

EVIDÊNCIA DE HIBRIDAÇÃO E INTROGRESSÃO EM *HYBANTHUS ARENARIUS* ULE E *H. CALCEOLARIA* (L.) OKEN (VIOLACEAE) A PARTIR DE MARCADORES ALOENZIMÁTICOS E ANÁLISE MULTIVARIADA MORFOMÉTRICA

TEONILDES S. NUNES¹, JORGE A. S. COSTA¹, LARISSA N. SÁTIRO¹, ÉLVIA R. SOUZA¹, MARLON C. MACHADO¹, ANA M. GIULIETTI¹ & EDUARDO L. BORBA²

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas, BR 116, Km 3, 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (borba@icb.ufmg.br)

(Evidência de hibridação e introgressão em *Hybanthus arenarius* Ule e *H. calceolaria* (L.) Oken (Violaceae) a partir de marcadores aloenzimáticos e análise multivariada morfométrica) – Foram realizadas análise morfométrica multivariada baseada em 46 caracteres morfológicos e análise de aloenzimas em 41 indivíduos de *Hybanthus arenarius*, 25 indivíduos de *H. calceolaria* e 33 indivíduos morfológicamente intermediários ocorrentes no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana para determinar a variabilidade nestas populações e investigar hipóteses de hibridação e introgressão. Na análise morfométrica, *H. arenarius* pode ser bem diferenciada dos indivíduos intermediários e *H. calceolaria*, enquanto estes dois últimos não podem ser bem separados. Estas mesmas relações foram aparentes também na análise de aloenzimas. A ausência de loci diagnósticos não permite a confirmação de hibridação entre as espécies, mas vários resultados encontrados nas análises morfométrica e genética fortalecem a hipótese de que os indivíduos considerados primariamente como intermediários sejam indivíduos de *H. calceolaria* com introgressão de genes de *H. arenarius*.

Palavras-chave: *Hybanthus*, hibridação, introgressão, taxonomia, Violaceae.

(Evidence for hybridization and introgression in *Hybanthus arenarius* Ule and *H. calceolaria* (L.) Oken (Violaceae) from allozyme markers and multivariate morphometric analysis) – Allozyme and multivariate morphometric analyses using 46 morphological characters were carried out in 41 individuals of *Hybanthus arenarius*, 25 individuals of *H. calceolaria* and 33 morphologically intermediate individuals occurring on the campus of the Universidade Estadual de Feira de Santana to quantify the variability within these populations and to test hypotheses of hybridization and introgression. *H. arenarius* could be well differentiated in the morphometric analysis from both intermediate and *H. calceolaria* individuals, but the latter two groups could not be separated. Those same relationships were found in the allozyme analysis. The lack of diagnostic loci does not allow definitive confirmation of natural hybridization between the two species. However, several results found in the morphometric and genetic analyses reinforce the hypothesis that the individuals considered formerly as intermediate are actually individuals of *H. calceolaria* introgressed from *H. arenarius*.

Key words: *Hybanthus*, hybridization, introgression, taxonomy, Violaceae.

INTRODUÇÃO

O gênero *Hybanthus* Jacq. (Violaceae) possui cerca de 150 espécies distribuídas nas Américas, África e Madagascar, sul da Ásia e Austrália. A região Neotropical é o principal centro de diversidade do grupo, onde ocorrem 75 espécies, sendo aproximadamente 45 encontradas na América do Sul (SOUZA, 2002). No Brasil, ocorrem cerca de 26 espécies em diferentes tipos vegetacionais, tais como florestas, campos de altitude, caatinga e cerrado.

SOUZA (2002, 2003), em seus estudos sobre *Hybanthus* do Brasil, citou cinco espécies para o município de Feira de Santana, Bahia: *H. arenarius* Ule, *H. calceolaria* (L.) Oken, *H. glaucus* (Chodat) Schulze-Menz, *H. communis* (A.St.-Hil.) Taub. e *H. verrucosus* Paula-Souza. As três últimas podem ser facilmente distinguidas em relação às demais. Porém, segundo SOUZA (2002), *H. arenarius* e *H. calceolaria* são espécies muito semelhantes e frequentemente confundidas, podendo ser separadas principalmente pela presença de tricomas estrelados e bractéolas de cerca de 0,5mm de comprimento em *H. arenarius* e presença

exclusivamente de tricomas simples e bractéolas de 4,5 a 8mm de comprimento em *H. calceolaria*. Contudo, a mesma autora mencionou a grande variação na distribuição de tricomas estrelados e simples em *H. arenarius*, dificultando a utilização deste caráter na diagnose destas espécies.

No campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), em ambiente de caatinga e cerrado, são encontradas as espécies *H. arenarius*, *H. calceolaria* e *H. glaucus*, esta última com morfologia bastante distinta das demais (SOUZA, 2002). *H. calceolaria* é menos abundante e muitas vezes confundida com *H. arenarius* nas identificações de herbários locais. Observações feitas no campo e em herbário mostraram um alto grau de variabilidade morfológica em *H. arenarius* e *H. calceolaria*. Dentre os caracteres variáveis mais facilmente observados estão a forma e o tamanho das peças florais, a coloração das flores casmógamas, podendo se apresentar alva, lilás, azulada, azul-brilhante ou violeta, variação esta também mencionada por SOUZA (2002). Grande variação também foi observada em relação ao hábito, com plantas apresentando-se eretas não ramificadas a três ou mais ramificações, até procumbentes

com três ou mais ramificações.

Os caracteres acima citados possibilitam uma primeira diferenciação morfológica de três grupos: 1- apresentando flores azuis de antese matutina e hábito ereto com uma a poucas ramificações; 2- com flores brancas de antese vespertina, procumbentes e bastante ramificadas; 3- com flores em diferentes gradações de branco a lilás com antese durante todo o dia e hábito ereto com poucas ramificações a bastante ramificado. Segundo o tratamento taxonômico de SOUZA (2002), as plantas do primeiro grupo correspondem a *H. arenarius* e as do segundo a *H. calceolaria*. Contudo, indivíduos do terceiro grupo apresentam posicionamento morfológico intermediário, com caracteres presentes em ambas as espécies, o que parece ser a causa de alguns problemas taxonômicos, também não se enquadrando satisfatoriamente em nenhuma das demais espécies descritas para o Brasil, sugerindo a ocorrência de hibridação entre *H. arenarius* e *H. calceolaria* e eventualmente introgressão. Alternativamente, este grupo poderia representar uma espécie ainda não descrita para o gênero.

Para testar estas hipóteses acima mencionadas, foi realizado um estudo de variabilidade morfológica empregando análise multivariada e variabilidade genética utilizando eletroforese de aloenzimas em 99 indivíduos de cinco subpopulações de *Hybanthus* pertencentes aos grupos acima mencionados ocorrentes na região do campus da Universidade Estadual de Feira de Santana. Adicionalmente, através da análise morfométrica multivariada, procurou-se verificar a consistência dos caracteres atualmente utilizados na delimitação destas espécies de *Hybanthus*, buscando novos caracteres diagnósticos para estes táxons.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O trabalho foi desenvolvido no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no município de Feira de Santana, Bahia, 12°16'00" S e 38°58'00" W, a cerca de 257m de altitude. O município possui clima semi-árido (de subúmido a seco) e encontra-se situado no polígono das secas, em uma zona de planície, entre o Recôncavo e os tabuleiros do semi-árido nordestino, apresentando solos dos tipos planossolo, podzólico, eutrófico e litólico, inserido no semi-árido baiano. A vegetação típica é a caatinga, com fragmentos de matas secas (Floresta Estacional Decidual) e apresenta áreas com elementos da flora do cerrado (SEI, 2003). O campus da UEFS, embora antropizado, apresenta ainda uma flora típica da região, com áreas de caatinga e cerrado.

Análise morfométrica

Foram coletados aleatoriamente 99 indivíduos de *Hybanthus* em cinco subpopulações naturais (quatro subpopulações com 20 indivíduos e uma com 19 indivíduos) em diferentes áreas do campus, sendo 41 pertencentes a *H. arenarius*, 25 pertencentes a *H. calceolaria* e 33 pertencentes ao grupo dos indivíduos morfológicamente intermediários

(Fig. 1). Os espécimes foram herborizados (MORI *et al.*, 1989) e flores e folhas foram coletadas e conservadas em álcool 70% para análise posterior. Quarenta e seis caracteres morfológicos (40 quantitativos contínuos, 4 descontínuos, 2 binários) foram mensurados, sendo 33 reprodutivos e 13 vegetativos (Tabela 1). Devido ao tamanho reduzido de algumas estruturas, as flores foram dissecadas e desenhos foram realizados com o auxílio de um estereomicroscópio equipado com câmara clara, e as medidas feitas a partir destes. O mesmo procedimento foi adotado para medidas de ângulos de órgãos vegetativos. Foi realizada análise de componentes principais (PCA) empregando os 46 caracteres e de discriminantes (utilizando os três grupos morfológicos identificados previamente) empregando 42 caracteres (excluídos caracteres 1, 6, 7 e 32) para os 99 indivíduos. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000). Com o objetivo de verificar se o resultado da análise de discriminantes poderia ser um artefato (ver Resultados), foi construído um modelo nulo através de reagrupamento por sorteios aleatórios (10 repetições) dos indivíduos de dois grupos (*H. calceolaria* e intermediários) e posteriormente realizada análise de discriminantes entre os três grupos.

Eletroforese de aloenzimas

A análise de aloenzimas foi realizada utilizando amostras conservadas em nitrogênio líquido dos mesmos 99 espécimes coletados nas 5 subpopulações para a análise morfométrica, mencionados acima. Pequenos fragmentos de folha foram macerados em 500 µl de tampão de extração (100 ml Tris-HCl 0,1 mol/l pH 7,0, 6,846 g sacarose, 0,6 g PVP [polivinilpirrolidona], 0,0372 g EDTA [ácido etileno-diaminotetracético], 0,145 g BSA [soroalbumina bovina], 0,13 g DIECA [dietilcarbamato de sódio], 0,6 g Borax e 100 µl β-mercaptoetanol; modificado de SUN & GANDERS, 1990). Os extratos foram absorvidos em papel Whatman #3 e então aplicados em gel de amido Sigma. Foram utilizados quatro sistemas tampão: sistema 1 - eletrodo: ácido bórico 0,3 mol/l, NaOH 0,06 mol/l, pH 8,0; gel: Tris 0,01 mol/l, pH 8,5; modificado de SHAW & PRASAD (1970); sistema 2 - eletrodo: ácido cítrico 0,04 mol/l ajustado ao pH 6,1 com N-(3-aminopropil)-morfolina; gel: tampão do eletrodo diluído 1:20 (CLAYTON & TRETIAK, 1972); sistema 3 - eletrodo: histidina 0,065 mol/l ajustado ao pH 6,5 com ácido cítrico; gel: tampão do eletrodo diluído 1:4; modificado de STUBER *et al.* (1977); sistema 4 - eletrodo: Tris 0,17 mol/l ajustado ao pH 8,6 com ácido cítrico; gel: Tris 0,02 mol/L ajustado ao pH 8,6 com ácido cítrico. Eletroforese horizontal padrão foi conduzida até o marcador interno (azul de bromofenol) alcançar 9 cm do local de aplicação, utilizando as seguintes condições de corrida: sistema 1: 25 mA; sistema 2: 200 V; sistema 3: 50 mA; sistema 4: 50 mA. Vinte e um sistemas enzimáticos foram testados, sendo que apenas cinco apresentaram boa resolução e foram utilizados para a análise: sistema tampão 1: esterase (EST; EC 3.1.1.1), fosfatase ácida (ACP; EC 3.1.3.2); sistema tampão 2: fosfoglucoisomerase (PGI; EC 5.3.1.9);

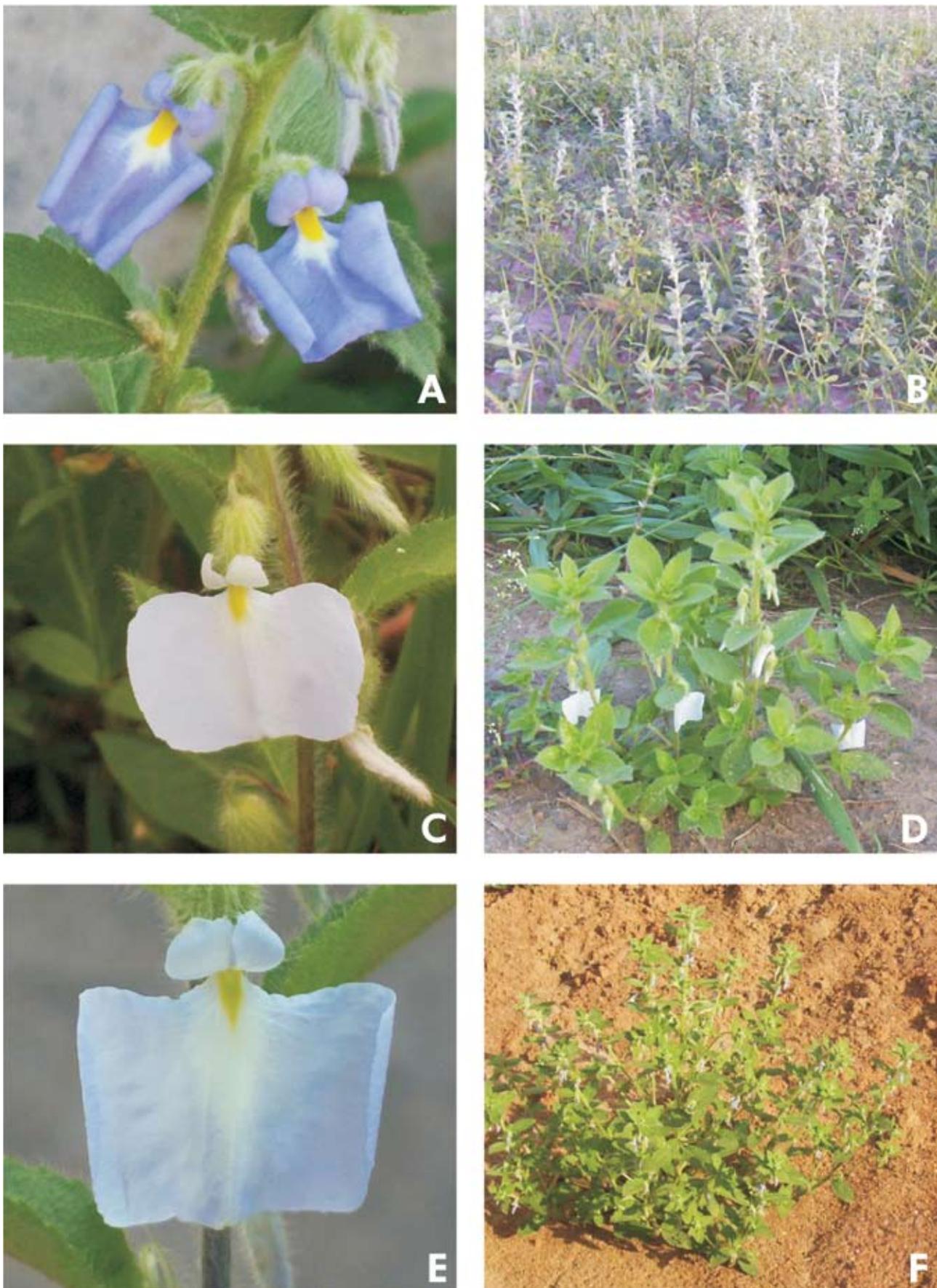


Fig. 1. Flor e hábito de *H. arenarius* (A-B), *H. calceolaria* (C-D) e indivíduos intermediários (supostos híbridos naturais e indivíduos com introgressão; E-F), no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana. Barras de escala = 1 cm.

Tabela 1. Caracteres utilizados na análise morfométrica e valores encontrados nas populações de *H. arenarius*, *H. calceolaria* e indivíduos intermediários (supostos híbridos naturais e indivíduos com introgressão), no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana. Valores apresentados como média (mínimo-máximo). * = característica predominante na população.

	Caracteres	<i>H. arenarius</i>	<i>H. calceolaria</i>	Intermediários
Caule				
1	Cor	verde*/castanho	verde/castanho*	verde/castanho*
2	Compr. médio internós (cm)	1,1 (0,6-2,7)	2,2 (1,5-4,1)	1,9 (0,9-3,4)
Folha				
3	Compr. pecíolo (mm)	2,4 (1,0-4,0)	1,6 (1,0-4,0)	1,5 (1,0-3,0)
4	Maior compr. lâmina (cm)	3,1 (1,8-4,5)	3,3 (1,2-5,7)	2,8 (1,5-6,3)
5	Maior larg. lâmina (cm)	1,4 (0,7-2,6)	1,5 (0,7-2,1)	1,2 (0,4-2,5)
6	Larg. lâmina a 1/3 do compr. (cm)	1,2 (0,7-2,1)	1,4 (0,7-1,9)	1,1 (0,5-2,3)
7	Larg. lâmina a 2/3 do compr. (cm)	1,3 (0,8-2,2)	1,3 (0,7-1,8)	1,0 (0,4-2,0)
8	Ângulo ápice	88 (64-125)	94 (61-131)	83 (51-125)
9	Ângulo base	74 (37-119)	68 (31-123)	73 (18-158)
10	Compr. dentes da margem (mm)	0,3 (0,2-0,5)	0,3 (0,1-0,4)	0,2 (0,1-0,4)
11	Profundidade dentes da margem (mm)	0,09 (0,01-0,21)	0,05 (0,01-0,13)	0,03 (0,01-0,05)
12	Densidade tricomas estrelados (mm ²)	11,8 (0-29)	0,5 (0-13)	0,0 (0-1)
13	Densidade tricomas simples (mm ²)	4,8 (0-26)	17,3 (0-32)	21,7 (8-41)
Inflorescência				
14	Compr. pedúnculo (cm)	3,7 (0,5-10,0)	4,9 (0,4-12,0)	5,5 (1,0-11,0)
15	Compr. bractéolas (mm)	1,2 (0,3-6,0)	4,5 (0,4-8,0)	4,5 (3,0-6,0)
16	Larg. bractéolas (mm)	0,3 (0,1-1,0)	1,2 (0,2-2,0)	1,2 (0,9-2,0)
Pedicelo				
17	Comprimento (mm)	3,3 (1,0-5,0)	3,5 (1,0-10,0)	3,1 (1,0-7,0)
Sépalas				
18	Compr. sépala inferior (mm)	6,8 (4,9-8,6)	10,0 (6,3-12,6)	9,3 (7,0-12,1)
19	Larg. sépala inferior a 1/3 (mm)	2,1 (1,5-2,8)	2,2 (1,5-3,0)	2,1 (1,4-3,1)
20	Larg. sépala inferior a 2/3 (mm)	1,3 (0,8-1,9)	1,6 (1,0-2,4)	1,5 (1,0-2,0)
21	Compr. sépala superior (mm)	6,4 (4,5-8,6)	8,8 (0,5-11,6)	9,1 (7,1-10,7)
22	Larg. sépala inferior a 1/3 (mm)	1,9 (1,3-2,8)	1,9 (1,2-2,7)	1,8 (1,4-2,4)
23	Larg. sépala inferior a 2/3 (mm)	1,2 (0,5-1,9)	1,5 (1,0-1,9)	1,4 (1,1-1,9)
24	Número de fimbrias das margem	7,2 (5-10)	10,0 (4-14)	9,7 (6-13)
25	Compr. maior fimbria (mm)	0,9 (0,4-1,6)	1,1 (0,7-1,7)	1,1 (0,6-2,0)
Pétalas				
26	Compr. pétala superior (mm)	5,0 (2,0-6,3)	7,5 (5,2-9,3)	7,5 (5,6-10,9)
27	Largura pétala superior (mm)	1,6 (0,5-2,0)	1,7 (1,3-2,2)	1,8 (1,3-2,2)
28	Compr. pétala lateral (mm)	10,3 (4,8-12,3)	12,0 (8,8-14,5)	11,3 (9,6-15,3)
29	Larg. lobo apical pétala lat. (mm)	4,7 (2,5-7,2)	4,0 (3,1-5,3)	4,0 (2,0-6,2)
30	Larg. lobo basal pétala lat. (mm)	2,8 (2,1-3,5)	2,1 (2,3-4,5)	2,4 (1,9-3,0)
31	Compr. lobo basal pétala lat. (mm)	5,2 (4,0-7,7)	7,1 (4,2-9,2)	7,1 (5,9-9,2)
32	Tricomas lobo apical pétala lat.	Simples/estrelado*	simples*/estrelado	Simples
Labelo				
33	Larg. unha (mm)	2,4 (1,3-3,4)	2,3 (1,6-3,1)	2,2 (1,2-2,9)
34	Compr. unha (mm)	5,8 (4,0-8,5)	8,2 (5,3-10,6)	8,3 (5,7-10,3)
35	Compr. região mediana da lâmina (mm)	12,5 (6,0-16,9)	14,6 (10,6-17,8)	14,3 (8,8-19,0)
36	Compr. lobo esquerdo (mm)	11,6 (5,3-16,6)	13,7 (9,7-18,6)	13,5 (8,1-19,0)
37	Compr. lobo direito (mm)	11,9 (5,5-16,5)	15,0 (9,8-20,5)	13,8 (7,8-19,8)
38	Larg. maior da lâmina (mm)	24,7 (14,1-34,8)	25,1 (18,0-32,6)	23,3 (11,3-32,3)

Cont.

39	Larg. lâmina a 1/3 (mm)	22,1 (12,5-31,4)	22,2 (15,9-29,6)	20,9 (10,5-30,2)
40	Larg. lâmina a 2/3 (mm)	24,9 (14,3-36,3)	25,9 (19,2-34,6)	24,1 (12,0-32,0)
Estames				
41	Compr. filete (mm)	3,1 (1,8-5,1)	3,9 (3,0-4,9)	3,9 (2,6-6,0)
42	Compr. antera (mm)	1,6 (0,9-2,0)	1,7 (1,1-2,2)	1,7 (1,4-2,2)
43	Compr. conectivo (mm)	1,4 (0,5-1,8)	1,2 (0,8-1,8)	1,2 (0,4-2,0)
Gineceu				
44	Compr. estilete (mm)	2,5 (1,6-3,9)	4,3 (2,5-5,2)	4,5 (3,7-6,1)
45	Compr. ovário (mm)	1,8 (1,3-3,0)	2,7 (2,0-3,3)	2,5 (2,0-3,2)
46	Número de óvulos	12,9 (9-18)	19,7 (12-24)	19,8 (12-25)

sistema tampão 3: fosfoglucosemutase (PGM; EC 2.7.5.1), desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH; EC 1.1.1.49). Os protocolos de coloração foram similares, com pequenos ajustes, ao apresentado por BRUNE *et al.* (1998; ACP, EST, G6PDH), CORRIAS *et al.* (1991; PGI) e SOLTIS *et al.* (1983; PGM). Sistemas enzimáticos apresentando mais que um locus foram numerados em ordem ascendente a partir do locus com menor mobilidade. Os alelos foram numerados de acordo com sua mobilidade relativa a um alelo de um indivíduo presente em todos os géis. As frequências alélicas foram determinadas através de contagem manual dos padrões de bandas dos homocigotos e heterocigotos corados nos géis. A variabilidade genética para cada morfo (*H. arenarius*, *H. calceolaria* e indivíduos intermediários) foi estimada para os seguintes parâmetros: proporção de loci polimórficos (P ; critério de 0,95), número médio de alelos por locus (A), heterocigosidade média por locus observada (H_o) e esperada (H_e). Matrizes de distância genética (“unbiased genetic distance” de NEI [1978]) e de similaridade genética (“unbiased genetic identity” de NEI [1978]) foram calculadas para as espécies. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa BIOSYS 1.0 (SWOFFORD & SELANDER, 1989).

Materiais-testemunho estão depositados no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS; *Hybanthus arenarius* - Nunes *et al.* 1130, 1133, 1134; *Hybanthus calceolaria* - Nunes *et al.*, 1135, 1136, 1137, 1138; indivíduos morfológicamente intermediários - Nunes *et al.* 1139, 1140, 1141, 1142).

RESULTADOS

Análise morfológica multivariada

Na análise de componentes principais (PCA) dois grupos foram delimitados com base na informação do primeiro eixo (Fig. 2). O primeiro grupo é formado quase que exclusivamente por indivíduos de *H. arenarius*, exceto por um indivíduo que apresenta características intermediárias ou não bem definidas e que por isso foi determinado como um suposto híbrido (grupo H) na caracterização morfológica. O segundo grupo visualizado na análise é constituído por indivíduos de *H. calceolaria* e intermediários, que não são separados entre si nos primeiros eixos da PCA. Nos dois primeiros eixos, os indivíduos de *H. arenarius* formam dois

subgrupos distintos, um deles (acima, Fig. 2A) constituído principalmente dos indivíduos em uma área onde ocorrem exclusivamente desta espécie, e o outro (abaixo, Fig. 2A) por indivíduos crescendo em sintopia com *H. calceolaria* e intermediários. Nesta análise, vários caracteres são responsáveis pela separação destes dois grupos, principalmente: cor do caule (1), margem das folhas (10 e 11) e a densidade e tipos dos tricomas (12 e 13) dentre os caracteres vegetativos, e, entre os caracteres florais, o tamanho das bractéolas (15) e das sépalas (18 e 21), o comprimento das pétalas superiores (26), comprimento do lobo basal (31) e tipo de tricomas (32) da pétala lateral, comprimento do estilete (44), entre outros (Tabela 1). Porém, nenhum caractere utilizado é perfeitamente diagnóstico entre *H. arenarius* e *H. calceolaria*, havendo alguma sobreposição em todos eles.

Na análise de discriminantes, os indivíduos de *H. arenarius* foram separados dos demais no primeiro eixo canônico, e os de *H. calceolaria* dos intermediários no segundo eixo canônico (Fig. 3). A menor distância D2 observada foi entre *H. calceolaria* e intermediários e a maior entre *H. arenarius* e intermediários (Tabela 2). Todos os indivíduos de *H. arenarius* apresentaram classificação correta em relação ao previsto, e um indivíduo intermediário e dois de *H. calceolaria* apresentaram classificação incorreta (97% e 92% de classificações corretas, respectivamente). Na amostragem, o percentual de acertos de intermediários variou de 76% a 94% e em *H. calceolaria* de 72% a 96%, entre as 10 repetições.

Variabilidade genética

Nenhum dos loci observados é diagnóstico para *H. arenarius* e *H. calceolaria* (locus onde todos os alelos de uma espécie são exclusivos a ela). Os indivíduos intermediários apresentaram um único alelo exclusivo a eles, porém em frequência muito baixa (alelo 4 da esterase; Tabela 3). Por outro lado, *H. arenarius* e *H. calceolaria* não apresentaram quaisquer alelos exclusivos, e apenas *H. arenarius* apresentou um alelo não presente em *H. calceolaria*. Apesar do alelo 2 da ACP-2 estar presente em frequência de 0,91 em *H. arenarius*, ele não foi encontrado em nenhum dos indivíduos intermediários.

Nenhum sistema apresentou-se monomórfico para todas as populações, com apenas a ACP-2 sendo mono-

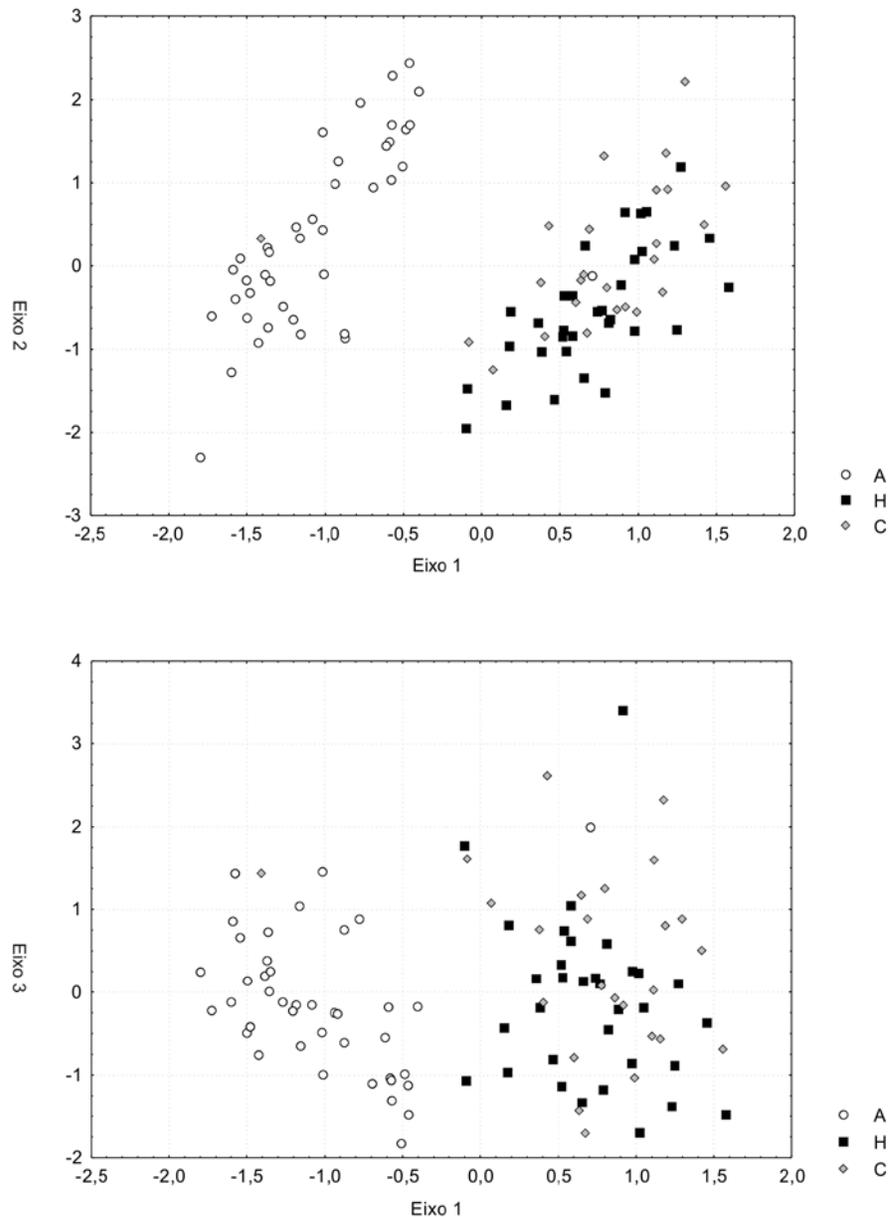


Fig. 2. Representação dos escores nos três primeiros eixos da análise de componentes principais de 46 caracteres morfológicos de populações de *H. arenarius* (A), *H. calceolaria* (C) e indivíduos intermediários (H; supostos híbridos naturais e indivíduos com introgressão), no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana. Percentual de variância acumulada nos três primeiros eixos = 57,37 (primeiro eixo = 33,22; segundo eixo = 15,31; terceiro eixo = 8,84).

mórfica nos intermediários. Foram encontrados até quatro alelos por locus, com média de 2,4 a 3,1 alelos por locus, e 86% a 100% de loci polimórficos por população. A heterozigosidade média esperada variou de 0,40 a 0,56 nas três populações. A maior variabilidade genética foi encontrada

em *H. arenarius*, e a menor na população dos indivíduos intermediários (Tabela 4). A maior distância genética foi encontrada entre *H. arenarius* e os indivíduos intermediários, e a menor entre *H. calceolaria* e os indivíduos intermediários (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz de Distância Generalizada de Mahalanobis (abaixo da diagonal) e distância genética de Nei (1978; unbiased genetic distance; acima da diagonal) entre as populações de *H. arenarius*, *H. calceolaria* e indivíduos intermediários (supostos híbridos naturais e indivíduos com introgressão), no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana.

População	<i>H. arenarius</i>	Intermediários	<i>H. calceolaria</i>
<i>H. arenarius</i>	***	0,690	0,452
Intermediários	74,676	***	0,026
<i>H. calceolaria</i>	58,290	13,692	***

Tabela 3. Frequências alélicas em sete loci aloenzimáticos em populações de *H. arenarius*, *H. calceolaria* e indivíduos intermediários (supostos híbridos naturais e indivíduos com introgressão), no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana. *N* = número de indivíduos amostrados.

Locus/Alelo	<i>H. arenarius</i>	Intermediários	<i>H. calceolaria</i>
EST			
1	0,15	0,02	0,04
2	0,23	0,20	0,20
3	0,62	0,77	0,76
4	0,00	0,02	0,00
<i>N</i>	41	30	23
PGM-1			
1	0,14	0,65	0,63
2	0,36	0,35	0,33
3	0,36	0,00	0,00
4	0,14	0,00	0,04
<i>N</i>	22	10	12
PGM-2			
1	0,50	0,13	0,35
2	0,36	0,00	0,35
3	0,14	0,88	0,30
<i>N</i>	11	8	10
ACP-1			
1	0,65	0,13	0,05
2	0,29	0,00	0,05
3	0,06	0,88	0,89
<i>N</i>	31	16	19
ACP-2			
1	0,91	0,00	0,17
2	0,09	1,00	0,83
<i>N</i>	11	3	3
PGI			
1	0,05	0,00	0,17
2	0,36	0,23	0,28
3	0,34	0,45	0,39
4	0,25	0,33	0,17
<i>N</i>	32	20	18
G6PDH			
1	0,40	0,33	0,40
2	0,23	0,33	0,20
3	0,37	0,33	0,40
<i>N</i>	14	3	5

Tabela 4. Variabilidade genética em oito loci aloenzimáticos em populações de *H. arenarius*, *H. calceolaria* e indivíduos intermediários (supostos híbridos naturais e indivíduos com introgressão), no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana. *N* = tamanho amostral médio; *A* = número médio de alelos por locus; *P* = percentual de loci polimórficos; *H_o* = heterozigiosidade média observada por locus; *H_e* = heterozigiosidade média esperada por locus (NEI 1978; “unbiased estimate”). Desvios padrões são apresentados entre parênteses.

População	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>P^a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>
<i>H. arenarius</i>	23,4 (4,4)	3,1 (0,3)	100,0	0,405 (0,099)	0,564 (0,072)
Intermediários	12,9 (3,7)	2,4 (0,4)	85,7	0,124 (0,083)	0,396 (0,104)
<i>H. calceolaria</i>	12,9 (2,8)	3,0 (0,2)	100,	0,226 (0,064)	0,513 (0,080)

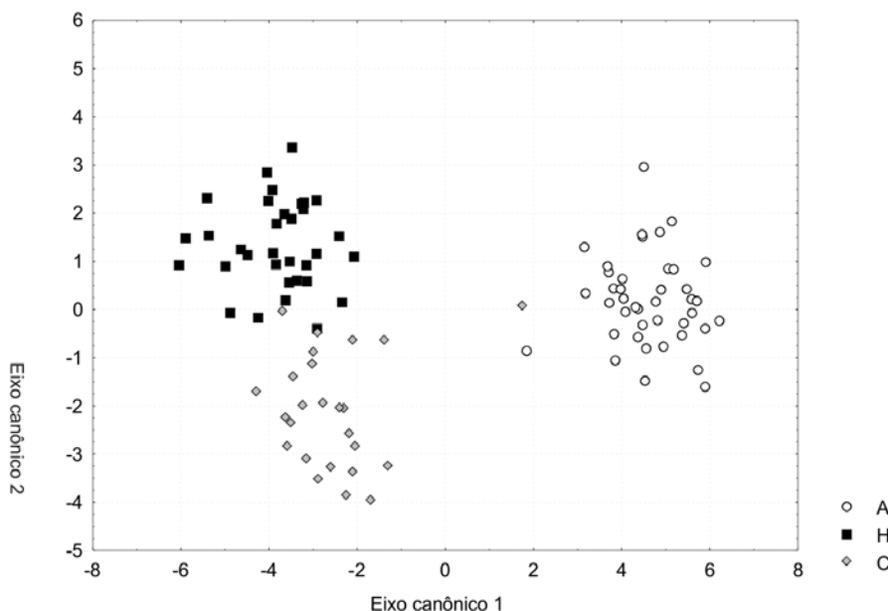


Fig. 3. Eixos canônicos 1 e 2 da análise de discriminantes de 42 caracteres morfológicos de populações de *H. arenarius* (A), *H. calceolaria* (C) e indivíduos intermediários (H; supostos híbridos naturais e indivíduos com introgressão), no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana.

DISCUSSÃO

As populações de *H. arenarius* e *H. calceolaria* presentes no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana puderam ser claramente separadas com base na análise morfométrica multivariada. Da mesma forma, a distância genética encontrada entre elas é relativamente alta e usualmente observada entre espécies congêneras não estreitamente relacionadas ou mesmo entre espécies de gêneros próximos (CRAWFORD, 1989). Porém, nenhum caractere isolado pode ser considerado perfeitamente diagnóstico para as duas espécies, inclusive os mencionados por SOUZA (2002) na sua revisão para o gênero no Brasil (tipos de tricomas e tamanho das bractéolas). Este fato explica pelo menos em parte a ocorrência de dificuldades na distinção destas espécies, levando frequentemente a identificações errôneas, conforme apontado por SOUZA (2002) e também observado por nós em materiais de herbário. Por outro lado, vários caracteres foram encontrados neste trabalho que podem conjuntamente auxiliar na determinação destas duas espécies, mas pouca atenção tem sido dada a eles. Características de hábito e coloração do caule e flor parecem ser particularmente importantes na distinção destas espécies, pelo menos nas populações ocorrentes no campus da UEFS. Uma vez que estas espécies são de ampla distribuição, é necessário verificar a consistência destes e dos demais caracteres apontados por nós na delimitação de *H. arenarius* e *H. calceolaria*.

A ausência de qualquer locus diagnóstico entre *H. arenarius* e *H. calceolaria* impede a confirmação definitiva da ocorrência de hibridação natural entre estas duas espécies no campus da UEFS. Na análise morfológica multivariada, apenas poucos indivíduos se apresentaram como realmente intermediários entre *H. arenarius* e *H. calceo-*

laria. A elevada similaridade morfológica entre os indivíduos considerados primeiramente como intermediários e a população de *H. calceolaria* sugere que esses não se tratam de uma espécie distinta nem tampouco de primeira geração de híbridos, a não ser que neste último caso esteja ocorrendo expressão de caracteres mais relacionada a apenas um dos parentais (*H. calceolaria*), fato muito mais raramente observado do que herança intermediária (ARNOLD, 1994; RIESEBERG, 1995; BRIGGS & WALTERS, 1997). A elevada similaridade genética dos indivíduos intermediários com a população de *H. calceolaria* é usualmente observada entre populações conspecíficas ou entre espécies muito estreitamente relacionadas (CRAWFORD, 1989). Este fato, aliado à baixa similaridade genética dos indivíduos intermediários com a população de *H. arenarius*, também sugere que esses não se tratam de uma espécie distinta ou de híbridos de primeira geração.

A distinção não encontrada na análise de componentes principais, mas observada na análise de discriminantes, entre a população de intermediários e a de *H. calceolaria* é aparentemente espúria. Caso esses grupos fossem verdadeiramente isolados, seria esperado que na reamostragem aleatória apenas metade dos indivíduos apresentassem classificação correta. Uma vez que, caso os intermediários fossem realmente híbridos, estes e a população de *H. calceolaria* não corresponderiam a grupos independentes (metade do genoma dos intermediários seria idêntico ao de *H. calceolaria*), poderia ser esperado que a probabilidade de classificações corretas alcançasse 0,75 (VALVERDE *et al.*, 1996). Porém, os valores observados foram predominantemente maiores, apesar de muitas vezes terem sido inferiores ao observado na análise com os dados originais.

Desta forma, se os indivíduos previamente identificados como intermediários não correspondem a uma

espécie distinta e nem a híbridos de primeira geração, poderiam eles ser considerados como *H. calceolaria*? O fato de que: 1) as características morfológicas apresentadas por estes indivíduos que não possuem a morfologia típica de *H. calceolaria* podem ser encontradas em *H. arenarius*; 2) na reamostragem aleatória da análise de discriminantes os valores de classificação correta foram predominantemente inferiores ao observado nos dados originais, mas superiores ao esperado para híbridos ou espécies distintas; 3) existe pequena descontinuidade morfológica entre intermediários e *H. calceolaria*; 4) a similaridade genética com *H. calceolaria* foi muito elevada, mas com frequências alélicas diferentes em alguns sistemas enzimáticos, leva-nos a sugerir que estes indivíduos possivelmente são indivíduos de *H. calceolaria* com introgressão de genes de *H. arenarius*.

Para que isto ocorra, hibridação entre as duas espécies deve estar ocorrendo na área de estudo, sendo que estes híbridos podem se tratar de alguns dos indivíduos com maior intermediariedade morfológica observada na análise de componentes principais e mesmo de discriminantes. Porém, a análise de aloenzimas não foi capaz de detectar tais indivíduos. É esperado que estes eventos de hibridação sejam relativamente raros devido a fatores como a baixa

sobreposição no período de antese das flores (as flores de *H. arenarius* possuem antese matutina e as de *H. calceolaria*, antese vespertina) e eventos de retrocruzamento de híbridos com *H. calceolaria* sejam mais freqüentes (ou que indivíduos introgrididos sejam mais viáveis do que híbridos F1).

Esta suposição, apesar de parcialmente especulativa em face dos dados apresentados, encontra mais suporte do que a suposição de que as populações tratadas como intermediários e de *H. calceolaria* representem apenas uma espécie naturalmente variável (sem introgressão de genes de outra espécie), uma vez que esta variação não é contínua, conforme apontado acima. Uma questão interessante de verificar futuramente é qual a variabilidade morfológica apresentada por populações de *H. calceolaria* quando em alopatria com *H. arenarius*, resultados que poderiam comprovar a sugestão de ocorrência de introgressão na população estudada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Guilherme G. Leoneli pelo apoio técnico. E.L. Borba e A.M. Giulietti agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de Produtividade em Pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD ML. 1994. Natural hybridization and Louisiana irises: defining a major factor in plant evolution. *BioScience* 44: 141-147.
- BRIGGS D & SM WALTERS. 1997. **Plant variation and evolution**. 3ª ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- BRUNE W, AC ALFENAS & TG JUNGHANS. 1998. Identificações específicas de enzimas em géis, p. 201-328. In: AC ALFENAS (ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- CLAYTON J & D TRETIAK. 1972. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *J. Fish. Res. Board Canada* 29: 1169-1172.
- CORRIAS B, W ROSSI, P ARDUINO, R CIANCHI & L BULLINI. 1991. *Orchis longicornu* Poiret in Sardinia: genetic, morphological and chorological data. *Webbia* 45: 71-101.
- CRAWFORD DJ. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics, p. 146-164. In: DE SOLTIS & PS SOLTIS (eds.). **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press.
- MORI SA, LA MATTOS SILVA, G LISBOA & L CORADIN. 1989. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. Ilhéus: CEPEC/CEPLAC.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- RIESEBERG LH. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *Amer. J. Bot.* 82: 944-953.
- SUPERINTENDÊNCIA DE ESTUDOS ECONÔMICOS E SOCIAIS DA BAHIA. 2003. Disponível online em <<http://www.sei.ba.gov.br>>. Acesso em: dez. 2003.
- SHAW CR & R PRASAD. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Bioch. Gen.* 4: 297-320.
- SOLTIS DE, CH HAUFLER, DC DARROW & GJ GASTONY. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.* 73: 9-27.
- SOUZA JP. 2002. **Levantamento das espécies de *Hybanthus* Jacq. (Violaceae) do Brasil**. Universidade de São Paulo, MSc. diss.
- SOUZA JP. 2003. A new species of *Hybanthus* (Violaceae) from North-eastern Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 503-506.
- STATSOFT INC. 2000. **STATISTICA for Windows (computer program manual)**. Tulsa, Statsoft.
- STUBER CW, MM GOODMAN & FM JOHNSON. 1977. Genetic control and racial variation of α -glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Bioch. Gen.* 15: 383-394.
- SUN M & FR GANDERS. 1990. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. *Heredity* 64: 139-143.
- SWOFFORD DL & RB SELANDER. 1989. **Byosys-1: computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics**. Champaign, Illinois Natural History Survey.
- VALVERDE PL, F VITE & JA ZAVALA-HURTADO. 1996. A morphometric analysis of a putative hybrid between *Agave marmorata* Roez and *Agave kerchovei* Lem.: *Agave peacockii* Croucher. *Bot. J. Linn. Soc.* 122: 155-161.