



Relações Evolutivas entre *Passiflora actinia* Hooker e  
*Passiflora elegans* Masters (Passifloraceae)

Aline Pedroso Lorenz

Orientador: Dr. Francisco M. Salzano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do Grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Porto Alegre**

**2002**

*Ao Ruben*

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho

À minha família

Ao Prof. Francisco M. Salzano e à Prof. Loreta B. de Freitas, esta última tendo atuado como uma co-orientadora efetiva deste trabalho

A todos os amigos do Laboratório de Evolução Molecular: Ana Helena, Ângela, Carla, Carlos André, Carolina, Cláudia, Clênio, Danaê, Gílis, Jaqueline, Laci, Mariene, Nelson, Nicolas, Nicole, Patrícia, Renata e Valéria

A todos companheiros de campo

A todos que pararam seus carros para que eu pudesse coletar as passifloras

Aos amigos Ana Paula, Andréa, Andrise, Ângela, Alisson, Cariane, João, Josi, e Tatiane

À Professora Maria Luisa Lorscheitter

Ao pessoal do Laboratório de Geoprocessamento do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da UFRGS, especialmente à Ana Paula e ao José Luís

Aos órgãos financiadores deste projeto: PRONEX, CNPq, FINEP, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS, em especial ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa durante os dois anos de mestrado

Aos colegas do Departamento de Genética

Aos professores do Departamento de Genética e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Ao Elmo e à Ellen

Ao Ruben e à sua família

Às passifloras.

## Sumário

1. Introdução	6
1.1 Evolução vegetal	6
1.2 Conceitos de espécie e modelos de especiação	7
1.3 Mecanismos de isolamento reprodutivo em plantas	8
1.4 Hibridação	10
1.5 Introgressão	11
1.6 Os marcadores moleculares	12
1.7 As formações vegetais do Rio Grande do Sul	15
1.8 Evolução da Planície Costeira e da Mata Atlântica no RS	17
1.9 O gênero <i>Passiflora</i> L.	20
1.10 <i>Passiflora actinia</i> Hooker (1843)	21
1.11 <i>Passiflora elegans</i> Masters (1872)	23
1.12 Estudos filogenéticos no gênero <i>Passiflora</i>	24
1.13 Um estudo de caso: <i>P. actinia</i> e <i>P. elegans</i>	24
<b>2. Objetivos</b>	26
<b>3. Materiais e Métodos</b>	27
3.1 Obtenção da amostra	27
3.2 Extração de DNA	28
3.3 Marcadores moleculares para o seqüenciamento	29
3.4 Teste de viabilidade das sementes	35
<b>4. Resultados</b>	36
4.1 Coletas	36
4.2 Seqüenciamento	49
4.2.1 Variação intraespecífica dos marcadores	49
4.2.2 Comparações interespecíficas	50
<b>5. Discussão</b>	66
5.1 Variação intraespecífica dos marcadores	66
5.2 Caracterização genética do híbrido	67
5.3 Variação interespecífica: implicações evolutivas e taxonômicas	70
5.4 O processo de especiação: a evolução dos genes no espaço e no tempo	73
5.5 O processo de especiação de <i>P. actinia</i> e <i>P. elegans</i> : possíveis relações com a imigração da Mata Atlântica	74

5.6 Fatores que podem ter influenciado a manutenção do padrão atual de distribuição	76
5.7 Considerações finais	80
<b>6. Resumo e Conclusões</b>	82
<b>7. Summary and Conclusions</b>	83
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	84
<b>9. Anexos</b>	92

## 1. Introdução

### 1.1 Evolução vegetal

O estudo dos processos evolutivos que levaram à atual diversidade das plantas tem sido um dos principais focos em análises filogenéticas. Para isso, os pesquisadores têm acessado diversos níveis de variação biológica, como a morfologia, ecologia, fenologia e genética, os quais podem ou não serem coincidentes com as variações geográficas abióticas ou bióticas (Judd *et al.*, 1999).

A morfologia comparada é a principal, e muitas vezes a única, fonte de dados para especulações filogenéticas. Neste tipo de estudo, é de extrema importância identificar se as características comuns a certos grupos são o resultado de descendência comum ou de evolução convergente. Com o advento da biologia molecular, pode-se avaliar diversos níveis de variação genética, esclarecendo muitas questões sobre os fenômenos evolutivos, especialmente quando combinados com outros tipos de dados (Hewitt, 2001; Silvertown *et al.*, 1997).

O conceito de espécie é central nos estudos de evolução, ecologia e biologia da conservação. Na prática, a maioria das espécies é definida através de caracteres morfológicos, pois são os mais abundantes e muitas vezes os únicos disponíveis aos taxonomistas. A enorme complexidade dos sistemas reprodutivos das plantas dificulta a aplicação de conceitos imutáveis de espécie para estes organismos (Templeton *et al.*, 2000).

Todos estes fatores contribuem para que os estudos evolutivos com plantas necessitem de uma ampla abordagem de dados, correlacionando os padrões biogeográficos, morfológicos, ecológicos e genéticos.

## 1.2 Conceitos de espécie e modelos de especiação

Não há um conceito de espécie consenso em plantas, pois cada linhagem tem uma história evolutiva única, o que pode gerar uma grande diversidade dentro de um grupo determinado. O conceito biológico de espécie apresenta uma série de problemas quando aplicado a plantas, porque se refere ao isolamento reprodutivo. Em plantas, o nível de infertilidade nos cruzamentos entre diferentes grupos é bastante variável (desde 0 até 100%). A aplicação estrita deste conceito nos levaria a classificar cada indivíduo autocruzante e clone assexual como uma nova espécie; por isso, muitos taxonomistas de plantas abandonaram este conceito (Judd *et al.*, 1999).

No conceito filogenético, as espécies são reconhecidas pelo critério de relacionamento filogenético (descendência). Quando comparados com indivíduos de outros grupos, os indivíduos de uma mesma espécie são muito mais relacionados entre si e seus genes mostram um ancestral comum mais recente. Este conceito pode falhar porque diferentes genes podem apresentar diferentes padrões de coalescência, mas o uso de diversos genes em uma análise pode minimizar o problema (Avice, 2000).

No modelo de especiação alopátrico, as populações começam a se diferenciar quando barreiras ambientais, ou a própria distância, corta o fluxo gênico. Impedimentos para o fluxo gênico são pré-requisitos para a divergência genética e para a eventual evolução de barreiras reprodutivas intrínsecas (Avice, 2000). Mas a divergência não é resultado automático da separação geográfica, e sim de mecanismos transformantes como o fluxo gênico em si e a seleção natural (Judd *et al.*, 1999). As zonas híbridas, locais em que as populações se inter cruzam, são geralmente interpretadas como local de contato secundário

entre as populações que se diferenciaram em alopatria, mas que não alcançaram um *status* pleno de espécie (Futuyma, 1992).

Se a seleção favorece diferentes alelos em duas populações adjacentes ou parapátricas, uma clina de frequências alélicas é estabelecida. Com uma seleção suficientemente forte sobre locos que contribuam para o isolamento reprodutivo, as populações podem se diferenciar em espécies isoladas reprodutivamente. Muitas das zonas híbridas que geralmente são atribuídas a contato secundário podem ter se originado *in situ*, pela diferenciação de populações parapátricas (Futuyma, 1992).

Na especiação simpátrica, uma barreira biológica ao intercruzamento tem que se originar dentro dos limites de uma população panmítica, sem nenhuma segregação espacial das espécies incipientes (Futuyma, 1992). Para isso, são propostos os modelos graduais e instantâneos, sendo que os instantâneos mais aceitos são: hibridação seguida de poliploidia (alopoliploidia); modificação do sistema reprodutivo de autoincompatível para autofecundação; modificações cromossômicas estruturais, que levam à interesterilidade; e mutações em genes de grande efeito nas estruturas florais (Judd *et al.*, 1999).

### 1.3 Mecanismos de isolamento reprodutivo em plantas

A separação geográfica e a diferenciação ecológica nem sempre são acompanhadas pelo isolamento reprodutivo, mas podem indiretamente levar a este. Para que populações simpátricas possam manter as modificações acumuladas, é preciso que haja algum mecanismo de isolamento que impeça o fluxo gênico entre elas. Estes mecanismos podem agir em diferentes momentos da reprodução: pré-cruzamento (antes da polinização), pós-cruzamento e pré-



zigótico (após a polinização e antes da fertilização) e pós-cruzamento e pós-zigótico (depois da fertilização).

Adaptações que modificam a estrutura floral ou o comportamento dos polinizadores também podem limitar ou restringir o fluxo gênico entre espécies relacionadas (isolamento floral). Um bom exemplo são as espécies *Pitcairnia albiflos* e *P. staminea* (Bromeliaceae), que raramente ocorrem juntas, sendo a rocha do Pão de Açúcar (RJ) um dos poucos lugares conhecidos onde crescem simpatricamente. Híbridos são comuns nestas populações, pois a intervenção humana quebrou o isolamento geográfico e ecológico destas espécies. As duas possuem diferentes sistemas de polinização: *P. albiflos* tem flores brancas e perfumadas, que são polinizadas à noite por morcegos e mariposas, enquanto *P. staminea* tem flores vermelhas e não perfumadas, que são polinizadas durante o dia por borboletas. Ambas são intensamente visitadas por abelhas durante todo o dia, sendo este visitante comum o provável responsável pelos cruzamentos interespecíficos (Wendt *et al.*, 2001).

O isolamento temporal pode ocorrer quando populações de espécies relacionadas florescem em diferentes épocas do ano ou em diferentes períodos do dia. Outro eficiente mecanismo é a modificação do sistema de cruzamento de fertilização cruzada para autofecundação, pois isto exige a eliminação dos mecanismos de autoincompatibilidade e a modificação da biologia floral (como a redução de atrativos para polinizadores e a prévia deposição de pólen no estigma da própria flor). A consequência da autofecundação é a eliminação do fluxo gênico, o que, em alguns casos, pode ser benéfico, como, por exemplo, em plantas adaptadas a ambientes adversos. Sistemas de incompatibilidade também podem favorecer o isolamento reprodutivo. A incompatibilidade pode ocorrer no estigma e estilete impedindo que o pólen estranho fecunde o óvulo ou, em alguns

casos, pode até haver a formação de um embrião híbrido, mas este não desenvolve uma semente viável (Judd *et al.*, 1999).

Se há a formação de híbridos, existe uma série de outros mecanismos que podem inviabilizar o sucesso evolutivo destes. Um híbrido é inviável quando não atinge a maturidade reprodutiva ou se não há um nicho ecológico favorável para seu desenvolvimento. Pode ocorrer o isolamento floral dos híbridos quando estes são originados de espécies adaptadas a polinizadores muito diferentes. O híbrido pode também ser vigoroso mas estéril, devido a falhas no pareamento dos cromossomos durante a meiose, se as espécies parentais diferirem em número de cromossomos ou tiverem divergido o suficiente para impedir o pareamento, resultando em gametas não funcionais (Judd *et al.*, 1999).

#### 1.4 Hibridação

Quando os mecanismos de isolamento reprodutivo não são efetivos pode ocorrer fluxo gênico entre diferentes *taxa*. O termo híbrido é muitas vezes utilizado para organismos formados pelo cruzamento de diferentes espécies. Um conceito mais amplo, no entanto, é de que seriam o resultado do cruzamento entre indivíduos de populações que são distinguíveis com base em um ou mais caracteres herdáveis (Rieseberg, 1997).

O aumento da diversidade genética intraespecífica, a origem e transferência de adaptações genéticas, a origem de novos ecótipos ou espécies e o reforço ou quebra das barreiras reprodutivas, são algumas das possíveis conseqüências evolutivas da hibridação. A hibridação pode estar associada a distúrbios que destruam as adaptações ecológicas que isolaram as duas espécies, ou que causem a diminuição da competição, criando um habitat favorável para os híbridos. Os híbridos podem apresentar um valor adaptativo

maior do que os parentais, num fenômeno conhecido como heterose ou vigor do híbrido. Mas em muitos casos há seleção contra a hibridação, para que os mecanismos de isolamento reprodutivo sejam reforçados e a diversidade de espécies simpátricas seja preservada (Judd *et al.*, 1999; Rieseberg, 1997).

### 1.5 Introgressão

Introgressão é a permanente incorporação de genes de uma espécie em uma outra. Algumas das possíveis conseqüências são o surgimento de uma nova espécie e a transferência do material genético de uma espécie para outra, aumentando sua diversidade genética, sem a formação de uma terceira espécie. Eventos passados de introgressão podem gerar conflitos entre filogenias baseadas em marcadores nucleares e cloroplasmáticos. Na maioria dos casos, a espécie híbrida apresenta ambas as seqüências parentais no DNA nuclear (ncDNA), enquanto o DNA cloroplasmático (cpDNA) é herdado somente de um dos parentais. Isto pode ocasionar um fenômeno conhecido como “chloroplast capture” ou introgressão diferencial. O ncDNA de uma das espécies pode ser eliminado através do retrocruzamento do híbrido com a outra espécie parental, mas o cpDNA pode permanecer, associando o ncDNA de uma com o cpDNA da outra espécie. Portanto, marcadores do cpDNA são considerados mais apropriados que os do ncDNA para delimitar cruzamentos entre espécies diferentes (Schaal *et al.*, 1998).

Geralmente as características quantitativamente herdadas da F<sub>1</sub> híbrida são intermediárias entre os parentais, embora haja muitas exceções. Normalmente, as características quantitativas são controladas por vários genes, cada um dando uma contribuição parcial para a expressão fenotípica. Já as características governadas por um ou poucos genes não se mostram

intermediárias na  $F_1$ , e os híbridos podem apresentar estados de caráter novos, parentais ou, até mesmo, extremos (Judd *et al.*, 1999).

### 1.6 Os marcadores moleculares

Os estudos clássicos de taxonomia vegetal utilizaram caracteres morfológicos para separar as espécies, mas atualmente os marcadores moleculares têm demonstrado ser grandes aliados na resolução de questões que não puderam ser esclarecidas em estudos anteriores. Entre os pesquisadores há um constante questionamento sobre qual método utilizar numa análise filogenética; os mais utilizados atualmente (morfológicos e moleculares) apresentam vantagens e desvantagens próprias. Os dados moleculares são criticados, porque é possível que representem somente a evolução do marcador, e não necessariamente das espécies. Por outro lado, uma das vantagens dos marcadores moleculares é que a análise do DNA pode acessar indiretamente informações sobre a morfologia. Além disso, eles possuem aplicabilidade em todos os níveis taxonômicos, pois diferentes partes do genoma possuem diferentes taxas de evolução (Petersen & Seberg, 1998).

As análises baseadas em dados moleculares fornecem uma enorme quantidade de dados filogeneticamente informativos. A escolha do marcador é de grande importância nestes estudos. Nos trabalhos que utilizam a técnica de seqüenciamento, a região do DNA a ser analisada deve variar de acordo com o nível taxonômico que está sendo considerado. As regiões não codificadoras são mais usadas em estudos de níveis taxonômicos baixos, pois não são funcionais, estando livres para variar e fornecer um maior número de caracteres informativos por unidade seqüenciada (Small *et al.*, 1998). Já nos estudos de taxa mais elevados, as seqüências a serem analisadas devem corresponder a

regiões codificadoras, que sofrem alta pressão seletiva sendo, portanto, mais conservadas.

O estudo simultâneo de vários marcadores moleculares fornece resultados mais robustos sobre as relações filogenéticas de um grupo, uma vez que filogenias baseadas em um único marcador molecular podem representar principalmente a evolução da seqüência analisada. Este argumento é especialmente relevante para o DNA de organelas herdado uniparentalmente, pois qualquer hibridação poderia conduzir a uma evolução reticulada dentro de um *taxon*, distorcendo a filogenia. Para evitar isso, recomenda-se usar diferentes marcadores, sendo pelo menos um de DNA nuclear (Käss & Wink, 1997). Os marcadores nucleares possuem características que complementam a variação do cpDNA e, quando usados juntos, estes marcadores permitem testes independentes de hipóteses filogenéticas, fornecendo muitas perspectivas em processos microevolutivos (Mayer & Soltis, 1999).

O cpDNA apresenta organização estrutural, seqüência e tamanho bastante conservados evolutivamente (van Ham *et al.*, 1994). Os genes nucleares de plantas apresentam taxas evolutivas cerca de três a seis vezes maiores que o cpDNA (Small *et al.*, 1998), mas a análise de regiões não codificadoras do cpDNA torna possível a utilização deste para inferências de filogenias em nível de espécies.

Os genes do RNA ribossomal nuclear (nrDNA) estão localizados em *clusters* de seqüências altamente repetitivas. Estes genes estão separados por espaçadores internos transcritos (ITS), sendo que o ITS1 está localizado entre os genes 18S e 5.8S, e o ITS2 entre os genes 5.8S e 26S. A variabilidade dentro de famílias multigênicas, como a do nrDNA, depende do número de cópias, taxas de mutação, especiação, evolução em concerto, localização cromossômica dos *loci* e proporção de reprodução sexual e assexual do organismo em estudo. Geralmente

a evolução em concerto é efetiva no nrDNA, garantindo a homogeneidade das repetições. Apesar disto, extensos polimorfismos em seqüências de ITS têm sido encontrados em espécies de angiospermas (Aguilar *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 1997; Mayer & Soltis, 1999). Um indivíduo pode apresentar polimorfismos no nrDNA quando a evolução em concerto não é rápida o suficiente para homogeneizar as repetições originadas por altas taxas de mutação e/ou hibridações interespecíficas recentes (Campbell *et al.*, 1997). Como são biparentalmente herdados, os marcadores de ITS podem ser utilizados para distinguir as contribuições maternas e paternas (Mayer & Soltis, 1999).

Aguilar *et al.* (1999) verificaram a rapidez da evolução em concerto na região do ITS utilizando híbridos artificiais e retrocruzamentos entre *Armeria villosa* ssp. *longiaristata* e *A. colorata* (Plumbaginaceae). As seqüências de ITS da F<sub>1</sub> dos híbridos apresentaram o padrão de polimorfismos aditivos para a maioria dos sítios variáveis, o que foi interpretado como o resultado da amplificação das cópias de ambos os progenitores. Mas alguns sítios, não mostraram polimorfismos, o que pode ser decorrência do mecanismo de conversão gênica. A homogeneização dos polimorfismos foi observada na F<sub>2</sub>. Nos retrocruzamentos a homogeneização dos sítios polimórficos ocorreu em direção ao parental recorrente, ou seja, a tendência foi homogeneizar no sentido das cópias mais numerosas.

Os estudos com ITS podem apresentar as mais variadas abordagens. *Mielichhoferia elongata* e *M. mielichhoferiana* são espécies morfológicamente muito semelhantes, já tendo sido tratadas como duas variedades de uma espécie, mas os marcadores ITS1 e ITS2 confirmaram evidências prévias, obtidas com dados morfológicos e de isoenzimas, de que podem ser consideradas como duas espécies distintas (Shaw, 2000a). Há casos em que os marcadores de ITS podem ser utilizados para confirmar suspeitas de espécies novas. Como a espécie nova

*Schizymenium shevokii* (Bryaceae) que, além de algumas diferenças morfológicas e reprodutivas, foi distinta das espécies mais próximas (*Schizymenium pontevedrensis*, *Mielichhoferia elongata* e *M. mielichhoferiana*), pela presença de uma inserção/deleção de 38 e 29 nucleotídeos, respectivamente, em ITS1 e uma inserção/deleção de 9 nucleotídeos em ITS2 (Shaw, 2000b). Os resultados das análises destes marcadores também podem ser incongruentes com as classificações baseadas em dados morfológicos. No caso da família Fontinalaceae (Bryophyta), a análise dos marcadores ITS e do espaçador intergênico entre os RNAs transportadores *trnL-trnF* indicou que grupos de espécies do gênero *Fontinalis* seriam polifiléticos, enquanto que sua classificação morfológica se deve ao fato de que todas estas espécies apresentam a mesma morfologia foliar (Shaw & Allen, 2000).

Análises conjuntas de marcadores de DNA nuclear e cloroplasmático podem revelar padrões reticulados de evolução, como por exemplo o estudo de Sang *et al.* (1997), no gênero *Paeonia* (Paeoniaceae), onde foram utilizados vários marcadores moleculares (seqüências do gene *matK* e dos espaçadores *psbA-trnH* e *trnL-trnF* do DNA cloroplasmático). Houve discordância entre as filogenias baseadas no DNA nuclear e naquelas em que foram consideradas seqüências do cpDNA, o que fez com que os autores levantassem a hipótese de que teria havido especiação através de hibridação de espécies, resultando na herança do cpDNA de um parental e do DNA genômico de outro.

### 1.7 As formações vegetais do Rio Grande do Sul

Conforme dados do IBGE (1986), estima-se que o Rio Grande do Sul (RS) foi originalmente ocupado por 50,83% de vegetação campestre e por 26,62% de vegetação florestal. Aproximadamente 90% das florestas foram devastadas por

ação antrópica. Um estudo sobre a vegetação da área identificou sete regiões fitoecológicas e duas áreas sob condições ecológicas especiais: Região da Savana, Região da Estepe, Região da Savana Estépica, Região da Floresta Ombrófila Densa, Região da Floresta Estacional Semidecidual, Região da Floresta Estacional Decidual, Região da Floresta Ombrófila Mista, Áreas de Formações Pioneiras e Áreas de Tensão Ecológica. As sete regiões fitoecológicas podem ser subdivididas de acordo com o tipo de formação vegetal predominante (tabela 1).

Tabela 1. Regiões fitoecológicas do Rio Grande do Sul (IBGE, 1986)

Classe de formação	Grupo de formação	Formação	Subformação
Savana (Campos)	Xeromorfa	Arbórea Aberta	Com floresta-de-galeria
		Parque	Com floresta-de-galeria
			Sem floresta-de-galeria
Estepe (Campanha)	Xerófita	Gramíneo-Lenhosa	Com floresta-de-galeria
		Parque	Sem floresta-de-galeria
		Gramíneo-Lenhosa	Com floresta-de-galeria
Savana Estépica (Campanha)	Xeromorfa	Arbórea Aberta	Com floresta-de-galeria
		Parque	Com floresta-de-galeria
		Gramíneo-Lenhosa	Com floresta-de-galeria
Floresta Ombrófila Densa	Higrófita	Terras Baixas	-
		Submontana	-
		Montana	-
Floresta Estacional Semidecidual	Hidrófita-xerófita	Aluvial	-
		Terras Baixas	-
		Submontana	-
Floresta Estacional Decidual	Hidrófita-xerófita	Aluvial	-
		Submontana	-
		Submontana	-
Floresta Ombrófila Mista	Higrófita	Submontana	-
		Montana	-
		Alto-Montana	-

As Áreas das Formações Pioneiras são caracterizadas pela ocorrência de uma vegetação típica das primeiras fases de ocupação de novos solos, constantemente renovados com deposições aluviais e marítimas. As Áreas de



Tensão Ecológica são constituídas pela interpenetração de floras entre duas ou mais regiões fitoecológicas.

Segundo Rambo (1951), as formações florestais do RS teriam seu centro de irradiação no Norte. A Mata do Alto Uruguai teria surgido como um prolongamento meridional da Amazônia, através da bacia Paraná-Uruguai, e a Mata Atlântica teria como centro de irradiação a região entre a Serra da Mantiqueira e o Oceano. No RS, a Mata Atlântica penetra no território por uma área conhecida como "Porta de Torres", numa faixa de contato entre a Serra Geral e Torres com a mata costeira de Santa Catarina, estendendo-se mais ou menos até Osório, sendo que poucas espécies estão representadas mais para o sul. A partir do extremo sul de Santa Catarina, três correntes de Mata Atlântica se infiltram no RS, uma ao longo do litoral até o Uruguai, outra pela faixa costeira até Porto Alegre, e uma terceira ao longo do talude meridional até Santa Cruz (Rambo, 1949).

### 1.8 Evolução da Planície Costeira e da Mata Atlântica no RS

Especialmente nos últimos dois milhões de anos, ocorreram várias alternâncias cíclicas de estágios glaciais e interglaciais. Estes estágios são determinados por alterações de temperatura, decorrentes de mudanças na taxa de insolação de altas latitudes dos hemisférios norte e sul. A mudança de temperatura é controlada por ciclos astronômicos, conhecidos como Ciclos de Milankovitch, que causam efeitos como a fusão ou o crescimento das calotas polares e conseqüente subida ou descida do nível do mar. As mudanças paleoambientais ocorridas no Quaternário, com ênfase nos últimos 20.000 anos, são de extrema importância para a distribuição de espécies animais e vegetais da costa brasileira. Isto principalmente em conseqüência das alterações climáticas

ocorridas no fim do último estágio glacial e no Holoceno, que foram acompanhadas de variações glacioeustáticas do nível do mar (Villwock & Tomazelli, 1995).

A comparação de padrões geográficos de diferenciação genética de *taxa* não relacionados tem sido utilizada para localizar refúgios de estágios glaciais e reconstruir rotas de colonização pós-glaciais. Além disso, também têm sido estudadas as mudanças macroevolutivas (especiação ou diversificação de plantas) em resposta às alterações climáticas ocorridas no Quaternário. Dados de abundância estatigráfica de pólen e sua datação por radiocarbono têm ajudado a monitorar as mudanças nos limites de distribuição e abundância das espécies de plantas através dos estágios glaciais e interglaciais. Mas há muitas dificuldades, como o tempo em que se pode considerar os registros e que espécies estarão representadas. Os registros que podem ser considerados são posteriores ao Pleistoceno Tardio (a partir de 123.000 anos A.P.), e a maioria deles é de plantas de ambientes úmidos e de espécies polinizadas pelo vento (que produzem uma quantidade muito maior de pólen); as de autofecundação e as polinizadas por animais não podem ser consideradas nessas análises. Além destes tipos de dados, a história das angiospermas no Quaternário Superior também pode ser acessada através dos marcadores moleculares; dentre estes, os mais utilizados são os de cpDNA. Estes estudos podem conectar estágios glaciais e interglaciais a distâncias genéticas entre linhagens de plantas, ao estabelecimento de novas espécies via isolamento geográfico de populações, a hibridações simpátricas e a eventos de poliploidização (Comes & Kadereit, 1998; Hewitt, 2000).

Estudos palinológicos realizados em Terra de Areia - RS (Neves & Lorscheitter, 1995) e no Parque Nacional dos Aparados da Serra-RS (Roth & Lorscheitter, 1993), sugerem que as regiões do planalto e da planície costeira passaram por um clima frio e semi-árido no último estágio glacial pleistocênico

(entre 23.000-11.000 anos A.P.). A vegetação campestre era predominante, e as matas com *Araucaria* do Planalto e as matas tropicais costeiras estavam restritas a refúgios ecológicos. Os deslocamentos vegetais deveriam ocorrer principalmente através das matas de galeria junto aos rios (Lorscheitter, 1997).

Com o início do Holoceno (entre 11.000-10.000 anos A.P.) houve uma significativa melhoria climática com o aumento da temperatura e da umidade. Na região dos Aparados da Serra, esta mudança é observada pelo aumento de indicadores de campo; mesmo assim, os elementos da mata com *Araucaria* se mantiveram escassos, seguindo em lenta expansão sobre o campo por todo o Holoceno. Esta melhoria climática permitiu a migração dos elementos da Mata Atlântica para o RS através da “Porta de Torres”. As populações migraram de forma esparsa, ocupando a Planície Costeira, a encosta e borda oriental da Serra Geral, chegando até as regiões mais interiorizadas do Estado. Por volta de 6.700 anos A.P. já há evidências de transgressão marinha invadindo os atuais limites da Planície Costeira do RS, atingindo o máximo entre 5.000-4.000 anos A.P. Tudo indica que esta transgressão corresponde a um aumento de temperatura e umidade em nível global, ocorrida há cerca de 5.000 anos A.P. (Lorscheitter, 1997).

Esta última transgressão causou danos significativos na vegetação litorânea, destruindo as florestas mais próximas do mar. Já nas regiões mais interiorizadas e protegidas do mar, esta fase foi favorável. Após o máximo transgressivo, houve uma lenta dessalinização dos terrenos com o recuo do mar, o que gradativamente possibilitou a expansão da mata tropical costeira (Mata Atlântica) a partir de 4.000 anos A.P. (clima quente e úmido). Portanto, as matas costeiras atuais se desenvolveram após 4.000 anos A.P.; dentre estas, as situadas mais próximas do mar são ainda mais jovens, pois foram as últimas a serem formadas após o processo regressivo. Já as matas atuais mais

interiorizadas não mostram indícios da transgressão marinha holocênica em seus sedimentos. Sem a influência negativa da invasão marinha, e beneficiadas pelo clima, datações radiométricas mostram que o desenvolvimento florestal ocorreu mais cedo, com início de expansão por volta de 6.000 anos A.P., nas matas próximas aos contrafortes da Serra Geral e da Depressão Central, e em torno de 4.000 anos A.P., nas matas das porções mais interiorizadas do Litoral (Lorscheitter, 2001; Werneck & Lorscheitter, 2001).

### 1.9 O gênero *Passiflora* L.

As plantas do gênero *Passiflora* L. apresentam flores características e estruturas especializadas, como gavinhas e nectários extraflorais. São lianas herbáceas ou lenhosas, com algumas exceções, como as espécies do subgênero *Astrophea*, que formam verdadeiros arbustos e até pequenas árvores. Algumas características morfológicas são ótimas para distinguir grupos (como as estípulas), mas outras apresentam uma enorme variação de forma e tamanho que nem sempre estão relacionados a grupos específicos (como as folhas). A flor apresenta uma grande complexidade morfológica, com várias estruturas adaptadas à polinização, como a corona de filamentos e o anel nectarífero. Algumas espécies são de grande importância econômica. *P. alata*, *P. edulis* e *P. quadrangularis* são as espécies mais utilizadas na alimentação, sendo que desta última também se extrai uma substância conhecida como “passiflorina” que possui propriedades letárgicas (Killip, 1938).

A descoberta do gênero ocorreu durante a expansão européia no Novo Mundo e a denominação *Passiflora* (flor da paixão) foi dada por seus primeiros conhecedores católicos, que relacionaram suas estruturas florais com alguns instrumentos da paixão de Cristo (Cervi, 1997).

O gênero *Passiflora* é representado no Rio Grande do Sul pelas seguintes espécies:

- *Passiflora actinia* Hooker;
- *Passiflora alata* Dryander;
- *Passiflora amethystina* Mikan;
- *Passiflora caerulea* Linnaeus;
- *Passiflora capsularis* Linnaeus;
- *Passiflora edulis* Sims;
- *Passiflora eichleriana* Masters;
- *Passiflora elegans* Masters;
- *Passiflora foetida* var. *nigelliflora* (Hooker) Masters;
- *Passiflora misera* Humboldt, Bonpland et Kunth;
- *Passiflora morifolia* Masters;
- *Passiflora organensis* Gardner;
- *Passiflora suberosa* Linnaeus;
- *Passiflora tenuifila* Killip;
- *Passiflora tricuspis* Masters.

Destas 15 espécies, somente *P. alata* não tem sua ocorrência considerada como natural no estado, sendo classificada como subespontânea (Mondin, 2001). Serão fornecidas, a seguir, informações sobre as duas espécies que constituem o objeto desta Dissertação.

#### 1.10 *Passiflora actinia* Hooker (1843)

Subgênero *Passiflora*, Série *Simplicifoliae* (Killip, 1938)

Esta é uma espécie típica de Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica) e Mista (Mata com *Araucaria*). Cresce no interior ou borda de florestas até seus

ramos atingirem a parte mais alta e exposta à luz. Tem sua ocorrência observada nos Estados do Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) (figura 1). No PR, SC e RS possui uma ampla distribuição pela encosta atlântica e borda oriental do planalto, não avançando muito em direção a oeste (Prazeres, 1989; Sacco, 1980).

Apesar da grande complexidade do gênero e do número de espécies conhecidas, os estudos envolvendo espécies silvestres limitam-se apenas a descrições taxonômicas da família e quase todos os estudos de biologia floral se restringem a espécies cultivadas. Uma das exceções foi o estudo realizado em Curitiba, com *P. actinia*, por Prazeres (1989), que revelou vários detalhes sobre o sistema reprodutivo desta espécie. Neste estudo, não foram encontrados indícios de polinização abiótica, sendo o principal polinizador uma mangava, *Xylocopa (Neoxylocopa) angustii*, tendo sido também observadas, como polinizadoras ocasionais, abelhas, moscas e vespas. O pólen tem um alto índice de viabilidade (98%), é produzido em grande quantidade e é altamente ornamentado. O sucesso reprodutivo, em condições naturais, é excelente, com praticamente 100% das flores formando frutos. Na região estudada, a floração tem início na primeira semana de setembro, o clímax é em outubro e o término em novembro, já com frutos. Nesta espécie a corona de filamentos é o aparato externo mais vistoso da flor, possuindo funções essenciais como a atração, recepção, acomodação e orientação dos polinizadores. Os filamentos mais externos possuem cores mais intensas, emitem odores, e estão numa disposição radial regular que serve para orientar o polinizador até o anel nectarífero na base da flor. O limem e o opérculo (elementos do disco) se completam, fornecendo proteção mecânica ao néctar.

Nos testes de polinização artificial de geitonogamia (flores diferentes da mesma planta) e autopolinização artificial e natural (ensacamento das flores) não houve a formação de frutos e sementes. Mas quando flores de diferentes plantas

(xenogamia) foram cruzadas artificialmente o sucesso reprodutivo foi equivalente ao das condições naturais.

A impossibilidade do contato mecânico entre o pólen e o estigma da mesma flor é devida ao comportamento floral durante a antese (abertura do botão floral). É fundamental a exposição antecipada do pólen aos agentes polinizadores em relação à deflexão estigmática. A formação dos frutos está altamente ligada à fecundação cruzada e o tamanho do fruto, bem como o número de sementes, está positivamente correlacionado com o número de grãos de pólen na superfície estigmática.

#### 1.11 *Passiflora elegans* Masters (1872)

Subgênero *Passiflora*, Série Lobatae (Killip, 1938)

A distribuição geográfica de *P. elegans* está basicamente restrita ao estado do RS e a alguns locais da Argentina e do Uruguai (figura 1). No RS ocorre em vários tipos de formações vegetais (Formações Pioneiras, Savana, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, Áreas de Tensão Ecológica), sempre ligada a um ambiente florestal. Ocorre no interior e bordas de florestas, capoeiras e matas baixas, crescendo até atingir a parte mais alta e exposta à luz. Nas áreas de campo, predominantes no interior do Estado, ocorre preferencialmente nas matas de galeria ao longo dos rios. Apesar da distribuição disjunta, ocorre na maioria das regiões do Estado, menos no planalto oriental e nas encostas da Serra Geral (limite sul da distribuição de *P. actinia*).

### 1.12 Estudos filogenéticos no gênero *Passiflora*

Com o objetivo de estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Passiflora*, diversos estudos com marcadores moleculares têm sido desenvolvidos pelo nosso grupo. Scherer (1999) estabeleceu as relações filogenéticas de 12 espécies de *Passiflora* através das seqüências dos espaçadores internos transcritos do nrDNA, ITS1 e ITS2; paralelamente, Lorenz (1999) analisou as seqüências do espaçador intergênico cloroplasmático *trnL-trnF* de 21 espécies do gênero. Muschner (2001) investigou, além dos marcadores ITS e *trnL-trnF*, as seqüências do espaçador intergênico cloroplasmático *psbA-trnH* para 21 espécies, distribuídas em cinco subgêneros. Utilizou ela diferentes métodos de análise filogenética (parcimônia, “neighbor-joining” e máxima verossimilhança) para comparar as filogenias obtidas para cada um dos três marcadores e pela combinação destes. Em todos estes estudos, foi verificada a clara separação entre as espécies dos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*, concordando com a taxonomia do grupo (baseada em características morfológicas).

### 1.13 Um estudo de caso: *P. actinia* e *P. elegans*

Nos estudos prévios sobre a filogenia do gênero *Passiflora*, além da separação dos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*, foram verificados constantes agrupamentos de espécies nas árvores filogenéticas, sugerindo um alto grau de relacionamento entre estas. Além da similaridade genética, algumas espécies chamaram a atenção pela semelhança morfológica (vegetativa e/ou floral), como no caso de *P. rubra* e *P. capsularis*, *P. tenuifila* e *P. caerulea* (formas jovens), *P. organensis* e *P. misera*, e *P. actinia* e *P. elegans*.



*P. actinia* e *P. elegans* destacaram-se por serem espécies que ocorrem no RS, e por apresentar uma notável semelhança nas formas florais e vegetativas. A principal característica para a distinção das duas é a morfologia foliar, que é simples em *P. actinia* e trilobada em *P. elegans*. Apesar de ocorrerem no mesmo tipo de habitat, elas apresentam padrões de distribuição bem diferentes: *P. actinia* tem uma ampla ocorrência na Mata Atlântica brasileira e *P. elegans* é restrita ao RS e regiões limítrofes do Uruguai e Argentina. Estas espécies podem ser consideradas parapátricas, pois o limite sul de distribuição de uma é o limite norte da outra, sendo que, até o presente momento, populações de ambas não foram observadas juntas.

A combinação dos dados genéticos, morfológicos e de distribuição, levaram à formulação de uma hipótese específica: *P. elegans* seria uma espécie derivada de *P. actinia*. Adicionalmente, procurou-se verificar qual seria a influência da evolução da planície costeira e da migração da Mata Atlântica neste eventual processo de especiação.



Figura 1. Distribuição geográfica das espécies *P. actinia* (em vermelho) e *P. elegans* (em verde).

## 2. Objetivos

O objetivo geral do presente estudo é investigar as relações evolutivas entre as espécies *Passiflora actinia* e *P. elegans* através das seguintes abordagens:

- Trabalho de campo para coleta de material e dados mais precisos sobre a distribuição geográfica das duas espécies no Rio Grande do Sul;
- Análise de informações morfológicas, fenológicas e ecológicas;
- Investigação das relações filogenéticas pelo estudo detalhado da seqüência nucleotídica dos marcadores moleculares: espaçadores intergênicos cloroplasmáticos *psbA-trnH* e *trnL-trnF*, e dos espaçadores internos transcritos dos genes ribossomais nucleares (ITS);
- Comparação dos padrões de distribuição das duas espécies com os fenômenos geológicos ocorridos durante o Holoceno e a influência destes na migração da Mata Atlântica.

### **3. Materiais e Métodos**

#### 3.1 Obtenção da amostra

O material analisado foi obtido a partir de coletas na natureza, onde também foram avaliados diversos aspectos do desenvolvimento e das interações ecológicas das espécies:

- tipo de formação vegetal na qual se encontravam os indivíduos;
- posição na mata onde se encontravam (beira ou interior do mato);
- hábito (rasteiro, escandescente, de dossel);
- estágio do desenvolvimento (juvenil ou adulto);
- presença de florescimento e/ou frutificação;
- identificação de outras espécies do gênero presentes no local;
- grau de degradação do ambiente.

Para a extração de DNA foram coletadas, preferencialmente, folhas jovens que, imediatamente, foram acondicionadas em sílica gel para secagem. Material para a confecção de exsicatas também foi coletado, sendo depositado no Herbário ICN, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 3.2 Extração de DNA

O material coletado foi macerado com nitrogênio líquido em gral e o DNA extraído pela técnica de Roy *et al.* (1992), modificada e adaptada para espécies de *Passiflora*, como é descrita a seguir:

- 20mg de material macerado;
- Adição de 600µl de tampão de extração (100mM TRIS-HCl; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoetanol; 2% PVP 40), 60µl de β-mercaptoetanol e 6µl de Proteinase K (10mg/ml);
- Incubação a 65°C por 30 minutos;
- Emulsão com 600µl de fenol-clorofórmio (1:1);
- Centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm;
- Recolhimento da fase aquosa e estimativa do seu volume;
- Precipitação do DNA com um volume de isopropanol e 1/10 de acetato de sódio;
- Armazenamento por 24 horas no freezer;
- Centrifugação por 20 minutos e descarte do sobrenadante;
- Lavagem do “pellet” com 200µl de etanol 70% e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos;
- Eluição do “pellet” em 200µl de água ultra-pura estéril e 2µl de RNase (10mg/ml).

Os produtos de extração foram testados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta. Para a quantificação, os produtos foram

comparados com um DNA padrão ( $\lambda$  DNA, GIBCO-BRL) e sua concentração estimada.

### 3.3 Marcadores moleculares para o seqüenciamento

Os DNAs foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), usando iniciadores específicos universais, descritos na literatura, para cada um dos marcadores analisados. As PCRs foram desenvolvidas em termociclador automático MJ Res. Inc., com protocolos padrões adaptados para os marcadores. Os ajustes foram feitos para atender as necessidades do material analisado e as repetições de cada reação não apresentaram diferenças.

As condições laboratoriais para a amplificação dos espaçadores intergênicos cloroplasmáticos *psbA - trnH*, *trnL - trnF* e dos espaçadores dos genes ribossomais nucleares ITS estão descritas nas tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2. Condições laboratoriais relacionadas às determinações do marcador *psbA – trnH*

---

<u>Reação</u>	
Tampão	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Primer 1 ( <i>psbA</i> F)	0,2 μM
Primer 2 ( <i>trnH</i> R)	0,2 μM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng

<u>Condições de amplificação</u>	
	94°C por 3 min para uma desnaturação inicial
30 ciclos	94°C por 45 seg para desnaturação
	58°C por 1 min para anelamento
	72°C por 1 min e 30 seg para alongamento
	72°C por 10 min para uma extensão final

Seqüências dos primers para PCR e seqüenciamento (Sang *et al.* 1997)

Primer 1 ( <i>psbA</i> F)	5' GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C 3'
Primer 2 ( <i>trnH</i> R)	5' CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC 3'

---

Tabela 3. Condições laboratoriais relacionadas às determinações do marcador *trnL – trnF*

---

<u>Reação</u>	
Tampão	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Primer e	0,2 μM
Primer f	0,2 μM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng

<u>Condições de amplificação</u>	
	94°C por 3 min
35 ciclos	{ 94°C por 1 min
	{ 55°C por 1 min
	{ 72°C por 1 min
	72°C por 5 min

Seqüências dos primers para PCR e seqüenciamento (Taberlet *et al.* 1991)

Primer e	5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3'
Primer f	5' TTT GAA CTG GTG ACA CGA G 3'

---

Tabela 4. Condições laboratoriais relacionadas às determinações do marcador ITS

---

<u>Reação</u>	
Tampão	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Primer 75	0,2 µM
Primer 92	0,2 µM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng

<u>Condições de amplificação</u>	
	94°C por 3 min
30 ciclos	{ 94°C por 45 seg
	{ 58°C por 1 min
	{ 72°C por 1 min e 30 seg
	72°C por 10 min

Seqüências dos primers para PCR (White *et al.* 1990)

Primer 75	5' TAT GCT TAA ACT CAG CGG G 3'
Primer 92	5' AAG GTT TCC GTA GGT GAA C 3'

Seqüências dos primers para o seqüenciamento (White *et al.* 1990)

Primer 74 (ITS1)	5' GCT ACG TTC TTC ATC GAT 3'
Primer ITS3 (ITS2)	5' ATC GAT GAA GAA CGT ACG 3'

---



Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz UV para a checagem da amplificação.

#### Quantificação do DNA amplificado

A quantificação dos produtos de PCR foi realizada com o marcador de peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (GIBCO-BRL). Foram utilizados 4 µl da amostra (produto de PCR) + 1 µl de BFB (com glicerol), e 4 µl do marcador + 1 µl de BFB (com glicerol). As amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz UV. Para a quantificação do DNA dos produtos de PCR, a banda das amostras foi comparada com as do marcador de peso molecular, estimando-se sua concentração.

#### Purificação enzimática dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados enzimaticamente utilizando a enzima ExoSAP-IT (USB), que degrada primers e dNTPs não incorporados durante as reações de PCR. A reação enzimática ocorre a 37°C e sua degradação a 80°C.

#### Seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA amplificado por PCR foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM 310, seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Perkin Elmer - Applied Biosystems), com marcação terminal

fluorescente. As condições da reação de seqüenciamento estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Condições das reações de seqüenciamento

---

<u>Reação</u>	
Terminator Ready Reaction Mix	2 $\mu$ l
2,5 X Sequencing Buffer	6 $\mu$ l
DNA	10 ng
Primer	3,2 pmol
Água estéril	Para completar 20 $\mu$ l

<u>Condições</u>	
25 ciclos	{ 96°C por 20 seg 60°C por 4 min

---

#### Purificação com etanol/acetato de sódio

Antes do seqüenciamento propriamente dito, as amostras foram purificadas para retirar reagentes não incorporados, de acordo com o seguinte protocolo:

- Adição de 2  $\mu$ l de acetato de sódio 3M pH 4,6 e 50  $\mu$ l de etanol 95% em cada produto de reação de seqüenciamento;
- Precipitação por 15 min à temperatura ambiente;
- Centrifugação por 20 min a 14.000rpm;
- Descarte do sobrenadante;
- Adição de 250  $\mu$ l de etanol 70% ao “pellet”;

- Centrifugação por 5 min a 14.000rpm;
- Descarte do sobrenadante, secagem das amostras a 90°C por 10 min.

#### Análise das seqüências de DNA

As seqüências foram alinhadas pelo programa Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 2001) e corrigidas manualmente. As matrizes de distância foram construídas no programa PAUP\*, versão 4.0b4a (Swofford, 1998), utilizando a distância-p (Kimura, 1980), e agrupadas através do método de “neighbor-joining” (Saitou & Nei, 1987). A análise dos sítios variáveis foi realizada no programa MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Kumar *et al.*, 1993).

#### 3.4 Teste de viabilidade das sementes

Para testar a viabilidade das sementes do indivíduo E56 (possível híbrido de *P. actinia* e *P. elegans*) foi utilizado o teste do tetrazolium (Bonner, 1986). Este experimento indica quais os embriões que são viáveis através da coloração avermelhada dos mesmos. Foram analisadas 20 sementes de cada fruto: três do indivíduo E56 e de um do indivíduo E30 (controle).

Protocolo:

- As sementes foram colocadas em água destilada a 30°C por 24h;
- Cortadas longitudinalmente, e embebidas em solução de 2,3,5 triphenyle tetrazolium chloride a 0,5% (0,5g/100ml);
- Incubadas a 30°C até que o embrião ficasse com uma coloração avermelhada (a reação não pode ultrapassar 48h).

## 4. Resultados

### 4.1 Coletas

No presente estudo foram observadas as quinze espécies do gênero *Passiflora* descritas para o Estado: *P. actinia* Hooker; *P. alata* Dryander; *P. amethystina* Mikan; *P. caerulea* Linnaeus; *P. capsularis* Linnaeus; *P. edulis* Sims; *P. eichleriana* Masters; *P. elegans* Masters; *P. foetida* var. *nigelliflora* (Hooker) Masters; *P. misera* Humbold, Bonplant et Kunth; *P. morifolia* Masters; *P. organensis* Gardner; *P. suberosa* Linnaeus; *P. tenuifila* Killip e *P. tricuspis* Masters. Os locais de coleta e as espécies encontradas estão descritos na tabela 6 e representados na figura 2.

Foi coletado material de 73 plantas de *P. actinia*, em 25 pontos diferentes de coleta (tabela 7), e 68 de *P. elegans*, em 21 pontos (tabela 8). As coletas foram realizadas no período de maio de 1999 a dezembro de 2001. Os dados de fenologia das duas espécies são apresentados na tabela 9.

A ocorrência de *P. actinia* no RS está restrita à região nordeste, sendo encontrada na encosta da Serra Geral, em áreas de Mata Atlântica, e no planalto oriental, em matas com *Araucaria*. *P. elegans* tem uma distribuição ampla e descontínua no RS, ocorrendo em vários tipos de formações vegetais, sempre ligada a um ambiente florestal. Apesar da ampla distribuição no Estado, ela não ocorre no planalto oriental e nas encostas da Serra Geral (limite sul da distribuição de *P. actinia*). Nas áreas de campo, predominantes no interior do Estado, a espécie ocorre preferencialmente nas matas de galeria. A alta fragmentação deste tipo de habitat deve ser responsável pelo grau elevado de isolamento geográfico entre as populações encontradas. Em comparação, as populações de *P. actinia* se distribuem de forma mais contínua na região que

ocupam, principalmente por estarem presentes nas encostas da Serra Geral. Esta região possui muitas áreas desfavoráveis para a agricultura o que permitiu a conservação destas florestas, apesar de em muitos pontos estas estarem fragmentadas.

Embora ocupem áreas geográficas diferentes, as duas espécies compartilham várias características ecológicas importantes. As plantas jovens foram observadas principalmente no interior de florestas (anexo 1), sendo também encontradas nas bordas. Com o decorrer do desenvolvimento, as plantas crescem em direção às partes mais altas, até atingir a área mais exposta à luz, crescendo então lateralmente no dossel. Durante o seu desenvolvimento, a planta perde as folhas jovens, ficando somente o caule nu (anexo 1) no interior do mato. O caule apresenta muitas ramificações e chega a ter diâmetros superiores a 20 cm. Durante as observações de campo, foi constatado que estas duas são as espécies que atingem as maiores dimensões em relação às demais espécies do gênero encontradas no Estado, sendo muitas vezes difícil determinar os limites de um indivíduo. As plantas perdem muitas folhas durante o inverno, rebrotando na primavera. Todos os indivíduos observados com flores e frutos eram plantas adultas, com um porte considerável, sendo que as primeiras flores foram observadas nas partes mais altas da planta, provavelmente devido ao fato de que estas partes ficam expostas mais tempo à luz do que as partes baixas. Os frutos maduros caem no chão, onde foram observados sinais de predação, sendo as marcas nos frutos indicativas de que estes são predados principalmente por pássaros e roedores.

Até o presente momento, as duas espécies não foram encontradas em simpatria, apesar de que em Santo Antônio da Patrulha (RS) foi encontrada uma população de *P. elegans* próxima (cerca de 9 quilômetros) de populações de *P. actinia*. Neste local, foi observada uma planta de *P. elegans* morfologicamente

diferente das demais. Este indivíduo apresentou um fenótipo claramente intermediário (foliar e floral) entre *P. actinia* e *P. elegans*, sugerindo que se tratava de um híbrido (anexos 2, 3 e 4). O seqüenciamento dos marcadores moleculares confirmou a origem híbrida deste indivíduo. Esta planta produziu flores e frutos, dos quais foram coletadas sementes. A viabilidade das sementes do híbrido foi determinada utilizando o teste do tetrazolium. Foram testadas vinte sementes de três frutos do híbrido e de um indivíduo de *P. elegans*, do mesmo local, usado como controle. Todos os frutos do híbrido apresentaram sementes viáveis (figura 3). Não houve diferença qualitativa entre o controle e o híbrido.

Para investigar os possíveis efeitos de fatores abióticos no padrão de distribuição geográfica de *P. actinia* e *P. elegans* no RS, foram levantados dados sobre a altitude e precipitação média anual de alguns pontos de coleta (tabela 10). Com o mesmo objetivo, os pontos de coleta georeferenciados foram sobrepostos a um mapa dos principais tipos de solos do RS (figura 4). As várias subdivisões dos tipos de solos foram agrupadas de acordo com o tipo de sedimento formador predominante: depósitos aluvionares de planícies de inundação; depósitos lacustres, eólicos, marinhos e coluviais; depósitos basálticos e depósitos graníticos.

Tabela 6. Pontos de coleta de espécies do gênero *Passiflora*

Local	Espécie
FLONA - São Francisco de Paula - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. actinia</i>
Serra da Boa Vista - Riozinho - RS	<i>P. actinia</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. organensis</i>
Parque Florestal Estadual do Turvo - Derrubadas - RS	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. misera</i>
Morro Santana - Porto Alegre - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. elegans</i>
Capané - Cachoeira do Sul - RS	<i>P. misera</i>
	<i>P. caerulea</i>
Três Barras - Santa Maria - RS	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. actinia</i>
Mirante - São Francisco de Paula - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. actinia</i>
Alpes de SFP - São Francisco de Paula - RS	<i>P. actinia</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. misera</i>
Serra do Pinto - Rota do Sol - São Francisco de Paula - RS	<i>P. actinia</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. misera</i>
Cânion Churriado - Praia Grande - SC	<i>P. actinia</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. organensis</i>
Horto Florestal Barba Negra - Barra do Ribeiro - RS	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. elegans</i>
Serra do Umbu - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. actinia</i>
BR 116/Km 318 - Barra do Ribeiro - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. alata</i>
BR 116/Km 346 - RS	<i>P. misera</i>
	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. suberosa</i>
BR 116 próximo à entrada da cidade Pelotas - RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. caerulea</i>
Florida - Canguçu - RS	<i>P. caerulea</i>
Pedra do Segredo - Caçapava do Sul - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. elegans</i>

Tabela 6. (Cont.)

Local	Espécie
Portão - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. suberosa</i>
D. Pedro de Alcântara - RS	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. actinia</i>
	<i>P. suberosa</i>
Parque da Guarita - Torres - RS	<i>P. actinia</i>
RS20/Km 82 - Loc. José Velho - RS	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. actinia</i>
	<i>P. suberosa</i>
Parque das Cachoeiras - São Francisco de Paula - RS	<i>P. actinia</i>
Próximo a sede campestre da AABB - Igrejinha - RS	<i>P. suberosa</i>
Galpão de Pedra - Caçapava do Sul - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. caerulea</i>
Casa de Pedra - Bagé - RS	<i>P. caerulea</i>
Strobel - Cachoeira do Sul - RS	<i>P. misera</i>
Colônia japonesa - Ivoti - RS	<i>P. capsularis</i>
PróMata - São Francisco de Paula - RS	<i>P. actinia</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. organensis</i>
	<i>P. misera</i>
Ponta do Cego - Porto Alegre - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. suberosa</i>
Reserva Biológica do Lami - Porto Alegre - RS	<i>P. misera</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. suberosa</i>
Fazenda Água Branca - Camaquã - RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. actinia</i>
Cachoeira das Andorinhas - Rolante - RS	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. tenuifila</i>
Barra do Ouro - RS	<i>P. actinia</i>
	<i>P. organensis</i>
	<i>P. caerulea</i>
Horto Botânico Irmão Teodoro Luís - Pelotas - RS	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. elegans</i>
	<i>P. elegans</i>
João Jardim - Guaíba - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. elegans</i>
BR 290/Km 271 - Cachoeira do Sul - RS	<i>P. actinia</i>
Estrada entre Morro da Antena (Osório) a Caraaá - RS	<i>P. actinia</i>
Estrada entre Maracanã e Taquara - RS	<i>P. actinia</i>



Tabela 6. (Cont.)

Local	Espécie
Porto Alegre - RS	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. morifolia*</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. suberosa</i>
Parque Nacional da Lagoa do Peixe - Tavares - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. suberosa</i>
Faxinalzinho - Torres - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. suberosa</i>
BR290/Km 150 - Arroio do Ratos - RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. elegans</i>
Rincão do Inferno - Lavras do Sul - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. foetida</i> var. <i>nigelliflora</i>
Itacolomi - Morungava - RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. suberosa</i>
Estrada entre Taquara e Gramado - RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. actinia</i>
Morro Pelado - Canela - RS	<i>P. actinia</i>
	<i>P. caerulea</i>
Linha Brasil - Nova Petrópolis - RS	<i>P. caerulea</i>
Tapes - RS	<i>P. suberosa</i>
Estrada entre Tapes e Arambaré - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. misera</i>
Arambaré - RS	<i>P. suberosa</i>
Cambará do Sul - RS	<i>P. caerulea</i>
Entre Águas Claras e Morro Grande - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. elegans</i>
Fazenda São Maximiano, Prof. Matzenbacher, Guaíba - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. elegans</i>
Estrada do Conde, entre Eldorado e Guaíba - RS	<i>P. tenuifila</i>
BR386/Km375, próximo ao acesso a Paverama - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. alata</i>
Estrada entre Tapera e Lagoa do Três Cantos - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. alata</i>
Estrada de acesso a São Miguel das Missões - RS	<i>P. tricuspis</i>
São Miguel das Missões - RS	<i>P. elegans</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. tricuspis</i>
RS332, Km128, entre Espumoso e Soledade - RS	<i>P. elegans</i>
BR386, Km330, próximo a Marques de Souza - RS	<i>P. elegans</i>

Tabela 6. (Cont.)

Local	Espécie
Reserva Biológica da Serra Geral - Barra do Ouro - RS	<i>P. actinia</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. organensis</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. edulis</i>
Nascente do Rio dos Sinos - Caraá - RS	<i>P. amethystina</i>
	<i>P. eichleriana</i>
	<i>P. actinia</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. caerulea</i>
RS 30/Km 60, Sto Ant. da Patrulha - RS	<i>P. misera ou organensis</i>
	<i>P. elegans</i>
Estrada entre Sto Ant. da Patrulha/Caraá - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. caerulea</i>
Estrada Caraá/Osório - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. actinia</i>
	<i>P. alata</i>
Parque Estadual de Itapuã - Viamão - RS	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. elegans</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. misera</i>
Novo Hamburgo - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. tenuifila</i>
Rosário do Sul - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. edulis</i>
Freeway (BR290) - RS	<i>P. misera</i>
	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. caerulea</i>
Entrepelados/RS474 - RS	<i>P. edulis</i>
	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. alata</i>
Taquara/Rolante - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. alata</i>
Taquara/Morungava (RS20) - RS	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. suberosa</i>
Es. José Soares-Morungava - RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. edulis</i>
	<i>P. suberosa</i>
Gravataí - RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. suberosa</i>
Estação Ecológica do TAIM - RS	<i>P. caerulea</i>
Santana da Boa Vista - RS	<i>P. caerulea</i>

Tabela 6. (Cont.)

Local	Espécie
Cerro Botucaraí-Candelária – RS	<i>P. alata</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. capsularis</i>
Santana do Livramento – RS	<i>P. caerulea</i>
Viamão – RS	<i>P. elegans</i>

\*Ação antrópica indireta.

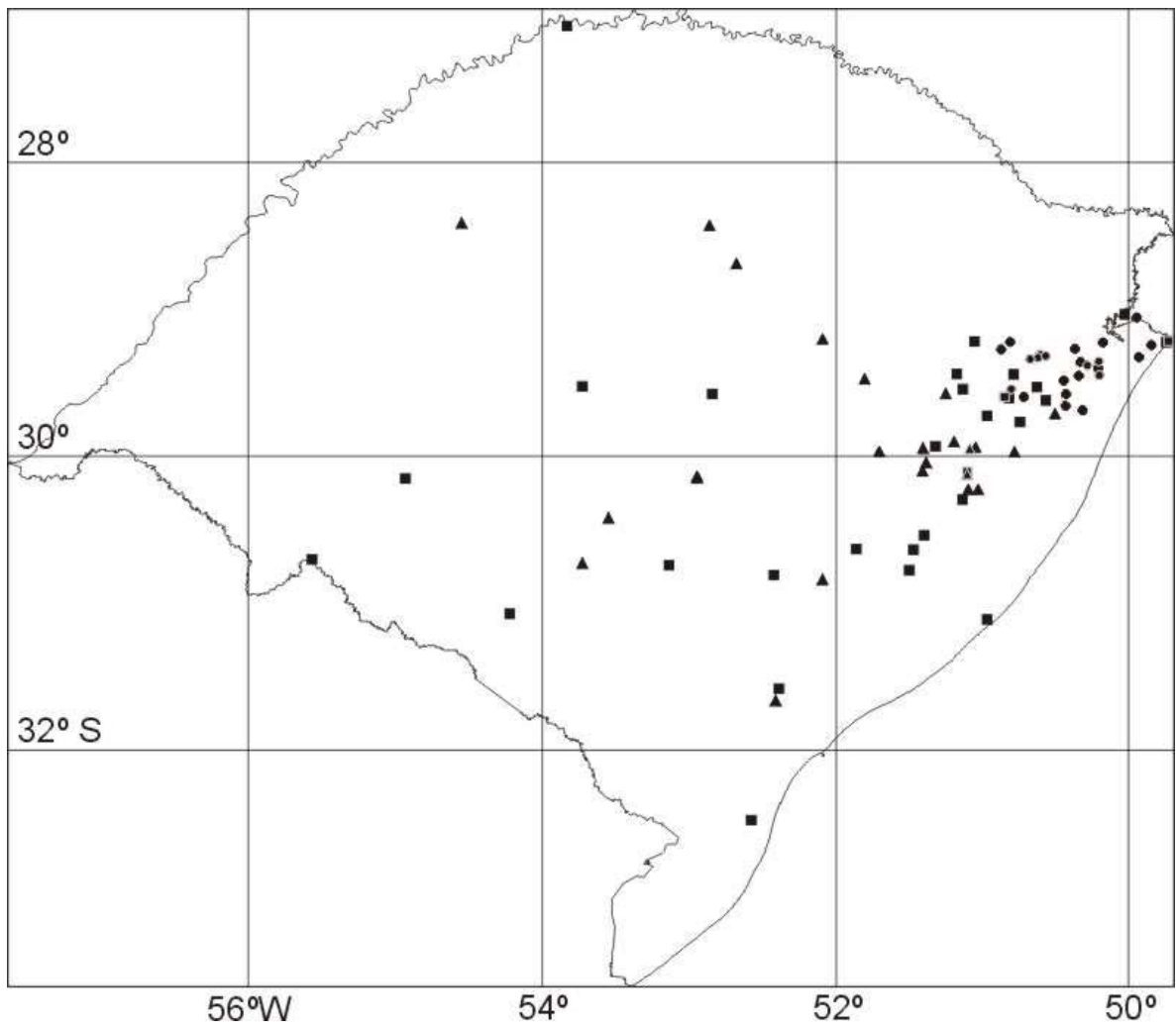


Figura 2. Mapa do RS indicando os pontos de coleta:

- *P. actinia*
- ▲ *P. elegans*
- *Passiflora* (sem *P. actinia* e *P. elegans*)

Tabela 7. Pontos de coleta de *Passiflora actinia*

n° de indivíduos	Origem
4	FLONA - São Francisco de Paula - RS
1	Três Cachoeiras* - RS
4	Serra da Boa Vista - RS
2	Mirante - São Francisco de Paula - RS
3	Alpes de São Francisco - São Francisco de Paula - RS
3	Serra do Pinto - RS
1	São José dos Pinhais** - PR
4	Cânion Churriado - Praia Grande - SC
5	Curitiba** - PR
1	Serra do Umbu - RS
4	José Velho - São Francisco de Paula - RS
3	Parque das Cachoeiras - São Francisco de Paula - RS
1	Pró-Mata PUCRS - São Francisco de Paula - RS
2	Dom Pedro de Alcântara - Torres - RS
2	Cachoeira das Andorinhas - Rolante - RS
2	Barra do Ouro - RS
5	Osório - RS
3	Taquara - RS
1	Gramado - RS
5	Canela - RS
3	Reserva Biológica da Serra Geral - RS
3	Nascente do Rio dos Sinos - RS
9	Caraá/Osório - RS
1	Taquara/Morungava - RS
1	Urubici** - RS
73 indivíduos	25 pontos de coleta

\* coletado por C.A. Mondin

\*\*coletado por A.C. Cervi

Tabela 8. Pontos de coleta de *Passiflora elegans*

n° de indivíduos	Origem
1	Camaquã* - RS
7	Morro Santana - Porto Alegre - RS
2	Barra do Ribeiro - RS
6	Pedra do Segredo - Caçapava do Sul - RS
1	Portão - RS
1	Viamão - RS
3	Ponta do Cego/Reserva Biológica do Lami - Porto Alegre - RS
3	Horto Botânico, Ufpel, Pelotas - RS
4	Guaíba - RS
1	BR290/Km 271 - Cachoeira do Sul - RS
7	RS30/Km60 - Santo Antônio da Patrulha - RS
3	Horto Florestal Barba Negra - Barra do Ribeiro - RS
3	BR290/Km 150, Arroio dos Ratos - RS
10	Rincão - Lavras do Sul - RS
1	Águas Claras - RS
2	Faz. Matzenbacher - Guaíba - RS
4	BR386/Km375 - Paverama - RS
2	Lagoa dos Três Cantos - RS
1	São Miguel das Missões - RS
1	RS332/Km128 - Espumoso - RS
5	Lageado - RS
68 indivíduos	21 pontos de coleta

\* coletado por C.A. Mondin

Tabela 9. Fenologia comparada de *P. actinia* e *P. elegans* no Rio Grande do Sul, período de amostragem: maio de 1999 a dezembro de 2001

		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<i>Passiflora actinia</i>	Flores									X	X	X	X
	Frutos	X		X	X	X				X	X	X	X
<i>Passiflora elegans</i>	Flores									X	X	X	X
	Frutos	X								X	X	X	X

Tabela 10. Altitude e precipitação média anual de alguns pontos de coleta das duas espécies consideradas no presente trabalho (Machado, 1950)

Município	Altitude (m)	Precipitação (mm)	Ocorrência
Caçapava do Sul - RS	450	1665	<i>P. elegans</i>
Cachoeira do Sul - RS	68	1590	<i>P. elegans</i>
Porto Alegre - RS	10	1322	<i>P. elegans</i>
Torres - RS	43	1423	<i>P. actinia</i>
São Francisco de Paula - RS	912	2468	<i>P. actinia</i>
Taquara - RS	29	1384	<i>P. actinia</i>

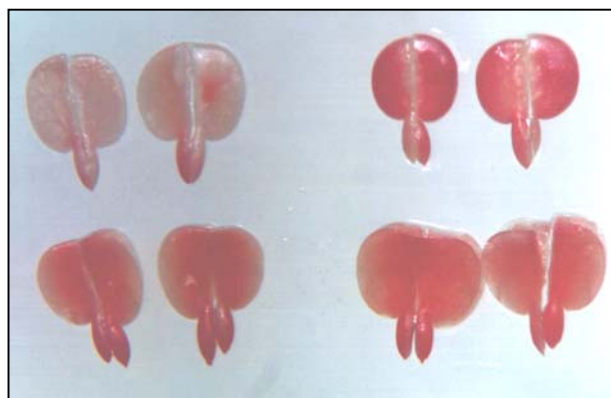


Figura 3. Foto representativa da análise de viabilidade de embriões pelo teste tetrazolium (Bonner, 1986). A coloração vermelha indica a viabilidade do embrião.

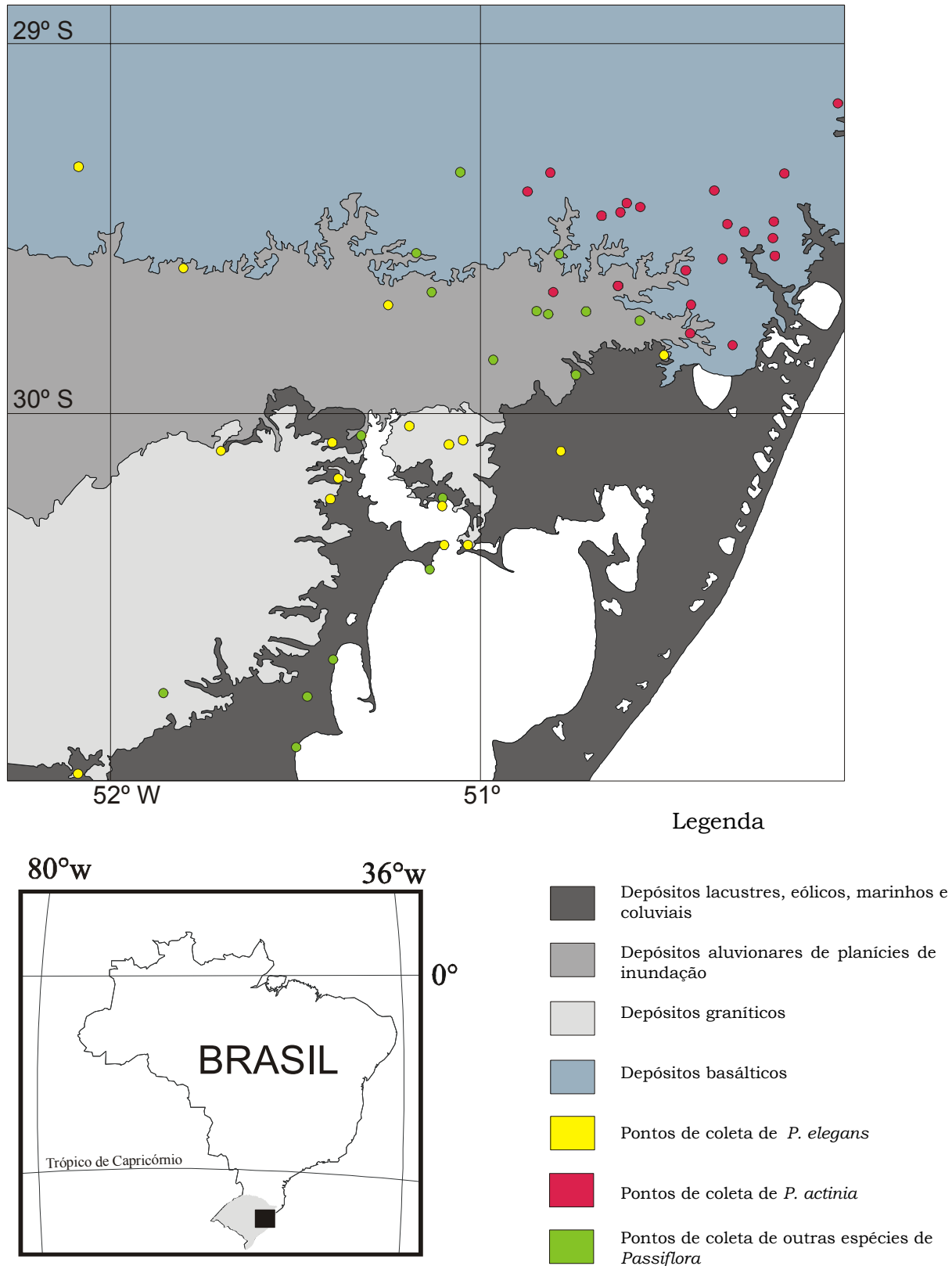


Figura 4. Detalhe do mapa do RS indicando os principais tipos de sedimento da composição do solo e a ocorrência de espécies de *Passiflora*



## 4.2 Seqüenciamento

Os espaçadores intergênicos cloroplasmáticos (*psbA-trnH* e *trnL-trnF*) e os espaçadores internos transcritos dos genes ribossomais nucleares (ITS) foram amplificados (figura 5) e seqüenciados. Doze plantas de *P. actinia* e doze de *P. elegans* foram analisadas (tabela 11). Além destas, sete outras espécies do gênero *Passiflora*, analisadas por Muschner (2001), foram incluídas na análise (tabela 12).

### 4.2.1 Variação intraespecífica dos marcadores

Os sítios que apresentaram variação intraespecífica nas plantas analisadas de *P. actinia* e *P. elegans* estão indicados na tabela 13.

A região ITS (ITS1 e ITS2 foram analisados juntos) de *P. elegans* apresentou uma transição (sítio 109), uma transversão (65) e duas inserções/deleções (108 e 388). *P. actinia* apresentou 5 sítios polimórficos: 3 transversões, 1 transição e uma inserção/deleção, todas na planta A17, coletada em Curitiba. Neste marcador, 15 sítios separaram *P. actinia* de *P. elegans*, dos quais 13 não apresentaram variação intraespecífica.

O espaçador cloroplasmático *trnL-trnF* não apresentou variação intraespecífica em *P. actinia* nem em *P. elegans*. Foram encontrados 7 sítios que diferenciaram uma espécie da outra: uma substituição (transversão) na posição 198 e uma inserção/deleção de 6pb (AAGATT) nas posições 263-268.

*P. actinia* também não apresentou nenhuma variação intraespecífica no espaçador cloroplasmático *psbA-trnH*. Algumas plantas de *P. elegans* apresentaram uma inserção/deleção de T (posição 227), em uma região do marcador que se caracteriza por uma série de repetições diretas. Com este

marcador, *P. actinia* e *P. elegans* podem ser diferenciadas através de uma substituição (T em *P. actinia* e G em *P. elegans*) no sítio 59 e de uma inserção/deleção (presença de um T em *P. elegans*) na posição 174.

#### 4.2.2 Comparações interespecíficas

Os resultados descritos a seguir, por marcador molecular, envolvem a análise considerando-se as nove espécies listadas na tabela 12, sendo que as seqüências das espécies *P. actinia* e *P. elegans* pertencem aos indivíduos A37 e E20, respectivamente.

*ITS*: Os espaçadores ITS1 e ITS2 foram analisados em conjunto e o tamanho da região examinada variou de 385 a 434 pares de bases (pb), tendo sido encontrados 133 sítios variáveis (tabela 14). Foram alinhados 458 nucleotídeos (incluindo *gaps* ou inserções/deleções). No indivíduo híbrido (*P. actinia* x *P. elegans*) foram encontrados 15 sítios polimórficos (heterozigotos) e para representá-los foram utilizados os símbolos de ambigüidade da IUPAC (K: G+T, M: C+A, R: G+A, S: C+G, W: A+T, Y: C+T), supondo que os nucleotídeos estejam em quantidades equimolares (figura 6).

*trnL-trnF*: O tamanho do espaçador considerado foi de 283 a 294pb, com 28 sítios variáveis (tabela 15), e o número total de nucleotídeos alinhados foi de 297 (incluindo *gaps*).

*psbA-trnH*: O tamanho da região avaliada variou de 306 a 317pb, sendo 75 sítios variáveis (tabela 16), e o número de nucleotídeos alinhados foi de 322 (incluindo *gaps*).

As médias do conteúdo de GC foram de 66,7% em ITS, 36,6% em *trnL-trnF* e 26,6% em *psbA-trnH*. As matrizes de distância-p calculadas através do programa PAUP são apresentadas nas tabelas 17, 18 e 19, respectivamente para cada um dos marcadores.

A tabela 20 mostra as distâncias genéticas médias dentro e entre as diferentes séries de *Passiflora* consideradas, comparadas com as diferenças entre *P. actinia* e *P. elegans* nos três marcadores genéticos analisados. Os valores encontrados entre as duas mostram-se sempre menores, sendo que, quanto aos marcadores citoplasmáticos, os números são cerca de dez vezes menores daqueles observados seja dentro ou entre as séries *Lobatae* e *Simplicifoliae*, documentando, assim, sua extrema similaridade.

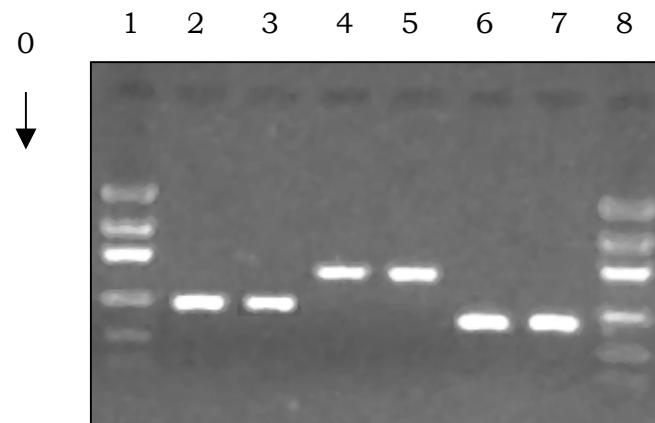


Figura 5. Foto de gel de agarose 1% corado com EtBr. Canaletas 1 e 8 marcador de peso molecular; 2 e 3 produtos de PCR de *psbA-trnH*; 4 e 5 produtos de PCR de ITS; 6 e 7 produtos de PCR de *trnL-trnF*.

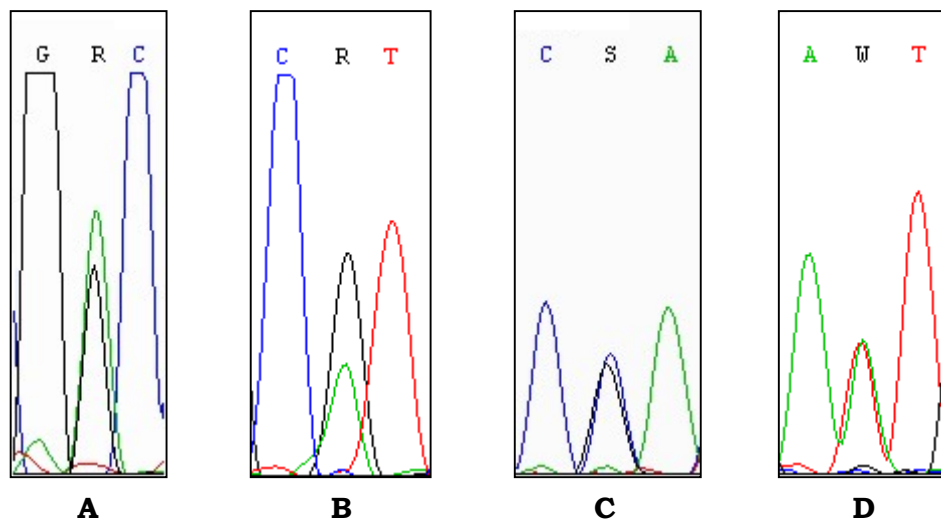


Figura 6. Fragmentos de eletroferogramas indicando alguns dos sítios polimórficos (heterozigotos) para o marcador ITS no indivíduo E56: R=A+G, S=C+G, W=A+T. Em **A**: sítio 212; **B**: sítio 238; **C**: sítio 254; **D**: sítio 309.

Tabela 11. Plantas de *P. actinia* e *P. elegans* cujos DNAs foram seqüenciados

Espécie	Planta	Localidade	Nº de coletor
	A8	São Francisco de Paula - RS	APL 014
	A10	Serra do Pinto - RS	APL 016
	A12	Praia Grande - SC	APL 019
	A17	Curitiba - PR	A.Cervi
	A23	Serra do Umbu - RS	APL 032
Passiflora	A32	D. Pedro de Alcântara - Torres - RS	PASS 059
<i>actinia</i>	A37	Serra da Boa Vista - RS	APL 055
	A39	Barra do Ouro - RS	APL 062
	A42	Osório - RS	PASS 069
	A47	Taquara - RS	PASS 074
	A50	Canela - RS	APL 105
	A56	Reserva Biol. da Serra Geral - RS	APL 115
	E12	Caçapava do Sul - RS	PASS 026
	E16	Portão - RS	PASS 033
	E20	Porto Alegre - RS	PASS 063
	E22	Pelotas - RS	APL 068
	E26	Guaíba - RS	APL 072
Passiflora	E29	Cachoeira do Sul - RS	APL 078
<i>elegans</i>	E30	Santo Antônio da Patrulha - RS	PASS 116
	E38	Lavras do Sul - RS	APL 093
	E44	Paverama - RS	PASS 097
	E48	Lagoa dos Três Cantos - RS	PASS 103
	E49	São Miguel das Missões - RS	PASS 105
	E56*	Santo Antônio da Patrulha - RS	PASS 118

\*híbrido

Tabela 12. Espécies analisadas para comparação

Espécie	Origem	Série
<i>P. elegans</i>	Porto Alegre - RS	Lobatae
<i>P. actinia x P. elegans</i>	Santo Antônio da Patrulha - RS	Lobatae x Simplicifoliae
<i>P. actinia</i>	Serra da Boa Vista - RS	Simplicifoliae
<i>P. sidaefolia</i> *	Munhoz - MG	Imbricatae
<i>P. eichleriana</i> *	Caraá - RS	Lobatae
<i>P. amethystina</i> *	Munhoz - MG	Lobatae
<i>P. jilekii</i> *	Rancho Queimado - SC	Simplicifoliae
<i>P. galbana</i> *	Camocim de São Félix - PE	Simplicifoliae
<i>P. tenuifila</i> *	Porto Alegre - RS	Lobatae
<i>P. caerulea</i> *	São Francisco de Paula - RS	Lobatae

\*Seqüências descritas por Muschner (2001).

Tabela 13. Variação intraespecífica dos marcadores *psbA-trnH* e ITS

Indivíduo	<i>psbA-trnH</i>					ITS				
	227	65	87	96	99	100	108	109	147	388
A8	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A10	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A12	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A17	-	C	C	-	G	A	-	C	A	-
A23	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A32	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A37	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A39	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A42	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A47	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A50	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
A56	-	C	T	A	T	C	-	C	C	-
E12	-	C	T	A	T	C	-	C	A	-
E16	T	A	T	A	T	C	-	T	A	-
E20	-	A	T	A	T	C	-	C	A	G
E22	-	A	T	A	T	C	-	C	A	-
E26	-	C	T	A	T	C	-	C	A	-
E29	T	C	T	A	T	C	-	C	A	-
E30	-	A	T	A	T	C	C	T	A	-
E38	-	A	T	A	T	C	-	C	A	-
E44	T	C	T	A	T	C	-	C	A	-
E48	-	C	T	A	T	C	-	C	A	-
E49	-	A	T	A	T	C	-	C	A	-
E56*	-	M	T	A	T	C	-	C	M	-

\*híbrido. M: C+A

Tabela 14. Sítios nucleotídicos variáveis na região dos espaçadores internos dos genes ribossomais nucleares (ITS)

Indivíduo	Sítio																								
	17	22	34	46	49	58	65	66	67	70	72	76	78	80	81	85	87	89	91	93	96	97	99	100	103
<i>P. elegans</i>	A	A	-	G	C	G	A	G	A	C	C	T	C	T	-	G	T	T	T	C	A	C	T	C	C
<i>P. actinia x P. elegans</i>	A	A	-	G	C	G	M	G	A	C	C	Y	Y	Y	-	G	T	T	T	C	A	C	T	C	C
<i>P. actinia</i>	A	A	-	G	C	G	C	G	A	C	C	C	T	C	-	G	T	T	T	C	A	C	T	C	C
<i>P. sidaefolia</i>	-	C	-	G	C	G	C	G	A	C	C	C	T	C	-	G	T	T	T	C	-	C	G	A	T
<i>P. eichleriana</i>	A	A	G	G	C	G	C	G	A	C	C	C	T	T	-	G	C	T	C	C	-	-	G	A	C
<i>P. amethystina</i>	A	A	-	T	C	G	C	G	A	C	C	C	A	T	G	G	T	C	T	C	-	C	G	A	C
<i>P. jilekii</i>	A	A	-	G	C	G	C	G	A	C	C	C	T	T	-	G	T	T	T	C	-	C	G	A	G
<i>P. galbana</i>	A	A	-	G	A	A	C	G	A	C	G	C	T	T	-	C	T	T	T	T	-	C	G	A	C
<i>P. tenuifila</i>	A	A	-	G	C	G	A	T	G	T	C	C	C	T	-	G	T	C	T	C	-	C	G	A	C
<i>P. caerulea</i>	A	A	-	G	C	G	A	T	G	N	C	C	C	T	-	G	T	C	T	C	-	C	G	A	C

Tabela 14. (Cont.)

Indivíduo	Sítio																								
	107	108	111	112	132	133	134	147	148	153	157	158	159	162	163	168	173	179	182	184	186	193	205	212	216
<i>P. elegans</i>	A	C	-	-	G	A	C	A	G	C	G	A	-	T	A	A	T	-	C	A	T	G	G	A	C
<i>P. actinia x P. elegans</i>	A	C	-	-	G	A	C	M	R	C	R	A	-	T	A	A	Y	-	C	A	T	G	G	R	C
<i>P. actinia</i>	A	C	-	-	G	A	C	C	A	C	A	A	-	T	A	A	C	-	C	A	T	G	G	G	C
<i>P. sidaefolia</i>	C	C	-	-	T	A	C	C	A	T	A	A	-	T	A	A	C	-	C	A	T	G	G	G	C
<i>P. eichleriana</i>	T	-	A	C	G	A	C	A	G	C	A	A	-	T	A	G	C	-	C	A	C	G	G	G	C
<i>P. amethystina</i>	A	C	-	-	G	T	C	C	A	C	A	A	A	T	A	A	C	-	C	A	C	G	G	G	C
<i>P. jilekii</i>	A	C	-	-	G	A	T	C	G	C	A	A	-	T	G	A	C	-	A	A	C	A	G	G	T
<i>P. galbana</i>	N	C	-	-	G	A	C	C	G	C	A	T	-	T	A	A	C	-	C	C	T	G	G	G	C
<i>P. tenuifila</i>	A	C	-	-	G	A	C	C	A	C	A	A	-	C	A	A	C	C	C	A	T	G	G	G	A
<i>P. caerulea</i>	A	C	-	-	G	A	C	C	A	C	A	A	-	C	A	A	C	C	C	A	T	G	A	G	A



Tabela 14. (Cont.)

Indivíduo	Sitio																								
	217	220	231	234	235	238	243	244	249	254	256	257	258	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271
<i>P. elegans</i>	T	T	-	A	-	G	C	-	C	G	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia x P. elegans</i>	T	T	-	A	-	R	C	-	M	S	Y	Y	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia</i>	T	T	-	A	-	A	C	-	A	C	T	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. sidaefolia</i>	T	T	-	A	-	A	T	-	C	C	T	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. eichleriana</i>	C	T	-	A	-	A	C	-	C	C	T	C	C	T	-	C	C	G	A	C	T	C	C	C	C
<i>P. amethystina</i>	T	T	A	-	-	G	C	-	C	C	T	C	C	T	T	C	C	G	A	C	T	C	C	C	C
<i>P. jilekii</i>	T	T	-	A	-	A	C	-	C	C	T	C	C	T	-	C	C	G	A	C	T	C	C	C	C
<i>P. galbana</i>	T	T	-	A	T	A	C	-	C	C	T	C	C	T	-	C	C	G	A	C	T	C	C	C	C
<i>P. tenuifila</i>	T	C	-	A	T	A	C	-	C	C	T	C	C	T	-	C	C	G	G	C	T	C	C	C	C
<i>P. caerulea</i>	T	C	-	A	T	A	C	A	C	C	T	C	C	T	-	C	C	G	G	C	T	C	C	C	C

Tabela 14. (Cont.)

Indivíduo	Sitio																								
	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	294	297	298	307
<i>P. elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G
<i>P. actinia x P. elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G
<i>P. actinia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G
<i>P. sidaefolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G
<i>P. eichleriana</i>	C	C	G	A	G	G	G	G	G	-	A	A	-	A	A	A	A	A	-	T	A	-	G	A	G
<i>P. amethystina</i>	C	C	G	A	-	G	G	G	G	G	A	A	-	A	A	A	A	A	-	T	A	-	G	G	G
<i>P. jilekii</i>	C	C	G	A	A	G	G	G	G	G	A	A	-	A	A	A	A	A	-	T	A	-	G	A	G
<i>P. galbana</i>	A	C	G	A	G	G	G	G	G	-	A	A	-	A	A	A	A	A	-	T	A	A	G	G	G
<i>P. tenuifila</i>	C	C	G	A	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	-	G	A	G
<i>P. caerulea</i>	C	C	G	A	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	-	A	A	A

Tabela 14. (Cont.)

Individuo	Sitio																		
	309	323	330	337	343	347	350	357	365	367	392	396	404	405	406	414	415	416	
<i>P. elegans</i>	T	G	C	T	G	T	G	T	G	T	C	G	G	A	G	C	-	G	
<i>P. actinia x P. elegans</i>	W	G	C	T	G	T	G	T	G	T	C	G	G	A	G	C	-	G	
<i>P. actinia</i>	A	G	C	T	G	T	G	T	G	T	C	G	G	A	G	C	-	G	
<i>P. sidaefolia</i>	A	G	C	T	G	T	N	T	G	T	C	G	G	A	G	T	-	C	
<i>P. eichleriana</i>	C	G	C	T	G	T	G	T	G	T	C	G	G	A	G	C	-	G	
<i>P. amethystina</i>	A	G	C	C	G	T	G	T	G	G	C	G	G	A	T	T	T	C	
<i>P. jilekii</i>	C	G	C	T	G	T	G	T	G	G	C	G	G	A	G	T	-	C	
<i>P. galbana</i>	C	G	C	T	G	C	G	T	G	G	C	G	G	G	G	T	-	C	
<i>P. tenuifila</i>	A	G	C	T	G	T	G	T	G	G	C	G	G	A	G	T	-	C	
<i>P. caerulea</i>	A	C	T	T	A	T	A	G	A	A	A	A	A	A	A	T	-	C	

Tabela 14. (Cont.)

Individuo	Sitio														n° pb	
	420	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	441	442		443
<i>P. elegans</i>	G	C	G	G	C	G	A	G	G	C	T	C	G	G	A	400
<i>P. actinia x P. elegans</i>	G	C	G	-	C	G	A	G	G	C	T	C	G	G	A	385
<i>P. actinia</i>	G	C	G	-	C	G	A	G	G	C	T	C	G	G	A	401
<i>P. sidaefolia</i>	G	C	G	-	C	G	A	G	G	C	T	C	G	-	A	392
<i>P. eichleriana</i>	G	C	G	-	C	G	A	G	G	C	T	C	G	G	A	429
<i>P. amethystina</i>	G	C	G	-	C	G	A	G	G	C	T	C	C	G	G	430
<i>P. jilekii</i>	G	C	A	-	C	G	G	G	G	C	T	C	G	G	A	428
<i>P. galbana</i>	G	C	A	-	C	G	A	G	G	C	T	C	G	A	A	428
<i>P. tenuifila</i>	G	A	C	-	T	A	A	A	A	T	C	T	G	G	A	434
<i>P. caerulea</i>	A	A	N	-	T	A	A	A	A	T	T	T	G	A	A	432

K: G+T, M: C+A, R: G+A, S: C+G, W: A+T, Y: C+T

Tabela 15. Sítios nucleotídicos variáveis na região do espaçador intergênico coroplasmático *trnL-trnF*

Indivíduo	Sítio														
	77	104	105	146	154	182	188	189	196	197	198	204	230	238	239
<i>P. elegans</i>	A	T	T	T	-	G	C	-	G	T	A	G	A	G	A
<i>P. actinia x P.elegans</i>	A	T	T	T	-	G	C	-	G	T	C	G	A	G	A
<i>P. actinia</i>	A	T	T	T	-	G	C	-	G	T	C	G	A	G	A
<i>P. sidaefolia</i>	A	T	T	T	-	G	C	T	G	T	C	G	A	G	A
<i>P. eichleriana</i>	A	T	T	T	-	G	T	-	A	C	C	G	C	-	-
<i>P. amethystina</i>	A	T	T	T	-	T	C	-	A	G	A	A	C	-	-
<i>P. jilekii</i>	A	T	T	G	-	T	C	-	A	T	C	A	C	-	-
<i>P. galbana</i>	A	G	A	T	C	G	C	-	A	T	C	G	C	-	-
<i>P. tenuifila</i>	A	T	T	T	-	G	C	-	A	C	C	G	C	-	-
<i>P. caerulea</i>	G	T	T	T	-	T	C	-	A	G	C	G	C	-	-

Tabela 15. (Cont.)

Indivíduo	Sítio												n° pb	
	240	241	242	244	248	255	260	263	264	265	266	267		268
<i>P. elegans</i>	A	A	A	G	A	T	-	-	-	-	-	-	-	288
<i>P. actinia x P.elegans</i>	A	A	A	G	A	T	-	A	A	G	A	T	T	294
<i>P. actinia</i>	A	A	A	G	A	T	-	A	A	G	A	T	T	294
<i>P. sidaefolia</i>	A	A	A	G	A	T	-	-	-	-	-	-	-	289
<i>P. eichleriana</i>	-	-	-	A	A	T	T	-	-	-	-	-	-	284
<i>P. amethystina</i>	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	283
<i>P. jilekii</i>	-	-	-	G	A	T	-	-	-	-	-	-	-	283
<i>P. galbana</i>	-	-	-	G	A	C	-	-	-	-	-	-	-	284
<i>P. tenuifila</i>	-	-	-	G	A	T	T	-	-	-	-	-	-	284
<i>P. caerulea</i>	-	-	-	G	A	T	-	-	-	-	-	-	-	283

Tabela 16. Sítios nucleotídicos variáveis da região do espaçador intergênico cloroplasmático *psbA-trnH*

Indivíduo	Sítio																								
	40	48	59	63	69	73	75	76	77	78	85	90	97	98	100	101	102	107	110	116	130	137	150	159	160
<i>P. elegans</i>	T	C	G	-	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	-	T	A	-	T	C	T	A
<i>P. actinia x P. elegans</i>	T	C	T	-	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	-	T	A	-	T	C	T	A
<i>P. actinia</i>	T	C	T	-	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	-	T	A	-	T	C	T	A
<i>P. sidaefolia</i>	T	C	G	-	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	-	T	A	-	T	C	T	A
<i>P. eichleriana</i>	T	C	G	-	A	G	C	A	A	T	T	T	G	A	T	G	T	-	T	C	T	T	C	T	A
<i>P. amethystina</i>	T	C	T	-	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	-	T	C	T	T	T	T	C
<i>P. jilekii</i>	T	C	G	-	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	C	T	C	T	T	C	T	A
<i>P. galbana</i>	T	C	G	-	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	G	C	-	C	C	T	T	C	A	A
<i>P. tenuifila</i>	T	C	G	-	T	G	C	C	A	T	G	T	G	A	T	G	G	-	T	C	T	G	C	T	A
<i>P. caerulea</i>	G	G	A	A	A	A	A	A	T	C	A	A	A	T	G	A	C	-	T	C	T	T	C	T	A

Tabela 16. (Cont.)

Indivíduo	Sítio																								
	166	172	173	174	175	179	181	188	189	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	208	212	216
<i>P. elegans</i>	T	T	T	T	C	T	G	C	C	T	T	T	-	T	T	T	C	A	G	A	A	A	A	G	T
<i>P. actinia x P. elegans</i>	T	T	T	-	C	T	G	C	C	T	T	T	-	T	T	T	C	A	G	A	A	A	A	G	T
<i>P. actinia</i>	T	T	T	-	C	T	G	C	C	T	T	T	-	T	T	T	C	A	G	A	A	A	A	G	T
<i>P. sidaefolia</i>	T	T	-	-	C	T	G	C	C	T	T	T	-	T	T	T	C	A	G	A	A	A	A	G	T
<i>P. eichleriana</i>	A	C	T	T	A	G	T	G	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	A	T
<i>P. amethystina</i>	A	C	T	T	C	T	T	C	T	T	T	A	-	T	T	T	A	T	T	T	C	T	T	A	-
<i>P. jilekii</i>	A	C	T	T	C	T	T	C	T	-	-	-	-	-	-	-	A	A	G	A	A	A	A	A	T
<i>P. galbana</i>	A	C	T	T	C	T	T	C	T	T	T	T	-	T	T	T	A	A	G	A	A	A	A	G	T
<i>P. tenuifila</i>	A	C	T	T	A	G	T	G	T	T	T	T	-	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	A	T
<i>P. caerulea</i>	A	C	T	T	C	T	T	C	T	T	T	T	-	T	T	T	A	T	T	T	C	T	A	A	T

Tabela 16. (Cont.)

Indivíduo	Sitio													
	217	218	219	225	226	227	232	235	243	254	255	256	257	258
<i>P. elegans</i>	T	C	G	C	T	A	-	G	G	-	-	-	-	-
<i>P. actinia x P.elegans</i>	T	C	G	C	T	A	-	G	G	-	-	-	-	-
<i>P. actinia</i>	T	C	G	C	T	A	-	G	G	-	-	-	-	-
<i>P. sidaefolia</i>	T	C	G	C	T	A	-	G	G	-	-	-	-	-
<i>P. eichleriana</i>	T	C	T	C	T	A	-	G	G	-	-	-	-	-
<i>P. amethystina</i>	-	A	G	A	A	A	-	G	G	-	-	-	-	-
<i>P. jilekii</i>	T	C	G	C	T	A	-	G	G	-	-	-	-	-
<i>P. galbana</i>	T	C	T	C	T	A	-	G	G	T	T	T	T	T
<i>P. tenuifila</i>	T	C	T	C	T	A	A	T	G	-	-	-	-	-
<i>P. caerulea</i>	T	C	T	C	T	G	-	G	A	-	-	-	-	-

Tabela 16. (Cont.)

Indivíduo	Sitio											n° pb
	259	263	267	271	272	275	276	283	288	289	306	
<i>P. elegans</i>	-	G	-	T	G	G	T	C	A	G	T	310
<i>P. actinia x P.elegans</i>	-	G	-	T	G	G	T	C	A	G	T	309
<i>P. actinia</i>	-	G	-	T	G	G	T	C	A	G	T	309
<i>P. sidaefolia</i>	-	G	-	T	G	G	T	C	A	G	T	308
<i>P. eichleriana</i>	-	A	-	G	T	G	T	A	A	G	T	312
<i>P. amethystina</i>	-	G	C	T	T	G	T	A	A	G	T	310
<i>P. jilekii</i>	-	G	-	T	T	G	T	A	A	G	T	306
<i>P. galbana</i>	A	G	-	T	T	G	T	A	C	T	T	317
<i>P. tenuifila</i>	-	A	-	G	-	G	T	A	A	G	-	309
<i>P. caerulea</i>	-	G	-	T	T	A	C	A	A	T	T	312

Tabela 17. Matriz de distância p (Kimura, 1980) para os espaçadores ITS

	<i>P. elegans</i>	<i>P. actinia x P.elegans</i>	<i>P. actinia</i>	<i>P. sidaefolia</i>	<i>P. eichleriana</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. jilekii</i>	<i>P. galbana</i>	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. caerulea</i>
<i>P. elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia x P.elegans</i>	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia</i>	0.0351	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. sidaefolia</i>	0.0585	0.0259	0.0255	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. eichleriana</i>	0.0525	0.0304	0.0400	0.0587	-	-	-	-	-	-
<i>P. amethystina</i>	0.0702	0.0456	0.0528	0.0560	0.0659	-	-	-	-	-
<i>P. jilekii</i>	0.0651	0.0408	0.0477	0.0484	0.0631	0.0702	-	-	-	-
<i>P. galbana</i>	0.0755	0.0511	0.0581	0.0562	0.0987	0.0964	0.0633	-	-	-
<i>P. tenuifila</i>	0.0799	0.0588	0.0694	0.0684	0.1028	0.0868	0.0702	0.0890	-	-
<i>P. caerulea</i>	0.1109	0.0903	0.1001	0.0952	0.1345	0.1182	0.1037	0.1182	0.0420	-

Tabela 18. Matriz de distância p (Kimura, 1980) para o espaçador *trnL-trnF*

	<i>P. elegans</i>	<i>P. actinia x P.elegans</i>	<i>P. actinia</i>	<i>P. sidaefolia</i>	<i>P. eichleriana</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. jilekii</i>	<i>P. galbana</i>	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. caerulea</i>
<i>P. elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia x P.elegans</i>	0.0030	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia</i>	0.0030	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. sidaefolia</i>	0.0031	0.0000	0.0000	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. eichleriana</i>	0.0267	0.0231	0.0231	0.0232	-	-	-	-	-	-
<i>P. amethystina</i>	0.0225	0.0256	0.0256	0.0257	0.0234	-	-	-	-	-
<i>P. jilekii</i>	0.0223	0.0191	0.0191	0.0191	0.0200	0.0128	-	-	-	-
<i>P. galbana</i>	0.0206	0.0171	0.0171	0.0172	0.0274	0.0309	0.0239	-	-	-
<i>P. tenuifila</i>	0.0206	0.0170	0.0170	0.0171	0.0068	0.0173	0.0138	0.0207	-	-
<i>P. caerulea</i>	0.0214	0.0179	0.0179	0.0178	0.0245	0.0170	0.0173	0.0206	0.0171	-

Tabela 19. Matriz de distância p (Kimura, 1980) para o espaçador *psbA-trnH*

	<i>P. elegans</i>	<i>P. actinia x P.elegans</i>	<i>P. actinia</i>	<i>P. sidaefolia</i>	<i>P. eichleriana</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. jilekii</i>	<i>P. galbana</i>	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. caerulea</i>
<i>P. elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia x P.elegans</i>	0.0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. actinia</i>	0.0025	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. sidaefolia</i>	0.0025	0.0051	0.0051	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. eichleriana</i>	0.1019	0.1051	0.1051	0.1024	-	-	-	-	-	-
<i>P. amethystina</i>	0.0668	0.0641	0.0641	0.0708	0.0792	-	-	-	-	-
<i>P. jilekii</i>	0.0286	0.0315	0.0315	0.0318	0.0710	0.0396	-	-	-	-
<i>P. galbana</i>	0.0441	0.0467	0.0467	0.0473	0.0881	0.0617	0.0234	-	-	-
<i>P. tenuifila</i>	0.1137	0.1167	0.1167	0.1143	0.0272	0.0932	0.0807	0.0963	-	-
<i>P. caerulea</i>	0.0675	0.0675	0.0675	0.0707	0.0856	0.0577	0.0508	0.0556	0.1047	-



Tabela 20. Distâncias genéticas médias (p) dentro e entre diferentes séries de *Passiflora*, bem como entre as espécies *P. actinia* e *P. elegans*

Comparações	Distâncias genéticas		
	ITS	<i>trnL-trnF</i>	<i>psbA-trnH</i>
<u>Dentro das séries</u>			
<i>Lobatae</i>	0,0864 ± 0,03	0,0197 ± 0,014	0,0797 ± 0,026
<i>Simplicifoliae</i>	0,0564 ± 0,027	0,0200 ± 0,01	0,0339 ± 0,017
<u>Entre séries</u>			
<i>Lobatae/Simplicifoliae</i>	0,0765 ± 0,024	0,0195 ± 0,005	0,0648 ± 0,03
<u><i>P. actinia/P. elegans</i></u>	0,0351	0,0030	0,0025
<u><i>P. actinia/Simplicifoliae</i></u>	0,0529 ± 0,01	0,0181 ± 0,007	0,0391 ± 0,014
<u><i>P. elegans/Lobatae</i></u>	0,0784 ± 0,033	0,0228 ± 0,015	0,0875 ± 0,041

## 5. Discussão

### 5.1 Variação intraespecífica dos marcadores

No presente estudo foi observada baixa variabilidade intraespecífica nas duas espécies analisadas em relação aos três marcadores amostrados. Tal fato era esperado, em parte, devido à baixa variabilidade própria dos marcadores utilizados. Este fato já foi evidenciado em diversas espécies (Kohjyouma *et al.*, 2000; Wittzell, 1999) e também em *P. suberosa*, onde as 37 plantas coletadas em duas populações do RS, mesmo apresentando variação em marcadores de RAPD (Finkler, 1997), foram idênticas para as seqüências de ITS e do espaçador *trnL-trnF* (Muschner, 1999). Outra explicação possível, mas pouco provável em função da distância que separa os locais de coleta dos indivíduos, é o tamanho amostral. Apesar da baixa variabilidade intraespecífica, os marcadores foram eficientes em demonstrar as diferenças genéticas entre as duas espécies e para estabelecer sua similaridade quando comparadas com outras do gênero.

Entre os marcadores estudados, os que apresentaram maior diversidade intraespecífica foram os ITS. Em *P. elegans*, os sítios variáveis não demonstraram nenhuma relação com a distância geográfica entre as plantas, como é evidenciado no sítio 65, onde o indivíduo de Porto Alegre (E20) e o de Lavras do Sul (E38) apresentam o mesmo nucleotídeo (A), embora estejam separados por 260 quilômetros, enquanto o indivíduo de Guaíba (E26) que está a somente 34 quilômetros do de Porto Alegre apresenta outro nucleotídeo (C). Nem sempre a variabilidade genética está correlacionada com a distância geográfica, o que sugere que outros agentes evolutivos, além da colonização e do fluxo gênico, caracterizam estas espécies (Ford *et al.*, 1998). Na comparação entre os indivíduos de *P. actinia*, todas as diferenças encontradas nas seqüências

pertenceram apenas à planta de Curitiba (A17), ou seja, o local mais isolado geograficamente dos outros. Alguns estudos filogenéticos baseados em seqüências de ITS sugerem que, além de um alto potencial em nível interespecífico e intergenérico, estes marcadores apresentam uma taxa de substituição nucleotídica suficiente para gerar variabilidade intraespecífica (Mayer & Soltis, 1999) mas, em muitos casos, com moderadas diferenças populacionais (Quijada *et al.*, 1998). A baixa diferenciação entre populações pode refletir uma origem recente ou níveis moderados de fluxo gênico entre elas (Batista *et al.*, 2001).

#### 5.2 Caracterização genética do híbrido

O perfil genético das duas espécies permitiu que os marcadores pudessem caracterizar o híbrido entre *P. actinia* e *P. elegans*. Através das seqüências dos espaçadores ITS foi possível identificar 15 sítios variáveis (sítios que apresentaram mais de um tipo de nucleotídeo, heterozigotos) nesta planta. A evolução em concerto é a responsável pela homogeneização dos ITS após eventos de hibridação, sendo que em alguns casos este processo pode homogeneizar totalmente as seqüências, uma geração após a combinação dos ITS parentais. Esta homogeneização pode ser tendenciosa em direção a bases ou seqüências parentais (Aguilar *et. al.*, 1999).

Vários casos têm sido descritos em que a evolução em concerto não é efetiva, permitindo que os marcadores ITS identifiquem (através do padrão aditivo de herança) as espécies parentais que originaram híbridos interespecíficos recentes (Morrell & Rieseberg, 1998). A história evolutiva da espécie endêmica *Draba ladina* (Brassicaceae), por exemplo, foi investigada através da variação intra e interespecífica de seqüências de regiões não codificadoras do cpDNA e

ncDNA (ITS). Além de *D. ladina*, foram analisados os seus prováveis genitores: *D. aizoides*, *D. dubia*, e *D. tomentosa*. As seqüências de ITS de *D. ladina* apresentaram o padrão aditivo, estando presentes as cópias de *D. aizoides* e *D. tomentosa*, apoiando a hipótese de origem híbrida desta espécie. O único haplótipo de cpDNA encontrado em *D. ladina* foi mais parecido com o encontrado em *D. tomentosa*, sugerindo que esta é a espécie parental materna. Os resultados sugerem que *D. ladina* é relativamente jovem e sua origem estaria associada a eventos de hibridação interespecífica, seguidos de poliploidização (Widmer & Baltisberger, 1999).

As seqüências dos espaçadores cloroplasmáticos *trnL-trnF* e *psbA-trnH* do híbrido são iguais às seqüências obtidas para os indivíduos de *P. actinia*, não deixando dúvidas de que esta foi a espécie doadora do genoma cloroplasmático. Apesar de estar em uma região muito rica em populações de *P. actinia*, o híbrido estava no meio de uma população de *P. elegans*. Toda a mancha de mato e arredores do local onde foi encontrado o híbrido foi investigada, sendo que nenhuma planta de *P. actinia* foi observada. Este fato abriu espaço para uma série de discussões.

Se a herança cloroplasmática das passifloras for de origem materna, como a da maioria das angiospermas, teriam de ter ocorrido dois eventos de dispersão à longa distância: primeiro o pólen de uma *P. elegans* teria de ser levado até uma *P. actinia* e, depois de formados os frutos, as sementes destes teriam de ser dispersas para longe da planta mãe, tendo sido depositadas justamente ao lado de outras *P. elegans*. Cain *et al.* (2000) ressaltam que, embora raros, os eventos de dispersão à longa distância possuem uma importância crítica em plantas, podendo influenciar a dinâmica populacional, a evolução de populações, a expansão de espécies invasoras e a diversidade de comunidades ecológicas. Eventos de dispersão à longa distância podem ocorrer de diversas maneiras,

incluindo vertebrados (por adesão ou ingestão), vento (durante tempestades), água ou, indiretamente, pelo substrato. Mas há muita falta de informação sobre estes eventos, pois eles são difíceis de se mensurar. Os métodos genéticos têm sido bastante utilizados para monitorá-los, sendo os marcadores cloroplasmáticos os mais indicados neste tipo de estudo (pela herança uniparental materna). Um exemplo é o do gênero *Microseris*, onde a análise de marcadores de cpDNA comprovaram a dispersão intercontinental e subsequente radiação adaptativa (Vijverberg *et al.*, 1999). O uso de marcadores moleculares permite a identificação destes eventos em espécies que aparentemente não possuem adaptações para dispersão à longa distância (Hagen *et al.*, 2001).

Mas a hipótese mais econômica para a origem do híbrido seria a de que uma planta de *P. elegans* tivesse sido fecundada pelo pólen de uma *P. actinia*. Para isso, a herança cloroplasmática nestas espécies teria que ser paterna. Diz-se que na maioria das angiospermas a herança de plastídeos e mitocôndrias é estritamente materna, mas a falta de marcadores fenotípicos e o uso de pequenas amostras podem ter influenciado esta visão, atualmente dominante. Além disso, a maioria dos trabalhos utiliza plantas cultivadas e ornamentais, o que impede o entendimento das razões evolutivas para estes padrões de herança, pois durante a domesticação pode haver seleção nos sistemas reprodutivos (como a macho esterilidade) ou mudanças na interação plastoma/genoma resultante de hibridação (Reboud & Zeyl, 1994). Através dos marcadores moleculares têm sido descritos vários casos de herança cloroplasmática paterna. O modo de herança do cpDNA do gênero *Larrea* (Zygophyllaceae), por exemplo, é uniparental paterno, e pode ser identificado através da amplificação de três fragmentos de cpDNA (Yang *et al.*, 2000). Mas há também grupos em que o padrão de herança cloroplasmática não é uniparental, como no caso da espécie *Turnera ulmifolia*, onde cruzamentos controlados e marcadores moleculares de cpDNA

identificaram 64% das plantas com herança paterna, 19% materna e 17% biparental (Shore & Triassi, 1998). A análise de 603 pb de cpDNA do híbrido encontrado neste trabalho, não apresentou qualquer heterozigoto, sugerindo herança uniparental de cloroplasto nas espécies em questão.

O acompanhamento do híbrido poderá contribuir com várias informações sobre a biologia reprodutiva e as características moleculares destas espécies. Experimentos com cruzamentos poderão ser realizados, uma vez que o híbrido é bem sucedido, produz flores, frutos e sementes férteis e encontra-se ao lado de outros indivíduos de *P. elegans* bem estabelecidos. Através destes cruzamentos, será possível analisar a progênie resultante do retrocruzamento com *P. elegans* em relação ao modo de herança cloroplasmática e ao processo de homogeneização (evolução em concerto) das seqüências de ITS após eventos de hibridação. O modo de herança do cpDNA pode ser facilmente detectado através do seqüenciamento dos marcadores cloroplasmáticos utilizados neste estudo, pois as espécies possuem diferentes haplótipos. E para a análise da velocidade e das tendências da evolução em concerto é indicada a clonagem dos fragmentos amplificados de ITS para uma melhor caracterização da variação intragenômica (Campbell *et al.*, 1997; Ritland *et al.*, 1993; Widmer & Baltisberger, 1999).

### 5.3 Variação interespecífica: implicações evolutivas e taxonômicas

As espécies escolhidas para as comparações interespecíficas pertencem ao subgênero *Passiflora*: *P. galbana* e *P. jilekii* pertencem à mesma série de *P. actinia* (*Simplicifoliae*), e as espécies *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. eichleriana* e *P. tenuifila* à mesma série de *P. elegans* (*Lobatae*). *P. sidaefolia* (série *Imbricatae*) foi incluída na análise pelo seu alto grau de similaridade genética (Muschner, 2001) e morfológica com *P. actinia* e *P. elegans*.

Neste estudo, observou-se o agrupamento genético de *P. actinia* e *P. elegans*, que, apesar de apresentarem muitas características morfológicas e ecológicas em comum, estão classificadas em diferentes séries do subgênero *Passiflora* (Killip, 1938). Há várias evidências de que a classificação destas séries seja artificial e puramente taxonômica, pois foram utilizados caracteres distintivos como folhas e brácteas, que apresentam forte interação ambiental e alto grau de variabilidade, podendo ser compartilhados por convergência de forma e não por ancestralidade comum. Vários trabalhos têm apresentado incongruências entre a classificação taxonômica e resultados das análises de marcadores genéticos (McKinnon *et al.*, 1999; Shaw & Allen, 2000).

Nos três marcadores foram encontrados sítios nucleotídicos que indicam as estreitas relações filogenéticas entre *P. actinia* e *P. elegans*. São eles: uma inserção/deleção de 34pb (st.260-292) e uma substituição (st.258) em ITS; uma inserção/deleção de 5pb (st.263-268) e duas substituições (st.196 e 230) em *trnL-trnF*; e cinco substituições nas seqüências de *psbA-trnH* (st.116, 172, 181, 189 e 283). Estes sítios são conservados nas outras espécies (exceto em *P. sidaefolia*), estando igualmente modificados em *P. actinia* e *P. elegans*. As mutações encontradas nos sítios 96 (inserção/deleção), 99 e 100 (substituições) de ITS só foram compartilhadas por *P. actinia* e *P. elegans*. Um aspecto interessante destes sítios é que todas as plantas de *P. elegans* e *P. actinia* do RS são iguais, mas o indivíduo A17 de Curitiba é diferente (apresentando seqüência igual a das outras espécies), sugerindo que as modificações destes sítios devem ser típicas das linhagens do RS. A região da posição 227 de *psbA-trnH* também indica a proximidade filogenética de *P. actinia* e *P. elegans*, pois é marcada por uma série de repetições diretas de T, onde alguns indivíduos de *P. elegans* possuem 10 repetições e outros 9, os de *P. actinia* 8, os de *P. sidaefolia* 7 e as demais espécies 5. Este tipo de repetição já foi observada neste marcador com

outras espécies (Aldrich *et al.*, 1988). Em ITS foram encontrados 6 sítios autopomórficos (st. 76, 157, 173, 212, 254 e 256) em *P. elegans*, que indicam a diferenciação genética desta espécie, apesar do provável pouco tempo de divergência evolutiva.

As pequenas mutações de tamanho (1-10pb) são mais freqüentes e geralmente são encontradas próximas de pequenas repetições de seqüência. Elas podem ser causadas por “slipped-strand mispairing” durante a replicação e o reparo. As mutações de tamanho maior (10-1000pb) são menos freqüentes e são provavelmente causadas por recombinação (Van Ham *et al.*, 1994). As inserções/deleções maiores que 4pb são consideradas altamente informativas filogeneticamente, além de serem praticamente livres de homoplasia (Mes & Hart, 1994). No presente estudo, a maioria das mutações observadas foram substituições pontuais, tendo sido encontradas também algumas mutações maiores que 4pb como a inserção/deleção de 34pb (st.260-292) em ITS.

Nas matrizes de distância-p (Kimura) dos três marcadores fica evidente o alto grau de relacionamento genético entre *P. actinia* e *P. elegans* em comparação com as outras espécies. Cabe ressaltar que o grau de similaridade genética encontrado entre *P. elegans* e *P. actinia* só foi comparável ao grau de relacionamento das duas com *P. sidaefolia*. As distâncias encontradas em ITS representaram a separação geográfica (*P. sidaefolia* ocorre nos estados de MG, SP e RJ) e, possivelmente, a ordem evolutiva da divergência das três espécies, onde se estabelece uma relação de proximidade em que *P. actinia* é muito semelhante a *P. sidaefolia* e *P. elegans*, e estas últimas geneticamente mais distantes, podendo-se cogitar que *P. actinia* deu origem as outras duas. Nos marcadores cloroplasmáticos a relação entre *P. elegans* e *P. sidaefolia* se estreitam, sugerindo que estes marcadores variam menos e retêm por mais tempo as relações de ancestralidade. Os padrões de variação genética do cpDNA nem sempre



correspondem aos da variação morfológica e distribuição geográfica, mas podem ser o resultado da manutenção da seqüência do cpDNA através do evento de especiação que deu origem às espécies em questão (Masongamer *et al.*, 1995).

A grande similaridade genética de *P. actinia* e *P. elegans* foi concordante com as análises realizadas por Mega (2002), que estabeleceu as relações filogenéticas de 14 espécies de *Passiflora* do RS, através da análise de 90 caracteres morfológicos. Esta análise separou os subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*, mas em geral a consistência dos agrupamentos dentro dos subgêneros foi baixa. Na árvore consenso construída no programa PAUP pelo método da parcimônia, o maior índice de consistência foi o do agrupamento entre *P. actinia* e *P. elegans* (77%, para um bootstrap de 100 replicações).

#### 5.4 O processo de especiação: a evolução dos genes no espaço e no tempo

Para entender como os organismos evoluíram, é preciso colocar as características genéticas num contexto espacial e temporal, congruentes com as regiões geográficas particulares e os eventos geológicos ocorridos nestas (Hewitt, 2001).

As filogenias construídas através de seqüências de DNA podem esclarecer os processos envolvidos na evolução morfológica e ecológica dos caracteres, sendo que a utilização de vários genes descreve mais adequadamente estes processos. As comparações de seqüências de DNA homólogas podem ser importantes na definição de espécie de determinados grupos, pois o padrão de coalescência e os eventos mutacionais observados representam as relações genealógicas, traçando a história da molécula de DNA ancestral (Hewitt, 2001; Templeton *et al.*, 2000).

Wu (2001) sugere que os genes mais adequados na investigação de processos de especiação são os responsáveis pelas características adaptativas do organismo em questão. A adaptação diferencial pode ser definida como a divergência entre alelos que possuem efeitos opostos no valor adaptativo de duas populações. Mas os genes diretamente responsáveis pela adaptação diferencial e isolamento reprodutivo raramente são conhecidos nos casos estudados, sendo que a maioria dos estudos genéticos de diferenciação de espécies utiliza outros marcadores, como seqüências de DNA, aloenzimas e microssatélites.

#### 5.5 O processo de especiação de *P. actinia* e *P. elegans*: possíveis relações com a imigração da Mata Atlântica

A correlação entre os dados de distribuição geográfica atual, história geológica da região, morfologia e variabilidade genética sugerem que *P. elegans* tenha derivado de populações ancestrais de *P. actinia*. Esta última é típica da Mata Atlântica, portanto, suas populações devem ter passado pelas mesmas transformações ambientais que esta formação passou durante o seu estabelecimento no RS. Sabe-se que as espécies florestais migraram de forma esparsa, isolando populações e criando condições favoráveis para a diferenciação destas e até para possíveis eventos de especiação. O padrão de distribuição de *P. actinia* e *P. elegans* sugere que este processo deve ter ocorrido nas áreas mais interiorizadas, pois nestas regiões, as populações ancestrais estiveram sujeitas a diferentes pressões seletivas (menor umidade, por exemplo), tendo que sofrer adaptações para o processo de colonização (anexo 5). Algum fator ainda impede a expansão das populações de *P. actinia* para o interior do Estado, enquanto as populações ancestrais de *P. elegans* tiveram que sofrer adaptações para explorar

os novos ambientes do interior, embora tenham mantido sempre uma condição ancestral de dependência de áreas florestais e de umidade (matas de galeria).

Salomon (2001) sugeriu um modelo de especiação alopátrica que é compatível com os padrões de distribuição das espécies *P. actinia* e *P. elegans*. As populações ancestrais teriam migrado de forma descontínua, formando isolados constituídos por poucos indivíduos. Isto permitiria a ação da deriva genética e/ou do endocruzamento, que poderiam gerar a diferenciação genética ao longo do tempo. A volta a situação de contato condicionaria conseqüências diversas.

Se há uma estreita faixa de simpatria, onde o contato entre as populações diferenciadas é restrito, com pouca ou nenhuma hibridação, é possível que os dois *taxa* sejam competidores ecológicos. Esta propriedade explica por que indivíduos de diferentes *taxa* excluem um ao outro espacialmente, permanecendo parapátricos. Este provavelmente é o caso de *P. actinia* e *P. elegans*, pois se não houvesse nenhum impedimento para a simpatria destas espécies (ocupam o mesmo habitat) poderia haver uma ampla área de intergradação entre as zonas alopátricas, com a presença de vários híbridos.

Há muitos debates sobre a origem das zonas híbridas, pois estas podem ser o resultado de divergência primária ou de contato secundário. Análises das seqüências de DNA que revelam genomas distintos nas zonas híbridas podem indicar contato secundário (Hewitt, 2001). Esta informação comparada com os resultados obtidos para *P. actinia* e *P. elegans*, reforça a hipótese de que elas tenham surgido em alopatria e que a zona híbrida incipiente foi formada por contato secundário.

Vários outros trabalhos utilizam dados genéticos para confirmar hipóteses deste tipo (Batista *et al.*, 2001; Francisco-Ortega *et al.*, 2001; Hardig & Soltis, 1999; Zhang *et al.*, 2001). Nas espécies insulares endêmicas *Lilium longiflorum* e *L. formosanum*, por exemplo, informações sobre a variabilidade genética

combinadas com outros dados biológicos e informações geohistóricas, sugerem o período geológico no qual as espécies se estabeleceram (final do Plioceno, quando a distribuição ainda era contínua com o Continente Asiático) e que *L. formosanum* derivou das populações do sul de *L. longiflorum* (Michikazu, *et al.* 2001). Já a grande similaridade genética entre *Senecio nebrodensis* (endêmica) e *S. viscosus* (ampla distribuição na Europa) quando comparadas com outras espécies do gênero, sugere que este grupo irmão represente uma espécie genitora e outra derivada e que a origem desta seja recente (Purps & Kadereit, 1998). A história filogenética de espécies alopátricas do mesmo gênero (*Cyclamen*) também foi acessada através de seqüências do cpDNA. Os dados sugeriram evolução em alopatria e definiram os possíveis limites geográficos onde as espécies divergiram. Neste trabalho, assim como o encontrado em *P. actinia* e *P. elegans*, em apenas um dos locais amostrados foi observada introgressão cloroplasmática de uma população pela presença de populações relictuais de outra espécie, evidenciando as fracas barreiras reprodutivas (Gielly *et al.*, 2001).

#### 5.6 Fatores que podem ter influenciado a manutenção do padrão atual de distribuição

Uma das características mais marcantes em *P. actinia* e *P. elegans* é que, apesar da extensiva amostragem das áreas limítrofes de distribuição, em nenhum local de coleta elas foram observadas em simpatria. Além disso, em um estudo paralelo com dez marcadores de microssatélites de cloroplasto, 88 indivíduos das duas espécies foram analisados. Para um dos marcadores, não se observa variabilidade intraespecífica, mas as duas espécies diferem em padrão de amplificação, sendo que o indivíduo E56 apresentou o mesmo padrão dos

indivíduos de *P. actinia*, diferente dos demais indivíduos de *P. elegans* coletados no mesmo local que ele. A existência de um híbrido bem sucedido e fértil no local onde *P. actinia* e *P. elegans* foram encontradas mais próximas sugere que as barreiras reprodutivas para o cruzamento entre as duas são fracas. Não há segregação floral e temporal, pois as flores são extremamente parecidas, florescem na mesma época e atraem os mesmos tipos de polinizadores (durante a realização do presente estudo foram observadas mangavas, totalmente cobertas por pólen, em flores de *P. elegans*, sendo que estes foram demonstrados como os principais polinizadores de *P. actinia* por Prazeres, 1989). Além disso, as duas espécies possuem o mesmo número cromossômico ( $2n=18$ , N.F. de Melo, comunicação pessoal), diminuindo o risco de erro no pareamento cromossômico durante as divisões celulares. Na mesma linha de argumentação de Milne *et al.* (1999), sugere-se que estes fatos indicam que as barreiras que impedem a existência de uma zona híbrida são externas e que o processo que separou as duas espécies deve ter ocorrido em alopatria.

As zonas híbridas podem ser afetadas por uma série de fatores como altitude, tipo de solo (fatores edáficos), pluviosidade e relações ecológicas. A formação de uma zona híbrida implicaria na competição entre os híbridos e as espécies parentais, sendo que os híbridos poderiam sofrer pressões seletivas dependentes ou independentes do ambiente. Como exemplo, pode-se citar o caso de *Prunella* (Lamiaceae), onde há uma pequena zona de simpatria e hibridação que é determinada por gradientes de altitude, profundidade do solo e quantidade de água (Fritsche & Kaltz, 2000).

A comparação da altitude de alguns dos locais amostrados (tabela 10) revela que não há uma segregação de altitude nas espécies analisadas. Assim, *P.*

*elegans* foi encontrada em regiões variando entre 10 m e 450 m de altitude, enquanto os valores correspondentes para *P. actinia* foram de 29 m a 912 m.

A pluviosidade poderia ser um dos fatores limitantes para a expansão de populações de *P. actinia* para o interior do Estado, pois é uma espécie típica de encosta, portanto sujeita a constantes chuvas orogênicas. Mas este não é o caso de todas as populações observadas desta espécie, que também ocorreram em locais com índices de precipitação similares aos de locais de ocorrência de *P. elegans*.

Diferentes espécies de plantas podem estar adaptadas a solos com características químicas e físicas específicas. Estas diferenças podem influenciar o padrão de distribuição geográfica e até levar à especiação. Estudos baseados em dados morfológicos, bioquímicos e fenológicos em *Lasthenia californica* (Asteraceae) revelaram a existência de duas raças. A distribuição geográfica das raças é adjacente, com alguns pontos de simpatria. Foram encontradas diferenças significativas na composição dos solos ocupados pelas mesmas e, em experimentos em casa de vegetação, as raças tiveram respostas diferentes (crescimento e floração) às condições edáficas. Isto deve ter contribuído para a manutenção do padrão de distribuição através dos anos, sugerindo que os fatores edáficos podem estar levando a um processo de especiação (Rajakaruna & Bohm, 1999).

Para verificar a possibilidade de que a distribuição de *P. actinia* e *P. elegans* esteja ligada a fatores edáficos, a região limítrofe das espécies foi investigada quanto à composição do solo (figura 4). Esta região é um clássico divisor de solos do RS (limite do derramamento basáltico da Serra Geral), o que poderia influenciar na dispersão de espécies de plantas. A maior parte dos pontos de coleta de *P. actinia* estão localizados na Serra Geral e conseqüentemente em solos basálticos, enquanto *P. elegans* não parece ter

nenhum tipo de preferência, ocupando regiões com diferentes composições edáficas. Apesar disso, não foi observada uma segregação edáfica total, com populações de ambas as espécies ocorrendo nos mesmos tipos de solo.

A competição também pode influenciar fortemente os padrões de distribuição, a abundância relativa, a diversidade de espécies e a estrutura de comunidades. A capacidade competitiva é extremamente importante no requerimento de habitats e/ou áreas geográficas para espécies endêmicas de plantas. Para entender as causas destes endemismos, o melhor é comparar espécies relacionadas, podendo controlar características históricas e evolutivas dissimilares. Com este objetivo, um estudo comparou as capacidades competitivas de *Solidago shortii* e *S. altissima* (Asteraceae). As folhas de *S. altissima* (com ampla distribuição) são relativamente maiores, sendo, portanto mais eficientes que as de *S. shortii* (que é endêmica) na recepção de luz e na produção fotossintética. Entretanto, o fato de *S. shortii* ter uma área foliar menor e uma maior porcentagem de alocação de reservas para as raízes, torna-a mais adaptada para viver em ambientes secos e rochosos, nos quais *S. altissima* não consegue se estabelecer (Walck *et al.*, 1999). Aparentemente, *P. actinia* e *P. elegans* possuem as mesmas habilidades competitivas, pelo menos no que se refere à atração de polinizadores e ocupação do habitat. Mas se as espécies foram originadas em alopatria, e atualmente há uma zona de simpatria incipiente, fica difícil para uma planta jovem competir com plantas adultas já estabelecidas, pois estas ocupam grandes dimensões, dificultando a captação de luz por um indivíduo menor. Talvez por isso, apesar da extensiva amostragem da região limítrofe, só tenha sido encontrado um híbrido, o qual se estabeleceu com grande sucesso ao lado de várias outras plantas de *P. elegans*.

### 5.7 Considerações finais

Cada linhagem de planta possui uma história única de modificações genéticas, morfológicas e ecológicas, de interações com outras espécies e com o ambiente físico, o que condiciona padrões diferenciais de migração e colonização de habitats.

A morfologia ainda é a fonte mais acessível de dados sobre as relações filogenéticas e é a única base para o reconhecimento de espécies hoje em dia. As unidades taxonômicas estabelecidas são apenas hipóteses abertas, para serem repetidamente testadas com novos dados e métodos de análise (Judd *et al.*, 1999).

Balduino Rambo, um dos maiores estudiosos da flora do RS, pesquisou profundamente a migração das matas tropicais no Estado. Ele questionava como e quando estes eventos aconteceram e quais as conseqüências para a diversidade florística, e chegou a discutir as possíveis razões para que apenas 14% das espécies da flora de Porto Alegre sejam tipicamente pluviais, sendo que a Floresta Ombrófila da escarpa da Serra está há menos de 50 quilômetros. Uma das hipóteses levantadas por ele é que, quando a Floresta Ombrófila estava invadindo o RS pelo talude da Serra, existia entre este e os morros típicos da região de Porto Alegre e da Serra do Sudeste um isolamento ocasionado pela invasão do mar. Mesmo depois da retirada da água, perduraram as circunstâncias adversas para a migração da Mata Ombrófila e, lentamente, a região ficou apta para a ocupação deste tipo de mata. Sugere também, que este isolamento poderia ter proporcionado uma série de endemismos, mas esta hipótese é descartada em Rambo (1954).

Com relação à formação de endemismos a partir destas formações, ele afirmava (Rambo, 1951): *“Em continuação desta cadeia de pensamentos, seria de*



*sumo interesse verificar, se esta selva imigrada produziu, no RGS, depois de sua migração, espécies novas e próprias, inexistentes no resto da área. Embora seja difícilimo operar com dados incompletos, parece que tal não foi o caso.”*

*“Em primeiro lugar, os elementos exclusivos das duas frentes de contato, pertencentes às mais variadas famílias e grupos ecológicos, são, sem exceção, comuns a uma grande parte da área geral, isto é, não se modificaram sistematicamente depois da imigração.”*

*“Em segundo lugar, em todos os casos, onde os conhecimentos sobre a área de distribuição são suficientes, pode verificar-se a existência dos elementos florestais fora da área do Estado.”*

Para defender suas teorias ele utiliza o gênero *Passiflora* como exemplo: “A única do gênero que parece endêmica no RGS e no sul de Misiones é *P. elegans* Mart., mas esta não é da selva, senão da matinha mirtácea.” A favor disto, cita alguns outros gêneros, cujos representantes riograndenses, estão nas mesmas condições das passifloras silvestres: *Cordia*, *Heliconia*, *Myrocarpus*, *Apuleia*, etc.

*“Se portanto, é lícito, sobre base incompleta formular uma extrapolação, parece provável que nenhuma espécie florestal é endêmica no RS.”*

Os resultados aqui apresentados sugerem que, de certa forma, B. Rambo estava correto: a expansão da Mata Atlântica não originou uma espécie endêmica no Estado que tenha se expandido para o norte, mas houve sim o surgimento de uma espécie endêmica e florestal a partir da Mata Atlântica; esta espécie colonizou áreas novas, nas quais a sua espécie ancestral não conseguiria se estabelecer.

## 6. Resumo e Conclusões

Em estudos prévios sobre a filogenia de *Passiflora*, as espécies *P. actinia* e *P. elegans* destacaram-se pela sua grande similaridade genética, apesar de sua classificação em séries taxonômicas distintas. As duas espécies apresentam distribuição geográfica muito diferente. Enquanto *P. actinia* é encontrada em áreas de Mata Atlântica desde o estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul (RS), *P. elegans* está restrita ao RS e a poucas regiões limítrofes. Para melhor avaliar as relações evolutivas entre estas duas espécies foram realizadas coletas intensivas em todo o estado e desenvolvidos testes quanto às seqüências dos espaçadores intergênicos cloroplasmáticos *trnL-trnF* e *psbA-trnH*, e dos espaçadores transcritos dos genes ribossomais nucleares ITS de plantas de diferentes localidades. As análises revelaram uma baixa variabilidade intraespecífica, e evidenciaram um perfil genético próprio a cada espécie. Nas comparações interespecíficas, foram utilizadas seqüências de espécies do subgênero (*Passiflora*) estudadas previamente, pertencentes às séries *Simplicifoliae* e *Lobatae*, as mesmas de *P. actinia* e *P. elegans*, respectivamente. Nos três marcadores as menores distâncias genéticas encontradas foram entre estas duas espécies, sugerindo o pouco tempo de divergência entre elas. Estas comparações não mostraram diferenças marcantes nas diversidades dentro e entre as duas séries, indicando similaridade genética entre elas. Apesar da intensa amostragem realizada na área limítrofe das distribuições de *P. actinia* e *P. elegans*, somente foi encontrado um híbrido entre as duas. Além do fenótipo morfológico intermediário, o híbrido pôde ser reconhecido através das suas características genéticas, o espaçador nuclear ITS apresentando padrão aditivo nos sítios variáveis destas duas espécies; as seqüências dos marcadores cloroplasmáticos foram iguais às de *P. actinia*, indicando que esta é a espécie doadora deste genoma. Os padrões genéticos e geográficos destas duas espécies sugerem que o processo de especiação que se desenvolveu entre as duas seja recente e tenha ocorrido em alopatria, estando provavelmente ligado aos eventos geológicos do Holoceno que influenciaram a migração da Mata Atlântica no RS. A investigação das características abióticas das regiões de ocorrência das espécies não apresentou grandes dissimilaridades, podendo indicar que a atual segregação espacial deva-se à fragmentação florestal ou que haja exclusão competitiva entre elas, pois apresentam nichos ecológicos muito semelhantes.

## 7. Summary and Conclusions

In previous studies of *Passiflora* phylogeny, *P. actinia* e *P. elegans* showed a high genetic similarity, despite the fact that they had been classified in distinct taxonomic series. The two species present a very different geographical distribution. While *P. actinia* is found in the Atlantic Rain Forest from the state of Espírito Santo up to Rio Grande do Sul (RS), *P. elegans* is restricted to RS and to few neighboring regions. To better evaluate the evolutionary relationships between the two species intensive collections were made in all state and tests performed in relation to the chloroplast intergenic spacer sequences *trnL-trnF* and *psbA-trnH*, as well as to the nuclear ribosomal transcribed spacers ITS genes from plants of different localities. The analyses revealed a low intraspecific variability, and indicated a genetic profile characteristic of each species. In the interspecific comparisons sequences of species from the *Passiflora* subgenus previously studied, belonging to the *Simplicifoliae* and *Lobatae* series to which *P. actinia* e *P. elegans* respectively belong, were utilized. In the three markers, the lowest genetic distances found occurred between the two species, suggesting a low divergence time between them. These comparisons did not show marked differences in the intra e interseries variabilities, indicating genetic similarity between them. Despite the thorough sampling made in the border distribution of *P. actinia* and *P. elegans*, only one hybrid between the two was found. Besides the intermediate morphological phenotype, the hibrid could be recognized by its genetic characteristics, since the ITS nuclear spacer presented an additive pattern in the variable sites of the two species; the chloroplast marker sequences were equal to those of *P. actinia*, indicating that it is the donating species for this genome. The genetic and geographic patterns of these two species suggest that the especiation process which took place between the two was recent and that it occurred in allopatry, probably being connected to the Holocene geologic events which influenced the migration of the Atlantic Rain Forest in RS. The investigation of the abiotic characteristics of the species' regions of occurrence did not present high dissimilarities, which could indicate that the present spatial segregation could be due to forest fragmentation, or that there is competitive exclusion between them, since they have very similar ecological niches.

## 8. Referências Bibliográficas

- AGUILAR, J.F.; ROSSELLO, J.A. & FELINER, G.N. 1999. Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). **Mol. Ecol.** **8**: 1341-1346.
- ALDRICH, J.; CHERNEY, B.W.; MERLIN, E. & CHRISTOPHERSON, L. 1988. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. **Curr. Genet.** **14**:137-146.
- AVISE, J.C. 2000. **Phylogeography: The history and formation of species.** Harvard University Press, London, England. 447p.
- BATISTA, F.; BAÑARES, A.; CAUJAPÉ-CASTELLS, J.; CARQUÉ, E.; MARRERO-GÓMEZ, M. & SOSA P.A. 2001. Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. **Am. J. Bot.** **88**:1582-1592.
- BONNER, F.T. 1986. Measurement of seed vigor for loblolly (*Pinus taeda*) and slash pines (*Pinus elliottii*). **Forest Sci.** **32**:170-178.
- CAIN, M.L.; MILLIGAN, B.G. & STRAND, A.E. 2000. Long-distance seed dispersal in plant populations. **Am. J. Bot.** **87**: 1217-1227.
- CAMPBELL, C.S.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; BALDWIN, B.G.; LAWRENCE, A.A. & DONOGHUE, M.J. 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). **Mol. Biol. Evol.** **14**: 81-90.
- CERVI, A.C. 1997. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** **45**: 1-92.
- COMES, H.P. & KADEREIT, J.W. 1998. The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. **Tren. Plan. Sci.** **3**: 432-438.
- FINKLER, C. 1997. **Caracterização molecular de duas formas de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae).** Relatório apresentado à Comissão de Bacharelado em Ciências Biológicas ênfase em Genética – UFRGS, Porto Alegre, 27p.

- FORD, B.A.; MCQUEEN, D.A.R.; STARR, J.R. & NACZI, R.F.C. 1998. The impact of species-specific traits and phylogenetic relatedness on allozyme diversity in *Carex* sect. *Phyllostachys* (Cyperaceae). **Pl. Syst. Evol.** **212**: 13-29.
- FRANCISCO-ORTEGA, J.; BARBER, J.C.; SANTOS-GUERRA, A.; FEBLES-HERNÁNDEZ, R. & JANSEN, R.K. 2001. Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. **Am. J. Bot.** **88**:161-169.
- FRITSCHÉ, F. & KALTZ, O. 2000. Is the *Prunella* (Lamiaceae) hybrid zone structured by an environmental gradient? Evidence from a reciprocal transplant experiment. **Am. J. Bot.** **87**: 995-1003.
- FUTUYMA, D.J. 1992. **Biologia Evolutiva**. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto. 646p.
- GIELLY, L.; DEBUSSCHE, M. & THOMPSON, J.D. 2001. Geographic isolation and evolution of mediterranean endemic *Cyclamen*: insights from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequence variation. **Pl. Syst. Evol.** **230**: 75-88.
- HAGEN, A.R.; GIESE, H. & BROCHMANN, C. 2001. Trans-atlantic dispersal and phylogeography of *Cerastium arcticum* (Caryophyllaceae) inferred from RAPD and SCAR markers. **Am. J. Bot.** **88**: 103-112.
- HARDIG, T.M. & SOLTIS, P.S. 1999. An ITS-based phylogenetic analysis of the *Euryptera* species group in *Lomatium* (Apiaceae). **Pl. Syst. Evol.** **219**: 65-78.
- HEWITT, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature** **405**: 907-913.
- HEWITT, G. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. **Mol. Ecol.** **10**: 537-549.
- IBGE, 1986. **Levantamento de Recursos Naturais, v. 33**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, p.356-379 (geomorfologia) e p.545-620 (vegetação).
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. 1999. **Plant Systematics. A phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Sunderland. 464p.

- KÄSS, E. & WINK, M. 1997. Phylogenetic relationship in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS 1 and 2). **Mol. Phylog. Evol.** **8**: 65-88.
- KILLIP, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. **Publ. Field Mus., Bot. Ser.** **19**: 1-613.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** **16**: 111-120.
- KOHJYOUMA, M.; LEE, I.J.; IIDA, O.; KURIHARA, K.; YAMADA, K.; MAKINO, Y.; SEKITA, S. & SATAKE, M. 2000. Intraspecific variation in *Cannabis sativa* L. based on intergenic spacer region of chloroplast DNA. **Biol. Pharm. Bull.** **23**: 727-730.
- KUMAR, S.; TAMURA, N. & NEI, M. 1993. **MEGA** (Molecular Evolutionary Genetic Analysis). Version 1.01. Pennsylvania State Univ., University Park.
- LORENZ, A.P. 1999. **Análise de seqüências de cpDNA e seu papel na reconstrução filogenética do gênero *Passiflora* (Passifloraceae)**. Relatório de Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- LORSCHUITTER, M.L. 1997. Paleoambientes do sul do Brasil no quaternário através da palinologia: revisão dos resultados obtidos. **Rev. Univ. Guarulhos - Geociências II, nº especial** (dez/1997): 197-199.
- LORSCHUITTER, M.L. 2001. Estudo palinológico comparativo entre as idades das matas paludosas atuais da planície costeira e da depressão central do Rio Grande do Sul, Brasil. Boletim de Resumos, Mudanças Globais e o Quaternário, **VIII Congresso da ABEQUA**, (out/2001): 380-381.
- MACHADO, F.P. 1950. **Contribuição ao estudo do clima do Rio Grande do Sul**. Serviço Gráfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 91p.
- MASONGAMER, R.J.; HOLSINGER, K.E. & JANSEN, R.K. 1995. Chloroplast DNA haplotype variation within and among populations of *Coreopsis grandiflora* (Asteraceae). **Mol. Biol. Evol.** **12**: 371-381.

- MAYER, M.S. & SOLTIS, P.S. 1999. Intraspecific phylogeny analysis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). **Syst. Bot.** **24**: 47-61.
- MCKINNON, G.E.; STEANE, D.A.; POTTS, B. M. & VAILLANCOURT, R.E. 1999. Incongruence between chloroplast and species phylogenies in *Eucalyptus* subgenus *Monocalyptus* (Myrtaceae). **Am. J. Bot.** **86**:1038-1046.
- MEGA, N.O. 2002. **Evolução e Ecologia de duas espécies nativas de maracujás do RS: *Passiflora caerulea* e *P. tenuifila***. Relatório apresentado à Comissão de Bacharelado em Ciências Biológicas ênfase Celular, Molecular e Funcional – UFRGS, Porto Alegre.
- MES, T.H.M. & HART, H. 1994. *Sedum surculosum* and *S. Jaccardianum* (Crassulaceae) share a unique 70 bp deletion in the chloroplast DNA *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA) intergenic spacer. **Pl. Syst. Evol.** **193**: 213-221.
- MICHIKAZU, H.; KAORI, I.; HIROSHI, O.; KUANG, L.H. & CHI, W.H. 2001. Biogeography and origin of *Lilium longiflorum* and *L. formosanum* (Liliaceae) endemic to the Ryukyu Archipelago and Taiwan as determined by allozyme diversity. **Am. J. Bot.** **88**:1230-1239.
- MILNE, R.I.; ABBOTT, R.J.; WOLFF, K. & CHAMBERLAIN, D.F. 1999. Hybridization among sympatric species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: morphological and molecular evidence. **Am. J. Bot.** **86**: 1776-1785.
- MONDIN, C.A. 2001. *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. **Pesquisas-Botânica** **51**: 147-150.
- MORRELL, P.L. & RIESEBERG, L.H. 1998. Molecular tests of the proposed diploid hybrid origin of *Gilia achilleifolia* (Polemoniaceae). **Am. J. Bot.** **85**: 1439-1453.
- MUSCHNER, V.C. 1999. **Análise filogenética das seqüências ITS1 e ITS2 de duas formas de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae)**. Relatório apresentado à Comissão de Bacharelado em Ciências Biológicas ênfase em Genética – UFRGS, Porto Alegre, 28p.
- MUSCHNER, V.C. 2001. **Análise filogenética comparada de três marcadores de DNA no gênero *Passiflora* (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- NEVES, P.C.F. & LORSCHREITER, M.L. 1995. Upper Quaternary paleoenvironments in the northern coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. **Quatern. South America Antarct. Penins. 9**: 39-67.
- PETERSEN, G. & SEBERG, O. 1998. Molecules vs morphology *in*: Karp, A.; Isaac, P.G.; Ingram, D.S. (Eds). **Molecular Tools for Screening Biodiversity – Plants and Animals**. Chapman & Hall, Londres, p. 359 – 365.
- PRAZERES, L.C. 1989. **Estudo dos aspectos biológicos da flor e do sistema de reprodução de *Passiflora actinia* Hooker (Passifloraceae) na região metropolitana de Curitiba, Paraná**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- PURPS, D.M.L. & KADEREIT, J.W. 1998. RAPD evidence for a sister group relationship of the presumed progenitor-derivative species pair *Senecio nebrodensis* and *S. viscosus* (Asteraceae). **Pl. Syst. Evol. 211**: 57-70.
- QUIJADA, A.; LISTON, A.; DELGADO, P.; VAZQUEZ-LOBO, A. & ALVAREZ-BUYLLA E.R. 1998. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP). **Theor. Appl. Gen. 96**: 539-544
- RAJAKARUNA, N. & BOHM, B.A. 1999. The edaphic factor and patterns of variation in *Lasthenia californica* (Asteraceae). **Am. J. Bot. 86**: 1576-1596.
- RAMBO, B.S.J. 1949. Estudos botânicos em Sombrio Município de Araranguá Santa Catarina. **Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues 1**: 7-20.
- RAMBO, B.S.J. 1951. A imigração da selva higrófila no rio Grande do Sul. **Sellowia 3**: 55-91.
- RAMBO, B.S.J. 1954. Análise histórica da flora de Porto Alegre. **Sellowia 6**: 9-111.
- REBOUD, X. & ZEYL, C. 1994. Organelle inheritance in plants. **Heredity 72**: 132-140.
- RIESEBERG, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. **Annu. Rev. Ecol. Syst. 28**: 359-389.
- RITLAND, C.E.; RITLAND, K. & STRAUS, N.A. 1993. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex. **Mol. Biol. Evol. 10**: 1273-1288.



- ROTH, L. & LORSCHREITER, M.L. 1993. Palynology of a bog in Parque Nacional de Aparados da Serra, east plateau of Rio Grande do Sul, Brazil. **Quatern. South America Antarct. Penins.** **8**: 39-69.
- ROY, A.; FRASCARIA, N.; MACKAY, J. & BOUSQUET, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theor. Appl. Genet.** **85**: 173-180.
- SACCO, J.C. 1980. Passifloráceas. In: REITZ, R. Ed., Flora ilustrada catarinense, **Herbário "Barbosa Rodrigues"**, Itajaí/SC. 130p.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** **4**: 406-425.
- SALOMON, M. 2001. Evolutionary biogeography and speciation: essay on a synthesis. **J. Biogeography** **28**: 13-27.
- SANG, T.; CRAWFORD, D.J. & STUESSY, T.F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). **Am. J. Bot.** **84**: 1120-1136.
- SCHAAL, B.A.; HAYWORTH, D.A.; OLSEN, K.M.; RAUSCHER, J.T. & SMITH, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Mol. Ecol.** **7**: 465-474.
- SCHERER, N.M. 1999. **Aplicação das seqüências dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear para estudos filogenéticos com o gênero *Passiflora* (Passifloraceae)**. Relatório de Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SHAW, A.J. 2000a. Molecular phylogeography and cryptic speciation in the mosses, *Mielichhoferia elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae). **Mol. Ecol.** **9**: 595-608.
- SHAW, A.J. 2000b. *Schizymerium shevockii* (Bryaceae), a new species of moss from California, based on morphological and molecular evidence. **Syst. Bot.** **25**: 188-196.
- SHAW, A.J. & ALLEN, B. 2000. Phylogenetic relationships, morphological incongruence, and geographic speciation in the Fontinalaceae (Bryophyta). **Mol. Phylog. Evol.** **16**: 225-237.

- SHORE, J.S. & TRIASSI, M. 1998. Paternally biased cpDNA inheritance in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Am. J. Bot.** **85**: 328–332.
- SILVERTOWN, J.; FRANCO, M. & HARPER, J.L. 1997. **Plant life histories – Ecology, Phylogeny and Evolution**. Cambridge University Press. United Kingdom. 313p.
- SMALL, R.L.; RYBURN, J.A.; CRONN, R.C.; SEELANAN, T. & WENDEL, J.F. 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **Am. J. Bot.** **85**: 1301-1315.
- SWOFFORD, D. L. (1998). **PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and others methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G. & BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Pl. Mol. Bio.** **17**: 1105-1109.
- TEMPLETON, A.R.; MASKAS, S.D. & CRUZAN, M.B. 2000. Gene trees: A powerful tool for exploring the evolutionary biology of species and speciation. **Plant Species Biology** **15**: 211-222.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. 2001. **ClustalX**. Program available in the internet (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx>).
- VAN HAM, R.C.H.J.; HART, H.; MES, T.H.M. & SANDBRINK, J.M. 1994. Molecular evolution of noncoding regions of the chloroplast genome in the Crassulaceae and related species. **Curr. Genet.** **25**: 558-566.
- VIJVERBERG, K.; MES, T.H.M. & BACHMANN, K. 1999. Chloroplast DNA evidence for the evolution of *Microseris* (Asteraceae) in Australia and New Zealand after long-distance dispersal from western North America. **Am. J. Bot.** **86**: 1448-1463.
- VILLWOCK, J.A. & TOMAZELLI, L.J. 1995. Geologia costeira do Rio Grande do Sul. **Notas Técnicas** **8**: 1-45.
- WALCK, J.L.; BASKIN, J.M. & BASKIN C.C. 1999. Relative competitive abilities and growth characteristics of a narrowly endemic and a geographically widespread *Solidago* species (Asteraceae). **Am. J. Bot.** **86**: 820-828.

- WENDT, T.; CANELA, M.B.F.; FARIA, A.P.G. & RIOS, R.I. 2001. reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **Am. J. Bot.** **88**: 1760-1767.
- WERNECK, P.B. & LORSCHREITER, M.L. 2001. Paleoambientes dos últimos milênios na zona da mata do Faxinal, Torres, Rio Grande do Sul, Brasil, através de um estudo de sucessão vegetal. Boletim de Resumos, Mudanças Globais e o Quaternário, **VIII Congresso da ABEQUA**, (out/2001): 405-406.
- WHITE, T.J.; BURNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. & WHITE T. (Eds.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, Academic Press, San Diego, California, pp. 315-322.
- WIDMER, A. & BALTISBERGER, M. 1999 Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the narrow endemic *Draba ladina* (Brassicaceae). **Am. J. Bot.** **86**: 1282-1289.
- WITZELL, H. 1999. Chloroplast DNA variation and reticulate evolution in sexual and apomictic sections of dandelions. **Mol. Ecol.** **12**: 2023-2035.
- WU, C-I. 2001. The genic view of the process of speciation. **J. Evol. Biol.** **14**: 851-865.
- YANG, T.W.; YANG, Y.A. & XIONG, Z. 2000. Paternal inheritance of chloroplast DNA in interspecific hybrids in the genus *Larrea* (Zygophyllaceae). **Am. J. Bot.** **87**:1452-1458.
- ZHANG, L.-B.; COMES, H.P.; & KADEREIT, J.W. 2001. Phylogeny and quaternary history of the European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and AFLP variation. **Am. J. Bot.** **88**: 2331-2345.

## 9. Anexos



**A**



**B**

Anexo 1. Fotos de diferentes estágios de desenvolvimento de *P. elegans*: planta jovem (**A**) e caule de uma planta adulta (**B**).



Anexo 2. Comparação da forma da folha entre *P. actinia* (**A**), *P. elegans* (**E**) e o indivíduo E56 (**B**, **C**, **D**). Material proveniente de folhas exsiccadas.



Anexo 3. Foto de um ramo do indivíduo E56, coletado em Santo Antônio da Patrulha – RS.



**A**

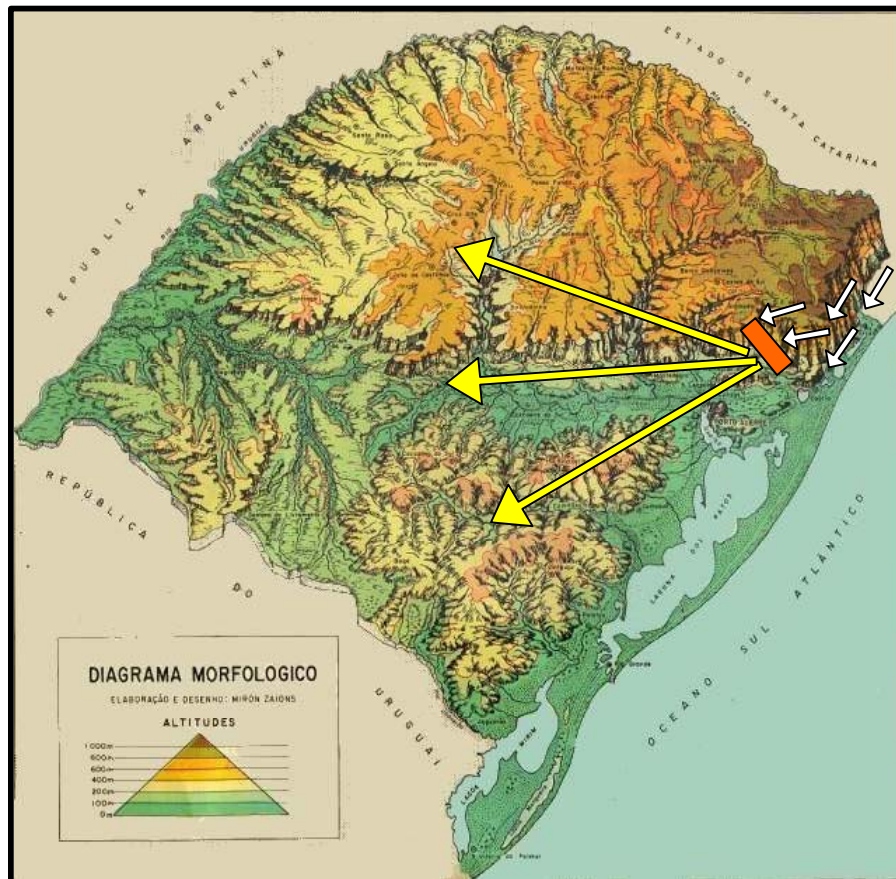



**B**



**C**

Anexo 4. Fotos das flores de *P. actinia* (**A**), *P. elegans* (**B**) e do indivíduo E56 (**C**).



Anexo 5. Representação esquemática do mapa do RS indicando: setas brancas – local de entrada e direção de dispersão da Mata Atlântica no Estado;  provável região de divergência entre as espécies *P. actinia* e *P. elegans*; setas amarelas – prováveis rotas de colonização do interior do Estado por *P. elegans*.