

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**INFERÊNCIAS MOLECULARES SOBRE *PASSIFLORA ACTINIA* HOOK.
(PASSIFLORACEAE)**

MARCELO COSTA TEIXEIRA

Orientação: Professora Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**INFERÊNCIAS MOLECULARES SOBRE *PASSIFLORA ACTINIA* HOOK.
(PASSIFLORACEAE)**

MARCELO COSTA TEIXEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Botânica, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientação: Professora Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre

2015

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.” Paulo Freire.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Loreta Brandão de Freitas pela orientação deste trabalho, pela enorme competência e amizade adquirida ao longo destes dois anos.

Ao Dr. Geraldo Mäder pela co-orientação deste trabalho e pelos inúmeros ensinamentos que espero ter aprendido.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Evolução Molecular Giovanna, Gustavo, Ana Lúcia, Caroline, Michel, Maikel, Lauís, Daniele e Karina pelos momentos de descontração e trabalho.

Aos meus colegas de graduação Áthur e Marcus pelos jogos de futebol ao vivo e virtual.

Ao Clênio pelas conversas descontraídas e cadinhos lavados em época de pulverizações.

Ao Elmo e Milene.

Aos colaboradores desse trabalho Geraldo, Gustavo, Sandro e Aline.

Aos meus familiares.

Aos meus priminhos Matheus, Guilherme e afilhado Eduardo pela alegria e diversão.

Aos meus sogros Oscar e Lígia.

Aos meus pais pelo amor incondicional e por sempre acreditarem na educação como parte indispensável.

Ao meu irmão por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

À minha futura esposa Amarilis por todo amor, compreensão, companheirismo e por ter me permitido ser pai, o maior presente que alguém pode receber, o meu filho LIONEL, que me motivou e motiva nesses ires e vires Uruguaiana-Porto Alegre e que sempre espera meu retorno com um abraço apertado e um sorriso aberto.

Ao PPGBot e aos órgãos financiadores dessa pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. O gênero <i>Passiflora</i> L.	7
1.2. <i>Passiflora actinia</i> Hook.	8
1.3. Floresta Atlântica	11
1.4. Marcadores Moleculares	13
1.5. Estudos Filogenéticos	15
1.6. Estudos Filogeográficos	16
1.7. Modelagem de Nicho Ecológico	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. ARTIGO “Molecular inferences on the evolution of <i>Passiflora actinia</i> (Passifloraceae) based on plastid and nuclear variation”	19
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
5. BIBLIOGRAFIA	23

RESUMO

Passiflora actinia Hook. (Passifloraceae) é uma liana típica da Floresta Atlântica, que cresce geralmente no interior ou eventualmente na borda de florestas até seus ramos atingirem a parte mais alta e exposta à luz do dossel. A espécie possui uma ampla distribuição, desde a encosta Atlântica até a borda oriental do Planalto Brasileiro, não avançando muito em direção a oeste. A Floresta Atlântica está entre os biomas mais ricos em biodiversidade do mundo, especialmente em termos de endemismos. Devido a grande utilização de seus recursos e ao desmatamento para cultivo agrícola, pastoril e ocupação imobiliária, a fragmentação da floresta aumenta constantemente, trazendo consigo os efeitos prejudiciais à biodiversidade. Estudos filogenéticos e filogeográficos envolvendo *P. actinia* determinaram seu posicionamento próximo de *P. elegans* Mast. e demonstraram uma estruturação da variabilidade genética no sentido norte-sul da distribuição. Com o intuito de avaliar os padrões de variabilidade genética de populações de *P. actinia* ao longo de sua distribuição geográfica, através da análise de marcadores moleculares nucleares e plastidiais e determinar os efeitos climáticos sobre a distribuição desta diversidade, nós aplicamos métodos filogeográficos e de modelagem climática para o passado, presente e futuro. Os tempos de diversidade encontrados para *P. actinia* datam do Pleistoceno e os resultados indicam uma forte influência das mudanças climáticas deste período na estruturação da diversidade genética desta espécie. Os resultados de modelagem climática indicaram a manutenção de áreas adequadas para a espécie em localidades de maior altitude e sua redução em áreas de baixa altitude, especialmente para cenários com maiores concentrações de carbono. O risco maior para a manutenção desta espécie é a destruição de seu habitat por desflorestamento. Sendo assim, a espécie *P. actinia* pode ser considerada um excelente parâmetro para descrever os acontecimentos históricos que levaram à formação da Floresta Atlântica e um indicador das transformações futuras. Seu monitoramento poderá auxiliar no controle da ação antrópica sobre a Floresta Atlântica e na preservação da biodiversidade nesta região considerada como hotspot de diversidade.

ABSTRACT

Passiflora actinia Hook. (Passifloraceae) is a vine species typical from the Atlantic Forest. Usually, it grows inside or on the edge of forests where the branches reach the highest part and exposed to light in the canopy. The species has a wide distribution from the Atlantic slope to the eastern edge of the Brazilian Plateau, not much moving toward the west. The Atlantic Forest is among the richest in biodiversity biomes in the world, especially in terms of endemism. Due to the great use of its resources and deforestation for agricultural farming, pastoral, and property occupation, forest fragmentation constantly increases, bringing the effects harmful to biodiversity. Phylogenetic and phylogeographic studies involving *P. actinia* determined its position close to *P. elegans* Mast. and demonstrated a genetic structuring the variability in the north-south distribution sense. In order to assess the genetic variability patterns of *P. actinia*, we analyzed populations throughout its geographical distribution based on nuclear and plastid molecular markers employing phylogeographic methods and climate modelling analyses to past, present, and future implementing an ensemble forecasting framework. The diversification age in *P. actinia* was compatible to Pleistocene period indicating strong influence of climate changes over genetic diversity distribution to this species. Our results predicted the persistence of suitable regions to *P. actinia* located in highlands and forecast a reduction in lowlands, especially for the scenario with higher greenhouse gas concentration. Most preserving efforts must be focused over localities carrying unique genetic units and distributed areas with more climatic instability. Habitat loss due to deforestation in Atlantic Forest constitutes the major risk to this species maintenance that comprises only few populations and low diversity indices. Thus, *P. actinia* can be considered an excellent parameter describing historical events that led to the formation of Atlantic Forest and an indicator of future changes. Monitoring this species may be helpful to control anthropic effect on the Atlantic Forest and to preserve the biodiversity in this region considered as a hotspot of diversity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Passiflora* L.

O gênero *Passiflora* L. é o maior representante da família Passifloraceae em número de espécies e se caracteriza por uma ampla variedade de formas morfológicas. Atualmente, são descritas mais de 530 espécies e aproximadamente 400 híbridos produzidos artificialmente (Ulmer & MacDougal 2004). A distribuição geográfica deste gênero ocorre entre os trópicos de Capricórnio e Câncer, estando o Rio Grande do Sul localizado no extremo sul desta distribuição. Na América do Sul, podem ser encontrados mais de 90% das espécies do gênero, sendo a maior diversidade observada na região Andina (Deginani, 2001). À medida que a distribuição avança para o sul e para o norte desta região, observa-se uma gradual diminuição do número de espécies encontradas. Apenas 5% das espécies apresenta distribuição fora das Américas Central e do Sul tropicais (Abrahamczyk *et al.*, 2014).

A taxonomia do gênero *Passiflora* é bastante complexa e o gênero é subdividido em quatro subgêneros, *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* L., diversas seções e séries (Feuillet & MacDougal, 2003). Essa complexidade taxonômica ocorre devido à diversidade de estruturas florais e vegetativas encontrada nas espécies. O hábito predominante é o de lianas herbáceas ou lenhosas, podendo ser encontradas ervas, arbustos perenes ou mesmo espécies arbóreas (Ulmer & McDougal, 2004). No Rio Grande do Sul ocorrem 18 espécies distribuídas em dois subgêneros, *Passiflora* e *Decaloba* (Mäder *et al.*, 2009; Freitas, 2011), sendo estes os de distribuição geográfica mais ampla e com o maior número de espécies no gênero (Ulmer & MacDougal 2004).

Como características comuns, as plantas pertencentes ao gênero *Passiflora* apresentam nectários extraflorais e gavinhas, embora alguns exemplares arbóreos não possuam esta estrutura. As folhas apresentam grande variabilidade, possivelmente a maior entre as angiospermas (MacDougal, 1994), são sempre alternas e podem apresentar lâminas desde inteiras até divididas em nove lobos (Ulmer & McDougal, 2004). Entretanto, a presença de características marcantes na flor, como um disco nectarífero na base do hipanto, uma corona de filamentos distribuídos em uma a seis fileiras, cinco estames e estruturas reprodutivas unidas em um androginóforo reúnem estas espécies em um mesmo gênero (Ulmer & McDougal, 2004) e garantem sua monofilia (Judd *et al.*, 2009; APG III, 2009)

A grande diversidade de estruturas florais pode ser resultado de seleção natural envolvendo seus agentes polinizadores como fatores seletivos (Koschnitzke, 1993), pois as flores de *Passiflora* atraem uma ampla gama de polinizadores, desde abelhas, vespas, borboletas e mariposas até beija-flores e morcegos (Koschnitzke, 1993; MacDougal, 1994; Varassin & Silva, 1999). Os frutos são na maioria das espécies carnosos e a dispersão das sementes é mediada por aves, morcegos e pequenos mamíferos como roedores e marsupiais, que são atraídos pelo agradável cheiro e pela coloração dos frutos (Semir & Brown 1975; Koehler-Santos *et al.*, 2006).

1.2. *Passiflora actinia* Hook.

Apesar da grande complexidade do gênero *Passiflora* 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 (Cerqueira-Silva *et al.*, 2014).

Uma das exceções é *P. actinia* que vem sendo estudada sob diferentes aspectos, desde detalhes de seu sistema reprodutivo (Prazeres, 1989) até aspectos de sua evolução (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005). Esta espécie ocorre no interior e na borda das florestas, capoeiras e capoeirões. Tem sua distribuição geográfica descrita para os estados do Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC), e Rio Grande do Sul (RS). Nos estados do PR, SC e RS apresenta distribuição pela encosta atlântica e borda oriental do planalto, não avançando muito em direção a oeste (Prazeres, 1989; Sacco, 1980; Mondin *et al.*, 2011), sendo, no RS, encontrada nas regiões fitoecológicas da Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semi-decidual, inseridas nas regiões fisiográficas dos Campos de Cima da Serra, Encosta Inferior do Nordeste e Litoral (Mondin *et al.*, 2011) (Figura 1). Entretanto, em mais de dez anos de coletas realizadas por nosso grupo e alguns colaboradores, a espécie não tem sido mais encontrada nos estados do ES, SP e RJ (dados do Laboratório de Evolução Molecular, não publicados e informações de herbários de referência destas regiões). Em todas as localidades de ocorrência, esta espécie é representada por um pequeno número de indivíduos, que ocupam grande área do dossel (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005).

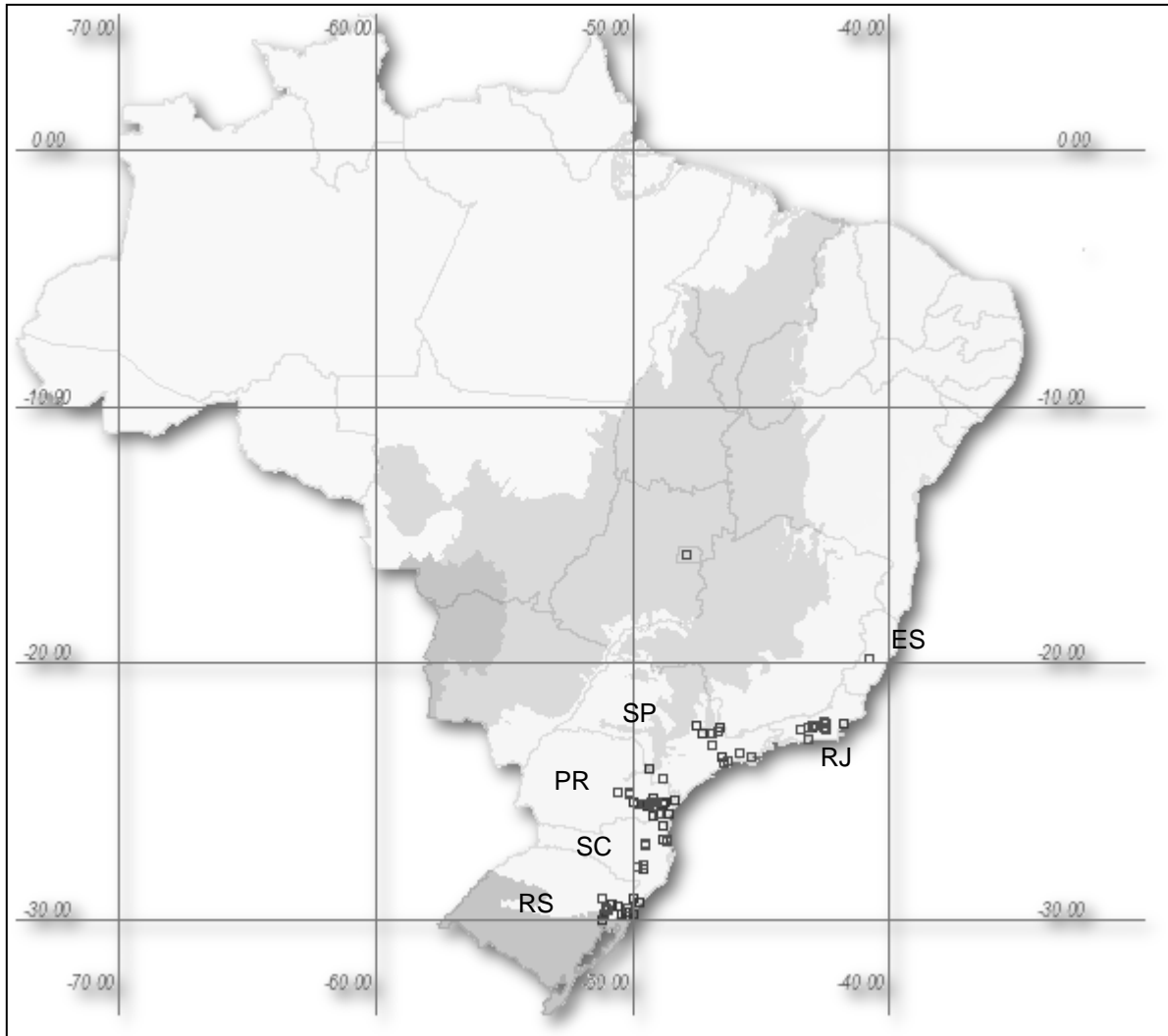


Figura 1. Distribuição geográfica da espécie *Passiflora actinia*, abrangendo todos os Estados de sua ocorrência: ES, Espírito Santo; RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; PR, Paraná; SC, Santa Catarina; e RS, Rio Grande do Sul.

O aspecto geral da espécie *P. actinia* está representado na Figura 2, como folhas simples, alternas e estipuladas, com nectários extraflorais, gavinhas e flores vistosas (Figura 2A).

O estudo de Prazeres (1989) sobre o sistema reprodutivo de *P. actinia* indicou que o principal polinizador da espécie é uma mamangava do gênero *Xylocopa* (Figura 2B) e que diversos visitantes florais ocasionais podem ainda ser encontrados em suas flores (abelhas, moscas e vespas de diversos gêneros) sem, no entanto, terem sido correlacionados com uma polinização efetiva.

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) através da protandria (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 (Prazeres, 1989). O fruto é do tipo baga e está representado na Figura 2C.

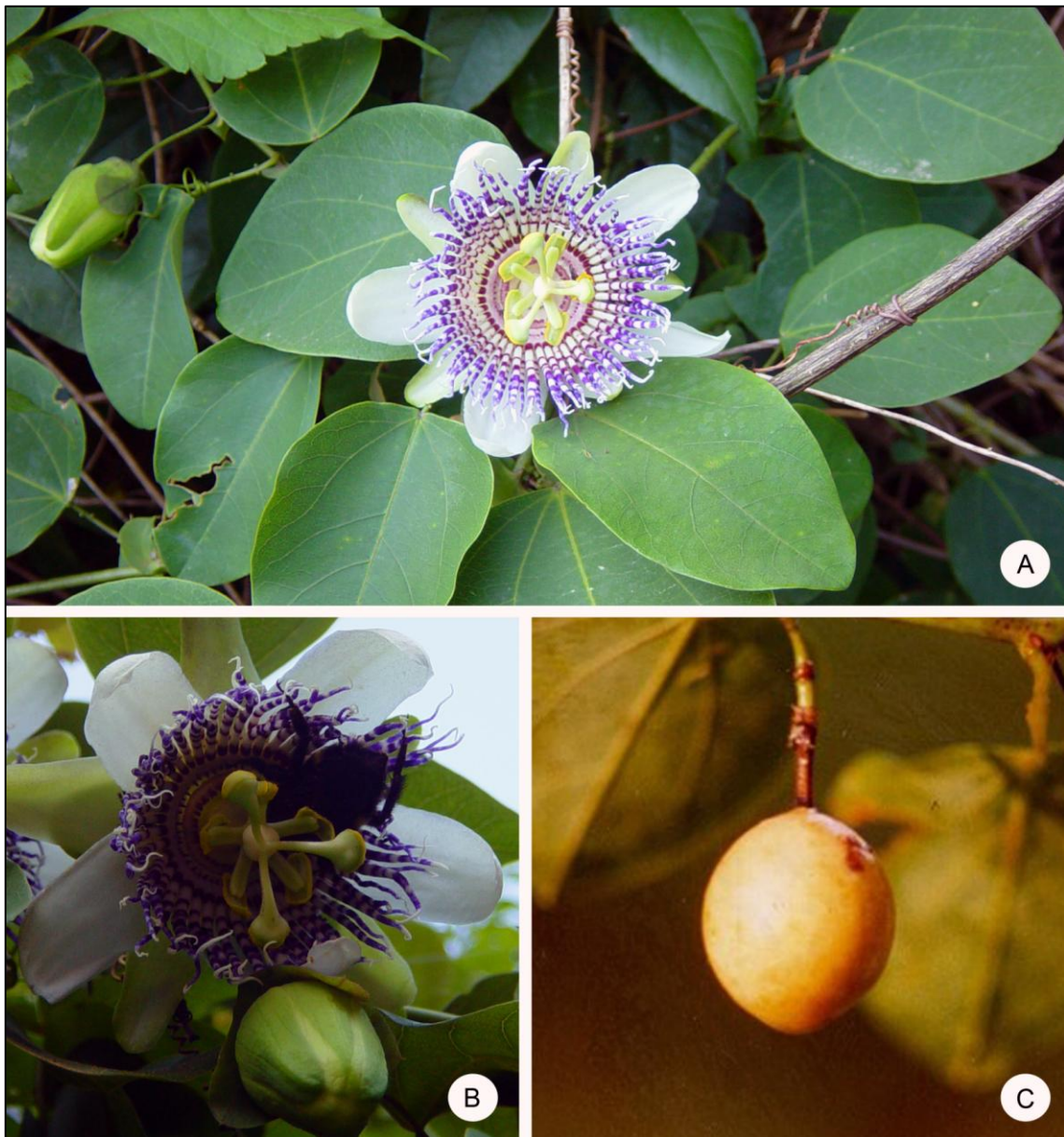


Figura 2. Aspecto geral da espécie *Passiflora actinia*. **A.** Folhas simples, alternas e estipuladas, com nectários extraflorais, gavinhas e flores vistosas . **B.** A flor vista em maior detalhe sendo visitada

pela mamangava do gênero *Xylocopa*. C. O fruto em maior detalhe. As imagens apresentadas são oriundas do LEM- Laboratório de Evolução Molecular.

Lorenz-Lemke *et al.* (2005) estudaram a variabilidade genética de *P. actinia* e sua relação com a espécie *P. elegans* Masters. Estas duas espécies são grupos irmãos (Muschner *et al.*, 2003; 2012) e apresentam diversas características em comum. De acordo com Lorenz-Lemke *et al.* (2005), elas apresentam distribuição geográfica parapátrica e eventos de hibridação entre elas são possíveis, mesmo que em baixa frequência.

Mäder *et al.* (2009) ampliaram o conhecimento sobre o limite sudoeste de distribuição de *P. actinia*, anteriormente descrito como o Portal de Torres e região adjacente (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005), descrevendo sua ocorrência para a região de Sapiranga (RS), contornando a Serra Geral, mas a variabilidade genética destas novas localidades ainda não foi determinada.

A escolha de *Passiflora actinia* se justifica por ser uma espécie de ampla distribuição na Floresta Atlântica. Como tal, esta espécie encontra-se naturalmente ameaçada pela degradação e fragmentação de seu habitat (Tabarelli *et al.*, 2005) e sofreu a influência de todos os eventos que moldaram a Floresta Atlântica (Martins, 2011).

1.3 Floresta Atlântica

A Floresta Atlântica (FA) compreende um complexo ambiental que incorpora cadeias de montanhas, platôs, vales e planícies de toda a faixa continental atlântica leste do Brasil. No sudeste e sul do País se expande para oeste alcançando as fronteiras com o Paraguai e Argentina, avançando também sobre o Planalto Meridional até o Rio Grande do Sul (IBGE, 2004). Abrange litologias do embasamento Pré-Cambriano, sedimentos da Bacia do Rio Paraná e sedimentos Cenozóicos. Este quadro traduz um processo histórico de expansão de formações florestais sobre as campestres, partindo da costa para o interior em consonância com o aumento do calor e da umidade do continente, no atual período interglacial. Representou no passado um dos mais ricos e variados conjuntos florestais pluviais sul-americanos, somente perdendo em extensão territorial para a Floresta Amazônica (IBGE, 2004).

A origem da FA está relacionada com o soerguimento da Cordilheira dos Andes, quando a placa de Nazca, a oeste da América do Sul, deslocou-se para o leste colidindo com a placa Sulamericana. Essa colisão resultou no levantamento da placa Sulamericana (Kious & Tilling, 1996) e o soerguimento desta na porção leste do continente. Esse soerguimento gerou fraturas e elevações no terreno, seguidas de afundamento de blocos de rochas, criando ladeiras íngremes que caracterizam a Serra do Mar (Almeida, 1976). A erosão resultante de chuvas e ventos acarretou em acúmulo de sedimentos ao longo da costa leste, originando a planície litorânea, a qual, nos últimos 1,8 milhões de anos, foi sendo alterada devido aos eventos de regressões e transgressões marinhas. Essa região de planície compõe um dos principais habitats da FA (Tonhasca, 2005).

A FA é reconhecida como o mais descaracterizado dos biomas brasileiros, tendo sido palco dos primeiros e principais episódios da colonização e ciclos de desenvolvimento do País. Sua área de abrangência tem hoje a maior densidade de população e lidera as atividades econômicas do país (IBGE, 2014). Historicamente, o desmatamento da Floresta Atlântica teve início juntamente com a colonização europeia no Brasil (Morellato & Haddad, 2000). Originalmente, esse bioma ocupava 15% do território nacional, percorrendo o litoral brasileiro de ponta a ponta. A floresta se estendia do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul e ocupava uma área de 1,3 milhões de quilômetros quadrados (Rizzini, 1988). Atualmente persistem apenas cerca de 8% de remanescentes florestais acima de 100 hectares em relação ao que existia originalmente (SOS Mata Atlântica, 2013). A maior parte dos remanescentes de mata é constituída de pequenos fragmentos (83% com menos de 50 ha), isolados entre si (Ribeiro *et al.*, 2009). Existem apenas duas regiões onde os remanescentes são contínuos, somando quase 10.000 km² de floresta cada uma: a Serra do Mar e de Paranapiacaba, nos estados de São Paulo e Paraná, no Brasil; e a província argentina de Misiones, que é contígua ao Parque Nacional do Iguazu e ao Parque Estadual do Turvo no Brasil (Galindo-Leal & Câmara, 2005).

Na região da FA é onde reside cerca de 70% da população brasileira, o que é refletido no alto grau de desmatamento que sofreu o bioma (IBAMA, 2010). Apesar de legalmente protegida, a perda e fragmentação dos habitats, caça e extração predatória de produtos florestais, tal como a conversão de áreas de floresta em campos cultivados, não diminuiram (MMA, 2013). Não obstante, o grau de conservação de ecorregiões desse

bioma varie, com ecorregiões que possuem até mais de 20% da cobertura original (Serra do Mar) até outras que conservam apenas 3% da cobertura original (Florestas do Interior, encontradas no interior de São Paulo, oeste do Paraná e Minas Gerais) (Ribeiro *et al.*, 2009).

Existem pelo menos 510 espécies em extinção, algumas em âmbito global, outras em âmbito nacional e outras estão ameaçadas apenas no bioma, com mais extinções locais sendo previstas para um futuro próximo devidas ao isolamento dos fragmentos remanescentes (Tabarelli *et al.*, 2005). Ainda assim, as formações vegetais da FA abrigam uma diversidade biológica ímpar, sendo um dos cinco maiores “hotspots” do mundo (Myers *et al.*, 2000).

Uma ampla variabilidade climática e de relevo, com elevações que vão desde o nível do mar até 2700 m, são observadas (Oliveira-Filho & Fontes, 2000), assim como muitos tipos fisionômicos florestais e ecossistemas associados, apresentando grande heterogeneidade de ambientes (Metzger, 2009). A FA faz contato com outros biomas, como a Caatinga, o Cerrado e o Pampa. De acordo com Oliveira-Filho & Fontes (2000), as muitas definições da FA podem ser classificadas em duas formas principais, *stricto sensu* (s.s.) e *lato sensu* (l.s.). A Floresta Atlântica s.s. compreende somente as florestas pluviais da encosta atlântica (Floresta Ombrófila Densa), enquanto a Floresta Atlântica l.s. inclui as Florestas Estacionais (Decídua e Semi-Decídua), as Florestas com Araucária (Floresta Ombrófila Mista) e as Áreas de Formações Pioneiras (Floresta de Restinga).

1.4 Marcadores Moleculares

A utilização de marcadores moleculares tem adquirido uma importância cada vez maior na resolução de muitos questionamentos biológicos em diversas áreas e contribuído especialmente para o entendimento do surgimento e evolução do gênero *Passiflora* (Cerqueira-Silva *et al.*, 2014).

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade biológica e mesmo de conservação, sendo ideais para o estudo de espécies em perigo, uma vez que fornecem uma grande quantidade de dados a partir de pouco material biológico que pode ser obtido por métodos não destrutivos (Petit *et al.*, 2001).

Entre os marcadores mais populares em estudos populacionais de plantas podemos destacar as regiões não codificadoras do DNA plastidial (cpDNA), especialmente regiões intergênicas (Hamilton *et al* 2003). A frequente herança uniparental desses marcadores e a ausência de recombinação são vantagens para uma avaliação diferencial do fluxo de pólen e sementes (Liston *et al* 2007), revelando diversos aspectos da estrutura populacional (Liston *et al* 2007). Como o genoma plastidial é haplóide, o tamanho efetivo populacional é menor que quando o genoma nuclear é considerado, essa característica acelera o processo de deriva genética, conseqüentemente o cpDNA pode apresentar diferenciação neutra entre populações ou linhagens divergentes maior que o DNA nuclear. Portanto, quando a divergência entre populações é relativamente recente e o fluxo gênico é limitado, polimorfismos neutros de cpDNA têm mais poder de detectar a diferenciação se comparados a polimorfismos neutros do DNA nuclear (Hamilton *et al* 2003).

Entre os marcadores nucleares, os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS 1 e ITS2) são os mais utilizados em estudos tanto de filogenia como populacionais (Álvarez & Wendel, 2003; Feliner & Rosselló, 2007; Taberlet *et al.*, 2007). Uma das vantagens de utilizar o marcador nuclear ITS é que ele provê uma alternativa ao uso de marcadores de cpDNA, que só são capazes de fornecer dados de uma parte da história da espécie, já que o cpDNA possui herança uniparental (Xu, 2005). O uso do marcador ITS tem obtido sucesso quando empregados para inferir padrões filogeográficos em uma ampla gama de espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Koehler-Santos *et al.*, 2006; Mäder *et al.*, 2010). Seu uso difundido explica-se por diferentes motivos, dentre eles a disponibilidade de primers universais, a herança biparental do marcador uma vez que este é nuclear e os consideráveis níveis de variação genética para estudos infragenéricos (Álvarez & Wendel 2003). Além destes fatores, o ITS também se destaca devido ao grande número de cópias e o tamanho moderado de suas sequências, que tornam mais fácil o isolamento e amplificação das regiões mesmo a partir de materiais de herbário (Feliner & Rosselló 2007).

O esquema de posicionamento das regiões ITS 1, ITS 2 e cpDNA (*trnG-trnS*) são apresentados na Figura 3.

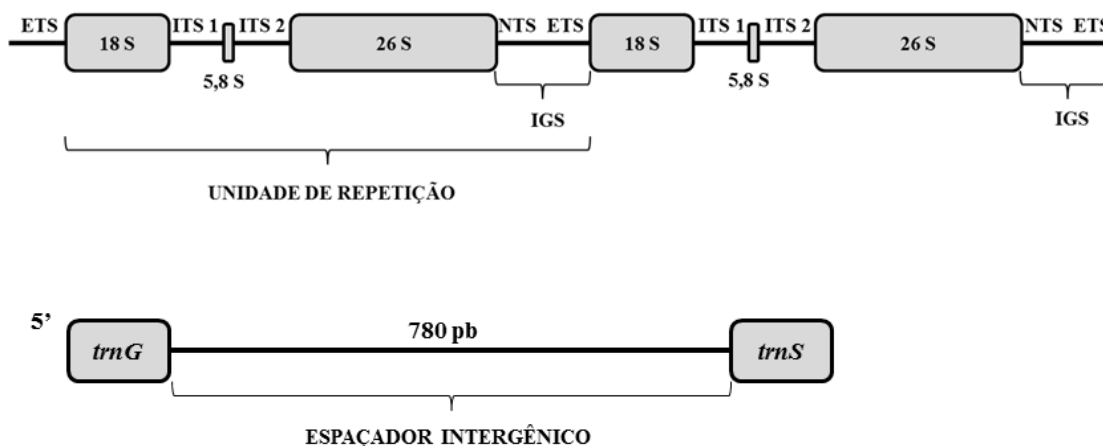


Figura 3. Esquema de posicionamento das regiões ITS 1, ITS 2 e *trnG-trnS*.

1.5. Estudos Filogenéticos

A construção de árvores filogenéticas possibilita explicar o relacionamento entre as espécies atuais e deduzir as histórias evolutivas das mesmas. Um fator que contribuiu para o avanço de estudos filogenéticos foi a utilização de marcadores de DNA, por permitir o acesso a informações contidas no material genético, gerando informações adicionais que levam ao entendimento da evolução de diferentes grupos taxonômicos.

Estudos filogenéticos com foco na delimitação de grupos taxonômicos têm elevado o número de reclassificações taxonômicas (DeSalle *et al.*, 2005; Shaffer & Thomson, 2007; Reeves & Richards, 2011), baseando as decisões no grau de diversidade encontrada nos grupos, desta forma contribuindo para a identificação de espécies em risco e o estabelecimento de programas de proteção à biodiversidade.

Na última década os estudos de filogenia molecular proporcionaram uma maior compreensão sobre o gênero *Passiflora*. O trabalho pioneiro de Muschner *et al.* (2003) avaliou três marcadores moleculares em 61 espécies do gênero e propôs uma nova organização taxonômica para o gênero, que passou a contar com apenas quatro subgêneros que depois foram corroborados por marcadores morfológicos na revisão de Feuillet & MacDougal (2003) e não mais com os 22 ou 23 propostos por Killip (1938) e Escobar (1989), respectivamente. Entre as 61 espécies estudadas por Muschner *et al.* (2003), destaca-se a proximidade evolutiva entre *P. actinia* e *P. elegans* Mast. Embora, de acordo com a classificação taxonômica, elas sejam colocadas em sessões diferentes do subgênero *Passiflora*.

1.6. Estudos Filogeográficos

Os estudos filogeográficos buscam evidências sobre a história da divergência entre populações, examinando as relações genealógicas das sequências dentro de um contexto geográfico. Segundo Avise (2000), a filogeografia tem como objetivo desvendar os processos atuais e históricos que influenciaram a variação genética observada atualmente nas populações. Neste tipo de estudo, a utilização de marcadores moleculares que apresentam variabilidade em nível individual é fundamental.

Para possibilitar o manejo e a conservação dos recursos genéticos existentes é necessário compreender os processos evolutivos envolvidos na manutenção da biodiversidade como o fluxo gênico e a filogeografia das espécies. Muitas espécies mostram uma estrutura populacional que pode ser interpretada em contextos geográficos e cronológicos, decifrar os componentes espaciais e temporais da estrutura populacional e interpretar os processos ecológicos e evolutivos responsáveis por eles são os maiores objetivos da filogeografia (Beheregaray 2008).

Cada vez mais, estudos que avaliam a diversidade genética de espécies vegetais e animais têm sido utilizados como ferramenta para a análise da biodiversidade e para guiar programas de manejo e conservação, tanto de ambientes específicos como de espécies em particular. O estudo da variabilidade genética das populações está sendo reconhecido em diversos países, inclusive no Brasil, por órgãos governamentais e privados que financiam as pesquisas e propõem a legislação na área de preservação como parte integrante do arcabouço científico que dará sustentação ao estabelecimento de parques e reservas.

Os resultados de similaridade genética e ecológica observada entre as espécies de *P. actina* e *P. elegans* e sua distribuição parapátrica motivaram o estudo de Lorenz-Lemke *et al.* (2005) em que foi realizado um estudo filogeográfico com ambas as espécies, envolvendo amostragem de toda a distribuição geográfica. As conclusões deste estudo foram que a variabilidade genética encontrada em *P. actinia* está gradualmente estruturada no sentido norte-sul de sua distribuição, que esta espécie é característica da Floresta Atlântica e tem como limite sul de sua distribuição a porção nordeste do Rio Grande do Sul.

1.7. Modelagem de Nicho Ecológico

Conhecer a distribuição e as necessidades ambientais das espécies é uma tarefa primordial no direcionamento de ações que visam à conservação das mesmas. Uma das ferramentas que têm sido mais utilizadas para identificar características ambientais favoráveis à sobrevivência de uma espécie bem como visualizar o resultado no espaço geográfico sob diferentes cenários ambientais é a modelagem de nicho ecológico (Sillero 2011).

Diversas técnicas de modelagem de nicho ecológico têm se mostrado importantes no estudo biogeográfico das espécies, encontrando ampla utilização em áreas como ecologia, biologia da conservação e biologia evolutiva (Elith *et al.*, 2006). Fatores como o grau de degradação do meio ambiente, a escassez de dados sobre a ocorrência de determinadas espécies e a iminência de alterações climáticas tornam ainda mais oportuna e urgente a utilização de tais técnicas.

Muitos estudos demonstram a utilidade de modelos de nicho ecológico na definição de estratégias para conservação, visto que podem auxiliar na escolha de áreas prioritárias para ações de conservação (Ferrier *et al.* 2002; Nelson & Boots 2008), indicar áreas para reintrodução de espécies (Pearce & Lindenmayer 1998), direcionar a busca por novas populações (Bourg *et al.* 2005; Guisan *et al.* 2006), prevenir a invasão de espécies exóticas em hábitat de espécies ameaçadas (Higgins *et al.* 1999; Peterson 2003), avaliar o impacto das mudanças climáticas (Araújo & New 2007; Hannah *et al.* 2007), direcionar ações de recomposição de áreas degradadas (Siqueira 2005), entre outras. Quando associadas a resultados de diversidade genética, tais informações são ainda mais significativas (Diniz-Filho *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os padrões de variabilidade genética de populações de *Passiflora actinia* ao longo de sua distribuição geográfica através da análise de marcadores moleculares nucleares e plastidiais, contribuindo para o entendimento dos processos de especiação no gênero *Passiflora*.

2.2. Objetivos específicos

O trabalho apresentou como objetivos específicos: (i) Determinar os níveis de diversidade dos espaçadores internos do DNA ribossomal nuclear (ITS) e do espaçador intergênico plastidial *trnS-trnG*; (ii) Estimar a distribuição da variabilidade genética intra e interpopulacional considerando os marcadores utilizados; (iii) Avaliar o relacionamento filogenético entre as populações amostradas; (iv) Verificar a existência de linhagens diferenciadas e a presença de barreiras geográficas que possam separá-las; e (v) Identificar fatores ecológicos que possam influenciar a distribuição da diversidade genética na espécie.

3. ARTIGO

“Molecular inferences on the evolution of *Passiflora actinia* (Passifloraceae) based on
plastid and nuclear variation

Marcelo C. Teixeira, Geraldo Mäder, Gustavo A. Silva-Arias, Sandro L. Bonatto,
Loreta B. Freitas

Artigo submetido à revista
Botanical Journal of the Linnean Society

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 Origem de *Passiflora actinia*

O gênero *Passiflora* L. é o maior representante da família Passifloraceae em número de espécies e se caracteriza por uma ampla variedade de formas morfológicas (Ulmer & MacDougal 2004). *Passiflora actinia* e *P. elegans* estão intimamente relacionadas dentro deste gênero (Muschner *et al.*, 2003). O tempo de divergência entre essas espécies e o momento em que a divergência principal entre as sequências de *P. actinia* foram períodos em que grandes mudanças climáticas afetaram a borda sul da Floresta Atlântica (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005), com as áreas de floresta expandindo em relação aos campos (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010), permitindo a migração e colonização por espécies florestais, corroborando os nossos resultados.

Os resultados apresentados no artigo que compõe esta dissertação mostram que a separação de *P. elegans* e *P. actinia* ocorreu antes da diversificação das sequências de *P. actinia*, sugerindo que *P. actinia* teria se originado a partir de representantes de *P. elegans*. Estes resultados, se confirmados, vão ao encontro do que propôs Rambo (1951) ao sugerir um forte componente Andino na composição da vegetação do Rio Grande do Sul e de suas ideias sobre a origem da FA (Rambo 1961).

Em seu trabalho sobre a diversidade genética de *P. elegans* e a ocorrência de eventos de hibridação entre ela e *P. actinia*, Lorenz-Lemke *et al.* (2005) estudaram diversos acessos destas duas espécies numa abordagem filogeográfica, comprovando o estreito relacionamento evolutivo entre estas duas espécies, mas concluindo que *P. elegans* deveria ser derivada de *P. actinia* especialmente porque esta última apresentou níveis mais elevados de diversidade. Convém ressaltar que a abordagem usada por estes autores não permitia a datação dos processos de divergência. Além disso, neste trabalho os dados de ITS, que foram responsáveis pela maior parte da diversidade genética, incluíram os sítios heterozigotos, o que pode ter superestimado tais valores (Mäder *et al.*, 2010) diferentemente do que aqui foi apresentado.

Outro fato que suporta nossa ideia de que foi *P. elegans* deu origem à *P. actinia* deriva dos resultados recentemente obtidos por Barros *et al.*, (submetido) que demonstram que espécies de *Passiflora* com origem tropical apresentam menor diversidade genética no limite sul de sua distribuição quando este está em regiões temperadas ou subtropicais. Desta forma, o ancestral deve ter tido uma origem a oeste

da distribuição e migrado para leste e norte. Os resultados obtidos pela modelagem de adequabilidade de nicho para o passado corroboram esta hipótese.

4.2 Efeitos do Pleistoceno sobre a Floresta Atlântica

Evidências de paleoecologia, modelagem e filogeografia sugerem a ocorrência de refúgios florestais do Pleistoceno em áreas mais subtropicais (ver revisão em Turchetto-Zolet *et al.*, 2013) . Neste período, a FA era um grande mosaico de campo e floresta, com os fragmentos florestais isolados e o clima na região era frio e semi-árido (Behling & Lichte, 1997; Ledru *et al.*, 1998; Lichte & Behling, 1999; Behling, 2002; Behling & Negrelle, 2001). Esse cenário se reflete na modelagem de adequabilidade de nicho observado para *P. actinia* em nosso trabalho, especialmente na projeção para o Último Máximo Glacial (UMG).

No entanto, o Pleistoceno também se caracteriza por múltiplos eventos de contração e expansão (Hewitt, 2000), com estas expansões tendo sido mais frequentes no início e meados do Holoceno. Isto poderia explicar as mudanças na área de distribuição de *P. actinia* e os índices de diversidade genética encontrados, em concordância com a modelagem na projeção para o médio Holoceno que revela o aumento da área de distribuição de *P. actinia*.

Rambo (1961) sugeriu que a expansão das populações florestais se deu em duas frentes principais e que a flora típica da porção sul da FA não teria se desenvolvido em um clima tropical, mas teria ocupado o território antes da chegada de espécies tropicais. Mais recentemente, estudos paleoclimáticos realizados no sul e sudeste do Brasil corroboraram essa ideia (Behling, 1995; 1998; 2002; Behling *et al.*, 2001; 2004; 2005). Desta forma, as migrações que colonizaram a porção sul da FA devem ter ocorrido de forma fragmentária, levando ao isolamento espacial das populações, levando ao padrão que observamos em relação à *P. actinia* e *P. elegans*, com *P. actinia* tendo seu limite de distribuição ao sul a partir do município de Sapiranga (Rio Grande do Sul) e chegando até o estado do Paraná.

4.3 Contribuição para o estabelecimento de programas de conservação da biodiversidade

As mudanças climáticas podem afetar a gama de espécies com a mudança de seus ambientes (Hewitt, 1996) e influenciar sua distribuição e taxas de diversificação. Na Floresta Atlântica as espécies estão sob ameaça constante da destruição de seu habitat, em especial aquelas que apresentam distribuição geográfica restrita e/ou baixa diversidade genética. A preservação das áreas que abrigam tais espécies é de grande importância para a preservação da biodiversidade (Moritz *et al.*, 2000). Além disso, é necessário, para fins de conservação, identificar linhagens evolutivas que estejam geograficamente e geneticamente isoladas (Moritz, 1994; Moritz & Fé, 1998; Moritz *et al.*, 2000).

O estudo das mudanças climáticas do passado permite propor cenários futuros para a preservação da biodiversidade (Rull, 2011), identificando áreas prioritárias para a conservação, especialmente aqueles locais de estabilidade, onde se espera encontrar uma maior diversidade de espécies ou uma maior variabilidade genética nas populações. Nas áreas de maior estabilidade de *P. actinia* existem áreas de proteção já regulamentadas, como o Parque Nacional da Serra Geral e a Reserva Biológica da Serra Geral, no entanto, ainda são necessárias a supervisão da região e a execução das leis para proteger esta e outras espécies.

Os resultados aqui apresentados demonstram a utilidade de estudos genéticos e evolutivos focados em espécies particulares para o estabelecimento de cenários gerais dos biomas e ecorregiões. A espécie *P. actinia* pode ser considerada como um excelente parâmetro para descrever os acontecimentos históricos que levaram à formação da FA e como indicador das transformações futuras. Seu monitoramento baseado em informações de sua diversidade genética poderá auxiliar no controle da ação antrópica sobre a FA e na preservação da biodiversidade nesta região considerada como hotspot de diversidade.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMCZYK, S.; SOUTO-VILAÓS, D.; RENNER S. S. 2014. Escape from extreme specialization: passionflowers, bats and the sword-billed hummingbird. **Proceedings of the Royal Society B** **281**: 20140888.
- ALMEIDA, F.F.M. 1976. The system of continental rifts bordering the Santos Basin, Brazil. **Academia Brasileira Ciências**. **48**: 15-26
- ALVAREZ, I.; WENDEL, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetic Evolution**. **29**: 417-434.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** **141**: 399–436.
- ARAÚJO, M.B. & NEW, M. 2007. Ensemble forecasting of species distributions. **Trends in Ecology & Evolution**, **22**: 42-47.
- AVISE, J.C. 2000. **Phylogeography: The history and formation of species**. London: Harvard University Press. 447 p.
- BARROS, M.J.F.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; FREITAS, L.B. Ecological drivers of plant genetic diversity at the southern edge of geographical distributions: Forestal vines in a temperate region. **Botanical Journal Lineau Society (sumetido)**.
- BEHEREGARAY, L. B. 2008. Twenty year of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology** **17**: 3754-3774
- BEHLING, H. 1995. Investigations into the Late Pleistocene and Holocene history of vegetation and climate in Santa Catarina (S Brazil). **Vegetation History Archaeobotany**. **4**: 127-152.
- BEHLING, H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil.

Review of Palaeobotany and Palynology. 99: 143-156.

BEHLING, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 177:** 19-27.

BEHLING, H.; LICHTER, M. 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical SE Brazil. **Quaternary Research 48:** 348–358.

BEHLING, H.; NEGRELLE, R.R.B. 2001. Late Quaternary tropical rain forest and climate dynamics from the Atlantic lowland in southern Brazil. **Quaternary Research. 56:** 87-101.

BEHLING, H.; PILLAR, V.; ORLÓCI, L.; BAUERMANN, S.G. 2004. Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 203:** 277-297.

BEHLING, H.; PILLAR, V.D ; BAUERMANN, S.G . 2005. Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology. 133:** 235-248.

BOURG, N. A.; MCSHEA, W. J. & GILL, D. E. 2005. Putting a CART before the search: Successful habitat prediction for a rare forest herb. **Ecology 86:** 2793-2804.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. 2014. Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. **International Journal of Molecular Sciences. 15:** 14122-14152

DEGINANI, N. B. 2001. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). **Darwiniana. 39:** 43-129.

DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy,

species delimitation and DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological**. **360**: 1905–16.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; LOYOLA, R. D. 2010. Conservation Science in Brazil: Challenges for the 21st Century. **Natureza & Conservação**. **8**: 1-2.

ELITH, J.; GRAHAM, C.H.; ANDERSON, R.P.; DUDÍK, M.; FERRIER, S.; GUIBAN, A.; HIJMANS, R.J.; HUETTMANN F.; LEATHWICK, J.R.; LEHMANN, A.L.; LI, J.; LOHMAN, L.G.; LOISELLE, B.A.; MANION, G.; MORITZ, C.; NAKAMURA, M.; NAKAZAWA, Y.; OVERTON, J.M.C.C.; PETERSON, A.T.; PHILLIPS, S.J.; RICHARDSON, K.; SCACHETTI-PEREIRA, R.; SCHAPIRE, R.E.; SOBERÓN, J.; WILLIAMS, S.; WISZ, M.S. & ZIMMERMANN, N.E. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. **Ecography** **29**: 129-151.

ESCOBAR, L. K. 1989. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. **76**: 877-885.

FELINER, G.N.; ROSSELLÓ, J.A. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. **Molecul. Phylogenetics and Evolution**. **44**: 911-919.

FERRIER, S.; WATSON G.; PEARCE, J. & DRIELSMA M. 2002. Extended statistical approaches to modelling spatial pattern in biodiversity: the north-east New South Walles experience. I. Species-level modelling. **Biodiversity and Conservation** **11**: 2275-2307.

FEUILLET, C., MacDOUGAL, J.M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**. **13**: 34-38.

FREITAS, L.B. 2011. História evolutiva das espécies de *Passiflora* L. De ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genético, estrutura populacional e filogenia. **Revista Brasileira de Biociências**, **9(s1)**: 41-47.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. 2005. **Floresta Atlântica: Biodiversidade, ameaças e Perspectivas**. Belo Horizonte: Fundação SOS Floresta Atlântica, 427 p. ISBN 85-98946-02-8

GUISAN, A., LEHMANN, A.; FERRIER, S.; AUSTIN, M.; OVERTON, J. MC. C.; ASPINALL, R. & HASTIE, T. 2006. Making better biogeographical predictions of species' distributions. **Journal of Applied Ecology** **43**: 386-392.

HAMILTON, M. B.; BRAVERMAN, J. M. & SORIA-HERNANZ D. F. 2003. Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in 42 New World species of the Lecythidaceae. **Molecular Biology and Evolution** **20**: 1710-1721.

HANNAH, L.; MIDGLEY, G.; ANDELMAN, S.; ARAÚJO, M.; HUGHES, G.; MARTINEZ-MEYER, E.; PEARSON, R. & WILLIAMS, P. 2007. Protected area needs in a changing climate. **Frontiers in Ecology and the Environment** **5**: 131-138.

HEWITT, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. **Biological Journal of the Linnean Society** **58**: 247–276.

HEWITT, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature** **405**: 907-913

HIGGINS, S. I.; RICHARDSON, D. M.; COWLING, R. M. & TRINDER-SMITH, T. H. 1999. Predicting the landscape-scale distribution of alien plants and their threat to plant diversity. **Conservation Biology** **13**: 303-313.

IBAMA. 2013. **Floresta Atlântica**. Página visitada em 18 de abril de 2013. <http://www.ibama.gov.br/>.

IBGE. 2004. **Mapa de Biomas do Brasil**. Página visitada em 27 de novembro de 2014. <http://www.ibge.gov.br/>.

IBGE. 2014. **Retração da vegetação nativa nos períodos de 1950-1960 e 1980-2010.**

Página visitada em 27 de novembro de 2014. <http://www.ibge.gov.br/>.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal – um enfoque filogenético (3ª ed).** Artmed, Porto Alegre, 2009.

KILLIP, E. P. 1938. The American species of Passifloraceae. **Publication of Field Museum of Natural History, Botanical Series. 19:** 1-613.

KIOUS, W.J., TILLING, R.I. 1996. **The dynamic earth: the story of plate tectonics.** United States Geological Services, U S Government Printing Office, Washington, DC, USA 77p.

KOEHLER-SANTOS, P. 2006. Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society. 88:** 611-630.

KOSCHNITZKE, C. 1993. **Morfologia e biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae).** Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Dissertação de Mestrado.

LEDRU, M.P., SALGADO-LABOURIAU, M.L. & LORSCHETTER, M.L. 1998. Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10,000 yr B.P. **Review of Palaeobotany and Palynology 99:**131-142.

LICHTE, M.; BEHLING, H. 1999. Dry and cold climatic conditions in the formation of the modern landscape in Southeastern Brazil. **Zeitschrift Für Geomorphologie. 43:** 341-358.

LISTON, A.; PARKER-DEFENIKS, M.; SYRING, J.V.; WILLYARD, A.; CRONN, R. 2007. Interspecific phylogenetic analysis enhances intraspecific phylogeographical inference: a case study in *Pinus lambertiana*. **Molecular Ecology. 16:** 3926–3937.

LORENZ-LEMKE, A.P.; MUSCHNER, V.C.; BONATTO, S.L.; CERVI, A.C.;

SALZANO, F.M. & FREITAS, L.B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nr DNA) variation. **Annals of Botany** **95**: 799–806.

LORENZ-LEMKE, A.P.; TOGNI P.D.; MÄDER, G.; KRIEDT, R.A.; STEHMANN, J.R.; SALZANO, F.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. 2010. Plant species diversification in eastern South American highland subtropical region: a phylogeographic perspective with native *Petunia* (Solanaceae). **Molecular Ecology**. **19**: 5240–5251.

MacDOUGAL, J.M. 1994. Revision on *Passiflora*, subgenus *Decaloba*, section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs**. **41**: 1-146.

MÄDER, G.; LORENZ -LEMKE , A.P.; CERVI, A.C., FREITAS, L.B. 2009. Novas ocorrências e distribuição do gênero *Passiflora* L. no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, **7(4)**: 364-367.

MÄDER, G.; ZAMBERLAN, P.M.; FAGUNDES, N.J.R.; MAGNUS, T.; SALZANO, F.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. 2010. The use and limits of ITS data in the analysis of intraspecific variation in *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**. **33**: 99-108.

MARTINS FM. 2011. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**. **104**: 499-509.

METSGER, J.P. 2009. Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation** **142**: 1138-1140.

MMA. 2013. **Monitoramento do bioma Floresta Atlântica**. Página visitada em 15 de abril de 2013. <http://www.mma.gov.br/>

MONDIN, C.; CERVI, A.C.; MOREIRA, G.R.P. 2011. Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de**

Biociências. 9: 3-27.

MORELLATO, P., HADDAD, C. 2000. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica. 32:** 786-792.

MORITZ, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. **Trends in Ecology and Evolution 9:** 373–375.

MORITZ, C.; FAITH, D.P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology 7:** 419–429.

MORITZ, C.; PATTON, J.L.; SCHNEIDER, C.J.; SMITH, T.B. 2000. Diversification of Rainforest Faunas: An Integrated Molecular Approach. **Annual Review of Ecology and Systematics 31:** 533–563.

MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SOUZA-CHIES, T.T.; SALZANO, F.M., FREITAS, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany. 90:** 1229-1238.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature. 403:** 853–858.

NELSON, T.A.; BOOTS, B. 2008. Detecting spatial hot spots in landscape ecology. **Ecography 31:** 556-566.

OLIVEIRA-FILHO, A.T., FONTES, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southern Brazil and the influence of climatic. **Biotropica 32:** 793-810.

PEARCE, J.; LINDENMAYER, D. 1998. Bioclimatic analysis to enhance reintroduction biology of the endangered helmeted honeyeater (*Linchenostomus melanops cassidix*) in southeastern Australia. **Restoration Ecology 6:** 238-243.

PETERSON, A.T. 2003. Predicting the geography of species' invasions via Ecological Niche Modeling. **Quarterly Review of Biology** **78(4)**: 419-433.

PETIT, C.; FRÉVILLE, H.; MIGNOT, A.; COLAS, B.; RIBA, M.; IMBERT, E.; HURTREZ-BOUSSÉS, S.; VIREVAIRE, M.; OLIVIERI, I. 2001. Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. **Biological Conservation** **100**: 21-34.

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.

RAMBO, B. 1951. O elemento andino no pinhal riograndense. **Anais Botânicos do HBR** **3**: 7-39.

RAMBO, B. 1961. Migration routes of the south Brazilian rain forest. **Pesquisas, Botanica** **12**: 5-54.

REEVES, P.A.; RICHARDS, C.M. 2011. Species delimitation under the general lineage concept: an empirical example using wild North American hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). **Systematic Biology**. **60**: 45-59.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** **142**: 1141-1153.

RIZZINI, C.T. 1988. **Ecosistemas brasileiros.** Index, Rio de Janeiro, 200p.

RULL, V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology & Evolution** **26**: 508–513.

SACCO, J.C. 1980. **Passifloraceas.** In: REITZ, R. Ed., Flora Ilustrada Catarinense, Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí/SC. 130p.

SEMIR, J., BROWN, K.S. Jr. 1975. **Maracujá: A flor da paixão**. Revista Universitária de Geografia, fevereiro, p.41-47.

SHAFFER, H.B.; THOMSON, R.C. 2007. Delimiting species in recent radiations. **Systematic Biology**. **56**: 896–906.

SILLERO, N. 2011. What does ecological modelling model? A proposed classification of ecological niche models based on their underlying methods. **Ecological Modelling**, **222**: 1343-1346.

SIQUEIRA, M. F. 2005. **Uso de Modelagem de nicho fundamental na avaliação do padrão de distribuição geográfica de espécies vegetais**. Tese de Doutorado. Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

SOS MATA ATLÂNTICA. 2013. Página visitada em 17 de abril de 2013. <http://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M.; HIROTA, V. M. 2005. **Floresta Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Belo Horizonte: SOS Floresta Atlântica e Conservação Internacional. 470 p.

TABERLET, P.; COISSAC, E.; POMPANON, F.; GIELLY, L.; MIQUEL, C.; VALENTINI, A.; VERMAT, T.; CORTIER, G.; BROCHMANN, C.; WILLERSLEV, E. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. **Nucleic Acids Research**. **35**: 14.

TONHASCA, J.A. 2005. **Ecologia e história natural da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro, Interciência, 197p.

TURCHETTO-ZOLET AC, PINHEIRO F, SALGUEIRO F, PALMA-SILVA F. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology** **22**: 1193–1213.

ULMER, T., MacDOUGAL, J.M. 2004. **Passiflora: Passionflowers of the World**.

Portland. Oregon. 430p.

VARASSIN, G., SILVA, A.G. 1999. A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em vegetação de restinga. **Rodriguésia. 50:** 5-17.

XU, J. 2005. The inheritance of organelle genes and genomes: Patterns and mechanisms. **Genome. 48:** 951-958.