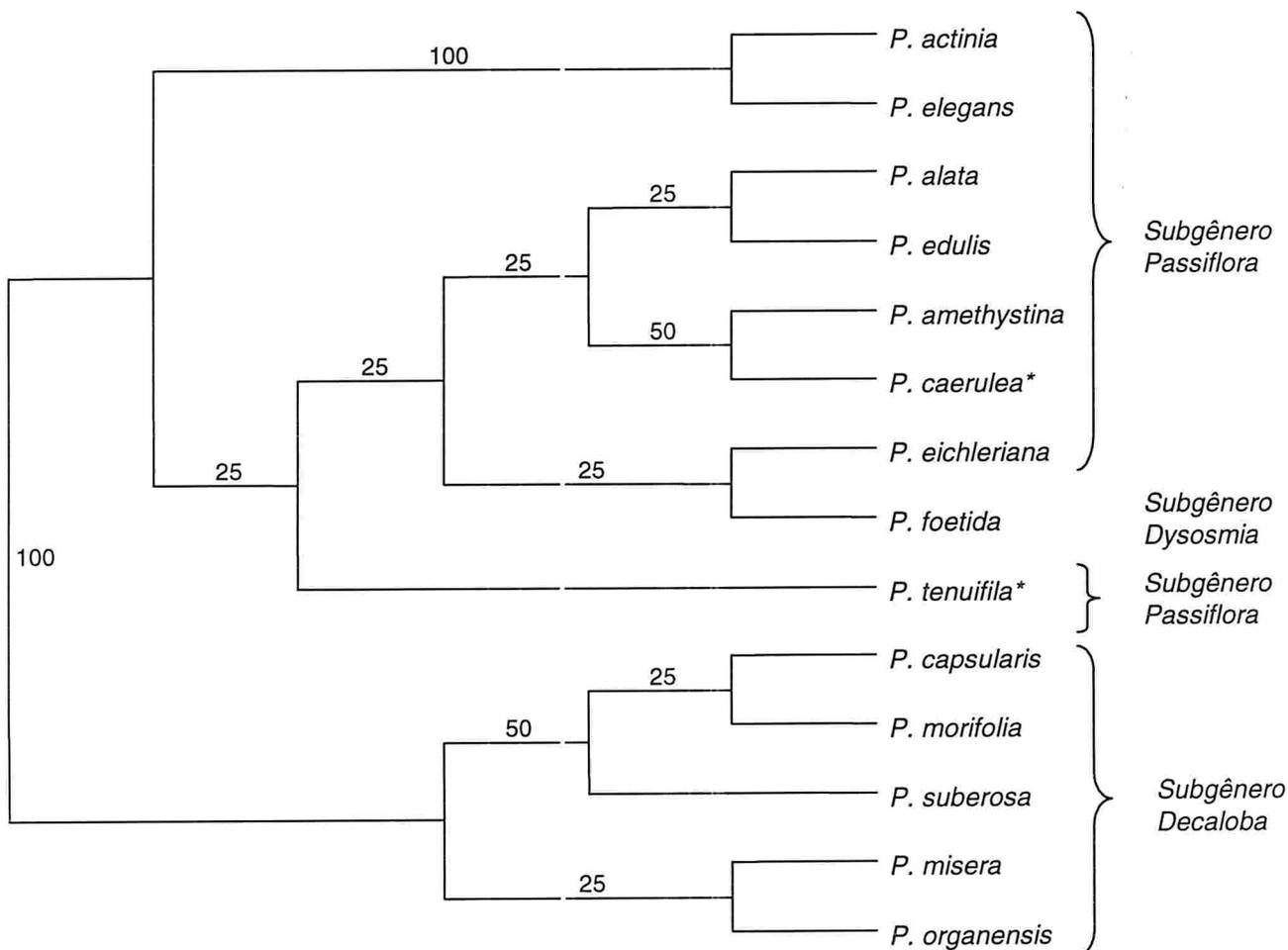


Figura 3: Árvore de consenso (*Majority Rule*) construída a partir das 14 árvores mais parcimoniosas obtidas pela comparação de 90 caracteres morfológicos de espécies de *Passiflora* que ocorrem naturalmente no RS. Os nomes no fim dos ramos correspondem a espécie; os números acima dos ramos indicam a porcentagem de ocorrência do agrupamento entre todas as árvores obtidas. As espécies de interesse neste trabalho aparecem destacadas com um asterisco.

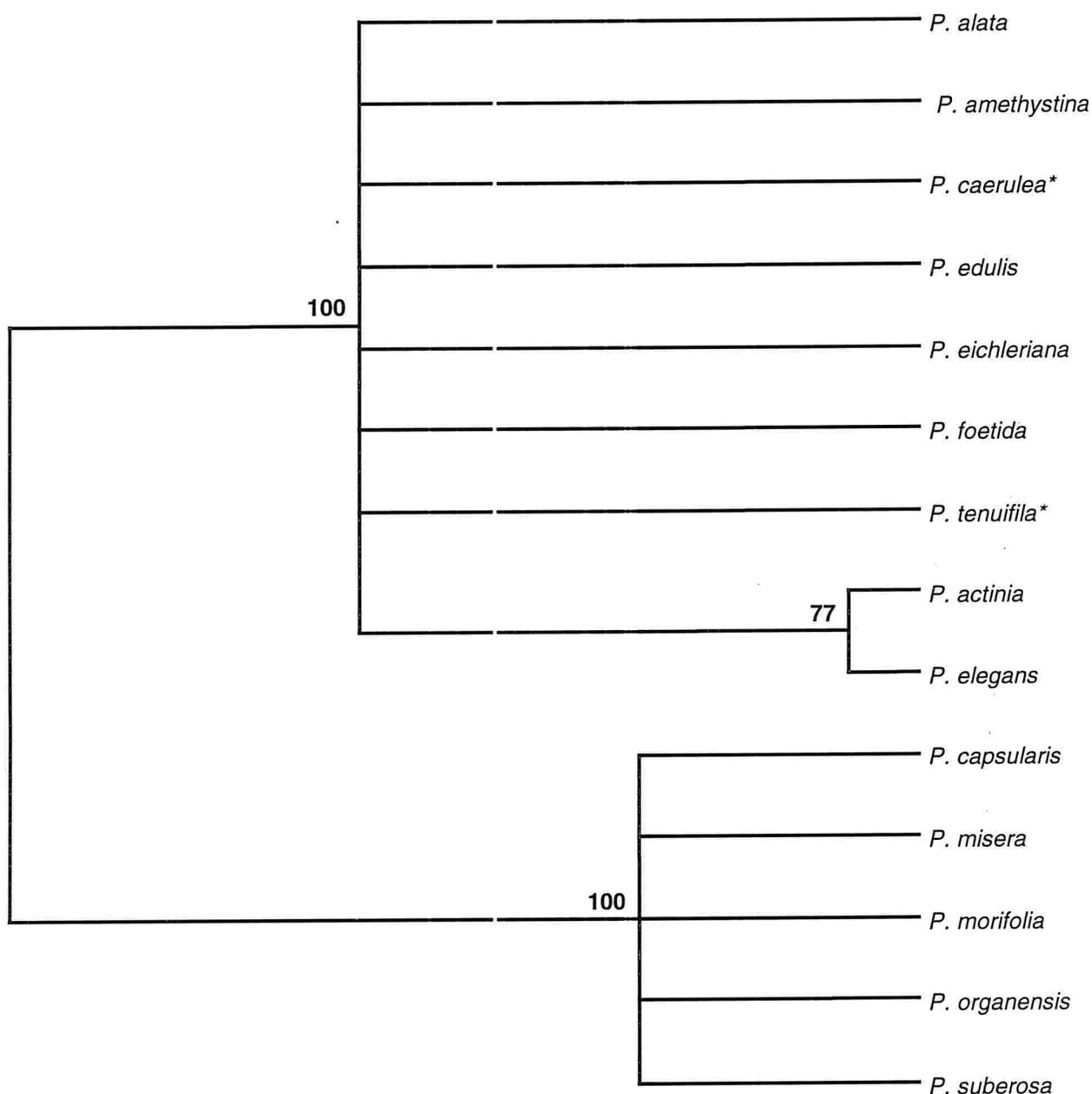


Figura 4: Árvore de consenso estrito, construída a partir das 14 árvores mais parcimoniosas obtidas pela comparação de 90 caracteres morfológicos de espécies de *Passiflora* que ocorrem naturalmente no RS. Os nomes no fim dos ramos correspondem a espécie; os números acima dos ramos indicam os valores de "Bootstrap" (100 replicações) em porcentagem para os agrupamentos. As espécies de interesse neste trabalho aparecem destacadas com um asterisco.

#### 4.2. Mapas de Distribuição

A localização dos registros e a distribuição das duas espécies em estudo, na América do Sul, podem ser vistas na figura 5. Os resultados indicam que *P. caerulea* tem uma distribuição mais ampla do que *P. tenuifila*. Através deste diagrama de dispersão, tem-se indícios de que ambas espécies

apresentam uma distribuição relacionada com as rotas migratórias da flora tropical, que partiu do norte avançou em direção ao sul (figura 2). As duas frentes de dispersão também ficam claramente definidas, formando uma estrutura em forma de “V”. O traço esquerdo, corresponderia à leva de dispersão do Brasil Central e Amazônia; enquanto que o braço direito corresponde à dispersão da Costa Atlântica (para detalhes, ver item 1.4.2). Assim, *P. caerulea* se distribui naturalmente pelo Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e Bolívia; e *P. tenuifila* pelo Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia.

A localização dos espécimes de ambas espécies amostrados no Rio Grande do Sul, pode ser visualizada na figura 6. Nesta figura, pode-se notar que *P. caerulea* se distribui por praticamente todas regiões do RS, não havendo registro de sua ocorrência no noroeste do Estado, na região do Alto Uruguai (porção oeste do Planalto Rio-Grandense). Isso pode ser devido, provavelmente, à expansão da fronteira agrícola do Estado, que se sobrepõe com a área onde a presença da espécie não foi registrada.

Por sua vez, *P. tenuifila* parece ter uma distribuição, em grande parte, sobreposta a *P. caerulea*. Contudo, em certas regiões, ela não está presente e, em outras, ela aparece sozinha. Estes dados demonstram que a ocorrência de *P. tenuifila* está distribuída pelas regiões da Planície Costeira, Depressão Central, porções oeste e média do Planalto Rio-Grandense (Alto Uruguai e Planalto Médio, respectivamente) e porções norte e leste da Serra do Sudeste. A restrição da distribuição de *P. tenuifila* seria em relação à região da Campanha Gaúcha e dos Campos de Cima de Serra (porção leste do Planalto Rio-Grandense).

O diagrama de distribuição das duas espécies no Rio Grande do Sul pode ser visto na figura 6. Um único registro de *P. caerulea* foi obtido para a porção da Planície Costeira que constitui a península que separa a Lagoa dos Patos do Oceano Atlântico. Esta ocorrência foi registrada no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no interior da zona da Mata de Restinga, justamente sob a sombra de uma figueira (*Ficus organensis*).

Apesar da ocorrência deste espécime ser natural, ela pode ser considerada rara e efêmera. A espécie de *Ficus* citada anteriormente oferece, sazonalmente, frutos que podem ser consumidos pela avifauna. Como um grande número de espécimes de *P. caerulea* tenham sido encontrados de baixo de árvores frutíferas normalmente visitadas por aves, isso sugere que esta espécie é dispersa regularmente por aves. Por outro lado, as características do solo desta região são muito adversas (salinidade, solo arenoso, baixa valor nutricional), de modo que o ambiente torna-se um fator limitante à presença de *P. caerulea* na região. A única espécie de *Passiflora* observada na região é *P. suberosa* (Lorenz, 2001), que é conhecida por sua robustez e capacidade de adaptação a ambientes arenosos e halófilos (evidências de

semente a longa distância, realizada por alguma aves não identificada.

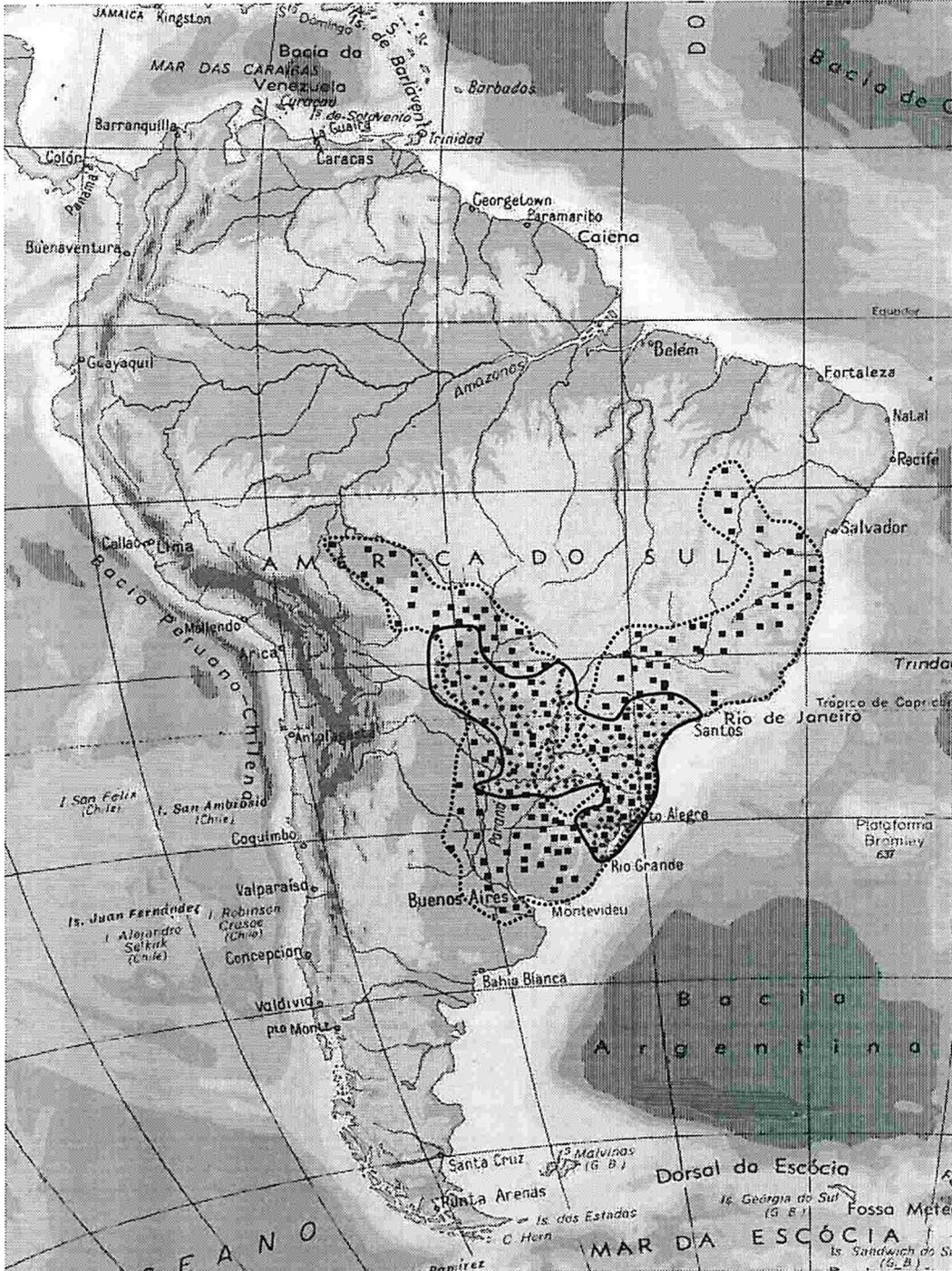


Figura 5: Mapa dos pontos de ocorrência registrados para *P. caerulea* (quadrados) e *P. tenuifila* (pontos). As linhas pontilhadas representam os limites de distribuição de *P. caerulea*, a linha contínua indica os limites de *P. tenuifila*.

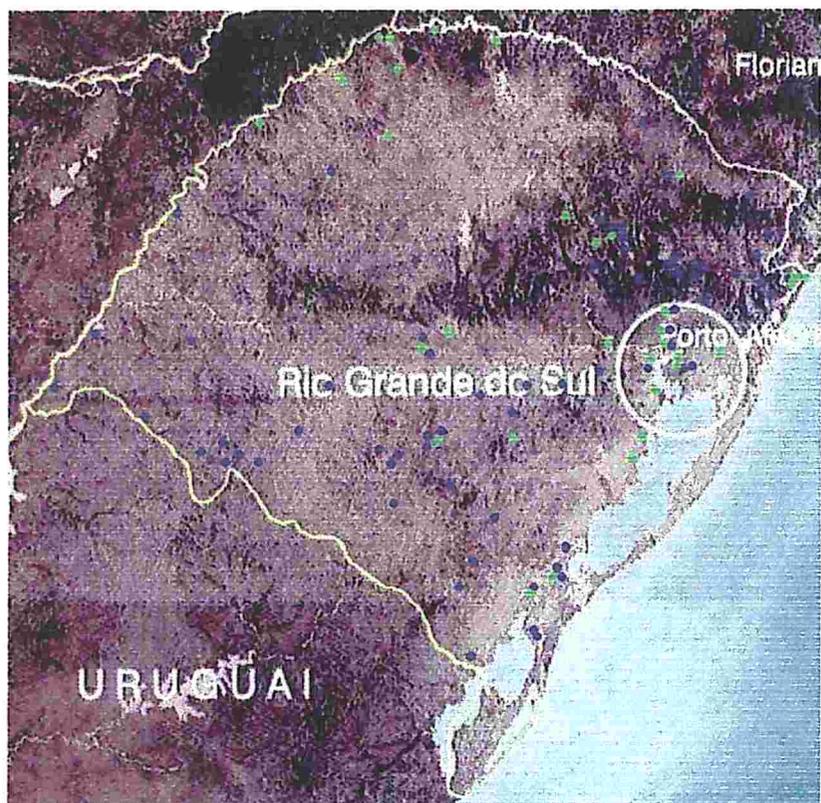


Figura 6: Mapa dos pontos de ocorrência registrados para *P. caerulea* (pontos azuis) e *P. tenuifila* (pontos verdes). As linhas amarelas indicam os limites internacionais; as linhas brancas os limites interestaduais (adaptado de Porto *et al*, 2001).

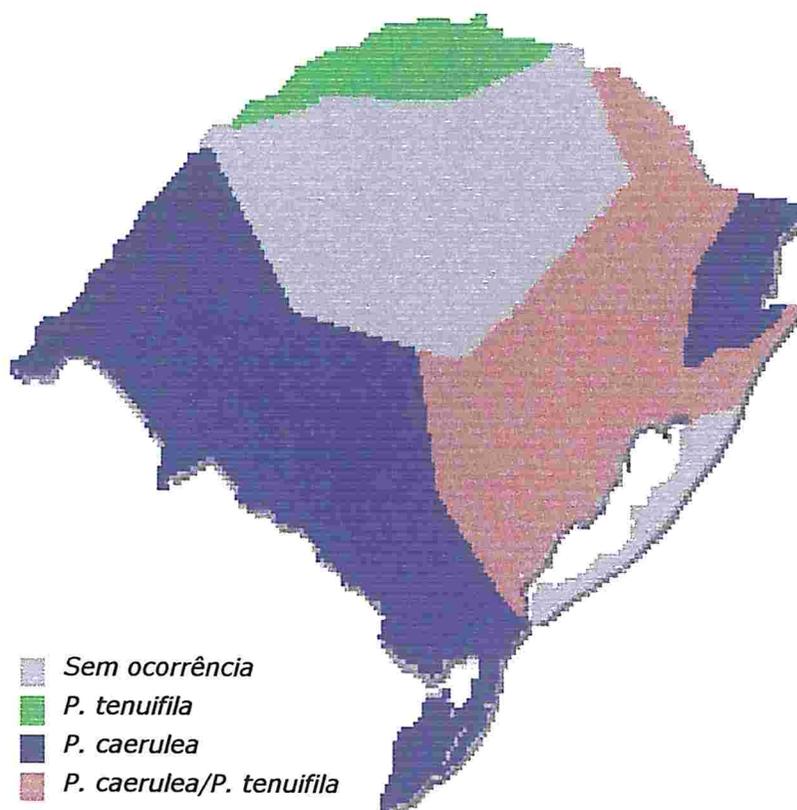


Figura 7: Diagrama de distribuição de *P. caerulea* e *P. tenuifila* para o Rio Grande do Sul, construído com base nas ocorrências registradas no Estado. Os limites são tratados como linhas retas pois são arbitrários. A legenda das cores está indicada na figura.

### 4.3. Dados Ecológicos

Os resultados obtidos com as 15 variáveis ecológicas podem ser visualizados nas tabelas 3, 4 e 5. Das quinze variáveis climáticas estudadas, onze apresentaram algum resultado significativo ( $p < 0,05$ ) (tabela 3). Dentre as variáveis quantitativas, oito apresentaram diferença significativa entre as médias obtidas para as duas espécies (temperatura média, amplitude térmica, índice de oceanidade de Kerner, índice de aridez de Knoche, dias de chuva, número de meses úmidos, número de meses chuvosos e evaporação); enquanto que as diferenças encontradas para as variâncias foram significativamente distintas entre *P. caerulea* e *P. tenuifila* para oito variáveis estudadas (temperatura média, amplitude térmica, umidade relativa do ar, índice de aridez de Knoche, dias de chuva, número de meses úmidos, precipitação total e insolação média) (tabela 4).

Tabela 3: Resultados obtidos para teste t e F e respectivos valores de probabilidade ( $p$ ), analisando as diferenças entre as populações de *P. caerulea* ( $n=127$ ) e *P. tenuifila* ( $n=52$ ); valores de  $p$  significativos em negrito-italico.

<b>Variáveis climáticas</b>				
<b>Variáveis quantitativas</b>	<b>t</b>	<b>p</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Temperatura Média (°C)	-3,610	<b>&lt;0,001</b>	14,265	<b>&lt;0,001</b>
Amplitude Térmica (°C)	2,087	<b>0,039</b>	11,158	<b>0,001</b>
Índice de Oceanidade (Kerner)	177	<b>0,002</b>	0,887	0,348
Umidade Relativa do Ar (%)	-1,516	0,132	8,568	<b>0,004</b>
Índice de Aridez (Knoche)	3,843	<b>&lt;0,001</b>	19,703	<b>&lt;0,001</b>
Dias de Chuva	2,331	<b>0,021</b>	45,794	<b>&lt;0,001</b>
Nº de Meses Úmidos (30-50 mm)	-2,189	<b>0,031</b>	5,184	<b>0,024</b>
Nº de Meses Chuvosos (>100 mm)	177	<b>0,011</b>	2,895	0,086
Índice de Continentalidade (Johannsson)	0,042	0,996	0,541	0,463
Precipitação Total (mm)	-1,461	0,147	5,830	<b>0,017</b>
Índice de Nebulosidade	1,109	0,269	0,612	0,435
Insolação Média	1,439	0,153	9,637	<b>0,002</b>
Evaporação (mm)	5,528	<b>&lt;0,001</b>	2,057	0,153
<b>Variáveis qualitativas*</b>		<b>p</b>		
Tipo de Clima (Köppen)*		<b>&lt;0,001</b> (Exato)		
Tipo de Solo*		0,536 (Exato)		

Dentro do grupo das variáveis qualitativas, somente o tipo de clima de Köppen mostrou resultados significativamente distintos entre as duas espécies (tabela 3). A relação entre o número de indivíduos encontrados em regiões com cada tipo de solo e com cada tipo climático estão exibidos na tabela 5.

Tabela 4: Médias e desvios padrões calculados para as variáveis quantitativas estudadas entre as populações de *P. caerulea* (n=127) e *P. tenuifila* (n=52).

Variável	Espécie	Média	Desvio Padrão
Temperatura Média (°C)	<i>P. caerulea</i>	18,3465	1,8187
	<i>P. tenuifila</i>	19,2692	1,4296
Amplitude Térmica (°C)	<i>P. caerulea</i>	10,6772	1,4523
	<i>P. tenuifila</i>	10,2308	1,2306
Índice de Oceanidade (Kerner)	<i>P. caerulea</i>	3,3071	8,2669
	<i>P. tenuifila</i>	-1,1538	9,2150
Umidade Relativa do Ar (%)	<i>P. caerulea</i>	78,1496	2,8732
	<i>P. tenuifila</i>	78,7500	2,1862
Índice de Aridez (Knoche)	<i>P. caerulea</i>	58,4252	21,1730
	<i>P. tenuifila</i>	47,6923	14,9004
Dias de Chuva	<i>P. caerulea</i>	99,2126	19,0907
	<i>P. tenuifila</i>	94,0385	10,3393
N° de Meses Úmidos (30-50 mm)	<i>P. caerulea</i>	1,7953	1,6298
	<i>P. tenuifila</i>	2,4231	1,7861
N° de Meses Chuvosos (>100 mm)	<i>P. caerulea</i>	10,2047	1,6298
	<i>P. tenuifila</i>	9,5000	1,7207
Índice de Continentalidade (Johannsson)	<i>P. caerulea</i>	13,6378	3,2797
	<i>P. tenuifila</i>	13,6154	3,0943
Precipitação Total (mm)	<i>P. caerulea</i>	1450,7874	261,7087
	<i>P. tenuifila</i>	1394,2308	223,3115
Índice de Nebulosidade	<i>P. caerulea</i>	5,0551	0,5241
	<i>P. tenuifila</i>	4,9615	0,4835
Insolação Média	<i>P. caerulea</i>	2467,7165	147,4018
	<i>P. tenuifila</i>	2438,4615	112,2914
Evaporação (mm)	<i>P. caerulea</i>	836,2205	180,6818
	<i>P. tenuifila</i>	703,8462	128,2790

Tabela 5: Distribuição observada para as categorias das variáveis ecológicas qualitativas analisadas entre *P. caerulea* (n=127) e *P. tenuifila* (n=52).

		Tipo de Clima (Köppen)		Total
		Cfa	Cfb	
Espécie	<i>P. caerulea</i>	60	67	127
	<i>P. tenuifila</i>	44	8	52
<b>Total</b>		104	75	179
		Solo (origem)		
		Basalto	Granito	
Espécie	<i>P. caerulea</i>	52	75	127
	<i>P. tenuifila</i>	18	34	52
<b>Total</b>		70	109	179

#### 4.4. Variabilidade genética e molecular

##### 4.4.1. RAPD-PCR

Os resultados obtidos com RAPD-PCR podem ser observados no apêndice 2. Foram obtidos no total 50 diferentes haplótipos para os 11 iniciadores utilizados na análise, que constituíram a totalidade de 182 fragmentos (*loci*).

A matriz de distância/similaridade obtida pelo método de Nei & Li pode ser vista no apêndice 3. A árvore filogenética obtida pela metodologia de "Neighbor-Joining" separa claramente dois grupos distintos, constituídos, cada um deles, por indivíduos de somente uma das espécies (figura 8). A consistência dos ramos que separam *P. caerulea* e *P. tenuifila* foi bastante alta, mostrando valores de suporte equivalentes a 100% e 95%, respectivamente. A exceção é feita ao indivíduo T11, que apresenta uma posição filogenética distinta dos demais, sustentada por um alto valor de suporte (90% dos casos). Isso pode ser devido a dois fatos diferentes: (1) este indivíduo é realmente uma *P. tenuifila* que, por se encontrar no limite oeste de distribuição da vegetação que invadiu o RS pela Costa Atlântica, apresenta um haplótipo característico devido ao isolamento genético da população local; ou, (2) trata-se de uma espécie distinta ou de um híbrido interespecífico. Analisando os dois casos, é mais provável que a segunda situação reflita mais a verdade. Isso pode ser afirmado pois outros indivíduos de *P. tenuifila* estudados, apesar da grande distância geográfica que os separa (alto grau de isolamento genético), são agrupados consistentemente dentro do mesmo grupo filético (p/ ex. T9 e T10). Como existem espécies presentes no Estado, que apresentam morfologia vegetativa muito semelhante a *P. tenuifila* (*P. eichleriana* e *P. amethystina*), é provável que tenha ocorrido um problema de identificação da espécie ou que o indivíduo em questão seja um híbrido, cuja morfologia se assemelha mais a de *P. tenuifila*.

Outras considerações interessantes podem ser feitas baseadas na árvore filogenética. Tanto para uma espécie como para outra, não houve grande suporte para os agrupamentos subpopulacionais, indicando que não existe uma estruturação em nível regional para as espécies estudadas. Porém, como os índices calculados para acessar a diversidade genética intraespecífica indicam um baixo fluxo gênico por geração (dados apresentados a seguir), supõe-se que as distâncias genéticas calculadas na árvore não foram suficientes para separá-las. Isso seria devido à pequena amostragem ou ao fato de que a estruturação genética das subpopulações de ambas espécies se dá em um nível de hierarquia geográfica menor do que o esperado.



Figura 8: Dendrograma construído a partir da distância genética de Nei & Li (1974), com o método de Neighbor-Joining. Os números no fim dos ramos indicam o código de cada haplótipo, sendo "C" correspondente a *P. caerulea* e "T" a *P. tenuifila*. Os números acima dos ramos indicam os valores de consistência dos agrupamentos, obtidos por re-amostragem (*Bootstrap*), em porcentagem. A escala presente no canto direito superior indica o grau de diferenciação genética entre os ramos filéticos. O asterisco indica o indivíduo com identificação duvidosa. 50

Esta mesma árvore não exibe uma clara ordenação dos indivíduos em relação à posição geográfica em todos os ramos filéticos. Apesar disso, os resultados demonstram que muitos grupos filéticos possuem grande consistência quando observados sob padrões espaciais menores, como é o caso de T20, T21 e T22 (todos de Guaíba), C24 e C25 (ambos da estrada Tainhas – Terra de Areia) e outros.

Na tabela 6 são mostradas as estimativas de  $F_{st}$  e  $\theta$ , bem como o número efetivo de migrantes por geração ( $N_m$ ), para as populações analisadas de acordo com o modelo de ilhas de Wright (1969). Como o  $F_{st}$  é inversamente relacionado ao  $N_m$ , um alto valor de  $F_{st}$  significa que as populações são geneticamente diferenciadas, resultado este obtido devido à baixa migração dos genótipos (Ayres & Ryan, 1999). Os resultados indicam que existe uma grande diferenciação entre as subpopulações de *P. caerulea* ( $F_{st} = 0.425$ ;  $N_m = 0.3$ ; valor  $p < 0.0001$  /  $\theta = 0.211$ ;  $N_m = 0.9$ ; Jackknife = 0.209), caracterizando grupos definidos geneticamente dentro das áreas estudadas. Como a distribuição desta espécie é bastante ampla no RS, o significado da diferenciação pode ser devido a fatores adaptativos às condições climáticas locais. Por outro lado, *P. tenuifila* apresenta uma diversidade intrapopulacional menor do que *P. caerulea* ( $F_{st} = 0.164$ ;  $N_m = 1.3$ ; valor  $p < 0.0001$  /  $\theta = 0.187$ ;  $N_m = 1.1$ ; Jackknife = 0.178), possivelmente refletindo sua menor distribuição geográfica, dependência de certa constância climática e as variações genéticas associadas.

Tabela 6: Índices populacionais calculados para as populações de *P. caerulea* e *P. tenuifila*. A primeira coluna indica o nível populacional analisado (itálico) e a metodologia empregada; as colunas seguintes contêm os valores calculados para a perda de heterozigosidade por geração ( $F_{st}$ ), número de migrantes por geração ( $N_m$ ) e os respectivos valores de probabilidade (Sig.)

<b>Espécie</b>	<b><math>F_{st}</math></b>	<b><math>N_m</math></b>	<b>Sig.</b>
<b><i>P. caerulea</i></b> (n=28, n° de loci=182)			
Wright ( $F_{st}$ )	0.425	0.3	p<0.0001
Weir & Cockerham ( $\theta$ )	0.211	0.9	0.209 (Jackknife)
<b><i>P. tenuifila</i></b> (n=21, n° de loci=165)			
Wright ( $F_{st}$ )	0.164	1.3	p<0.0001
Weir & Cockerham ( $\theta$ )	0.187	1.1	0.178 (Jackknife)
<b><i>P. caerulea vs. P. tenuifila</i></b> (n=50, n° de loci=182)			
Wright ( $F_{st}$ )	0.143	1.5	p<0.0001
Weir & Cockerham ( $\theta$ )	0.352	0.5	0.356 (Jackknife)

Os resultados da variação intrapopulacional e interpopulacional estão apresentados na tabela 7. Os dados indicam que a variação da porcentagem de loci polimórficos (P%) dentro das subpopulações de *P. caerulea* foi bastante heterogênea, oscilando desde  $\approx 52\%$ , para a subpopulação da Serra Geral (SG), até  $\approx 19\%$ , para a Campanha Gaúcha (CA). A mesma razão pode ser observada em relação aos índices médios

de heteroziguidade ( $H_e$ ) e diversidade de Shannon ( $I_{sh}$ ), sendo que SG apresentou os maiores valores; enquanto CA apresentou os menores índices. Curiosamente, os desvios padrões (sd) obtidos para as seis diferentes subpopulações foram bastante próximos, tanto para  $H_e$  como para  $I_{sh}$ , indicando que a variância dos indivíduos próximos à média é bastante homogênea nos diferentes locais. Outro fato interessante, é que as subpopulações de *P. caerulea* são, em média, apenas 27,45% diversas entre si, sendo que a grande maioria dos loci ( $\approx 70\%$ ) são polimórficos entre as subpopulações e a heteroziguidade calculada foi 17,37% ( $\pm 17,62\%$ ).

Tabela 7: Índices populacionais calculados para as subpopulações e populações de *P. caerulea* e *P. tenuifila*. A primeira coluna indica o nível populacional analisado (variação intraespecífica ou interespecífica), as demais colunas contêm os valores calculados para os índices descritos na tabela.

Espécie/População	Porcentagem de loci polimórficos (P%)	Heteroziguidade de Nei esperada ( $H_e$ )	Índice de Shannon ( $I_{sh}$ )
<b><i>P. caerulea</i> (n=28, n° de loci=182)</b>			
Campanha (CA)	18.68	0.0774 $\pm$ 0.1619 (sd)	0.1130 $\pm$ 0.2363 (sd)
Depressão Central (DC)	39.01	0.1285 $\pm$ 0.1795 (sd)	0.1959 $\pm$ 0.2623 (sd)
Planície Costeira (PC)	27.47	0.0939 $\pm$ 0.1636 (sd)	0.1426 $\pm$ 0.2413 (sd)
Planalto Meridional (PL)	24.18	0.1001 $\pm$ 0.1778 (sd)	0.1462 $\pm$ 0.2596 (sd)
Serra Geral (SG)	51.65	0.1512 $\pm$ 0.1834 (sd)	0.2337 $\pm$ 0.2635 (sd)
Serra do Sudeste (SS)	19.23	0.0755 $\pm$ 0.1633 (sd)	0.1106 $\pm$ 0.2343 (sd)
<b>População total</b>	<b>70.88 (129)</b>	<b>0.1737 <math>\pm</math> 0.1762 (sd)</b>	<b>0.2745 <math>\pm</math> 0.2501 (sd)</b>
<b><i>P. tenuifila</i> (n=21, n° de loci=165)</b>			
Depressão Central (DC)	48.48	0.1583 $\pm$ 0.1900 (sd)	0.2402 $\pm$ 0.2748 (sd)
Planície Costeira (PC)	30.30	0.1219 $\pm$ 0.1928 (sd)	0.1784 $\pm$ 0.2767 (sd)
Planalto Meridional (PL)	39.39	0.1367 $\pm$ 0.1878 (sd)	0.2058 $\pm$ 0.2719 (sd)
Serra Geral (SG)	09.70	0.0407 $\pm$ 0.1236 (sd)	0.0594 $\pm$ 0.1805 (sd)
<b>População total</b>	<b>67.58 (123)</b>	<b>0.1808 <math>\pm</math> 0.1875 (sd)</b>	<b>0.2803 <math>\pm</math> 0.2641 (sd)</b>
<b><i>P. caerulea</i> vs. <i>P. tenuifila</i> (n=50, n° de loci=182)</b>			
<b>População total</b>	<b>95.60 (174)</b>	<b>0.2249 <math>\pm</math> 0.1697 (sd)</b>	<b>0.3564 <math>\pm</math> 0.2260 (sd)</b>

Para as subpopulações de *P. tenuifila*, a estrutura evidenciada pelo cálculo dos diferentes índices mostrou uma certa peculiaridade. Para as subpopulações da Depressão Central (DC), Planície Costeira (PC) e Planalto Meridional (PL), os índices foram, em média, relativamente altos; enquanto que para a subpopulação da Serra Geral (SG), os índices foram muito baixos. O valor de P% demonstra claramente esta situação: 9,10% dos loci foram polimórficos. O índice  $H_e$  mostra que a população SG tem cerca de 5% de heteroziguidade, enquanto que  $I_{sh}$  indica a baixa diversidade da população ( $\approx 6\%$  do total). Assim como para *P. caerulea*, *P. tenuifila* apresentou um pequeno grau de diversidade dentro da população (cerca de 28%), sendo que a variação intraespecífica, evidenciada pela porcentagem de loci polimórficos, foi bastante elevada (67,58%) e a heteroziguidade estimada em torno de 18% ( $\pm 18,75\%$ ).

Para a variação interespecífica, os resultados obtidos indicam que a variação global dentro da

população de cada uma das espécies não é significativamente diferente. Contudo, esta similaridade não se deve a um alto grau de semelhança genética entre ambas para os mesmos *loci*, mas ao fato que a diversidade genotípica geral de cada grupo é semelhante. Assim, em termos gerais, tem-se que a incidência de *loci* polimórficos entre as duas populações é extremamente alta ( $\approx 95\%$ ), apesar da diversidade entre as duas populações ficar em torno de 36% e a heterozigosidade média esperada ser equivalente a 22,49%.

A correlação entre as distâncias geográficas e genéticas (teste de Mantel) pode ser observada na tabela 8. A análise indica que não houve relação estatisticamente significativa entre a variação genética observada e as distâncias geográficas calculadas, tanto para as populações de *P. caerulea* como para *P. tenuifila*. Contudo, quando as duas espécies são analisadas em conjunto, uma correlação positiva entre as variações genéticas e geográficas é encontrada ( $r = 0,1186$ ;  $p < 0,025$ ).

Tabela 8: Resultados do teste de Mantel, considerando as variações genéticas e geográficas de 28 indivíduos *P. caerulea* e de 22 *P. tenuifila* (n=50) amostrados.

Comparação	Coefficiente de Correlação ( r )	Probabilidade
<b><i>P. caerulea</i></b>		
Dist. Genética vs. Dist. Geográfica	0,1339	$p > 0,05$
<b><i>P. tenuifila</i></b>		
Dist. Genética vs. Dist. Geográfica	0,0998	$p > 0,05$
<b><i>P. caerulea</i> / <i>P. tenuifila</i></b>		
Dist. Genética vs. Dist. Geográfica	0,1186	$0,01 < p < 0,025$

Com se trata de uma correlação positiva, pode-se dizer que quanto mais distantes forem os indivíduos, menos parecidos geneticamente eles serão, já que a variação geográfica esteve diretamente relacionada à variação genética. Calculando o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), encontra-se que somente 1,42% da variação genética encontrada pode ser explicada pela distância geográfica ( $r^2 = 0,01406$ ). Em função do valor baixo de  $r^2$ , que não indica grande diferença genética em termos geográficos, estes resultados devem ser considerados com cuidado.

Como existem dois "sinais" interferindo um no outro (a distância geográfica e a filogenia) só poderiam ser misturados os dados de ambas espécies, com algum valor informativo, se fosse assumido que o fato de um indivíduo ser *P. caerulea* ou ser *P. tenuifila* não interfere no padrão de bandas, e que apenas a geografia sofre variação. Isto não é válido, uma vez que os dados de distância genética utilizados para a construção do dendrograma separam claramente, e com grande valor de suporte, os grupos formados por

cada uma das espécies estudadas. Sendo assim, a correlação positiva encontrada não passa de um resultado casual e não informativo.

## 5. DISCUSSÃO:

### 5.1. Filogenia Molecular vs. Morfologia

A complexidade dentro do gênero *Passiflora* é alta, o que dificulta a classificação sistemática baseada somente em caracteres morfológicos. Os resultados aqui apresentados concordam com esta observação, pois demonstraram que, para a análise das espécies do RS, as relações filogenéticas ficam pouco resolvidas quando apenas dados morfológicos são considerados (figura 4).

Contudo, comparações morfológicas que considerem um grande número de caracteres também são problemáticas e podem mascarar as verdadeiras relações de descendência/ancestralidade entre grupos muito relacionados, causando inconsistências (de Queiroz *et al*, 1995). Os problemas podem surgir quando se comparam características que não apresentam importância evolutiva ou que sejam convergentes (Hillis, 1996). Um exemplo deste aspecto, é o valor taxonômico atribuído ao formato da folha dentro de *Passiflora*; este critério, que é um dos aspectos fundamentais para a constituição de uma série, não necessariamente indica as relações evolutivas entre as espécies consideradas.

O caso de *P. actinia* e *P. elegans* é um bom exemplo. Estas duas espécies estão classificadas em séries distintas (Simplicifolia e Lobatae, respectivamente), o que pressupõe uma certa distância filogenética, caso o critério adotado para a separação esteja correto. No entanto, os resultados de análises moleculares (Lorenz, 2000; Muschner, 2001) e observações morfológicas, ecológicas e genéticas (Lorenz, 2002) indicam grande similaridade entre as espécies.

Apesar dos problemas inerentes à metodologia de análise, a morfologia comparada constitui uma poderosa ferramenta para resolver problemas evolutivos, principalmente quando aliada à biologia molecular (ver item 1.4.1). Ela constitui um método extremamente confiável, desde que sejam escolhidos os caracteres corretos para a análise e que lhes sejam atribuídos os pesos corretos. A comparação morfológica aqui apresentada, aliada aos resultados moleculares anteriormente obtidos por Muschner (2001) e Lorenz (2002), fornece subsídios bastante significativos para a proposição de uma nova classificação para, pelo menos, parte do gênero *Passiflora*, especialmente no que se refere a seções e

subgêneros (Freitas *et al.*, 2002; Muschner *et al.*, 2002).

## 5.2. Ecologia vs. Distribuição

Os resultados obtidos com os dados ecológicos apontam para fatos interessantes. Em uma primeira análise, olhando a variável climática 'temperatura média', os dados sugerem que *P. caerulea* tenderia a ocorrer em regiões onde o clima é mais ameno, enquanto que *P. tenuifila* estaria preferencialmente distribuída em zonas de temperaturas mais elevadas.

Porém, considerando os resultados de uma forma combinada envolvendo as demais variáveis, a análise indica algo distinto: *P. tenuifila* estaria relacionada a climas mais constantes do que *P. caerulea*, onde a temperatura é menos variável (amplitude térmica), a umidade mais constante ao longo do ano (nº de meses úmidos), as chuvas são melhor distribuídas (nº de meses úmidos vs. nº de meses chuvosos) e onde a água não é tão facilmente perdida (índice de aridez de Knoche vs. evaporação).

Curiosamente, este fator é confirmado pela análise do tipo de clima, indicando que *P. tenuifila* não está associada ao clima Cfb. Este clima é encontrado nos Campos de Cima da Serra (porção leste do Planalto Meridional), parte da Serra Gaúcha e algumas porções da Serra do Sudeste, sendo definido por ter verões quentes, épocas sempre úmidas e invernos frios. Esta variação ambiental sazonal poderia prejudicar a sobrevivência de *P. tenuifila* nestas regiões.

Este aspecto é também evidenciado pelo fato de que as variâncias de oito variáveis climáticas quantitativas diferem significativamente entre as duas espécies (tabela 3). Assim, de um modo geral, poder-se-ia supor que *P. caerulea* apresenta características mais tolerantes e menos especialistas em relação às variações climáticas quando comparada com *P. tenuifila*. Isto é reforçado por observações de campo, que evidenciam a extrema capacidade (ruderal) de colonizar ambientes degradados, alterados e sujeitos a modificações bruscas de *P. caerulea*. Esta capacidade parece ser mais reduzida em *P. tenuifila*.

Apesar desta evidência, certos cuidados devem ser tomados ao se considerar esta conclusão como definitiva. Muitas das variáveis estudadas podem detectar aspectos do clima que são semelhantes (p/ ex. umidade relativa do ar, dias de chuva, índices de precipitação). Estes aspectos podem constituir sinais ambientais correlacionados que influenciam a análise, pois detectam as mesmas características do clima através de índices distintos. Assim, diferentes variáveis que são correlacionadas podem estar indicando aspectos climáticos únicos, já que o que sinal apontado por uma variável pode estar sendo detectado

também por outra.

Observando as regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul, onde a distribuição de ambas as espécies foi prevista (figura 6), tem-se também uma evidência extra da influência ambiental sobre suas preferências ecológicas. *P. tenuifila* ocorre em zonas mais próximas ao mar, onde a oceanidade mantém o clima mais equilibrado, e na porção nordeste do Estado, onde o clima é quente praticamente o ano todo. Exceções também podem ser identificadas. Este é o caso da ocorrência de algumas plantas de *P. tenuifila* na Serra Gaúcha e na Serra do Sudeste, onde o clima é tipicamente Cfb.

Seja como for, os fatores físicos condicionados pelo ambiente são importantes para o bem estar e sobrevivência dos organismos no meio, determinando sua distribuição natural. Como as plantas possuem condições internas diferentes das externas, mantendo-as ao custo de altas taxas energéticas, as mudanças ambientais podem invadir o espaço interno e alterar o funcionamento do mesmo. Porém, este funcionamento é plástico, podendo responder às mudanças ambientais dentro de um intervalo de sobrevivência confiável, que não precisa, necessariamente, ser o ótimo (Ricklefs, 1996).

O que determina o ótimo ecológico é variável de espécie para espécie, e tem a ver com a velocidade de funcionamento interno e com os mecanismos de resposta/defesa apresentado por cada uma delas. Estes mecanismos são medidos em termos de custo/benefício (Odum, 1983; Ricklefs, 1996) para a planta, e podem ser cruciais para a seletividade/tolerância dos organismos sob as adversidades do ambiente.

### 5.3. Diversidade Genética

Convém ressaltar que algumas observações de campo sugerem que *P. caerulea* apresenta, geralmente, tamanhos populacionais mais elevados do que *P. tenuifila* (dados não apresentados), destacando que a estrutura populacional da primeira espécie se aproxima mais do modelo teórico utilizado. Esta diferenciação poderia ter algum valor adaptativo regional, dada as diferenciações climáticas e edáficas encontradas no Rio Grande do Sul. Contudo, estes dados devem ser considerados com cuidado, já que muitos dos grupos analisados podem não apresentar uma distribuição nos padrões previstos pelo modelo de ilhas, tendo, na verdade, uma distribuição aproximadamente contínua no Estado.

Outras evidências de campo reforçam este fato, como a presença de um grande banco de sementes e plântulas de *Passiflora* localizadas debaixo de árvores que oferecem frutos comestíveis e são

comumente visitadas por aves (p/ ex. *Eugenia spp* (Mirtaceae) e *Ficus spp.* (Moraceae)). Estes animais teriam assim um importante papel na dispersão das semente de *Passiflora*, indicando a importância do mecanismo de dispersão de semente a longas distâncias (migrações) para o grupo (Cain et al, 2000; Nathan & Muller-Landau, 2000). Por outro lado, estes dados geram um paradoxo que não pode ser explicado facilmente. Como pode uma espécie apresentar bancos genéticos dispersos, construídos por migrações de longa distância se as subpopulações aparentemente exibem uma estrutura mais localizada? Uma possibilidade é que, talvez, o fluxo gênico medido pelas estatísticas  $F$  represente dois sinais distintos: um oriundo da polinização e outro da dispersão das sementes. Ambos estão relacionados, já que uma semente só é gerada por um evento de polinização. Porém o estabelecimento de plantas adultas, oriundas de sementes dispersas a longas distâncias, poderia ser dificultado por um coeficiente de seleção maior quanto maior fosse a distância percorrida pelo migrante. Assumindo que exista uma certa regionalização, devida a fatores adaptativos, isso poderia ser possível.

Outro ponto de abordagem interessante é o fato de que a taxa de sobrevivência de indivíduos que constituem um banco de sementes e plântulas é baixa (W. Mantovani, comunicação pessoal). Estreitamentos demográficos atuantes durante os estágios de recrutamento, que se seguem após a dispersão, causam uma alta taxa de mortalidade das sementes dispersas, das plântulas e das plantas adultas estabelecidas (Schupp 1990, 1993, 1995; Jordano & Herrera, 1995; Jordano & Godoy, 2000). Por consequência, a chance dos migrantes de participarem da população efetiva local também é pequena, já que dificilmente sobreviverão para produzirem sementes ou pólen. Os sobreviventes, por sua vez, poderiam contribuir com seus genes para a população local, mas pouco, devido a dois possíveis motivos: (1) estariam em pequeno número, tendo uma pequena influência genética; e (2) teriam baixas chances de terem seu pólen e sementes dispersos, já que seriam raros para os polinizadores e também porque que as aves visitantes preferencialmente comeriam os frutos presentes nas árvores.

Assim, os valores obtidos pelas estatísticas  $F$  e pela árvore filogenética não estariam refletindo a interferência dos indivíduos migrantes. Dentro do possível, as evidências apontam que existe uma estruturação em metapopulações, que, apesar de serem fragmentadas, compõe uma estrutura mais complexa quando analisadas sob um ponto de vista mais amplo.

#### 5.4. Considerações Históricas

O Brasil, como um todo, apresenta uma flora essencialmente tropical. O sul do Brasil também, embora haja uma participação notável de elementos temperados no Planalto Meridional.

No Rio Grande do Sul a flora temperada concentra-se nas altitudes maiores do Planalto Meridional, com um foco secundário na Serra do Sudeste (escudo cristalino). Nestas áreas, o elemento temperado mistura-se com elementos tropicais de altitude (orófilos), com centros de riqueza nos Andes tropicais ou no Brasil Central, além de elementos neotropicais de ampla distribuição. Diversos gêneros apresentam distribuição disjunta em relação aos Andes, sugerindo a existência de paleocaminhos de migração ou eventos bem sucedidos de dispersão a longa distância (Rambo, 1948, 1951, 1958).

O Rio Grande do Sul, apesar da situação tipicamente subtropical, possui uma flora predominantemente tropical, embora empobrecida em relação aos Estados brasileiros mais setentrionais. A flora tropical concentra-se sobretudo no Litoral Norte e no Alto Uruguai. Estas regiões podem ser consideradas como verdadeiras frentes de contato com elementos tropicais costeiros (atlânticos) e do interior (Paraná-uruguayos), respectivamente. Mais ao sul, nas matas de encosta da Serra Geral e da Serra do Sudeste, a mistura destes dois elementos forma uma combinação florística tipicamente sul-riograndense. Isso representa, também, o limite meridional de muitos *taxa* florestais (Rambo, 1950, 1960, 1961).

O gênero *Passiflora* é tipicamente um grupo de plantas tropicais, como já descrito anteriormente (ver item 1.2). Como a flora tropical pode ser entendida como o conjunto de *taxa* endêmicos ou centrados em regiões de baixas latitudes (apesar de não serem muito homogêneas), elas podem ser diferenciadas segundo vários regimes hídricos e também em diferentes regimes térmicos (Waechter, 1998 e 2000). Assim, pode-se falar de floras tropicais higrófilas, orófilas e xerófilas, que tendem a se concentrar, respectivamente, em florestas, montanhas e savanas.

A distribuição de *taxa* tropicais muitas vezes não se restringe aos trópicos propriamente, mas se estende também para regiões subtropicais e mesmo temperadas. Neste caso, quase sempre ocorre uma redução acentuada na riqueza específica e sua ocorrência fica, muitas vezes, restrita a planícies ou terras baixas, onde as médias de temperaturas são mais elevadas (Waechter, 2000). A origem ou afinidade tropical, portanto, pode ser reconhecida por gradientes de diversidade decrescente no sentido norte-sul, quando se considera o hemisfério meridional.

Este fato é comprovado quando se observa a riqueza específica do gênero *Passiflora* que ocorre no

Brasil. No centro geográfico do Brasil (regiões Sudeste e Centro-Oeste), existem algumas dezenas ou centenas de espécies de ocorrência natural (Cervi, 1997), enquanto que no Rio Grande do Sul, extremo sul do limite da flora Neotropical (Waechter, 1998), ocorrem somente 15 espécies (Mondin, 2001) (item 1.5.4). Levando em conta os fatores históricos dos contingentes migratórios (item 1.5.3), poder-se-ia considerar que as populações das diferentes espécies de *Passiflora* presentes no Estado surgiram após a expansão meridional da vegetação tropical, que migrou do norte. É de se supor, então, que os indivíduos que constituíram as primeiras populações de *P. caerulea* e *P. tenuifila* colonizaram o Estado a partir de dois locais preferenciais: o Alto Uruguai (noroeste) e a “porta de Torres” (nordeste). Assim, as populações das duas espécies presentes atualmente nas diversas regiões do Estado teriam sido originadas de um processo dispersivo ocorrido no decorrer da última era geológica. Este processo não chegou ao seu fim, mas continua até os dias de hoje.

## 6. BIBLIOGRAFIA:

- \_\_\_\_\_. 2000. **Atlas 2000: A Nova cartografia do Mundo**. Nova Cultural. São Paulo, SP.
- AGUIRRE-PLANTER, E.; FURNIER, G.R. & FIGUARTE, L.E. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. **Am. J. Bot.** **87** (3): 362-371.
- ANDRADE-LIMA, D. 1966. Vegetação. In: **Atlas nacional do Brasil**. Rio de Janeiro, IBGE. 2-11.
- ANDREASEN, K. & BREMER, B. 2000. Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data. **Am. J. Bot.** **87**(11): 1731–1748.
- ARAFEH, R.M.H.; SAPIR, Y.; SHMIDA, A.; IRAKI, N.; FRAGMAN, O. & COMES, H.P. 2002 Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (*Iris* sect. *Oncocyclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank. **Mol. Ecol.** **11**: 39 - 53.
- AYLIFFE, M.A.; LAWRENCE, G.J. & ELLIS, J.G. 1994. Heteroduplex Molecules Formed Between Allelic Sequences Cause Nonparental RAPD Bands. **Nucleic Acids Res.** **22**: (9) 1632-1636.
- AYRES, D.R. & RYAN, F.J. 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. **Am. J. Bot.** **86** (3): 344-353.
- BELL, C.D. & PATTERSON, R.W. 2000. Molecular phylogeny and biogeography of *Linanthus*

- (Polemoniaceae) **Am. J. Bot.** **87** (12): 1857-1870.
- BARRETO, I. 1973. Vegetação. In: LEMOS, R.C. **Levantamento de reconhecimento dos solos do estado do Rio Grande do Sul**. Boletim Técnico no. 30, Ministério da Agricultura. Recife. 431p.
- BETTIOL, A. I. & MASLAK, M.I.G. 1983. **Programa de reflorestamento estadual**. SRN/RS. Porto Alegre.
- BETTO, G. 1982. **Il frutti tropicali in Italia**. Ec Rizzoli. Milão. 269p
- BLACK, B. 1997. **RAPDFST 4.0.1: A FORTRAN Program to estimate F(st) and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files**. Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins. USA. (meio eletrônico: <ftp://lamar.colostate.edu/pub/wcb4/>).
- BRADY, N. C. 1989. **Natureza e propriedades dos solos**. Ed. Freitas Bastos, Rio de Janeiro. 7ª.ed. 878 p.
- CAIN, M.L.; MILLIGAN, B.G. & STRAND, A.E. 2000. Long-distance seed dispersal in plant populations. **Am. J. Bot.** **87** (9): 1217-1227.
- CERVI, A.C. 1997. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** **45**: 1-92.
- CULLEY, T.M.; WALLACE, L.E.; GENGLER-NDWAK, K.M. & CRAWFORD, D.J. 2002. A comparison of two methods of calculating  $G_{st}$ , a genetic measure of population differentiation. **Am. J. Bot.** **89** (3): 460-465.
- DARWIN, C. 1959. **The origin of species**. New York : Random House, 689 p. (reimpressão de 1993).
- DE MELO, N.F.; CERVI, A.C. & GUERRA, M. 2001. Karyology and citotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant. Syst. Evol.** **226**: 69-84.
- DE QUEIROZ, A.; DONOGHUE, M.J. & KIM, J. 1995. Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. **Annu. Ver. Ecol. Syst.** **26**: 657-681.
- ESCOBAR, L.K. 1988. Passifloraceae. **Flora de Colombia**. **10**: 1-138. Univ. Nac. de Colombia.
- ESSELMAN, E.J.; CRAWFORD, D.J.; BRAUNER, S.; STUESSY, T.F.; ANDERSON, G.J. & O. SILVA, M. 2000. RAPD marker diversity within and divergence among species of *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae). **Am. J. Bot.** **87** (4): 591-596.
- ELLSWORTH, D.L.; RITTENHOUSE, K.D. & HONEYCUTT, R.L. 1993. Artifactual Variation In Randomly Amplified Polymorphic Dna Banding-Patterns. **Biotechniques** **14**: (2) 214-&.
- FAGUNDES, N.J.R.; BONATTO, S.L.; CALLIGARI-JACQUES, S.M. & SALZANO, F.M. 2002. Genetic, Geographic, and linguistic variation among south American Indians: possible Sex influence. **Am. J. Phys. Anthropol.** **117**: 68-78.
- FISCHER, M. & MATTHIES, D. 1998. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). **Am. J. Bot.** **85** (6): 811-819.

- FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; LIMPUS, C.J.; POPE, L & PRINCE, R. 1997. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. **Genetics** **147**(4): 1843-1854
- FREITAS, L.B.; MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; MEGA, N.O. & SALZANO, F.M. 2002. Filogenias molecular e morfológica das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul. In: MOREIRA, G.R.P. & MONDIN, C.A. (org ). **Passiflora do Rio Grande do Sul**. Ed. da Universidade, UFRGS, Porto Alegre (livro no prelo).
- FUTUYMA, D. J. 1992. **Biologia evolutiva**. SBG/CNPq. Ribeirão Preto. 2 ed. 631p.
- GILBERT, L. E. 1971. Butterfly- plant coevolution: has *Passiflora adenopoda* won the selection race with Heliconiine butterflies? **Science** **172**: 585-586.
- GILBERT, L. E. 1983. Coevolution and mimicry. In D. J. Futuyama and M. Slatkin (eds.), **Coevolution**. Sinauer Ass. Sunderland, Massachusetts. pp. 263-281
- HAECKEL, E. 1866. **Generelle morphologie der organismen: allgemeine grundzüge der organischen formen-wissenschaft mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte descendenz-theorie**. Georg Riemer, Berlin.
- HANSEN, K.T.; ELVEN, R. & BROCHMANN, C. 2000. Molecules and morphology in concert: tests of some hypotheses in artic *Potentilla* (Rosaceae). **Am. J. Bot.** **87** (10): 1466-1479.
- HADRYS, H.; BALICK, M. & SCHIERWATER, B. 1992. Applications os random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.** **1**: 55-63.
- HEDRICK, P. 1992. Shooting the RAPDs. **Nature** **355**: 679-680.
- HEIBEL, E.; LUMBSCH, H.T. & SCHMITT, I. 1999. Genetic variation of *Usnea filipendula* (Parmeliaceae) populations in western Germany investigated by RAPDs suggests reinvasion from various sources. **Am. J. Bot.** **86** (5): 753-757.
- HENNIG, W. 1966. **Phylogenetic Systematic**. Urbana 111: University of Illinois Press. Illinois, USA.
- HILLIS, D.M. 1996. Inferring complex phylogenies. **Nature** **383**: (6596) 130-131
- IRGANG, B.E. 1983. A situação florestal do Rio Grande do Sul. **R. Serv. Públ.** **111** (4): 33-35.
- JORDANO, P. & GODOY, J.A. 2000. RAPD variation and populational genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal dispersed tree. **Mol. Ecol.** **9**: 1293-1305.
- JORDANO, P. & HERRERA, C.M. 1995. Shuffling the offspring: uncounting and spatial discordance of multiple stages in vertebrate seed dispersal. **Ecoscience** **2**: 230-237.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. 1999. **Plant systematics: A**

- phylogenetic approach.** Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Massachusetts. 278-280.
- KILLIP, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. **Publ. Field Mus. Bot. Ser. 19:** 1-613.
- KIMURA, M. 1981. Possibility of extensive neutral evolution under stabilizing selection with special reference to non-random usage of synonymous codons. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A, 78:** 5773-5777.
- KIMURA, M. 1982. The neutral theory as a basis for understanding the mechanisms of evolution and variation at the molecular level. *In*. M. Kimura (ed.) **Molecular evolution, protein polymorphism, and the neutral theory.** Springer-Verlag, Berlin.
- LAMARK, J.B. 1809. **Philosophie Zoologique** Paris, Dentier.
- LANDER, E.S. 1989. DNA fingerprinting on trial. **Nature 339 (6225):** 501-505.
- LEITE, P.F. 1995. As diferentes unidades fitoecológicas da região Sul do Brasil - proposta de classificação. **Cad. Geoc., 15:** 73-164.
- LEITE, P.F. & KLEIN, R.M. 1990. Vegetação. *In*: **Geografia do Brasil; Região Sul.** IBGE. Rio de Janeiro. v.2. 113-150.
- LEWONTIN, R.C. 1966. Is nature probable or capricious? **BioScience 16:** 25-27.
- LEWONTIN, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. **Evol. Biol. 6:** 381-398.
- LEWONTIN, R.C. & HUBBY, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations II: Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophyla pseudoobscura*. **Genetics 54:** 594-609
- LEWONTIN, R.C. & GOULD, S.J. 1979. Spandrels Of San-Marco And The Panglossian Paradigm - A Critique Of The Adaptationist Program. **P. Roy. Soc. Lond. B. Bio. 205:** (1161) 581-598.
- LIEDLOFF, A. 1999. **MANTEL v2.0: nonparametric test calculator for windows.** School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia. (meio eletrônico: <http://www.sci.qut.edu.au/NRS/mantel.htm>)
- LINDMAN, C.A.M. 1906. **A vegetação no Rio Grande do Sul.** Livraria Universal. Porto Alegre. 356p. (reed. 1974).
- LORENZ, A.P. 2000. Análise de seqüências de cpDNA e seu papel na reconstrução filogenética do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). Dissertação Bacharelado, Curso de Ciências Biológicas. UFRGS. Porto Alegre. 19 p.
- LORENZ, A.P. 2002 **Relações evolutivas entre *Passiflora actinia* Hooker e *Passiflora elegans* Masters (Passifloraceae).** Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Porto Alegre. 95 p.

- LYNCH, M. 1990. The Similarity Index and DNA Fingerprinting. **Mol. Biol. Evol.** 7: (5) 478-484.
- MACDOUGAL, J.M. 1994. Revision of *Passiflora* subgenus Decaloba section Pseudodysosmia (Passifloraceae). **Systematics Botany Monographs** 41: 1-146.
- MACDOUGAL, J.M. & FEUILLET, C. 2001. A new infrageneric classification of *Passiflora* with nomenclator. (lino prelo).
- MACDOUGAL, J.M. & JØRGENSEN, P.M. 2001. Passifloraceae: Depiction of a special poster included in the Missouri Botanical Garden 2001 Calendar. In: **Missouri Botanical Garden 2001 Calendar** Missouri Botanical Garden Press. St. Louis (divulgação eletrônica: [ridgwaydb.mobot.org/mobot/passifloraceae/](http://ridgwaydb.mobot.org/mobot/passifloraceae/))
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Res.** 27: 209-220.
- MATIOLE, S.R. 2001. **Biologia Molecular e Evolução**. Ed. Holos, Ribeirão Preto.
- MAYR, E. 1983. Speciation and Macroevolution. **Interciencia** 8: (3) 133-142.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, ECPC, ESCRITÓRIO DE METEOROLOGIA. 1969. **Atlas Climatológico do Brasil: reedição de mapas selecionados**. Rio de Janeiro.
- MOHRDIECK, K.H. 1980. Formações campestres do Rio grande do Sul. In.: FARSUL. Seminários sobre pastagens: "de que pastagens necessitamos?". FARSUL, Porto Alegre. 18-27.
- MONDIN, C.A. 2001. *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. **Pesquisas Botânica** 51: 147-150
- MOSER, J.M. 1990. Solos. In: **Geografia do Brasil: Região Sul**. Rio de Janeiro: IBGE.
- MULLIS, K.B. & FALOONA, F.A. 1987. Specific Synthesis Of Dna Invitro Via A Polymerase-Catalyzed Chain-Reaction. **Method. Enzymol.** 155: 335-350.
- MUSCHER, V.C. 1998. **Análise filogenética das seqüências ITS1 e ITS2 em duas formas morfológicas de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae)**. Dissertação Bacharelado, Curso de Ciências Biológicas. UFRGS. Porto Alegre. 28 p.
- MUSCHER, V.C. 2001. **Análise filogenética comparada entre três marcadores de DNA no gênero *Passiflora* (Passifloraceae)**. Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Porto Alegre, 93 p.
- NATHAN, R. & MULLER-LANDAU, H.C. 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinates and consequences for recruitment. **Trends in Ecology and Evolution** 15(7): 278-285.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590.

- NEI, M & LI, W.H. 1979. Mathematical-Model For Studying Genetic-Variation In Terms Of Restriction Endonucleases. **P. Natl. Acad. Sci. USA** 76: (10) 5269-5273.
- ODUM, E. P. 1985. **Ecologia**. Interamericana. Rio de Janeiro. 434 p.
- OUEDRAOGO, J.T.; GOWDA, B.S.; JEAN, M. CLOSE, T.J.; EHLERS, J.D.; HALL, A.E.; GILLASPIE, A.G.; ROBERTS, P.A.; ISMAIL, A.M.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M.P. & BELZILE, F.J. 2002. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome** 45 (1): 175-188.
- PERÉZ, T.; ALBORNOZ, J. & DOMINGUEZ, A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Mol. Ecol.** 7 (10):1347-1357
- PORTO, M.L. 1978. Classificação da vegetação do Rio Grande do Sul. In: GARCIA, I.S., ALVES, Y.M.B. & TEIXEIRA, M.B. **Vegetação atual da Região Sul**. SUDESUL. Porto Alegre. 108p.
- PORTO, M.L. & MENEGAT, R. 2002. **Landscape and vegetation of the southern Brazilian coast and meridional plateau (with field guide)**. IAVS, UFRGS, Porto Alegre. 66 p.
- RAMBO, B. 1942. **A fisionomia do Rio Grande do Sul**. Imprensa Oficial. Porto Alegre. 360p. (reeds. 1956, 1994).
- RAMBO S.J., B. 1950. A porta de Torres. **Sellowia** 2: 125-136.
- RAMBO S.J., B. 1951. A imigração da selva higrofila do Rio Grande do Sul. **Sellowia** 3: 55-91.
- RAMBO S.J., B. 1954. A história do litoral riograndense. **Sellowia** 6: 113-172.
- RAMBO S.J., B. 1956. **A fisionomia do Rio Grande do Sul**. Livraria Selbach. Porto Alegre. 458p. (reed. 1994, Ed. Unisinos, São Leopoldo)
- RAVEN, P.H. 1996. **Biologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 728 p.
- RICKLEFS, R.E. 1996. **A economia da natureza**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 472 p.
- RIEDY, M.F.; HAMILTON, W.J. & AQUADRO C.F. 1992. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD-PCR. **Nucleic Acids Res.** 20 (4): 918-918.
- ROMARIZ, D. 1974. **Aspectos da vegetação do Brasil**. IBGE. Rio de Janeiro. 60p.
- ROY, A.; FRASCARIA, N.; MACKAY, J. & BOUSQUET, J. 1992. Segregatin random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theor. Appl. Genet.** 85: 173-180.
- SACCO, J.C. (1980) **Flora Ilustrada Catarinense: Passifloráceas**. EMBRAPA. Itajaí. 130 p.
- SÁNCHEZ, I.; ANGEL, F.; GRUMM, M; DUQUÊ, M.; LOBO, M.; TOHME, J. & ROCA, W. 1999. Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora* L. **Euphytica** 106: 15-26.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

- SCHIMPER, A.F.W. 1898. **Pflanzengeographie auf physiologischer Grundlage**. G. Fischer, Jena. 640 p.  
(reimpressão de 1947)
- SCHMIDT, G.J. & SCHILLING, E.E. 2000. Phylogeny and biogeography of Eupatorium (Asteraceae : Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data. **Am. J. Bot.** **87** (5): 716-726.
- SCHNABEL, A. & WENDEL, J.F. 1998. Cladistic biogeography of Gleditsia (Leguminosae) based on ndhF and rpl16 chloroplast gene sequences. **Am. J. Bot.** **85** (12): 1753-1765.
- SCHULTZ, A.R. 1957. Some phytogeographical and phytological data from Rio Grande do Sul. Den Haag, **Vegetatio Acto Botanica** **1**(5/6): 355-360.
- SCHUPP, E.W. 1990. Annual variation in seedfall, postdispersal seed predation, and recruitment of a neotropical tree. **Ecology** **71**: 504-515.
- SCHUPP, E.W. 1993. Quantity, quality, and the effectiveness of seed dispersal by animals. *In: Frugivory and seed Dispersal: Ecological and Evolutionary Aspects* (eds Fleming, T.H.; Estrada, A.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 15-29.
- SCHUPP, E.W. 1995. Seed-seedling conflicts, habitat choice, and patterns of plant recruitment. **Am. J. Bot.** **82**: 399-409.
- SCHWEDER, M.E.; SHATTERS, R.G. & WEST, S.H. 1995. Effect Of Transition Interval Between Melting And Annealing Temperatures On Rapid Analyses. **Biotechniques** **19**: (1) 38-42.
- SMALL, R.L.; RYBURN, J.A.; CRONN, R.C. SEELANAN, T. & WENDEL, J.F. 1998. The tortoise and hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **Am. J. Bot.** **85**: 1301-1315.
- SMITH, J.J.; SCOTT-CRAIG, J.S.; LEADBETTER, J.R.; BUSH, G.L.; ROBERTS, D.L. & FULBRIGHT, D.W. 1994. Characterization of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. **Mol. Phyl. Evol.** **3** (2): 135-145.
- STANFORD, A.M.; HARDEN, R. & PARKS, C.R. 2000. Phylogeny and Biogeography of *Junglans* (Junglandaceae) based on matK and ITS sequence data. **Am. J. Bot.** **87** (6): 872-882.
- STEWART, C.N. & EXCOFFIER, L. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). **J. Evolution. Biol.** **9**: (2) 153-171.
- SUN, M. & WONG, K.C. 2001. Genetic structure of tree orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **Am. J. Bot.** **88** (12): 2180 – 2188.

- SUNNUCKS, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. **Trends Ecol. Evol.** **15**: 199-203.
- SWOFFORD, D.L. 1998. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. (meio eletrônico: [//www.sinauer.com/Titles/frswofford.htm](http://www.sinauer.com/Titles/frswofford.htm))
- TAKHTAJAN, A. 1986. **Floristic regions of the world**. University of California Press. Berkeley. 522 p.
- TEIXEIRA, M.B. 1986. Vegetação. *In*: **Levantamento de recursos naturais**. IBGE. Rio de Janeiro. v.33. p. 541-620.
- VAN DE PEER, Y. & DE WACHTER, R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. **Comput. Applic. Biosci.** **10**, 569-570.
- VECCHIA, M. 2001. Il genere *Passiflora*. (meio eletrônico: [www.passiflora.it](http://www.passiflora.it))
- VELOSO, H.P. 1962. Os grandes climas do Brasil. I - Considerações sobre os tipos vegetativos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **60**(2):175-194.
- WAECHTER, J.L. 1998. Epiphytic orchids in eastern subtropical South America. **Proceedings of the 15<sup>th</sup> World Orchid Conference**, Rio de Janeiro, Brasil, p. 332-341.
- WAECHTER, J.L. 2000. **Princípios de fitogeografia**. UFRGS, Porto Alegre. 18p.
- WALTER, H. & STRAKA, H. 1970. *Arealkunde; floristisch-historische Geobotanik*. Stuttgart, Eugen Ulmer. 478 p.
- WEIBLEN, G.D. 2000. Phylogenetic relationships of functionally dioecious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology. **Am. J. Bot.** **87** (9): 1342 – 1357.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** **38**:1358-1370.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research** **18**: 6531-6535.
- WILLIAMS, K.S.; GILBERT, L.E. 1981. Insects as selective agents in plant vegetative morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. **Science** **212**: 467-469.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. **Genetics** **16**:97-159.
- WRIGHT, S. 1969. **Evolution and the genetics of populations. Vol. 2: The theory of gene frequencies**. University of Chicago Press, Chicago.
- YEH, F.; YANG, R.C. & BOYLE, T. 1997. **POPGENE**. The user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, CA. (meio eletrônico: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>)

7. APÊNCIDE

Apêndice 1: Caracteres e categorias utilizados na análise filogenética baseada em morfologia.

Caráter	Estado
<b>Ecologia</b>	
1. Hábito	0: rastejante; 1: herbácea; 2: escandente
2. Habitat	0: capoeiras; 1: bordo de mata; 2: interior de mata; 3: bordo e interior de mata; 4: capoeiras e bordo de mata
3. Floração	0: primavera; 1: verão; 2: outono; 3: primavera-verão; 4: verão-outono; 5: primavera-verão-outono; 6: inverno; 7: inverno-primavera; 8: inverno-primavera-verão; 9: todo o ano
4. Formação dos frutos	0: primavera; 1: verão; 2: outono; 3: primavera-verão; 4: verão-outono; 5: primavera-verão-outono; 6: inverno; 7: inverno-primavera; 8: inverno-primavera-verão; 9: todo o ano
5. Auto-compatibilidade	0: não; 1: sim
6. Polinizador	0: abelhas e vespas; 1: beija-flores; 2: morcegos; 3: outros
7. Crescimento	0: contínuo; 1: descontínuo
8. Capacidade ruderal	0: não; 1: sim
<b>Folhas</b>	
9. Número de lóbulos	0: um; 1: dois; 2: três; 3: mais de três
12.1. Formato dos lóbulos	0: linear ; 1: ovado; 2: oval; 3: oblongo; 4: agudo; 5: cordado; 6: orbicular; 7: deltóide
12.2. Ápice dos lóbulos	0: obtusos; 1: agudos; 2: mucronados; 3: aristados; 4: emarginados; 5: arredondados
13. Pecíolo foliar	0: ausente; 1: presente
14.1. Superfície peciolar	0: glabra; 1: pilosa
14.2. Número de nervuras	0: ausente; 1: uma; 2: duas; 3: três; 4: quatro; 5: cinco, 6: + de seis
16. Glândulas	0: ausentes 1: no limbo (ocelos); 2: no sinus e ápices; 3: no pecíolo; 4: no pecíolo e folhas
19. Bordo foliar	0: inteiro; 1: trabalhado
20. Textura	0: membranácea; 1: cartácea; 2: coriácea
21. Filotaxia	0: alterna; 1: oposta; 2: verticilada
22. Coloração	0: concolor; 1: discolor; 2: variegada
23. Superfície do limbo	0: glabra; 1: pilosa
<b>Estípulas foliares</b>	
24. Presença	0: não; 1: sim
25. Formato	0: ovais; 1: oblongas; 2: reniformes; 3: lineares; 4: outro;
27.2. Nervuras	0: ausente; 1: uma; 2: duas; 3: três; 4: mais de três
28. Ápice	0: obtuso; 1: agudo; 2: mucronado; 3: aristado; 4: acuminado
<b>Caule</b>	
29.1. Aspecto da seção transversal	0: cilíndrico; 1: sub-angulado; 2: angulado; 3: irregular
29.2. Aspecto da superfície	0: inteiro; 1: estriado ou sulcado; 2: alado
29.3. Resistência	0: sólida; 1: flexível
29.4. Coloração	0: não pigmentado; 1: pigmentos esverdeados; 2: pigmentos carotenóides; 3: pigmentos azul-arroxeados
<b>Pedúnculo floral</b>	
30. Resistência	0: delgado; 1: robusto – sólido
31. Articulações	0: ausentes; 1: presentes
32.1. Superfície	0: glabra; 1: pilosa

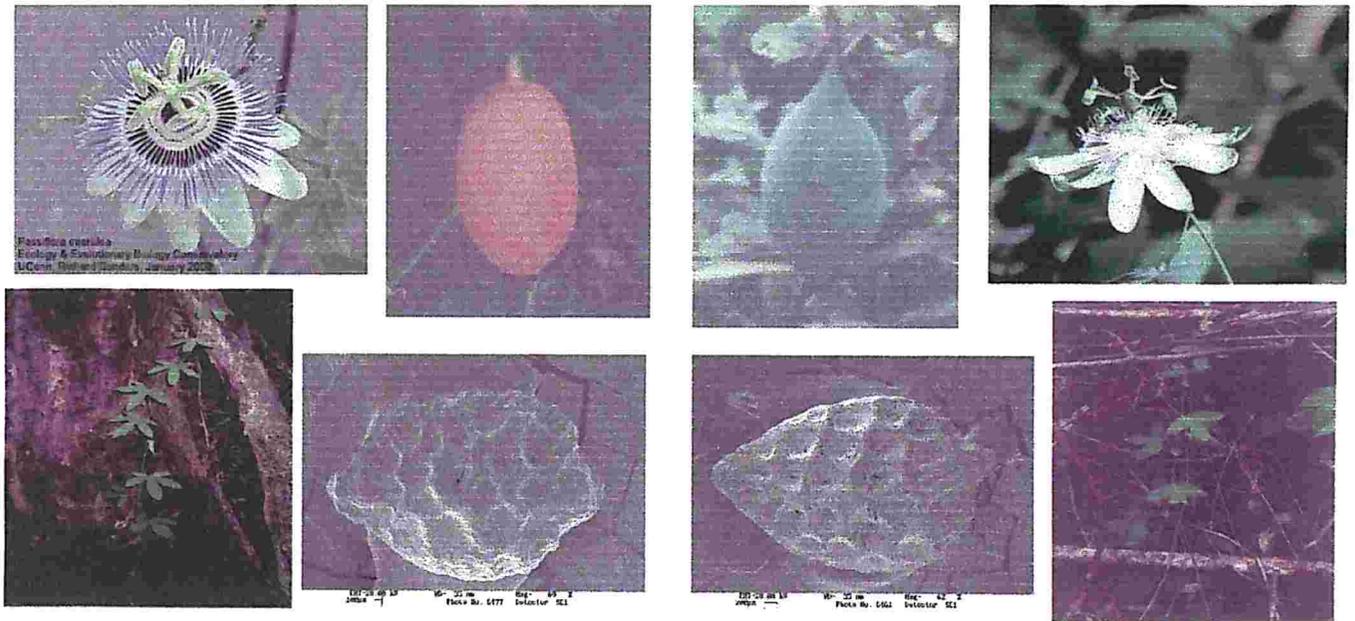
## Apêndice 1: (cont.)

32.2. Tipo	0: solitário; 1: aos pares; 2: solitários e aos pares
<b>Brácteas</b>	
33.1. Formato	0: linear ; 1: ovado; 2: oval; 3: oblongo; 4: agudo; 5: cordado; 6: sem brácteas; 7: setáceos
33.2. Ápice	0: obtuso; 1: agudo; 2: mucronado; 3: aristado; 4: sem brácteas
33.3. Nervuras	0: ausente; 1: presente; 2: sem brácteas
34. Coloração	0: concolor; 1: discolor; 2: variegada; 3: sem brácteas
35. Textura	0: membranácea; 1: cartácea; 2: coriácea; 3: sem brácteas
36.1. Superfície	0: glabra; 1: pilosa; 2: sem brácteas
36.2. Bordo	0: inteiro; 1: trabalhado; 2: sem brácteas
<b>Cálice</b>	
37. Formato do tubo	0: pateliforme 1: caliciforme; 2: tubular; 3: campanulado; 4: urceolado; 5: rotado; 6: ligulado
38. Formato das sépalas	0: linear ; 1: acicular; 2: ovado; 3: oval; 4: oblongo; 5: agudo; 6: lanceolado
39. Ápice das sépalas	0: obtuso; 1: agudo; 2: mucronado; 3: aristado
40. Textura das sépalas	0: membranácea; 1: cartácea; 2: coriácea
41. Coloração dorsal das sépalas	0: não pigmentada (branca); 1: pigmentos esverdeados; 2: pigmentos carotenóides; 3: pigmentos azul-arroxeados;
42. Coloração ventral das sépalas	0: não pigmentada (branca); 1: pigmentos esverdeados; 2: pigmentos carotenóides; 3: pigmentos azul-arroxeados;
43. Quilhas dorsais das sépalas (aristas)	0: ausentes; 1: presentes
44. Superfície das sépalas (dorsal)	0: glabra; 1: pilosa
45. Soldadura das sépalas	0: dialissépala; 1: gamossépala
46. Número de sépalas	0: zero; 1: três, 2: cinco, 3: mais que cinco
47. Superfície das sépalas (ventral)	0: glabra; 1: pilosa
<b>Corola</b>	
48. Formato das pétalas	0: linear ; 1: acicular; 2: ovada; 3: oval; 4: oblonga; 5: aguda; 6: lanceoladas; 7: sem pétalas
49. Ápice das pétalas	0: obtuso 1: agudo; 2: mucronado 3: aristado; 4: sem pétalas
50. Textura das pétalas	0: membranácea; 1: cartácea; 2: coriácea; 3: sem pétalas
51. Coloração dorsal das pétalas	0: não pigmentada; 1: pigmentos esverdeados; 2: pigmentos carotenóides; 3: pigmentos azul-arroxeados ou rosados; 4: sem pétalas
52. Coloração ventral das pétalas	0: não pigmentada; 1: pigmentos esverdeados; 2: pigmentos carotenóides; 3: pigmentos azul-arroxeados ou rosados; 4: sem pétalas
53. Quilhas dorsais das pétalas	0: ausentes; 1: presentes; 3: sem pétalas
54. Superfície das pétalas	0: glabra; 1: pilosa; 2: sem pétalas
55. Soldadura das pétalas	0: dialipétala; 1: gamopétala; 2: sem pétalas
56. Número de pétalas	0: sem pétalas; 1: três, 2: cinco, 3: mais que cinco;
<b>Corona</b>	
57. Número de séries	0: ausente; 1: uma; 2: duas; 3: três; 4: quatro; 5: cinco, 6: seis; 7: mais do seis.
58. Séries internas (filamentos)	
58.2. Coloração	0: não pigmentada; 1: uni-pigmentada; 2: variegada ou listrada; 3: ausentes
58.3. Formato	0: cilíndrico, 1: filiforme; 2: achatado; 3: capilar; 4: liguliforme; 5: tuberculado; 6: ausente; 7: capitado
58.4. Ápice	0: obtuso-agudo; 1: mucronado-aculminado; 2: cirroso-ondulado; 3: ausente
59. Séries externas (filamentos)	
59.2. Coloração	0: não pigmentada; 1: uni-pigmentada; 2: variegada
59.3. Formato	0: cilíndrico, 1: filiforme; 2: achatado; 3: capilar; 4: liguliforme; 5: tuberculado; 6: radiado; 7: dolabriforme
59.4. Ápice	0: obtuso-agudo; 1: mucronado-aculminado; 2: cirroso-ondulado
<b>Opérculo</b>	
60. Porção superior	
60.1. Formato	0: membranoso; 1: filamentosos; 2: estendido horizontalmente; 3: plicado
60.2. Coloração	0: não pigmentado; 1: pigmentado
60.3. Margem	0: inteira; 1: denticulada; 2: fimbriada; 3: crenulada; 4: incurvada
61. Porção médio-inferior	
61.1. Formato	0: membranoso; 1: filamentosos; 2: estendido horizontalmente; 3: plicado
61.2. Coloração	0: não pigmentado; 1: pigmentado;

## Límen

Apêndice 1: (cont.)

62. Formato	0: cupuliforme; 1: achatado; 2: convexo; 3: anular; 4: tubular; 5: membranoso
63. Coloração	0: não pigmentado; 1: pigmentado
64. Arranjo em relação ao androginóforo	0: aberto; 1: circundante; 2: envolvente; 3: fechado; 4: anular; 5: basal
<b>Androginóforo</b>	
66. Coloração	0: não pigmentada; 1: pigmentos esverdeados; 2: pigmentos carotenóides; 3: pigmentos azul-arroxeados ou rosados; 4: ausente
67. Pêlos	0: ausentes; 1: presentes
68. Pistilo	
68.1. Número de carpelos	0: um; 1: dois; 2: três; 3: quatro; 4: cinco ou mais
68.2. Número de locos	0: um; 1: dois; 2: três; 3: quatro; 4: cinco ou mais
68.3. Formato do ovário	0: globoso; 1: subgloboso 2: ovóide; 3: oblongo; 4: obovóide
68.4. Placentação	0: axial; 1: parietal; 2: central livre
<b>Fruto</b>	
70. Formato	0: globoso; 1: oval; 2: ovóide; 3: oblongo; 4: elipsóide; 5: fusiforme;
73. Coloração do epicarpo	0: esverdeada; 1: carotenóide; 3: arroxeadada ou violácea; 4: variegada ou listrada; 5: outra
74. Tipo de mesocarpo	0: denso; 1: com câmaras
75. Coloração do endocarpo (arilo)	0: ausente; 1: esverdeada; 2: amarelada; 3: avermelhada; 4: arroxeadada
76. Suculência do endocarpo	0: ausente; 1: presente
77. Tipo de fruto	0: baga; 1: cápsula
<b>Sementes</b>	
78. Formato	0: arredondadas; 1: obovadas; 2: cordiformes; 3: oblongas; 4: reniformes; 5: ovadas;
81. Borda	0: inteira; 1: trabalhada
82. Superfície	0: inteira; 1: sulcos irregulares; 2: sulcos arredondados; 3: sulcos transversais
<b>Citologia</b>	
86. Número cromossômico	0: 2n = 12; 1: 2n = 18; 2: 2n = 24



Apêndice 2: Comparação entre diferentes estruturas de *P. caerulea* (esquerda) e *P. tenuifila* (direita) (Fotos gentilmente cedidas por Aline. P. Lorenz e Valéria C. Muschner)





Apêndice 4: Distâncias genéticas dos indivíduos analisados por RAPD-PCR obtidas pelo método de Nei e Li (1979).

	C1	C2	C3	C6	C7	C10	C15	C16	C18	C19	C21	C22	C24	C25	C26	C28	C29	C31	C32	C33	C36	C37	
C1	0.00000000																						
C2	0.03926900	0.00000000																					
C3	0.02333917	0.02333917	0.00000000																				
C6	0.03826278	0.04358089	0.03730706	0.00000000																			
C7	0.03090023	0.04638199	0.03988821	0.05241222	0.00000000																		
C10	0.05331388	0.06976884	0.06293438	0.06243969	0.04958364	0.00000000																	
C15	0.07003444	0.06620018	0.06630452	0.05421089	0.08710399	0.07885666	0.00000000																
C16	0.07772183	0.08684395	0.06796536	0.05833654	0.08833885	0.05673219	0.05709447	0.00000000															
C18	0.07349630	0.06643977	0.06369840	0.06334778	0.08102732	0.06614295	0.05461940	0.04814117	0.00000000														
C19	0.06996097	0.06966008	0.06639720	0.06122445	0.09601816	0.05229164	0.06601655	0.04933721	0.05039702	0.00000000													
C21	0.07929599	0.05949749	0.06796536	0.07922032	0.06390398	0.08147616	0.07929599	0.08445048	0.06796536	0.07807288	0.00000000												
C22	0.12067602	0.12170187	0.10034903	0.11496488	0.10912015	0.11077879	0.11473058	0.10307962	0.09317721	0.11481551	0.09025099	0.00000000											
C24	0.11127767	0.11188549	0.09878656	0.07835321	0.09878656	0.10189765	0.10098836	0.08910622	0.09516184	0.10900660	0.10795850	0.10370216	0.00000000										
C25	0.20953378	0.17804211	0.17529206	0.18021189	0.16934244	0.17281125	0.18920563	0.17249870	0.15474468	0.17722157	0.18920563	0.16677631	0.09096267	0.00000000									
C26	0.04231600	0.07133841	0.06040856	0.05039702	0.06243969	0.06404562	0.06030554	0.06614295	0.04700213	0.06796536	0.06989253	0.09130430	0.09823175	0.17108533	0.00000000								
C28	0.07003444	0.08234064	0.07464723	0.06976884	0.07433180	0.08575626	0.07368391	0.07922032	0.06966008	0.08575626	0.07207917	0.11103925	0.08498584	0.16580434	0.06608187	0.00000000							
C29	0.05059466	0.07619713	0.05790552	0.05111591	0.08147616	0.09239303	0.05191841	0.07708816	0.07581385	0.07761018	0.08469606	0.10731907	0.05634492	0.13030019	0.07445433	0.04487935	0.00000000						
C31	0.07546469	0.09108573	0.06982864	0.07003444	0.10696282	0.11915644	0.08204044	0.05634492	0.08575626	0.07885666	0.09619927	0.09835800	0.09823175	0.16088279	0.05331388	0.08640551	0.06194648	0.00000000					
C32	0.08029036	0.08147616	0.06820018	0.07193391	0.09641635	0.09516184	0.09082881	0.06989253	0.08102732	0.09401350	0.09601816	0.13717113	0.13942464	0.19836244	0.06205204	0.08762529	0.07089831	0.04427962	0.00000000				
C33	0.07039177	0.05923432	0.05160677	0.06608187	0.06796536	0.08427943	0.07640316	0.07368391	0.06452549	0.08445048	0.09601816	0.10521761	0.11948484	0.17722157	0.04622117	0.08947450	0.06513240	0.05833654	0.04015851	0.00000000			
C36	0.09130430	0.06601655	0.06608187	0.08095540	0.07835321	0.10189765	0.08955809	0.10049038	0.08640551	0.09968111	0.07885666	0.11667355	0.13527207	0.21571343	0.07011353	0.06601655	0.09543094	0.09295838	0.05634492	0.04549564	0.00000000		
C37	0.06550455	0.06601655	0.05709447	0.06003528	0.08910622	0.07546469	0.08649001	0.07433180	0.06989253	0.07673230	0.10408643	0.12810126	0.09130430	0.15186813	0.05974525	0.05673219	0.06796536	0.07458167	0.07640316	0.05433014	0.05548431	0.00000000	
C41	0.07258661	0.07179856	0.07155380	0.08002575	0.09285756	0.10982963	0.09714112	0.09108573	0.07349630	0.07207917	0.07207917	0.11049308	0.11415500	0.17249870	0.05634492	0.06614295	0.08855235	0.07207917	0.08002575	0.06225244	0.05229164	0.04348459	
C44	0.07673230	0.08102732	0.07133841	0.07554904	0.09968111	0.08147616	0.06003528	0.07368391	0.06620018	0.07388470	0.11049308	0.12264352	0.09528228	0.14294598	0.07807288	0.07349630	0.06513240	0.05229164	0.06030554	0.05865564	0.09295838	0.06796536	
C48	0.05331388	0.02574718	0.03730706	0.03986821	0.03162397	0.04280901	0.04663440	0.06321774	0.05634492	0.06277964	0.04099442	0.13400695	0.12190829	0.14884398	0.03244739	0.06358759	0.07349630	0.06225244	0.02790745	0.02389786	0.04814117	0.02389786	
C49	0.11000850	0.07581385	0.08265393	0.09015087	0.08070980	0.10731907	0.05974525	0.09015087	0.07514527	0.08855235	0.08969077	0.10637448	0.11667355	0.16713943	0.08486389	0.08405682	0.11309482	0.08855235	0.09130430	0.06796536	0.05932384	0.07708816	
C51	0.08785752	0.07315572	0.07285466	0.09843744	0.07845014	0.08247325	0.08575626	0.08633846	0.07464723	0.08969608	0.10717976	0.11851211	0.13435048	0.20988275	0.07922032	0.08458601	0.09528228	0.09025099	0.08147616	0.06277964	0.06390398	0.06404562	
C59	0.07278477	0.07410011	0.07739437	0.07609784	0.09878656	0.11667355	0.08867291	0.07193391	0.08640551	0.07223547	0.10748757	0.14820525	0.10370216	0.20636189	0.05762788	0.08445048	0.11000850	0.06358759	0.08575626	0.05592999	0.07258661	0.04663440	
T1	0.22460018	0.18604557	0.17570730	0.19103859	0.21641292	0.22651653	0.16400842	0.21614677	0.18282831	0.23760359	0.23028885	0.21265031	0.26108938	0.27761230	0.17281125	0.19536218	0.14939699	0.15674734	0.15474468	0.14048845	0.14649884	0.15674734	
T2	0.17955171	0.15915512	0.14803435	0.18021189	0.17789045	0.18604557	0.16310358	0.18299910	0.16677631	0.19589533	0.19649321	0.18763202	0.20421556	0.21752644	0.18444422	0.19649321	0.18341762	0.19169386	0.15831251	0.14468060	0.15872756	0.15663667	
T3	0.16353278	0.14048845	0.12664552	0.16086279	0.16523919	0.18263723	0.14349976	0.17989947	0.14196707	0.18282831	0.17452054	0.17674477	0.18382445	0.19118772	0.16472898	0.18263723	0.16846453	0.16643387	0.14597046	0.12567948	0.13773173	0.14358704	
T4	0.18363810	0.14894395	0.14048845	0.17417090	0.14370698	0.19370413	0.15244721	0.20204309	0.15474468	0.20809909	0.17330131	0.18189830	0.27471820	0.20173056	0.17978777	0.22680736	0.21957618	0.18604557	0.16247444	0.13790614	0.15735000	0.16580434	
T5	0.14820525	0.14233480	0.12018068	0.15474468	0.14222673	0.15474468	0.14437573	0.16513301	0.14738519	0.16793567	0.17978777	0.19009829	0.18021189	0.20636189	0.17621349	0.17765185	0.17281125	0.16744611	0.13909087	0.13909087	0.13193151	0.14048845	
T6	0.16830914	0.16271438	0.14048845	0.17353296	0.17561781	0.20173056	0.15831251	0.18772553	0.14557889	0.21265031	0.16830914	0.16523919	0.20342863	0.22588003	0.16006978	0.18424304	0.17249870	0.16713943	0.15283220	0.14738519	0.14294598	0.16310358	
T7	0.17353296	0.14527710	0.13030019	0.16345821	0.17674477	0.18444422	0.15474468	0.18168837	0.13883084	0.19384289	0.16633959	0.16086279	0.18604557	0.19618545	0.16580434	0.18444422	0.16988054	0.16934244	0.13424601	0.13030019	0.15110330	0.16580434	
T8	0.16036096	0.14557889	0.12264352	0.15797581	0.17200115	0.17016476	0.14778058	0.16146313	0.12621889	0.18090823	0.17200115	0.15644638	0.17465134	0.19716839	0.15302439	0.18424304	0.17249870	0.15872756	0.13030019	0.13400695	0.13883084	0.14294598	
T9	0.19881956	0.22009800	0.17621349	0.19169386	0.19466259	0.21265031	0.16105062	0.21073888	0.16400842	0.21672292	0.18808347	0.16453853	0.18075021	0.21265031	0.15283220	0.16713943	0.18021189	0.18382445	0.17765185	0.15474468	0.13106976	0.14141405	
T10	0.18217781	0.15797581	0.13597658	0.15813582	0.15663667	0.21872498	0.14048845	0.19134605	0.14678639	0.20727392	0.14549635	0.17739888	0.17872302	0.19716839	0.15293337	0.16219410	0.14388213	0.14496805	0.14165682	0.12841707	0.12968077	0.14090042	
T11	0.19984384	0.21265031	0.18808347	0.18604557	0.20507720	0.21537566	0.18604557	0.21991554	0.16580434	0.21265031	0.18341762	0.19370413	0.22624402	0.18604557	0.19118772	0.18604557	0.19118772	0.18604557	0.20421556	0.19445217	0.15993522	0.17529206	
T12	0.15283220	0.12865357	0.12621889	0.16353278	0.16068584	0.18912337	0.15663667	0.16758223	0.13755907	0.18242203	0.14925404	0.18424304	0.18842086	0.22588003	0.16036096	0.13763720	0.19370413	0.16262268	0.13216333	0.15474468	0.11103925	0.13773173	
T13	0.15041210	0.14953268	0.12865357	0.16036096	0.16793567	0.19040623	0.14294598	0.16643387	0.14294598	0.19209054	0.16513301	0.17494529	0.18341762	0.22460018	0.15674734	0.18412220	0.17249870	0.14294598	0.13970521	0.12049606	0.14294598	0.14437573	
T14	0.15872756	0.15474468	0.13134599	0.12915635	0.16713943	0.16513301	0.13673663	0.14119411	0.15310669	0.17016476	0.16453853	0.16400842	0.18363810	0.21872498	0.13216333	0.14416200	0.11415500	0.12458921	0.12372705	0.12033159	0.13970521	0.11868821	
T16	0.15872756	0.14809948	0.12621889	0.13086933	0.16912337	0.16713943	0.11667355																

Apêndice 4: Distâncias genéticas dos indivíduos analisados por RAPD-PCR obtidas pelo método de Nei e Li (1979).

C41	C44	C48	C49	C51	C59	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T16	T17	T18	
0.00000000																							
0.08507848	0.00000000																						
0.03470733	0.01590615	0.00000000																					
0.07075284	0.04722557	0.02938731	0.00000000																				
0.05377656	0.06101603	0.03306238	0.05213383	0.00000000																			
0.03306238	0.08362935	0.01966280	0.07089831	0.03440771	0.00000000																		
0.15283220	0.15474468	0.09180002	0.15993522	0.16006978	0.17212290	0.00000000																	
0.14776056	0.16000978	0.14294598	0.15717354	0.15636763	0.15283220	0.07708816	0.00000000																
0.12789999	0.13148811	0.13461721	0.13193151	0.13030019	0.14165682	0.07885666	0.01403028	0.00000000															
0.14294598	0.17108533	0.13400895	0.11991338	0.17108533	0.17804211	0.07929599	0.04231600	0.03440771	0.00000000														
0.13106976	0.16988054	0.13400695	0.14294598	0.15474468	0.14725095	0.09714112	0.03373958	0.03821126	0.04099442	0.00000000													
0.14165682	0.18021189	0.14294598	0.14048845	0.14953268	0.15271905	0.07984360	0.02040438	0.01891800	0.04678079	0.03456568	0.00000000												
0.14015065	0.14349976	0.13883084	0.14820525	0.14141405	0.15474468	0.07089831	0.02030228	0.01772995	0.05377656	0.03986821	0.01171216	0.00000000											
0.13290310	0.14738519	0.13461721	0.14048845	0.13673663	0.14294598	0.07445433	0.02291071	0.02333917	0.03838572	0.02509968	0.01128707	0.01728171	0.00000000										
0.12751800	0.16364704	0.12587446	0.12841707	0.16068584	0.15956949	0.06614295	0.06796536	0.06966008	0.07977227	0.08728696	0.07739437	0.07603941	0.07349630	0.00000000									
0.13290310	0.16068584	0.15474468	0.12699139	0.15831251	0.14859670	0.10360239	0.04814117	0.04268302	0.04678079	0.06796536	0.03730706	0.04766317	0.04651795	0.06243969	0.00000000								
0.13673663	0.20421556	0.16580434	0.15813582	0.15717354	0.20421556	0.20104679	0.13573588	0.13371713	0.13818912	0.17108533	0.14294598	0.13290310	0.13673663	0.18341762	0.15041210	0.00000000							
0.11481551	0.16643387	0.11667355	0.13290310	0.12391489	0.10838348	0.10434725	0.04322506	0.04924309	0.07011353	0.06796536	0.04080230	0.04762814	0.04080230	0.08445048	0.06122445	0.15701266	0.00000000						
0.13371713	0.13573588	0.10343266	0.12947881	0.13583143	0.13335846	0.08833885	0.03906352	0.04527936	0.05634492	0.06358759	0.04099442	0.04814117	0.03821126	0.09082881	0.05895426	0.12401918	0.03079659	0.00000000					
0.12651357	0.12841707	0.08265393	0.14776056	0.12742652	0.12087376	0.06101603	0.06472389	0.07464723	0.10189765	0.08785752	0.08458601	0.06951948	0.06966008	0.06417771	0.08458601	0.14978439	0.09075737	0.08234064	0.00000000				
0.12237652	0.12049606	0.10049038	0.12401918	0.14294598	0.13461721	0.06620018	0.05997893	0.06472389	0.08147616	0.07640316	0.07155380	0.06643977	0.06122445	0.06417771	0.07885666	0.17872302	0.08147616	0.06971277	0.02414559	0.00000000			
0.12810126	0.12810126	0.09668130	0.13818912	0.13773173	0.12160465	0.08047332	0.06796536	0.07167214	0.08147616	0.07546469	0.08047332	0.08405682	0.06225244	0.07019891	0.08047332	0.15474468	0.08147616	0.06404562	0.03639809	0.03192779	0.00000000		
0.12540205	0.11889672	0.09878656	0.12497578	0.12898414	0.11915644	0.08002575	0.04252376	0.04527936	0.06321774	0.05548431	0.04280901	0.04155479	0.03639809	0.07458167	0.06079432	0.12133431	0.05160677	0.03192779	0.04690126	0.05561498	0.05799479	0.00000000	
0.13673663	0.13483031	0.10049038	0.14776056	0.14119411	0.14859670	0.06277964	0.08469606	0.08309355	0.09082881	0.11257756	0.08633846	0.07885666	0.08021358	0.05709447	0.09052245	0.15228195	0.07984360	0.08633846	0.02951006	0.03175828	0.04875781	0.06430119	
0.14294598	0.11667355	0.08405682	0.14207222	0.13216333	0.15474468	0.06796536	0.07133841	0.07485195	0.08265393	0.08955809	0.07960912	0.07603941	0.07155380	0.08910622	0.10758578	0.17108533	0.09401350	0.07167214	0.04591606	0.05331388	0.05478714	0.04814117	
0.13773173	0.12067602	0.07789426	0.15993522	0.13763720	0.14820525	0.08807345	0.06490067	0.06796536	0.09082881	0.09198555	0.07680123	0.06943803	0.08189499	0.09401350	0.08979136	0.15717354	0.09317721	0.06976884	0.03897612	0.05206981	0.05331388	0.05709447	
0.14696720	0.12067602	0.07789426	0.15474468	0.13763720	0.15041210	0.08102732	0.06961046	0.07300069	0.08955809	0.10408643	0.08515123	0.07916689	0.08633846	0.09304303	0.09311510	0.17108533	0.09743609	0.07530151	0.04487935	0.06142073	0.05865564	0.05895426	
0.12960877	0.12326028	0.07789426	0.13030019	0.12458921	0.12160465	0.10838348	0.05331388	0.06417771	0.07619713	0.08085603	0.05592999	0.06441688	0.05229164	0.09878656	0.06594655	0.14939699	0.05895426	0.03730706	0.06796536	0.07193391	0.06796536	0.03423041	

Apêndice 4: Distâncias genéticas dos indivíduos analisados por RAPD-PCR obtidas pelo método de Nei e Li (1979).

T19	T20	T21	T22	T23
-----	-----	-----	-----	-----

0,00000000				
0,05331388	0,00000000			
0,05206981	0,01836164	0,00000000		
0,05667845	0,02229676	0,01053908	0,00000000	
0,09108573	0,06183708	0,05634492	0,05634492	0,00000000