

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

Dissertação de Mestrado

**Biossistemática do complexo *Vellozia hirsuta*
(Velloziaceae) baseada em análise
filogeográfica e genética de populações**

ARIANE RAQUEL BARBOSA

ORIENTADOR: Dr. Eduardo Leite Borba
CO-ORIENTADORA: Dra. Viviane da Silva Pereira

Belo Horizonte - Minas Gerais
Fevereiro - 2011

ARIANE RAQUEL BARBOSA

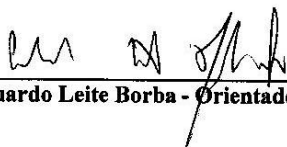
**Biossistemática do complexo *Vellozia hirsuta*
(Velloziaceae) baseada em análise
filogeográfica e genética de populações**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

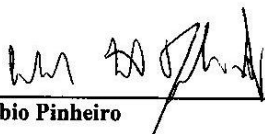
Belo Horizonte - Minas Gerais

Fevereiro - 2011

**Dissertação defendida e aprovada, em 25 de fevereiro de 2011, pela banca
examinadora constituída pelos professores:**



Dr. Eduardo Leite Borba - Orientador



Dr. Fábio Pinheiro



Dr. João Aguiar Nogueira Batista

Penso que só há um caminho para a ciência ou para a filosofia: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonar-se por ele; casar e viver feliz com ele até que a morte vos separe – a não ser que encontrem outro problema ainda mais fascinante, ou, evidentemente, a não ser que obtenham uma solução. Mas, mesmo que obtenham uma solução, poderão então descobrir, para vosso deleite, a existência de toda uma família de problemas-filhos, encantadores ainda que talvez difíceis, para cujo bem-estar poderão trabalhar, com um sentido, até ao fim dos vossos dias.

Karl Popper

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por todas as oportunidades providenciadas por Ele.

A meus pais, Agnaldo e Rozane, pelos exemplos de caráter, coragem e persistência. As minhas irmãs, Rafa e Ari, pelo amor incondicional e pela admiração. À minha irmã de coração Grazi, pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

A minha família, pelo incentivo e pela compreensão nos momentos de ausência. Em especial, à tia Aliete e à tia Rosângela que foram fundamentais para que eu chegasse onde estou hoje.

A todos os amigos, pelo incentivo, pela torcida e pelas comemorações a cada conquista.

A meu orientador Eduardo Borba, por toda a confiança depositada em mim, pelas discussões e pelos ensinamentos valiosos que contribuíram muito para o meu amadurecimento profissional e formação científica.

A minha co-orientadora Viviane Pereira, por todos os ensinamentos, não só científicos, pela confiança e pelo incentivo.

Ao professor Renato Mello-Silva, pelas viagens para coletar as *Vellozia hirsuta* e pela confiança em deixá-las em minhas mãos.

Ao professor João Batista, pela contribuição para a minha formação profissional.

Ao professor Eric Smidt, pelo auxílio em algumas análises.

A todos os professores do departamento de Botânica da UFMG, pela contribuição para meu aprendizado.

Aos colegas e amigos do laboratório de Biosistemática e Sistemática Molecular de Plantas.

Aos colegas dos demais laboratórios da Botânica e da Genética da UFMG, pelas discussões e troca de experiências.

À professora Denise Oliveira, coordenadora do PPGBOT, pelo auxílio quanto às questões burocráticas.

Às secretárias do PPGBOT, Sônia e Terezinha, pelo atendimento e auxílio.

Às agências CAPES, CNPq e FAPEMIG, pela bolsa e pelo financiamento do projeto no qual este trabalho está inserido.

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO 1 - Filogeografia do complexo <i>Vellozia hirsuta</i> (Velloziaceae), endêmico dos campos rupestres brasileiros: estruturação geográfica e ausência de correlação com a morfologia reveladas por marcadores plastidiais	15
CAPÍTULO 2 - Gradiente de variação genética revelado por marcadores ISSR ao longo da distribuição geográfica de populações do complexo <i>Vellozia hirsuta</i> (Velloziaceae)	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	89

RESUMO GERAL

Os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço são conhecidos por sua riqueza de espécies vegetais com elevado grau de endemismo, citado como resultado das disjunções na distribuição das populações, decorrente da descontinuidade das cadeias montanhosas. Esta disjunção tem sido citada como um dos principais fatores responsáveis pelo isolamento e diferenciação das populações. *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) corresponde a um complexo de espécies que ocorre na Cadeia do Espinhaço e apresenta grande variação na morfologia externa e anatomia foliar. Esta variação levou à sinonimização de quatro espécies sob o nome de *V. hirsuta* e ao reconhecimento de 14 padrões morfo-anatômicos. Neste estudo foi investigada a correlação dos padrões morfo-anatômicos com a distribuição da variabilidade genética e a distribuição geográfica das populações, investigando também a existência de possíveis barreiras responsáveis pela restrição do fluxo gênico recente ou histórico entre populações. Empregando sequenciamento da região intergênica *trnL-rpl32F* (cpDNA), a ocorrência de 25 sítios polimórficos revelou 20 haplótipos nas 23 populações amostradas. As populações de *V. hirsuta* aparecem estruturadas ($\Phi_{ST} = 0,818$) em quatro grupos filogeográficos que correspondem às principais regiões geográficas ocupadas pela espécie, demonstrando uma estruturação geográfica da diversidade genética e ausência de correlação com os padrões morfo-anatômicos descritos. O grupo formado pelas populações do norte de Minas Gerais e sul da Bahia se mostrou geneticamente mais diferenciado devido à presença de haplótipos exclusivos em suas populações. Este resultado associado ao isolamento geográfico e diferenciação morfológica deste grupo indica que o mesmo poderia ser reconhecido como um táxon distinto das demais populações de *V. hirsuta*. No estudo de genética de populações realizadas com marcadores ISSR, a heterozigosidade média das populações (0,216) apresentou valores inferiores a espécies de mesmas características biológicas. A AMOVA apontou alta variação dentro das populações (84-86%) e baixa divergência (11-14%) entre as populações. A análise Bayesiana indicou um número de populações geneticamente estruturadas sem delimitações precisas entre estes grupos e sim uma estruturação em um gradiente geográfico norte-sul. Entretanto, o grupo do norte parece ser mais diferenciado do que os demais, e a delimitação deste grupo como um táxon distinto é suportada como nas análises filogeográficas. Tanto as análises filogeográficas as de genética de populações não sustentaram o reconhecimento de nenhum dos táxons

sinonimizados sob *V. hirsuta*. Portanto, *V. hirsuta* aparentemente corresponde a uma única espécie com grande variação morfológica, indiferente do reconhecimento das populações do norte da distribuição como um táxon distinto, e seria melhor tratá-la como uma ocoespécie, sendo possivelmente, eventos de hibridação antigos, a origem dos atuais padrões de variação morfológica.

Palavras-chave: genética de populações, filogeografia, ISSR, *rpl32F-trnL*, *Vellozia hirsuta*, Velloziaceae.

ABSTRACT

The campos rupestres of the Espinhaço Range are known for their richness of plant species with a high degree of endemism, cited as a result of disjunctions in the distribution of populations due to the discontinuity of the mountain ranges. This disjunction has been cited as a major factor responsible for the isolation and differentiation of populations. *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) corresponds to a species complex that occurs in the Espinhaço Range and shows great variation in external morphology and leaf anatomy. This variation led to synonymization of four species under the name *V. hirsuta* and the recognition of 14 morpho-anatomical patterns. In this study we investigated the correlation of those morphological and anatomical patterns with the distribution of genetic variability and geographic distribution of populations, also investigating the possible existence of barriers responsible for the restriction of recent or historical gene flow among populations. Using sequencing of *trnL-rpl32F* intergenic region (cpDNA), the occurrence of 25 polymorphic sites revealed 20 haplotypes in the 23 populations sampled. The populations of *V. hirsuta* appears structured ($\Phi_{ST} = 0.818$) in four phylogeographic groups that correspond to major geographic regions occupied by the species, demonstrating a geographic structure of genetic diversity and lack of correlation with the morpho-anatomical patterns described. The group formed by the populations of northern Minas Gerais and southern Bahia states was genetically more divergent due to the presence of unique haplotypes within their populations. This result associated with geographic isolation and morphological differentiation suggests that this group could be recognized as a taxon distinct from other populations of *V. hirsuta*. In the study of population genetics performed with ISSR, the mean heterozygosity of the populations (0.216) showed lower values than species of similar biological characteristics. The AMOVA showed high variation within (84-86%) and low divergence (11-14%) among populations. The Bayesian analysis showed a number of populations genetically structured with no precise boundaries between these groups, but instead structured in a north-south geographical gradient. However, the northern group appears to be more differentiated than others and delimitation of this group as a distinct taxon is supported, as found in the phylogeographical analysis. Both phylogeographical and population genetics did not support the recognition of any taxa synonymized under *V. hirsuta*. Therefore, *V. hirsuta* apparently corresponds to a single species with great variation, regardless of the recognition of the populations of

northern distribution as a distinct taxon, and it would be better treated as an ochlospecies. Possibly ancient hybridization events were the origin of the current pattern of morphological variation.

Key word: ISSR, phylogeography, population genetics, *rpl32F-trnL*, *Vellozia hirsuta*, Velloziaceae.

INTRODUÇÃO GERAL

Os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço são conhecidos por sua riqueza de espécies (Joly, 1970), com muitos elementos endêmicos, especialmente ao nível específico. As populações desta região tiveram uma taxa de especiação altamente dependente do ambiente que ocupavam, resultando na formação de floras autóctones, muitas com tamanho extremamente reduzido (Giulietti & Pirani, 1988). Tem sido estimado que cerca de 30% dos táxons ocorrentes nos campos rupestres são restritos a este tipo vegetacional, com certos grupos taxonômicos mostrando altos níveis de riqueza e endemismos e microendemismos, especialmente Velloziaceae (Mello-Silva, 1996, 1999, 2008) e Eriocaulaceae (Sano, 1998; Costa *et al.*, 2006; Trovó & Sano, 2010). Grande parte das espécies que ocorrem nos campos rupestres está distribuída em populações disjuntas, devido à descontinuidade destas cadeias montanhosas. Nas espécies rupícolas, esta distribuição naturalmente fragmentada é ainda mais evidente devido à descontinuidade dos afloramentos rochosos. Esta disjunção tem sido citada como um dos principais fatores responsáveis pela diferenciação das populações, levando ao elevado endemismo encontrado em áreas de campos rupestres (Giulietti & Pirani, 1988).

Apesar do relativamente elevado número de trabalhos florísticos a respeito da flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (e.g., Leme & Funch, 1988; Giulietti *et al.*, 1997, 2000; Rapini *et al.*, 2001, 2002, 2008; Pirani *et al.*, 2003; Zappi *et al.*, 2003; Conceição *et al.*, 2005; Oliveira, 2006; Azevedo & van den Berg, 2007; Conceição *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2008; Pena, 2009; Santos, 2009) e trabalhos que visam determinar a variabilidade genética das populações de plantas destas formações (Borba *et al.*, 2001, 2007; Jesus *et al.*, 2001, 2009; Gomes *et al.*, 2004; Viccini *et al.*, 2004; Cavallari *et al.*, 2006; Franceschinelli *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2006a, 2006b; Azevedo *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Conceição *et al.*, 2009; Lousada, 2010; Oliveira, 2010, Lousada *et al.*, no prelo), poucos destes últimos procuram relacionar os padrões genéticos encontrados com eventos históricos e geográficos do passado a fim de elucidar o efeito destes eventos nos padrões de distribuição observados atualmente (Collevatti *et al.*, 2009; Feres *et al.*, 2009; Fiorini *et al.*, dados não publicados; Silva-Pereira *et al.*, dados não publicados).

Estudos sobre a diversidade e estruturação genética de algumas das espécies ocorrentes em campos rupestres podem contribuir para um melhor entendimento dos processos evolutivos de táxons ocorrentes neste tipo de ambiente. Além disso, a disjunção de cadeias montanhosas forma um sistema comparado a ilhas oceânicas, em termos de isolamento espacial e restrição de fluxo gênico, e por apresentarem condições ecológicas distintas, que funcionam como barreiras à migração, são ideais para estudos evolutivos em espécies de plantas que ocupam este habitat (Harley, 1995; Barbará *et al.*, 2008, 2009).

A família Velloziaceae apresenta a maior diversidade e elevados níveis de endemismo nas montanhas do leste do Brasil, especialmente nas áreas de campos rupestres da Cadeia do Espinhaço nos estados de Minas Gerais e Bahia (Menezes *et al.*, 1994). A família compreende cerca de 240 espécies, predominantemente de distribuição Neotropical, com 25 espécies ocorrendo na África, três em Madagascar e uma na península Arábica (sul do Yemen) (Ayensu, 1973; Smith & Ayensu, 1974). A biogeografia das Velloziaceae tem sido considerada de grande interesse devido a esta disjunção da sua distribuição.

A taxonomia da família é muito controversa, tanto nas subdivisões infrafamiliares quanto na circunscrição dos gêneros (Mello-Silva, 1991, 2000, 2005a; Menezes *et al.*, 1994; Behnke *et al.*, 2000; Salatino *et al.*, 2001; Stevens, 2001). Vários autores têm dividido a família tradicionalmente em duas subfamílias, Vellozioideae e Barbacenioideae, porém com diferenças na delimitação de ambas (Mello-Silva, 1991; Behnke *et al.*, 2000; Stevens, 2001). Estudos recentes mostram que a subfamília Vellozioideae é parafilética, e uma definição mais ampla, englobando as Barbacenioideae, tem sido proposta (Behnke *et al.*, 2000; Salatino *et al.*, 2001; Stevens, 2001; Mello-Silva, 2005a). Da mesma forma, a inclusão na família do gênero monotípico *Acanthochlamys*, endêmico da China, tem sido disputada, e esta posição não é aceita pela maioria dos autores (Behnke *et al.*, 2000; Salatino *et al.*, 2001; Mello-Silva, 2005a). Stevens (2001) considera a família composta por nove gêneros distribuídos em duas subfamílias, Acanthochlamydoideae e Vellozioideae (incluindo Barbacenioideae). Por outro lado, Mello-Silva (2005a) sugere a ocorrência de apenas três a seis gêneros, excluindo *Acanthochlamys* da família.

Vellozia, com cerca de 105 espécies, constitui o maior gênero da família, englobando quase 45% das espécies de Velloziaceae. Tentativas de subdivisão das espécies do gênero em seções têm sido feitas, porém estas não têm recebido suporte em análises filogenéticas

(Mello-Silva, 2000, 2005a). As espécies de *Vellozia*, conhecidas popularmente como canela-de-ema, são elementos típicos dos campos rupestres brasileiros (Giulietti & Pirani, 1988). Várias espécies, especialmente as arbustivas e arborescentes constituem importantes forófitos para diversas espécies, especialmente de Orchidaceae, sendo várias destas epífitas exclusivas de seus caules.

Vellozia hirsuta Goethart & Henrard está incluída na seção *Radia* L.B.Smith & Ayensu e é caracterizada por flores com hipanto longo, com características esfingófilas (polinizadas por mariposas Sphingidae) (Melo-Silva, 1990). Esta espécie, diferentemente da maioria das espécies de Velloziaceae, apresenta uma distribuição geográfica moderadamente ampla, ocorrendo em Minas Gerais ao longo da Cadeia do Espinhaço, do município de Santa Bárbara, até Mato Verde e São João do Paraíso, e no sul da Bahia até o município de Caitité (Mello-Silva, 1990, 2005b). Esta espécie apresenta grande variação quanto à morfologia externa e anatomia foliar. Mello-Silva (1990) inicialmente descreveu cinco variantes anatômicos (1-5) e três morfológicos (A-C), que combinados resultaram em seis padrões (A1, A2, A4, B3, B5 e C3) nos quais as populações até então conhecidas foram enquadradas. Posteriormente, análises de novas populações foram feitas na tentativa de descrever padrões mais concisos para a espécie. Entretanto, padrões morfo-anatômicos intermediários àqueles anteriormente reconhecidos e ainda novos padrões foram diagnosticados (Mello-Silva, 2005b, no prelo). Estes padrões morfológicos divergem entre si quanto a características das bainhas foliares, distribuição das folhas ao longo do caule, presença/ausência e densidade de tricomas nas superfícies foliares, existência de folhas marcescentes ou caducas, altura média das plantas, tamanho do pedicelo floral e tipo das emergências do hipanto. Quanto aos padrões anatômicos, a presença/ausência de células esclerificadas nas fissuras da face abaxial e a distribuição do feixe de células esclerificadas na epiderme adaxial são as características que diferenciam os padrões. Atualmente, são conhecidas cerca de 30 populações que retratam 14 padrões morfo-anatômicos distintos (Mello-Silva, 2005b, no prelo). Em algumas populações é possível encontrar indivíduos com características intermediárias àquelas descritas para os padrões gerais. Na figura 1 é possível observar como a combinação das diversas características morfológicas mantem a maior parte dos padrões morfolologicamente sobrepostos.

A variação morfológica das populações de *V. hirsuta* isoladas nas diferentes cadeias de montanhas é complexa, não seguindo um padrão geográfico claro e desafiando a

classificação taxonômica formal (Mello-Silva, 1990). Devido a isso, estas populações constituem o complexo de espécies atualmente reconhecido sob o nome de *Vellozia hirsuta*. Sob este nome, Mello-Silva (2005b, no prelo) sinonimizou quatro espécies: *V. leucanthos* Goethart & Henrard, *V. maguirei* L.B.Smith, *V. markgrafii* Schulze-Menz e *V. riedeliana* Goethart & Henrard. O holótipo de *V. hirsuta* apresenta o padrão morfo-anatômico 1 (plantas com caule longo, folhas marcescentes, com indumento hirsuto dourado com tricomas muito longos), *V. leucanthos* o padrão 3 (caule muito curto, folhas pequenas e marcescentes), *V. maguirei* e *V. riedeliana* o padrão 5 (plantas pequenas com até 20 cm de altura, com folhas pequenas, com tricomas curtos, flores curto-pediceladas), e *V. markgrafii* o padrão 6 (plantas altas com até 1,2 m altura, com bainhas lanosas e lâmina glabra a glabrecente na face adaxial e densamente tomentoso-prateada na face abaxial, pedicelo muito curto mas que se desenvolve na frutificação, hipanto longo com emergências glandulares) (veja Fig. 1.1). Mello-Silva (2005b, no prelo) ainda descreve que é possível separar parte destes 14 padrões em dois subgrupos: “*V. hirsuta*”, compreendendo os padrões de 1 a 5, e “*V. markgrafii*”, os padrões de 6 a 11. Os padrões restantes (12 a 14) não poderiam ser encaixados em nenhum dos dois grupos, pois apresentam características morfológicas intermediárias aos outros padrões.

O padrão de variação morfológica observado nas populações de *V. hirsuta* é característico de ocloespécies, conforme as definições discutidas por Cronk (1998). Em geral, o conceito de ocloespécie é aplicado a uma espécie que apresenta uma variação fortemente polimórfica, mas fracamente politípica, as características morfológicas variam independentemente, podendo a distribuição das mesmas apresentar correlação parcial com a geografia e a ecologia da espécie, além da complexidade da variação morfológica não ser devida à hibridação entre espécies comumente reconhecíveis, tampouco a um sistema de reprodução especializado (Cronk, 1998). Ainda, estas espécies frequentemente apresentam ampla distribuição geográfica e ecológica. Devido às confusões taxonômicas causadas pelo padrão de variação morfológico aparentemente caótico, ocloespécies possuem um grande número de sinônimos. Esta confusão é ainda maior se alguns variantes locais podem ser detectados. Tem se observado que neste caso dois posicionamentos para solucionar a questão taxonômica têm sido tomados: taxonomistas considerados como *splitters* segregam a espécie de acordo com os variantes observados, enquanto outros taxonomistas, considerados *lumpers*, preferem acomodar toda a variação sob um único nome. Por

apresentar estas características, uma ocolespécie não se enquadra facilmente em um tratamento taxonômico formal, sendo sugerido o estudo das relações históricas das populações que podem ser inferidas através de uma abordagem evolutiva (White, 1998).

Duas hipóteses são sugeridas para explicar o surgimento desse padrão de polimorfismos em ocolespécies. Prance (1982) sugere a "Teoria de refúgios do Pleistoceno" em que as condições mais secas na época da máxima glacial teriam ocasionado a descontinuidade das florestas úmidas. No caso de espécies rupícolas, com o recuo das florestas, a vegetação de áreas mais secas teria se expandido além das áreas elevadas dos campos rupestres ocupando grandes áreas com solo quartzítico em terrenos mais baixos, ambiente propício para o desenvolvimento destas espécies. As novas populações formadas teriam uma composição alélica diferenciada entre si. Com esta expansão, algumas populações passaram a compartilhar habitats nos quais eventos de hibridação pederiam ter ocorrido. Com o aumento de temperatura e umidade, já no final da glaciação, as florestas teriam voltado a se expandir restringindo a ocorrência dos campos rupestres às áreas de maior altitude. Como, possivelmente, as populações acumularam diferenças genéticas ao longo do processo de evolução da espécie, após este isolamento continuariam se diferenciando, seria observada que a variação genética das populações estaria geograficamente correlacionada.

Já a segunda hipótese (Cronk, 1998) sugere que uma rápida expansão de uma espécie colonizadora com ampla tolerância ecológica, desencadearia inúmeras forças nas populações que estariam passando por expansão, como rápida seleção e conservação das mutações na espécie. Desta forma a espécie apresentaria baixa perda de alelos e cada evento de expansão originaria uma variação genética não estruturada geograficamente (Jacob *et al.*, 2009). Estas duas hipóteses não são mutuamente excludentes, e ambos os processos podem ter ocorrido em uma mesma espécie.

A comparação da distribuição de haplótipos, revelada através de análises de regiões não-codificantes do DNA plastidial, associada à distribuição dos morfotipos pode ajudar a revelar os processos históricos que teriam levado ao padrão de variação observado em ocolespécies. Se o mosaico de morfotipos for devido a processos históricos antigos, como fragmentação alopátrica no passado, então as populações apresentarão haplótipos exclusivos e a rede de haplótipos será predita com maior probabilidade de estruturação geográfica dos haplótipos do que dos morfotipos, desde que a origem politípica dos

haplótipos seja pouco provável (Bandelt *et al.*, 1999). Se, por outro lado, os padrões forem devido à expansão populacional rápida, então será esperada uma rede de haplótipos com os mesmos espalhados pela distribuição da espécie e pouco relacionados (Cronk, 1998).

A filogeografia é uma importante ferramenta para estudos evolutivos, pois permite fazer inferências sobre os processos demográficos e históricos que moldaram a evolução das populações e das espécies (Avice, 2000). Estudos filogeográficos em plantas são baseados na variação genética encontrada tanto no DNA plastidial quanto no nuclear (Petit *et al.*, 2005; Petit & Excoffier, 2009). Na maioria das angiospermas o DNA plastidial apresenta herança materna. O fluxo de genes de herança materna é, geralmente, mais restrito do que o de genes nucleares de herança biparental, pois ocorre via dispersão de sementes, que normalmente é uma força coesiva menos eficiente do que o fluxo gênico via dispersão de pólen (Birk *et al.*, 1983). Marcadores moleculares derivados de DNA organelar têm se demonstrado úteis na descrição de padrões filogeográficos e para inferir as rotas de migração de espécies (Avice, 2000; Petit *et al.*, 2003, 2005). Relações históricas, fluxo gênico antigo e mudanças climáticas em escala geológica podem influenciar significativamente a estrutura genética de genoma organelar de herança materna (Avice *et al.*, 1998; Avice, 2000).

Para as regiões temperadas, os estudos filogeográficos realizados em espécies de plantas são bem numerosos, principalmente na Europa e na América do Norte (e.g., Petit *et al.*, 2002; Stehlik, 2002; Volz & Renner, 2009). Estes estudos têm contribuído para a compreensão das respostas das espécies quanto às mudanças ambientais que ocorreram no Pleistoceno. Por outro lado, a maioria das áreas tropicais são pouco estudadas, tanto a respeito das alterações climáticas do passado, quanto as consequências dessas mudanças nas espécies vegetais (Cavers *et al.*, 2003). Especificamente para o Brasil, estes estudos são relativamente recentes e estão focados em dois biomas: o cerrado (Collevatti *et al.*, 2003, 2009; Ramos *et al.*, 2007, 2009; Feres *et al.*, 2009; Antonelli *et al.*, 2010; Lage-Novaes *et al.*, 2010, Fiorini *et al.*, dados não publicados; Silva-Pereira *et al.*, dados não publicados) e a mata atlântica (Salgueiro *et al.*, 2004; Lorenz-Lemke *et al.*, 2005, 2006; Palma-Silva *et al.*, 2009). Estudos em diferentes biomas são importantes para auxiliar o entendimento da dinâmica populacional durante as glaciações, pois cada um destes habitats respondeu de forma distinta às alterações climáticas ocorridas neste período e consequentemente, também as espécies vegetais apresentaram comportamentos diferentes

para tais mudanças. As espécies de campos rupestres foram avaliadas em apenas cinco dos trabalhos existentes para o cerrado, sendo dois do nosso grupo de pesquisa. Dentre os trabalhos existentes para o Brasil, além das espécies estudadas por nosso grupo, apenas um trabalho foi realizado em monocotiledôneas (Palma-Silva *et al.*, 2009). Algumas espécies típicas de mata atlântica, mas que ocorrem em afloramentos rochosos também foram estudadas sobre uma abordagem filogeográfica e endossam o conhecimento sobre o comportamento das espécies vegetais diante das alterações climáticas do Pleistoceno nas regiões tropicais (Barbará *et al.*, 2007, 2008, 2009). Considerando que estas regiões são os principais centros de biodiversidade de plantas, investigações da filogeografia das espécies ocorrentes nestas áreas, se tornam fundamentais para o entendimento de como elas responderam a estas mudanças climáticas e prever como elas podem lidar com as mudanças em curso.

Além de eventos históricos ocorridos durante os processos de expansão e retração dos habitat ocupados pelas espécies, eventos recentes como sistemas de reprodução, fluxo gênico através do pólen, dispersão de sementes, crescimento clonal, hibridação/introgressão e história de vida do indivíduo também são responsáveis pela modelagem da distribuição da diversidade genética nas populações (Hamrick & Godt, 1990; Nybom & Bartish, 2000). A distribuição disjunta das espécies de campo rupestre resultando na diferenciação das populações tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo surgimento dos complexos padrões de distribuição da variabilidade genética observados nestas espécies. Estes padrões têm sido foco de estudos em diversas famílias de plantas, tais como Asteraceae (Jesus *et al.*, 2001, 2009, Gomes *et al.*, 2004), Bromeliaceae (Cavallari, *et al.*, 2006), Cactaceae (Machado, 2004; Lambert *et al.*, 2006a, 2006b), Eriocaulaceae (Pereira *et al.*, 2007), Leguminosae (Silva *et al.*, 2007; Conceição *et al.*, 2009; Souza & Lovato, 2010), Orchidaceae (Borba *et al.*, 2001, 2007; Azevedo *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Silva, 2008, Oliveira, 2010), Velloziaceae (Franceschinelli *et al.*, 2006; Lousada, 2010; Lousada *et al.*, no prelo; Fiorini *et al.*, dados não publicados) e Verbenaceae (Viccini, *et al.*, 2004; Manica-Cattani, *et al.*, 2009).

Marcadores moleculares que são modelados por eventos deste tipo têm sido muito utilizados na tentativa de explicar quais fatores atuam sobre as diferentes espécies de campos rupestres, conferindo a elas os padrões de diversidade observados. Os marcadores que podem ser utilizados para este fim dividem-se em dois grupos principais, segundo a

natureza de dados obtidos com sua aplicação (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Os marcadores codominantes, como microssatélites e alozimas, permitem a distinção de indivíduos heterozigotos, de forma que valores de fluxo gênico e número de migrantes podem ser de fato calculados. Por outro lado, os marcadores dominantes, ISSR, RAPD e AFLP, apenas permitem estimativas de fluxo gênico, pois não se tem o número de heterozigotos nas populações, mas sim uma estimativa obtida a partir da frequência do alelo recessivo.

Estudos de genética de populações com espécies de campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, por algum tempo, foram realizados utilizando marcadores alozimáticos, revelando diferentes graus de variabilidade em espécies de *Acianthera* (como *Pleurothallis*; Borba *et al.*, 2001), *Proteopsis* (Jesus *et al.*, 2001), *Melocactus* (Lambert *et al.*, 2006a, 2006b), *Vellozia* (Franceschinelli *et al.*, 2006), *Syngonanthus* (Pereira *et al.*, 2007), e *Chamaecrista* (Conceição *et al.*, 2009). Em alguns casos, a partição da variabilidade genética nas populações tem sido apontada como um recurso para auxiliar na delimitação taxonômica de complexos de espécies (Ribeiro *et al.*, 2008). Entretanto, marcadores dominantes com níveis de polimorfismo similares aos encontrados com alozimas e com a vantagem de empregar técnicas mais baratas e menos laboriosas têm sido incorporados aos estudos de genética de população (Gomes *et al.*, 2004; Cavallari *et al.*, 2006; Manica-Cattani *et al.*, 2009; Souza & Lovato 2010; Lousada *et al.*, no prelo).

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*; Zietkiewicz *et al.*, 1994) têm sido utilizados em estudos com espécies silvestres de plantas, pois não é necessário nenhum conhecimento prévio da genética da espécie a ser estudada. O polimorfismo detectado por esses marcadores é decorrente de substituições de nucleotídeos nos sítios de ligação dos iniciadores, deleções destes sítios ou rearranjos cromossômicos e inserções ou deleções entre os dois sítios de anelamento adjacentes, provocando a ausência de amplificação ou a amplificação de um fragmento de tamanho diferente, aparecendo com uma nova banda no gel (Wolfe *et al.*, 1998). A maior temperatura de anelamento do *primer* usada em reações ISSR em relação aos marcadores RAPD pode reduzir a quantidade de artefatos e aumentar a reprodutibilidade das bandas, o que confere uma maior confiabilidade nos dados gerados por este tipo de marcador (Wolfe *et al.*, 1998).

Apesar de ser uma técnica mais acessível, poucos trabalhos foram desenvolvidos utilizando os ISSR no Brasil (e.g., Manica-Cattani *et al.*, 2009; Lüdtkke *et al.*, 2010;

Oliveira *et al.*, 2010; Souza & Lovato, 2010), sendo especialmente pouco comuns para plantas de campos rupestres (Cruz, 2007; Silva, 2008; Lousada, 2010; Oliveira, 2010; Lousada *et al.*, no prelo). Estudos de variabilidade e estruturação genética são necessários para entender a dinâmica das populações, possibilitando a tomada de decisões quanto a delimitações taxonômicas de espécies. Da mesma forma, a elaboração de estratégias de conservação de espécies é dependente da identificação de diferenciação genética entre populações. Ryder (1986) propôs o conceito de *Evolutionary Significant Units – ESUs* (Unidades Evolutivamente Significativas) definida como grupos de indivíduos isolados por um período de tempo suficiente para apresentarem alta diferenciação genética entre si. Entretanto, este conceito tem sido reformulado para atender às propostas de conservação (Moritz, 1994, Crandal *et al.*, 2000; Fraser & Bernatchez, 2001; Diniz-Filho & Telles, 2002). O conceito de ESUs mais aceito atualmente é utilizado para definir unidade em que as populações apresentam baixo fluxo gênico com as demais e estão sob efeito de forças evolutivas tais como deriva genética e seleção (Crandal *et al.*, 2000). Esta definição aborda a existência de diferenciação adaptativa entre populações baseada em diferenciação genética e ecológica; e as possibilidades de ocorrência de fluxo gênico histórico ou recente (Crandal *et al.*, 2000; Frankham *et al.*, 2002). Moritz (1994) propôs um conceito menos específico que o de ESUs que se baseia na diferença das frequências alélicas entre populações e independe da relação filogenética entre estes alelos, as *Management Units – MUs* (Unidades de Manejo). Como cada espécie apresenta características peculiares como nível de fluxo gênico e distribuição das populações, as informações de diversidade genética devem ser cuidadosamente analisadas para a tomada de decisão quanto à definição de unidades de conservação.

Este trabalho teve por objetivo desenvolver estudos filogeográficos e de genética de populações em populações do complexo *Vellozia hirsuta*, amostradas ao longo da distribuição geográfica e abrangendo a amplitude morfológica, para o entendimento da dinâmica evolutiva destas populações, investigando a existência de correlação entre os padrões morfo-anatômicos descritos por Mello-Silva (2005b, no prelo) e os genéticos apresentados neste estudo, a fim de auxiliar na identificação de possíveis táxons distintos no complexo. Ainda, pretendeu-se verificar a relação entre a variabilidade genética das populações e a distribuição geográfica das mesmas, investigando a existência de barreiras responsáveis pela restrição do fluxo gênico recente ou histórico entre populações. Com

isso, foi testado se o complexo *Vellozia hirsuta* corresponde a uma única espécie com grande variação morfo-anatômica e ampla distribuição, ou é constituído por várias espécies microendêmicas, com distribuição restrita.

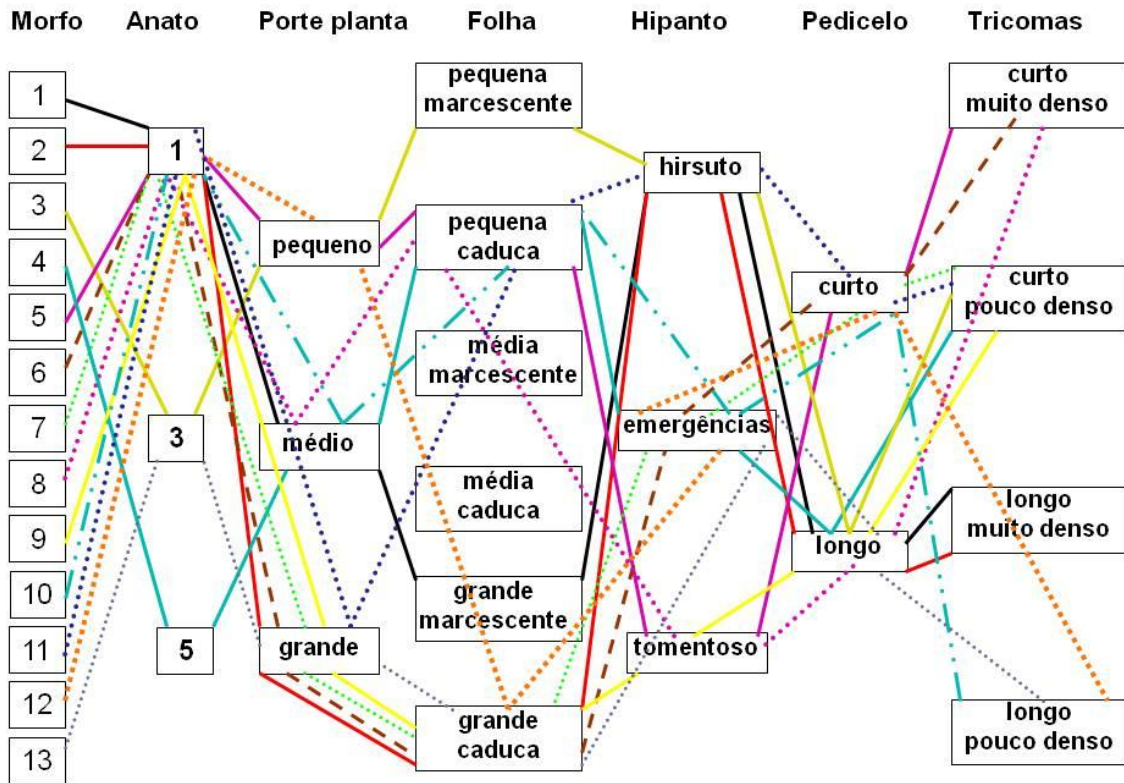


Figura 1: Combinação das características anatômicas e macromorfológicas para 13 padrões morfo-anatômicos de *Vellozia hirsuta* descritos por Mello-Silva (2005b, no prelo) e tratados neste estudo.

CAPÍTULO 1

Filogeografia do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae), endêmico dos campos rupestres brasileiros: estruturação geográfica e ausência de correlação com a morfologia reveladas por marcadores plastidiais

RESUMO

Vellozia hirsuta, espécie rupícola, apresenta grande variação quanto à morfologia externa e anatomia foliar, o que levou à sinonimização de outras quatro espécies sob o nome de *V. hirsuta* e a descrição de 14 padrões morfo-anatômicos. A fim de verificar a existência de relações entre os padrões genéticos e morfológicos para auxiliar na delimitação de possíveis táxons no complexo foram desenvolvidos estudos filogeográficos empregando sequenciamento da região intergênica *rpl32F-trnL*. Foram avaliados 26 sítios polimórficos que revelaram 20 haplótipos nas populações amostradas. As populações de *V. hirsuta* aparecem estruturadas ($\Phi_{ST} = 0,818$) em quatro grupos filogeográficos que correspondem às principais regiões geográficas ocupadas pela espécie, demonstrando uma estruturação geográfica da diversidade genética e ausência de correlação com os padrões morfo-anatômicos descritos. O grupo formado pelas populações do norte de Minas Gerais e sul da Bahia se mostrou geneticamente mais diferenciado devido à haplótipos exclusivos em suas populações. Este resultado associado ao isolamento geográfico e diferenciação morfológica do grupo indica que este possa ser reconhecido como um táxon distinto das demais populações de *V. hirsuta*. As análises não sustentaram o reconhecimento de nenhuma das espécies sinonimizadas sob *V. hirsuta*. Portanto, sugere-se o reconhecimento de *V. hirsuta* como uma única espécie, independente da possibilidade de se reconhecer as populações do norte da distribuição como um táxon infraespecífico distinto, sendo tratada sob o conceito de oloespécie devido à grande variação morfológica observada.

Palavras-chave: filogeografia, oloespécie, *rpl32F-trnL*, *Vellozia hirsuta*, Velloziaceae.

INTRODUÇÃO

Os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço são conhecidos por sua riqueza de espécies (Joly, 1970), com muitos elementos endêmicos, principalmente ao nível específico (Giulietti & Pirani, 1988). Cerca de 30% dos táxons ocorrentes nos campos rupestres são restritos a este tipo vegetacional, com certos grupos taxonômicos, especialmente Velloziaceae e Eriocaulaceae, mostrando altos níveis de riqueza e endemismos e microendemismos. Grande parte das espécies que ocorrem nos campos rupestres está distribuída em populações disjuntas devido à descontinuidade destas cadeias montanhosas. Nas espécies rupícolas, esta distribuição naturalmente fragmentada é ainda mais evidente devido à descontinuidade dos afloramentos rochosos. Esta disjunção tem sido citada como um dos principais fatores que atuam na diferenciação das populações, levando ao elevado endemismo encontrado em áreas de campos rupestres (Giulietti & Pirani, 1988). Apesar do relativamente elevado número de trabalhos florísticos a respeito da flora dos campos rupestres (Giulietti *et al.*, 2000; Dutra *et al.*, 2008; Pena, 2009; Santos, 2009) e trabalhos que visam determinar a variabilidade genética de populações de plantas desta região (Borba *et al.*, 2001, 2007; Jesus *et al.*, 2001, 2009; Franceschinelli *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2006a, 2006b; Azevedo *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Lousada, 2010; Oliveira, 2010), poucos destes últimos procuram relacionar os padrões genéticos encontrados com eventos históricos e geográficos do passado (Collevatti *et al.*, 2009; Antonelli *et al.*, 2010; Fiorini *et al.*, dados não publicados; Silva-Pereira *et al.*, dados não publicados) como mencionado por Hardy (2009).

A família Velloziaceae apresenta cerca de 240 espécies, predominantemente de distribuição Neotropical, com 25 espécies ocorrendo na África, três em Madagascar e uma na península Arábica - sul do Yemen (Ayensu, 1973; Smith & Ayensu, 1974). A biogeografia das Velloziaceae tem sido considerada de grande interesse devido a esta disjunção da sua distribuição. A família apresenta maior diversidade e elevados níveis de endemismos nas montanhas do leste do Brasil, especialmente na Cadeia do Espinhaço nos estados de Minas Gerais e Bahia (Menezes *et al.*, 1994). *Vellozia*, com cerca de 100 espécies, constitui o maior gênero da família, englobando quase 45% das espécies de Velloziaceae. Tentativas de subdivisão das espécies do gênero em seções têm sido feitas, porém estas não têm recebido suporte em análises filogenéticas (Mello-Silva, 2000,

2005a). As espécies de *Vellozia*, conhecidas popularmente como canela-de-ema, são elementos típicos dos campos rupestres brasileiros (Giulietti & Pirani, 1988).

Vellozia hirsuta Goethart & Henrard esta incluída na seção *Radia* L.B.Smith & Ayensu e é caracterizada por flores com hipanto longo (Mello-Silva, 1990). Esta espécie, diferentemente da maioria das espécies de Velloziaceae, apresenta uma distribuição geográfica moderadamente ampla, ocorrendo em Minas Gerais ao longo da Cadeia do Espinhaço, do município de Santa Bárbara, até Mato Verde e São João do Paraíso, e no sul da Bahia até o município de Caitité (Mello-Silva, 1990, 2005b, no prelo). Esta espécie apresenta grande variação quanto à morfologia externa e anatomia foliar (Fig. 1.1). Mello-Silva (1990) inicialmente descreveu cinco variantes anatômicos (1-5) e três morfológicos (A-C), que combinados resultaram em seis padrões (A1, A2, A4, B3, B5 e C3) nos quais as populações até então conhecidas foram enquadradas. Posteriormente, análises de novas populações foram feitas na tentativa de descrever padrões mais concisos para a espécie. Entretanto, padrões morfo-anatômicos intermediários àqueles anteriormente reconhecidos e ainda, novos padrões foram diagnosticados (Mello-Silva, 2005b, no prelo). Estes padrões morfológicos divergem entre si quanto a características das bainhas foliares, distribuição das folhas ao longo do caule, presença e densidade de tricomas nas superfícies foliares, presença de folhas marcescentes, altura média das plantas, tamanho do pedicelo floral e tipo das emergências do hipanto. Quanto aos padrões anatômicos, a ocorrência de células esclerificadas nas fissuras da face abaxial e a distribuição do feixe de células esclerificadas na epiderme adaxial são as características que diferenciam os padrões. Atualmente, são conhecidas cerca de 30 populações distribuídas nos 14 padrões morfo-anatômicos reconhecidos por Mello-Silva (2005b, no prelo).

A variação das populações de *V. hirsuta* isoladas nas diferentes cadeias de montanhas é complexa, não seguindo um padrão geográfico claro e desafiando a classificação taxonômica formal (Mello-Silva, 1990). Devido a isso, estas populações constituem o complexo de espécies atualmente reconhecido sob o nome de *Vellozia hirsuta*. Sob este nome, Mello-Silva (2005b, no prelo) sinonimizou quatro espécies: *V. leucanthos* Goethart & Henrard, *V. maguirei* L.B.Smith, *V. markgrafii* Schulze-Menz e *V. riedeliana* Goethart & Henrard. O holótipo de *V. hirsuta* apresenta o padrão morfo-anatômico 1, *V. leucanthos* o padrão 3, *V. maguirei* e *V. riedeliana* o padrão 5, e *V. markgrafii* o padrão 6. Mello-Silva (2005b, no prelo) ainda descreve que é possível separar

parte destes 14 padrões em dois subgrupos: “*V. hirsuta*”, compreendendo os padrões de 1 a 5, e “*V. markgrafii*”, os padrões de 6 a 11. Os padrões restantes (12 a 14) não poderiam ser encaixados em nenhum dos dois subgrupos, pois apresentam características morfológicas intermediárias aos outros padrões.

O padrão de variação morfológica observado nas populações de *V. hirsuta* é característico de ocloespécies, conforme as definições discutidas por Cronk (1998). Em geral, o conceito de ocloespécie é aplicado a uma espécie que apresenta uma variação fortemente polimórfica, mas fracamente politípica, as características morfológicas variam independentemente, podendo a distribuição das mesmas apresentar correlação parcial com a geografia e a ecologia da espécie, além da complexidade da variação morfológica não ser devida à hibridação entre espécies comumente reconhecíveis, tampouco a um sistema de reprodução especializado (Cronk, 1998). Ainda, estas espécies frequentemente apresentam ampla distribuição geográfica e ecológica e um grande número de sinônimos. Por apresentar características peculiares, uma ocloespécie não se enquadra facilmente em um tratamento taxonômico formal, sendo sugerido o estudo das relações históricas das populações que podem ser inferidas através de uma abordagem evolutiva (White, 1998).

A filogeografia é uma importante ferramenta para estudos evolutivos, pois permite fazer inferências sobre os processos demográficos e históricos que modularam a evolução das populações e das espécies (Avice, 2000). Estudos filogeográficos em plantas são baseados na variação genética encontrada no DNA plastidial, cuja herança é maternal na maioria das angiospermas. O fluxo gênico de genes de herança materna é, geralmente, mais restrito do que o de genes nucleares de herança biparental, pois ocorre via dispersão de sementes (Birk *et al.*, 1983). Marcadores moleculares derivados de DNA organelar têm se demonstrado úteis na descrição de padrões filogeográficos e para inferir as rotas de migração de espécies (Avice, 2000; Petit *et al.*, 2003, 2005; Ramos *et al.*, 2007; Collevatti *et al.*, 2009). Relações históricas, fluxo gênico antigo e mudanças climáticas em escala geológica podem influenciar significativamente a estrutura genética de genoma organelar de herança materna (Avice *et al.*, 1987; Avice, 2000).

A maioria dos estudos filogeográficos em plantas foi realizada com espécies europeias e asiáticas (Beheregaray, 2008; Diniz-Filho *et al.*, 2008; e.g. Inda *et al.*, 2007; Yamaji *et al.*, 2007; Volz & Renner, 2009; Wang *et al.*, 2010). Estes estudos têm ajudado a reconstruir a história da distribuição das espécies e a identificar os refúgios e rotas de

colonização pós-glaciais (Petit *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 2003). Já na região neotropical, dados filogeográficos são escassos (Cavers *et al.*, 2003). No Brasil, a maior parte dos estudos foi realizada com espécies arbóreas (Collevatti *et al.*, 2003, Salgueiro *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2007, 2009; Feres *et al.*, 2009; Lage-Novaes *et al.*, 2010), sendo escassos aqueles voltados para plantas herbáceas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005, 2006), especialmente com monocotiledôneas (Palma-Silva *et al.*, 2009). Para espécies de *Vellozia*, estudos filogeográficos têm sido desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa para *V. auriculata*, *V. compacta* e *V. gigantea* (Fiorini *et al.*, dados não publicados; Silva-Pereira *et al.*, dados não publicados). Estes poucos estudos têm conseguido demonstrar a importância de tais trabalhos, especialmente na aplicação para a conservação de espécies de distribuição restrita, como *V. gigantea*, e na compreensão da biogeografia destas formações vegetais.

A comparação da distribuição de haplótipos com a distribuição dos morfotipos pode ajudar a revelar os processos históricos que estão por trás do padrão de variação observado em *V. hirsuta*. Se o mosaico de morfotipos for devido a processos históricos antigos, então clados de haplótipos serão preditos com maior probabilidade de estruturação geográfica dos haplótipos do que dos morfotipos, desde que a origem politípica dos haplótipos seja menos provável. Se, por outro lado, os padrões forem devido à expansão populacional rápida, então será esperada uma árvore de haplótipos com os mesmos espalhados pela distribuição da espécie e pouco relacionados (Cronk, 1998).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo desenvolver um estudo filogeográfico para o entendimento da dinâmica evolutiva das populações de *Vellozia hirsuta*, investigando a existência de correlação entre os padrões morfo-anatômicos descritos por Mello-Silva (2005b, no prelo) e os genéticos apresentados neste estudo, a fim de auxiliar na identificação de possíveis táxons distintos no complexo, testando se o mesmo corresponde a uma única espécie com grande variação morfo-anatômica e ampla distribuição, ou é constituído por várias espécies microendêmicas, com distribuição restrita. Ainda, pretendeu-se verificar a relação entre a variabilidade genética das populações e a distribuição geográfica das mesmas, investigando a existência de barreiras responsáveis pela restrição do fluxo gênico histórico entre populações.

METODOLOGIA

Amostragem populacional

Foram coletadas folhas jovens de 13 a 18 indivíduos de 23 populações do complexo *Vellozia hirsuta*, abrangendo a quase totalidade da distribuição geográfica do complexo e 13 dos 14 padrões morfo-anatômicos descritos por Mello-Silva (2005b, no prelo) (Tab. 1.1, Fig. 1.2). Apesar dos esforços de coleta, não foi possível amostrar o 14º padrão, conhecido apenas por uma população localizada na Serra do Cabral (Joaquim Felício-MG), que não pôde ser encontrada. As populações de onde foram coletados os holótipos de *V. hirsuta* e *V. maguirei* foram amostradas (DIAM-2 e PKUB, respectivamente). Porém, para as outras três espécies (*V. leucanthos*, *V. markgrafii* e *V. riedeliana*) foram incluídos apenas os padrões morfológicos aos quais elas pertenciam: padrão 3 (GMOG-4), padrão 6 (JURA e GMOG-2) e padrão 5 (PKUB, mesmo padrão de *V. maguirei*) (Tab. 1.1). Adicionalmente, foram amostrados indivíduos de *V. geotegens* L.B.Smith & Ayensu e *V. albiflora* Pohl, espécies filogeneticamente próximas a *V. hirsuta*, utilizados como grupo externo nas análises realizadas. A figura 1.1 apresenta parte da variação morfológica dos padrões descritos para a *V. hirsuta*. Voucher de todas as populações amostradas foram depositados nos herbários SPF, da Universidade de São Paulo, e BHCB, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

O DNA total foi extraído de todo o material das três espécies, seguindo protocolo de Doyle & Doyle (1987), com modificações no tempo de precipitação do DNA com isopropanol. Os produtos de extração foram visualizados em gel de agarose 0,8% e tampão TAE 1x, corados em solução de brometo de etídio e fotografados. Para as amplificações foram testadas três regiões intergênicas, *rpl32F-trnL*, *trnT-psbD* e *trnQ-rpS16* em cerca de 80 indivíduos (três a quatro por população). As reações foram realizadas em volume de 25 µl, consistindo de 0,7 unidade de *Taq* polimerase, tampão 1x com MgCl₂ a 1,5 mM, dNTP a 0,2 mM, primers a 0,10 µM e DNA genômico, sob o programa de amplificação com pré-melting a 80 °C por 2 min, 30 ciclos com etapa de desnaturação a 95 °C por 1 min, etapa de anelamento a 53 °C por 1 min e etapa de extensão a 65 °C por 2 min, seguidos de uma extensão final a 65 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados com PEG 20% e

verificados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 1x, corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentados para quantificação. Após obtenção de massa suficiente (cerca de 1.000 ng de DNA), os produtos foram sequenciados em sequenciador automático Applied Biosystems 3100 por empresa especializada (Macrogen Inc.).

Análises filogeográficas

Todas as sequências obtidas foram tratadas no programa Staden Package (Staden, 1996) para obtenção da sequência consenso. Uma matriz de alinhamento foi construída com o consenso das sequências, utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999). No programa DNASP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) foram realizados testes de neutralidade (Fu & Li, 1993) da região e calculados índices de diversidade. Estes últimos também foram calculados com Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2009). O programa GenAIEx 6.3 (Peakall & Smouse, 2009) foi utilizado para contabilização dos haplótipos e para realizar uma análise de variância molecular (AMOVA) para calcular a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações. Foram realizadas cinco análises de variância molecular: 1) populações agrupadas de acordo com os três padrões anatômicos principais; 2) populações agrupadas de acordo com os 13 padrões morfológicos; 3) populações divididas nos subgrupos “*V. hirsuta*” e “*V. markgrafii*”, de acordo com Mello-Silva (2005b, no prelo) (excluindo os padrões 12 e 13); 4) populações divididas nos subgrupos “*V. hirsuta*”, “*V. markgrafii*” e um terceiro grupo incluindo os padrões 12 e 13; e 5) de acordo com quatro grupos geográficos (Tab. 1.1, Fig. 1.2). As relações filogenéticas entre haplótipos foram inferidas pelo algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) implementado no programa Network 4.5 (Fluxus Technology Ltd.). Utilizando DNASP 4.0, foi construído um histograma (*Mismatch distribution*) que representa a distribuição das diferenças genéticas entre os haplótipos encontrados. Uma *Nested Clade Analysis* (NCA) da rede de haplótipos foi produzida utilizando ANeCa 1.2 (Panchal, 2007).

Para acessar o número de agrupamentos genéticos, foi realizada uma análise espacial Bayesiana utilizando o pacote GENELAND versão 1.0.5 (Guillot *et al.*, 2005) implementada no programa R (<http://www.cran.r-project.org/>) que permite visualizar grupos geneticamente distintos e detecta descontinuidades genéticas ao longo da

distribuição da espécie. Foi utilizado um K (número inferido de agrupamentos genéticos) variando de 1 a 23, com 10 corridas independentes seguindo os parâmetros de 100.000 interações de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) e modelo espacial com frequências alélicas correlacionadas. Este modelo avalia os padrões espaciais que podem ser esperados quando ocorre diferenciação por restrição de fluxo gênico induzido por barreiras físicas como estradas, rios, descontinuidade geográfica, cadeias de montanhas ou atividade humana (Guillot *et al.*, 2008). A probabilidade posterior de cada membro do grupo foi calculada para 100.000 interações.

RESULTADOS

Variabilidade

Das três regiões inicialmente testadas, a única empregada neste trabalho foi a *rpl32F-trnL* pois demonstrou polimorfismo suficientemente alto para realização das análises. As outras duas regiões também apresentaram polimorfismo, porém em menor grau, além do baixo rendimento nos processos de amplificação e sequenciamento.

Fragmentos de 772 a 932 pb foram obtidos pelo sequenciamento da região intergênica *rpl32F-trnL* para *V. hirsuta*. Esta variação no tamanho dos fragmentos obtidos foi devido à qualidade do sequenciamento nas extremidades das fitas e não a inserções/deleções internas. Após a edição das sequências, foi considerado um fragmento de 693 pb para a realização das análises. O sequenciamento de 257 indivíduos (244 de *V. hirsuta*, seis de *V. geotegens* e sete de *V. albiflora*) forneceu 41 sítios polimórficos. Porém, 16 destes sítios não foram utilizados nas análises, pois se constituíam de sítios em regiões de repetição mononucleotídica (poli A e poli T) cuja relação de origem não pode ser determinada, e com possibilidade de gerar elevado número de homoplasias. Dos 25 sítios considerados, 20 foram substituições, quatro foram inserções-deleções (um em região de repetição mononucleotídica cuja interpretação foi possível, dois de um par de bases e outro de 7 pb) e um foi uma inversão de 14 pb (Tab. 1.2). O indel de 7 pb apareceu contido na região onde ocorre a inversão, mas as duas mutações não ocorreram simultaneamente em um mesmo indivíduo. Dois sítios apareceram como mutações exclusivas de *V. albiflora*, fornecendo um haplótipo diagnóstico para a espécie, enquanto *V. geotegens* não apresentou

sítio polimórfico exclusivo. A região intergênica estudada revelou 21 haplótipos para o conjunto das 25 populações das três espécies (Tab. 1.2).

Os testes D de Tajima e de Fu & Li realizados apontaram a neutralidade da região estudada (Tab. 1.3). A diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) para *V. hirsuta* foram de 0,802 e 0,004, respectivamente (Tab. 1.4). A população BOTU-3 apresentou a maior diversidade haplotípica (0,733) e GMOG-5 apresentou a maior diversidade nucleotídica (0,007) enquanto 12 populações não apresentaram variação (Tab. 1.4).

Relação entre os haplótipos

O haplótipo H17 foi o mais frequente, sendo encontrado em 30% dos indivíduos e compartilhado por 11 populações, e apontado na NCA como provável haplótipo ancestral. Em sua maioria ($n=15$), os haplótipos estão restritos cada um a uma única população. O haplótipo H10 está restrito à população de *V. albiflora*, enquanto que o haplótipo ocorrente em *V. geotegens* é o mesmo que ocorre na maioria das populações de *V. hirsuta* (H17) (Fig. 1.3; Tab. 1.2). O haplótipo H1 apareceu separado do haplótipo ancestral por três mutações e sem haplótipos intermediários amostrados, sendo um dos mais diferenciados, e ocorrendo exclusivamente na população disjunta de Joaquim Felício-MG. Os haplótipos H5 (GOUV) e H6 (GMOG-1) também apresentam grande diferenciação. Os haplótipos H5, H11, H12 e H13 formaram um ramo representando populações que ocorrem no Planalto de Diamantina (GOUV, DIAM-1 e PKUB). O ramo formado pelos haplótipos H19 e H20 corresponde ao grupo geográfico localizado mais ao norte da distribuição da espécie, formado pelas populações SJPA e CAET, CORD, MVER-1 e MVER-2. Não foi observada associação clara entre a distribuição dos padrões morfológicos e a relação entre os haplótipos (Fig. 1.3). Isto é evidenciado principalmente pela distribuição dos haplótipos ocorrentes nas populações correspondentes ao padrão morfológico 2 (mais frequente) na rede de haplótipos (Fig. 1.3).

A curva observada no histograma das diferenças genéticas entre os pares de indivíduos (*mismatch distribution*) indica a ocorrência de expansão populacional recente (Fig. 1.4). O mesmo pode ser sugerido pela estrutura do *network*, em que um haplótipo mais frequente está centralmente localizado de onde se derivam diversos haplótipos pouco ou menos frequentes (Fig. 1.3).

A *Nested Clade Analysis* (NCA) da rede de haplótipos indica a ocorrência de diversos eventos evolutivos levando ao padrão complexo observado na espécie (Tab. 1.5; Fig. 1.5). Os clados 1-1 (haplótipos H19 e H20), 1-4 (haplótipos H3 e H4) e 1-8 (haplótipos H14 e H18) podem ser explicados por fragmentação alopátrica. H19 e H20 são haplótipos restritos às populações que compõe o grupo geográfico do norte de Minas Gerais e sul da Bahia. Já os haplótipos H3 e H4 são exclusivos de populações da região de Grão Mogol e, apesar de estarem muito próximas a outras populações, são restritos a BOTU-2 e BOTU-3, respectivamente. Da mesma forma, os haplótipos H14, restrito à população BOTU-1, e H18, restrito à GMOG-4 e GMOG-5, estão ausentes em populações geograficamente próximas, indicando que a diferenciação entre estas populações não é devida a isolamento geográfico.

A diferenciação do clado 1-5, representado por H2, H9, H15, H16, H17 e H21, pode ser explicada por restrição de fluxo gênico e por isolamento por distância, uma vez que alguns deste haplótipos são restritos a apenas uma população cada um, apesar da pequena distância geográfica entre elas (fluxo gênico restrito) e, ao mesmo tempo, o haplótipo H21 está restrito à população JFEL da Serra do Cabral, geograficamente mais afastada das demais (isolamento por distância) (Fig. 1.5). Os clados 1-3 e 1-6 não apresentam associação geográfica, uma vez que os haplótipos que compõem cada um deles não são exclusivos de populações geograficamente próximas. No segundo nível, o clado 2-1 reúne os grupos 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 e 1-8, sendo explicado por eventos de fluxo gênico ou dispersão restritos, com alguma dispersão a longa distância em áreas intermediárias não ocupadas pela espécie. O clado 2-2, por sua vez, reúne os clados 1-6 e 1-7 e é explicado por fluxo gênico restrito com isolamento por distância, devido, principalmente, a diferenciação do haplótipo H5, exclusivo à população GOUV.

Estruturação genética das populações

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou uma elevada estruturação genética entre as populações, com valor médio entre os tratamentos de $\Phi_{ST} = 0,771$ (0,691-0,818) (Tab. 1.6). A diferenciação genética entre os grupos, nas análises onde foram considerados os padrões anatômicos, os 13 padrões morfológicos e apenas os subgrupos morfológicos “*V. hirsuta*” e “*V. markgrafii*”, foi sempre abaixo de 20%. Na análise considerando o agrupamento de “*V. hirsuta*”, “*V. markgrafii*” e os padrões 12 e 13 a

diferenciação intergrupos se elevou a 33%. Entretanto, para o grupo formado de acordo com a distribuição geográfica, considerando as descontinuidades da cadeia montanhosa, esta diferenciação foi de 54%. (Tab. 1.6).

Na análise Bayesiana, as corridas de MCMC identificaram $K=9$ para o número de agrupamentos genéticos (Fig. 1.6 e Tab. 1.7). Todos os indivíduos pertencentes a uma mesma população apareceram em um mesmo grupo, demonstrando a homogeneidade destas populações no nível genético (Fig. 1.6 e 1.7). O grupo #1 foi formado pelas populações ITAC-1 e ITAC-2 que apresentam padrões morfológicos (7 e 8) similares entre si (Fig. 1.7 – Grupo 1). BOTU-2 e BOTU-3 formaram o grupo #2, porém apresentam valores de probabilidade posterior muito similares para pertencer ao grupo #4 que contém as outras duas populações da mesma região (Fig. 1.7 – Grupos 2 e 4). O grupo #3 engloba as quatro populações do Planalto de Diamantina e algumas populações da região central (JURA, ITAC-3 e GMOG-2) (Fig. 1.7 – Grupo 3). O grupo #5 reúne as populações do norte de Minas e sul da Bahia (Fig. 1.7 – Grupo 5), exceto SJPA, que apresentou alta probabilidade posterior (0,22) de pertencer sozinha ao grupo #7. O grupo #6 foi formado pelas populações GMOG, excetuando a GMOG-2 (Fig. 1.7 – Grupo 6). A população JFEL, localizada na Serra do Cabral, também forma um grupo exclusivo evidenciando que esta constitui uma população genética diferente (Fig. 1.7 – Grupo 8). Não foram designadas quaisquer das populações amostradas para o grupo 9, mas as populações CORD, MVER-1 e MVER-2 apresentam a maior probabilidade posterior (0,16) de pertencer a ele, porém sendo incluídas em outro grupo com probabilidade maior (0,20).

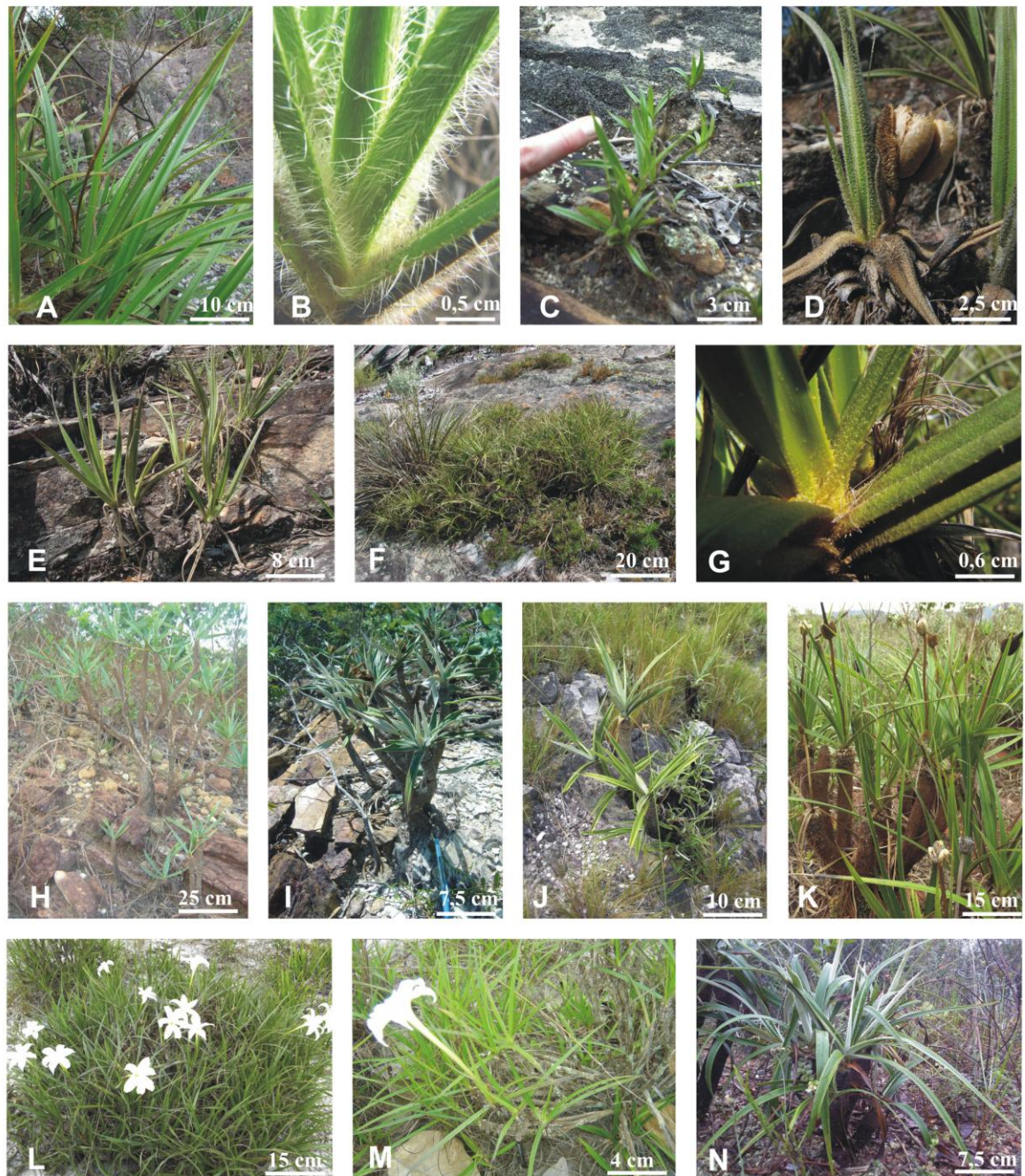


Figura 1.1: Variação morfológica em populações de *Vellozia hirsuta*. A-B: DIAM-2, padrão 4 (população onde foi coletado o holótipo de *V. hirsuta*); C: GMOG-4, padrão 3; D-E: PKUB, padrão 5; F-G: DIAM-1, padrão 2; H: GMOG-2, padrão 6; I: ITAC-1, padrão 7; J: BOTU-1, padrão 11; K: GMOG-1, padrão 2; L-M: GMOG-5, padrão 4; N: BOTU-4, padrão 9. Veja Tabela 1.1 para nomes das populações.

Tabela 1.1: Populações de *Vellozia hirsuta*, *V. geotegens* e *V. albiflora* utilizadas nas análises filogeográficas. Vouchers depositados nos herbários SPF e BHCB.

Espécie/População	Nome	Nº indiv. utilizados	Padrão morfo-anatômico	Padrão anatômico	Coordenadas	Voucher
<i>Vellozia hirsuta</i>						
Diamantina/MG	DIAM-2*	11	1	1	18°11'27,4"S; 43°37'36,1"W	Mello-Silva 407
Gouveia/MG	GOUV	12	2	1	18°34'47,1"S; 43°52'33,4"W	Mello-Silva et al. 3176
Botumirim/MG	BOTU-3	10	2	1	16°54'07,7"S; 42°59'28,7"W	Mello-Silva et al. 3196
Grão-Mogol/MG	GMOG-1	10	2	1	16°35'48,0"S; 42°54'23,7"W	Mello-Silva et al. 3202
Joaquim Felício/MG	JFEL	10	2	1	17°41'34,0"S; 44°11'41,5"W	Mello-Silva et al. 3222
Diamantina/MG	DIAM-1	12	2	1	18°17'48,7"S; 43°44'26,5"W	Mello-Silva & Forzza 2698
Grão-Mogol/MG	GMOG-4 ¹	13	3	5	16°35'31,8"S; 42°57'50,1"W	Mello-Silva 465
Grão-Mogol/MG	GMOG-3	12	4	3	16°35'23,0"S; 42°55'09,2"W	Mello-Silva et al. 3204
Grão-Mogol/MG	GMOG-5	10	4	3	16°35'29,6"S; 42°54'09,4"W	Mello-Silva 475
Pres. Kubitschek/MG	PKUB ^{\$-3}	10	5	1	18°34'21,7"S; 43°35'30,8"W	Mello-Silva et al. 3177
Grão-Mogol/MG	GMOG-2 ²	7	6	1	16°34'49,6"S; 42°53'48,5"W	Mello-Silva et al. 3203
Juramento/MG	JURA ²	13	6	1	16°57'49,3"S; 43°32'14,8"W	Mello-Silva et al. 3180
Itacambira/MG	ITAC-1	12	7	1	16°58'19,7"S; 43°20'50,9"W	Mello-Silva et al. 3185
Itacambira/MG	ITAC-3	11	7	1	17°02'04,6"S; 43°20'40,5"W	Mello-Silva et al. 3190
Itacambira/MG	ITAC-2	12	8	1	17°00'28,0"S; 43°20'12,7"W	Mello-Silva et al. 3189
Botumirim/MG	BOTU-4	9	9	1	16°45'54,1"S; 43°03'34,7"W	Mello-Silva et al. 3197
Mato Verde/MG	MVER-2	9	10	1	15°23'13,3"S; 42°46'31,4"W	Mello-Silva et al. 3221
Botumirim/MG	BOTU-2	9	11	1	16°53'58,4"S; 42°59'29,6"W	Mello-Silva et al. 3193
Botumirim/MG	BOTU-1	9	11	1	16°53'05,2"S; 43°00'54,7"W	Mello-Silva et al. 3191
Caetité/BA	CAET	11	12	1	14°16'45,0"S; 42°31'53,0"W	Mello-Silva et al. 3218
Mato Verde/MG	MVER-1	11	12	1	15°23'13,3"S; 42°46'31,4"W	Mello-Silva et al. 3220
S. João do Paraíso/MG	SJPA	12	13	3	15°26'42,2"S; 42°03'44,1"W	Mello-Silva et al. 3205
Cordeiros/BA	CORD	9	13	3	15°08'06,1"S; 41°58'08,2"W	Mello-Silva et al. 3206
<i>Vellozia geotegens</i>						
Datas/MG	Vg	6	-	-	18°27'45,0"S; 43°39'14,8"W	Mello-Silva et al. 3178
<i>Vellozia albiflora</i>						
Diamantina/MG	Va	7	-	-	18°17'42,5"S; 43°41'11,6"W	Mello-Silva et al. 3179

*- Pop. em que foi coletado o holótipo de *V. hirsuta*, \$- Pop. em que foi coletado o holótipo de *V. maguirei*. As populações das quais foram coletados os holótipos de *V. leucanthos*, *V. markgrafii* e *V. riedeliana* não foram amostradas. **1-** Padrão morfológico ao qual pertence *V. leucanthos*; **2-** Padrão morfológico ao qual pertence *V. markgrafii*; **3-** Padrão morfológico ao qual pertence *V. riedeliana*.

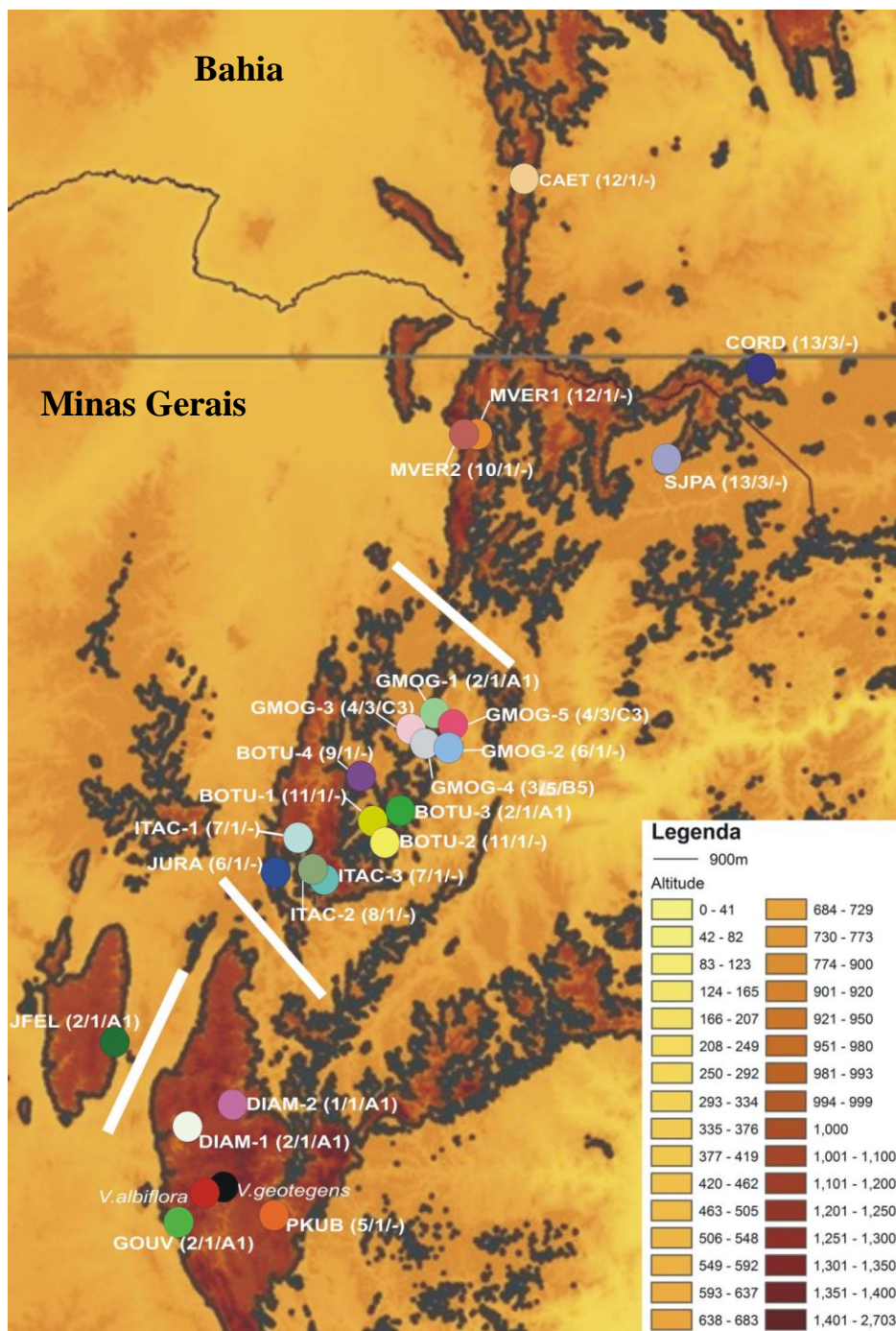


Figura 1.2: Distribuição geográfica das populações de *Vellozia hirsuta*, *V. geotegens* e *V. albiflora* estudadas, indicando os quatro grupos geográficos utilizados na AMOVA (região de Grão-Mogol, Planalto de Diamantina, Joaquim Felício, e norte de Minas Gerais com sul da Bahia). Entre parênteses são apresentados os padrões morfológico e anatômico de acordo com Mello-Silva (2005b) e padrão morfo-anatômico anteriormente descrito em Mello-Silva (1990). Populações que não apresentam este último parâmetro não foram estudadas por Mello-Silva (1990). Veja Tabela 1.1 para nomes das populações.

Tabela 1.2: Haplótipos encontrados e sua frequência em populações de *Vellozia hirsuta*, *V. geotegens* e *V. albiflora*. Os números indicam a localização dos sítios variáveis na região intergênica *rpl32F-trnL* de DNA plastidial e os pontos indicam que os estados de caracter são os mesmos que os do haplótipo H1. Veja Tabela 1.1 para nomes das populações.

Hap.	36	49	63	74	78	86	98	127-129	189	228-229*	280	288-294	295	297	281-299	389	412	437	472	542	549	617	642	645	667	Freq.	Populações
1	A	C	C	A	T	G	G	GAG	G	-	C	-	A	T	-	G	-	C	-	C	G	G	C	C	G	9	JFEL
2	.	T	A	A	A	2	ITAC-1
3	.	T	.	.	A	C	A	A	5	BOTU-2
4	.	T	.	.	A	A	A	4	BOTU-3
5	.	T	.	.	.	A	.	.	.	T	A	A	A	T	.	.	11	GOUV
6	.	T	CTC	.	.	A	.	.	A	‡	.	A	A	3	GMOG-1
7	.	T	CTC	A	A	41	BOTU-3, BOTU-4, GMOG-1, GMOG-2, GMOG-3, GMOG-4, GMOG-5
8	.	T	CTC	T	A	.	.	A	A	1	BOTU-3
9	.	T	A	A	A	4	BOTU-2
10	.	T	TT	A	A	A	T	.	7	<i>V. albiflora</i>
11	.	T	T	A	A	A	.	.	A	4	DIAM-1
12	.	T	T	A	A	A	2	GOUV, DIAM-1
13	.	T	T	A	A	2	PKUB
14	.	T	†	A	A	9	BOTU-1
15	.	T	A	A	T	7	ITAC-1, ITAC-2
16	.	T	A	A	.	.	.	A	.	.	.	4	ITAC-1
17	.	T	A	A	78	PKUB, DIAM-1, DIAM-2, JURA, ITAC-1, ITAC-2, ITAC-3, BOTU-3, BOTU-4, GMOG-2, <i>V. geotegens</i>
18	.	T	T	†	A	A	11	GMOG-4, GMOG-5
19	.	T	.	C	A	A	.	A	T	12	SJPA
20	.	T	.	C	A	A	T	40	CORD, CAET, MVER-1, MVER-2
21	G	T	A	A	1	JFEL

228-229*: Indel em região poli T, onde '-' indica a condição T₈, enquanto T e TT a presença de uma e duas bases adicionais, respectivamente; †: indel de 7 pb; ‡: inversão de 14 pb. O indel 288-294 está contido na região da inversão 281-299, mas não ocorrem simultaneamente em um mesmo indivíduo.

Tabela 1.3: Parâmetros de polimorfismo e testes de neutralidade na região intergênica *rpl32F-trnL* de DNA plastidial para 23 populações de *V. hirsuta*, uma população de *V. geotegens* e uma população de *V. albiflora*.

Parâmetros	
Nº de indivíduos	257
Nº de haplótipos	21
Diversidade haplotípica (h)	0,804
Diversidade nucleotídica (π)	0,00389
Teste D de Tajima	-1,4514 (p= 0,03800)
Teste de Fu & Li	0,9467 (p= 0,88200)

Tabela 1.4: Diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) para 23 populações de *V. hirsuta* obtidos pelo sequenciamento da região intergênica *rpl32F-trnL* de DNA plastidial. Veja Tabela 1.1 para nomes das populações.

População	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica (π)
GOUV	0,167 (0,134)	0,00049 (0,00058)
PKUB	0,356 (0,159)	0,00052 (0,00062)
DIAM-1	0,591 (0,108)	0,0023 (0,0016)
DIAM-2	0	0
JURA	0	0
ITAC-1	0,788 (0,070)	0,0016 (0,0013)
ITAC-2	0,530 (0,076)	0,0008 (0,0008)
ITAC-3	0	0
BOTU-1	0	0
BOTU-2	0,556 (0,090)	0,0024 (0,0018)
BOTU-3	0,733 (0,105)	0,0039 (0,0025)
BOTU-4	0,556 (0,090)	0,0024 (0,0018)
GMOG-1	0,467 (0,132)	0,0061 (0,0038)
GMOG-2	0,286 (0,196)	0,0013 (0,0014)
GMOG-3	0,485 (0,106)	0,0077 (0,0045)
GMOG-4	0,385 (0,132)	0,0061 (0,0036)
GMOG-5	0	0
JSPA	0	0
CORD	0	0
CAET	0	0
MVER-1	0	0
MVER-2	0	0
JFEL	0,200 (0,154)	0,0012 (0,0010)
espécie	0,802	0,0039

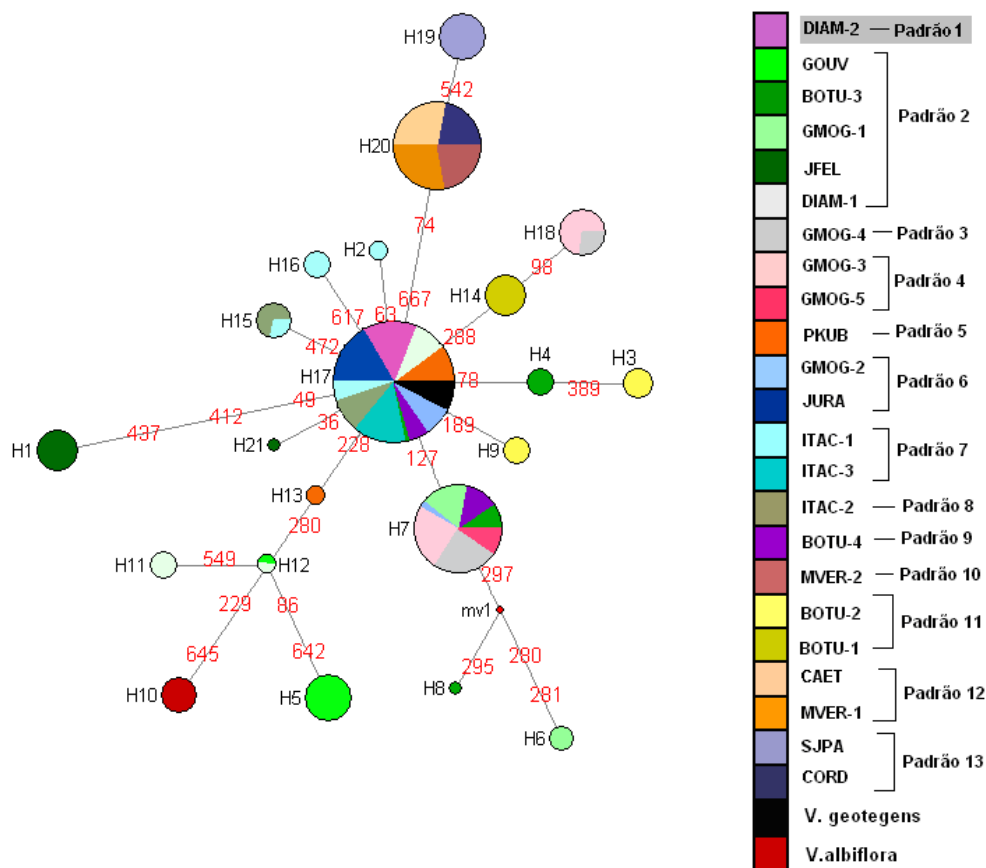


Figura 1.3: *Median-joining network* de 21 haplótipos de 23 populações de *V. hirsuta*, uma população de *V. geotegens* e uma população de *V. albiflora* encontrados na região intergênica *rpl32F-trnL* de DNA plastidial. Os diâmetros dos círculos são proporcionais à frequência destes haplótipos. Os números sobre os ramos indicam o sítio onde ocorreu a mutação que diferencia s haplótipos (veja Tabela 1.2). *mv1* indica um haplótipo não amostrado ou extinto. Veja Tabela 1.1 para nomes das populações.

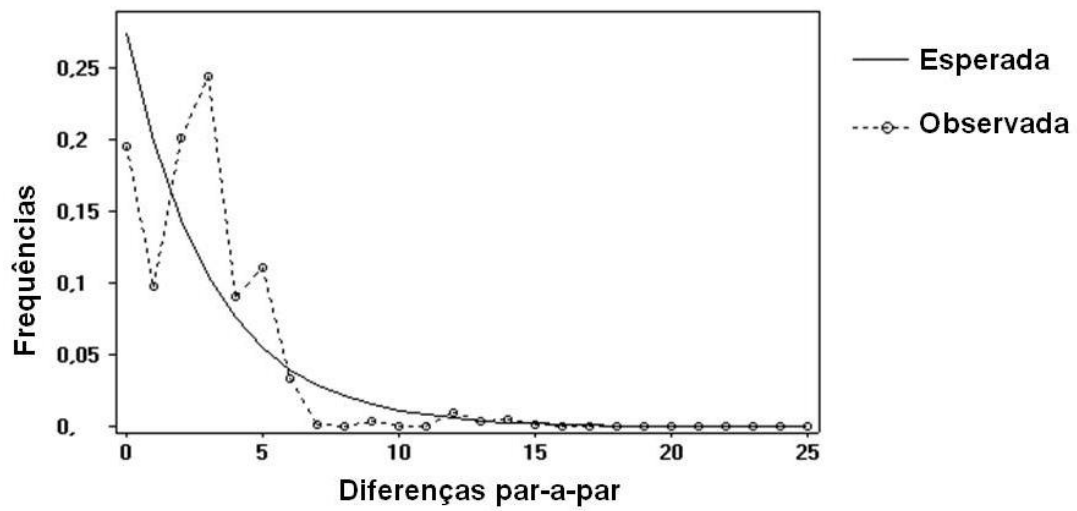


Figura 1.4: Histograma indicando as diferenças par-a-par observadas e esperadas entre as sequências de *Vellozia hirsuta* encontradas na região intergênica *rpl32F-trnL* de DNA plastidial.

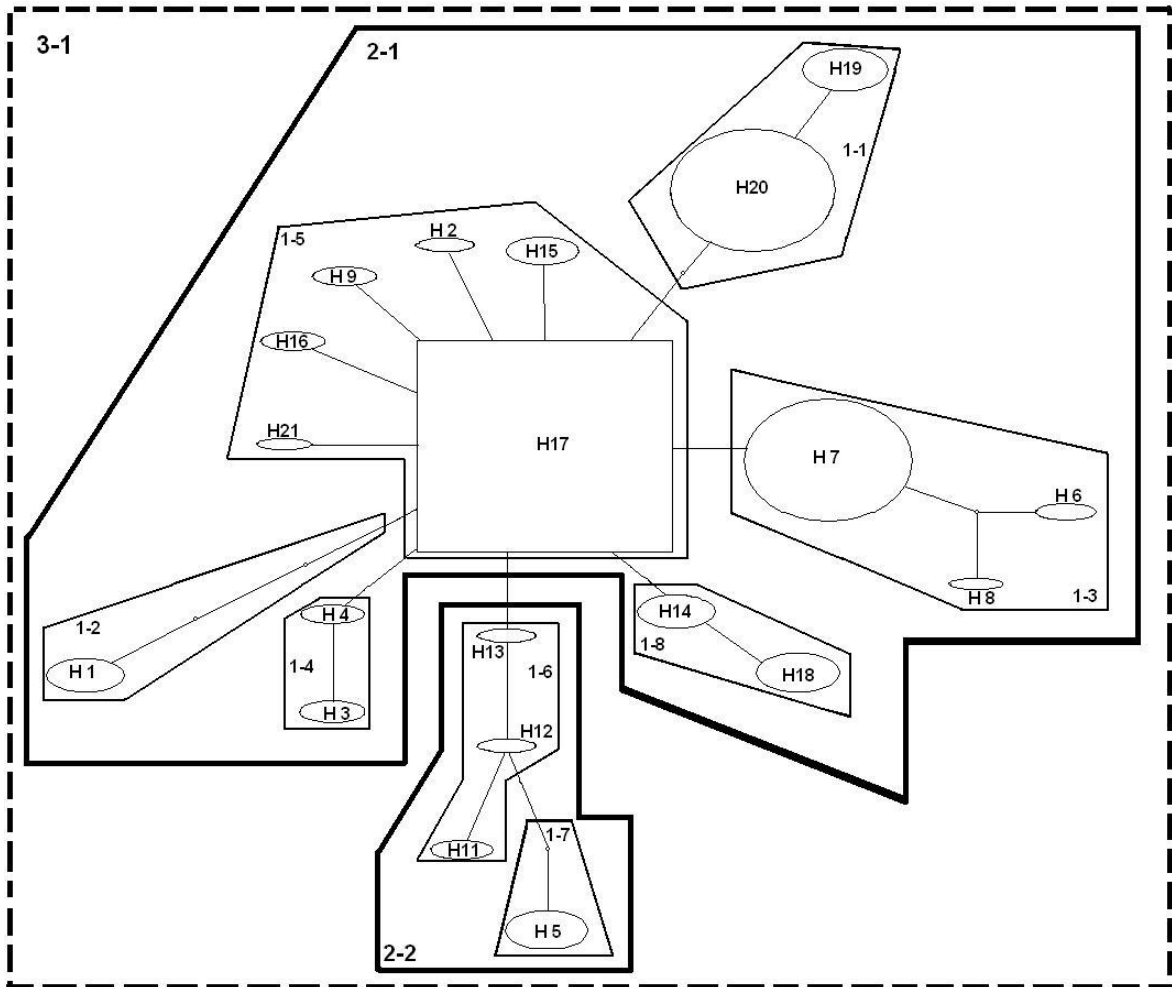


Figura 1.5: *Nested Clade Analysis* da rede de haplótipos de *Vellozia hirsuta*, indicando os clados apontados na análise. O haplótipo representado por um quadrado (H17) é indicado com maior probabilidade de ser o haplótipo ancestral. Pontos representam haplótipos não amostrados ou extintos.

Tabela 1.5: Chave de inferências para *V. hirsuta* na *nested clade analysis*. Veja Figura 1.5 para delimitação dos clados.

Clado	Passos da chave	Padrão inferido
1-1	1-19 NO	Fragmentação alopátrica
1-3	Hipótese nula não rejeitada	Não associação geográfica
1-4	1-19 NO	Fragmentação alopátrica
1-5	1-2-3-4 NO	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
1-6	Hipótese nula não rejeitada	Não associação geográfica
1-8	1-19 NO	Fragmentação alopátrica
2-1	1-2-3-5-6-7-8 YES	Fluxo gênico/dispersão restrito, mas com alguma dispersão a longa distância em áreas intermediárias não ocupadas pela espécie; ou fluxo gênico antigo seguido de extinção de populações intermediárias
2-2	1-2-3-4 NO	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
Cladograma total	1-19 NO	Fragmentação alopátrica

Tabela 1.6: Análise de variância molecular de 20 haplótipos de *Vellozia hirsuta* encontrados na região intergênica *rpl32F-trnL* de DNA plastidial, com as populações agrupadas de acordo com padrão anatômico, padrão morfológico (13 padrões separadamente ou distribuídos em grupos conforme descrito) e padrão geográfico, e valor de estruturação genética (Fst). *p< 0,001

Fonte de variação	Porcentagem de variação (%)				
	Padrão anatômico 3 padrões	Padrão morfológico (todos os padrões)	" <i>V. hirsuta</i> " X " <i>V. markgrafii</i> " padrões (1-5) X (6-11)	" <i>V. hirsuta</i> " X " <i>V. markgrafii</i> " padrões (1-5) X (6-11) X (12 e 13)	Padrão geográfico 4 grupos
Entre grupos	0	11	3	33	54
Entre populações dentro dos grupos	77	66	66	47	28
Dentro das populações	23	22	31	20	18
Fst (pop/total)	0,773*	0,775*	0,691*	0,799*	0,818*

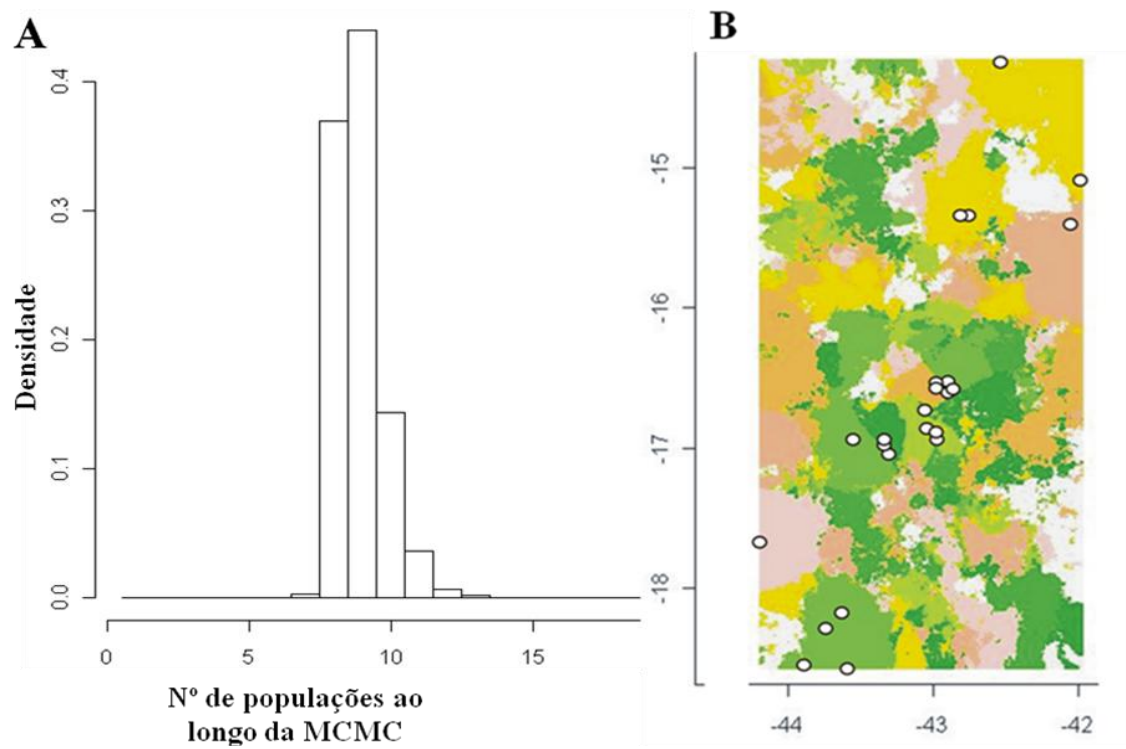


Figura 1.6: A- Distribuição da probabilidade posterior de um número K de agrupamentos genéticos de *Vellozia hirsuta*. B- Mapa das populações de *Vellozia hirsuta* em cada domínio genético inferido por análise Bayesiana com o pacote GENELAND (Guillot *et al.*, 2005) do programa R. Veja Figura 1.2 e Tabela 1.1 para nomes das populações.

Tabela 1.7: Grupos genéticos com suas respectivas populações de *Vellozia hirsuta* inferidos a partir de análise Bayesiana da estrutura das populações descrito em Guillot *et al.* (2005). Veja Tabela 1.1 para nomes das populações.

Grupo	Populações
1	ITAC-1; ITAC-2
2	BOTU-2; BOTU-3
3	GOUV; PKUB; DIAM-1; DIAM-2; JURA; ITAC-3; GMOG-2
4	BOTU-1; BOTU-4
5	CORD; CAET; MVER-1; MVER-2
6	GMOG-1; GMOG-3; GMOG-4; GMOG-5
7	SJPA
8	JFEL
9*	<i>CORD; MVER-1; MVER-2</i>

*Nenhuma população foi designada para este grupo, mas *CORD; MVER-1; MVER-2* apresentaram os maiores valores de probabilidade posterior de pertencerem a este grupo (0,16, contra 0,20 de pertencerem ao 5).

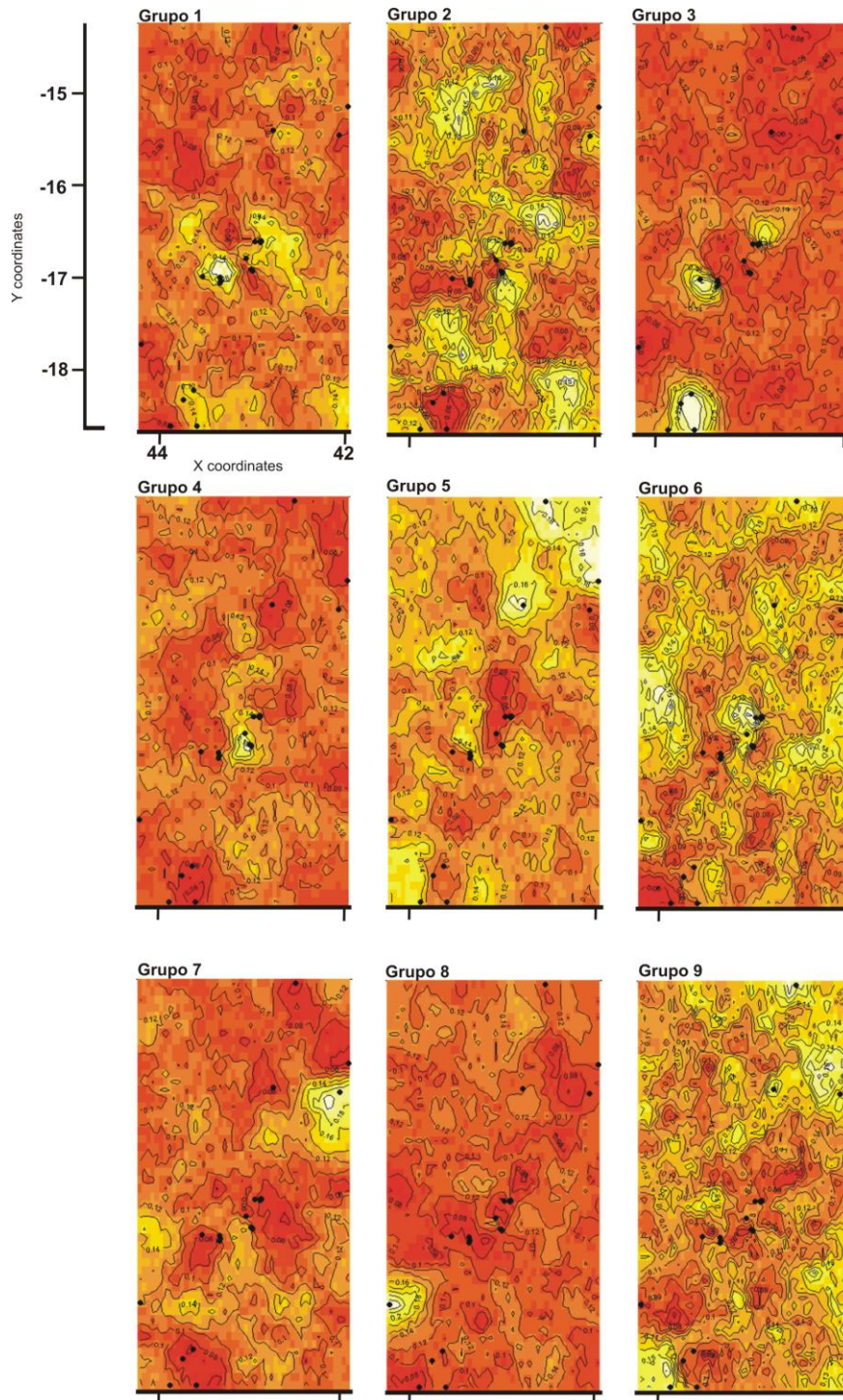


Figura 1.7: Mapa da probabilidade posterior das populações de *Vellozia hirsuta* que compõem cada domínio espacial para os nove grupos genéticos inferidos a partir de análise Bayesiana da estrutura das populações descrito em Guillot *et al.* (2005). A probabilidade posterior é maior nas áreas mais claras do mapa. Os eixos X e Y designam as coordenadas geográficas em graus. Veja Figura 1.2 e Tabela 1.1 para nomes das populações.

DISCUSSÃO

Variabilidade e estruturação genética

Várias das regiões intergênicas sugeridas por Shaw *et al.* (2007) têm sido avaliadas para estudos de filogenia e filogeografia em espécies de Velloziaceae (Smidt *et al.*, dados não publicados; Silva-Pereira *et al.*, dados não publicados). Nestes estudos, muitas das regiões, dentre elas as três testadas neste trabalho, têm apresentado alto polimorfismo, indicando ser esta uma característica do DNA plastidial de espécies desta família.

A diversidade genética de *Vellozia hirsuta*, revelada pelo sequenciamento de uma única região intergênica, pode ser considerada muito elevada em comparação com outras espécies brasileiras que apresentam distribuição geográfica mais ampla (e.g., Ramos *et al.*, 2007; Collevatti *et al.*, 2009). Shaw *et al.* (2007) compararam diversas regiões intergênicas plastidiais quanto à taxa mutacional e polimorfismo e descreveram a *rpl32F-trnL*, como uma das regiões de mais rápida evolução por apresentar alta taxa mutacional, o que foi confirmada pelo alto polimorfismo encontrado em *V. hirsuta*. Os valores de diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) encontrados para a espécie são elevados quando comparados a estas diversidades, exploradas a partir de outras regiões intergênicas, em outras espécies de plantas brasileiras mesmo com ocorrência geográfica mais ampla do que *V. hirsuta* (Ramos *et al.*, 2007, 2009; Collevatti *et al.*, 2009). Espécies com ampla distribuição geográficas tendem a apresentar valores de diversidade haplotípica e nucleotídica mais elevados (Nybom, 2004). Isto geralmente reflete os efeitos de eventos evolutivos, como surgimento de mutações, extinção de populações intermediária e restrição de fluxo gênico, durante os processos de expansão e colonização das populações destas espécies, sendo a diversidade genética, portanto, também dependente do grau de isolamento das populações.

Nos agrupamentos formados por padrões anatômicos ou macromorfológicos na AMOVA, o menor percentual de variação entre grupos do que entre populações do mesmo grupo e dentro das populações, demonstra que a elevada estruturação genética encontrada para a espécie não pode ser relacionada aos padrões morfológicos ou anatômicos sugeridos por Mello-Silva (1990, 2005b, no prelo). Esta estruturação, devida à maior variação entre os grupos no agrupamento geográfico, parece estar relacionada principalmente com a distribuição geográfica das populações. A maior diferenciação encontrada entre os grupos

geográficos pode ser devida às populações do norte de Minas Gerais e sul da Bahia, geneticamente mais diferenciadas, e que estão geograficamente separadas das demais. A anatomia foliar é tida por Mello-Silva como importante caráter na distinção de espécies do complexo *V. hirsuta* e *V. tubiflora* (Mello-Silva, no prelo). Ainda, características anatômicas tendem a ser mais conservadas em plantas que ocorram em ambientes similares, sendo esperado que para *V. hirsuta* os padrões anatômicos seriam informativos quanto à delimitação de grupos. Entretanto, estes resultados revelaram que o tipo anatômico está pouco relacionado com a estruturação genética das populações aqui estudadas, podendo não ser um caráter tão informativo para delimitação de táxons neste complexo.

Esta tendência à estruturação geográfica da espécie teve mais suporte com a análise Bayesiana, que não só demonstra essa relação quanto aponta uma tendência à diferenciação das populações no eixo norte-sul da distribuição da espécie. De forma complementar, os resultados obtidos na NCA corroboram as outras análises, pois suas inferências quanto a fluxo gênico antigo e extinção de populações intermediárias, sugerem a separação das populações do Planalto de Diamantina, e daquelas da região norte de Minas Gerais e sul da Bahia, do restante das populações, coincidindo com as barreiras geográficas (depressões e vales) que ocorrem ao longo da Cadeia do Espinhaço.

Apesar desta tendência à estruturação geográfica inferida pelas análises, é importante destacar que poucos padrões foram claramente determinados. Em várias das nossas análises fica evidenciada a existência de fluxo gênico entre populações. Os valores de probabilidade posterior muito similares que BOTU-2 e BOTU-3 (grupo #2) apresentam de pertencer ao grupo #4, conferindo a posição incerta de BOTU-2 e BOTU-3, é um indício de fluxo gênico, ou isolamento recente, entre as populações destes grupos, que pertencem a uma mesma região geográfica. Da mesma forma, a proximidade geográfica e a baixa diferenciação entre as populações GOUV, PKUB, DIAM-1 e DIAM-2, que apresentam padrões morfológicos diferentes (2, 5, 2 e 4, respectivamente), sugerem a ocorrência de fluxo gênico entre elas. Apesar da maior distância geográfica das populações ITAC-3, que apresenta padrão 7, e GMOG-2, padrão 6, estas populações foram agrupadas com as quatro anteriores, reafirmando que a divisão dos padrões em subgrupos “*V. hirsuta*” (padrões 1 a 5) e “*V. markgrafii*” (padrões de 6 a 11) não se sustenta. O grupo formado por CAET, CORD, MVER-1 e MVER-2 apresenta o padrão 12, 13 e 10. Os padrões 12 e 13 são muito

similares entre si, com exceção da anatomia: o padrão 12 possui anatomia tipo 1, enquanto o 13 apresenta o tipo 3, que se diferenciam pela presença/ausência de células esclerificadas nas fissuras que abrigam os estômatos (Mello-Silva, 2005b, no prelo). A população JFEL, que apareceu isolada em um grupo, demonstrou uma maior diferenciação das demais, corroborando os estudos genéticos utilizando marcadores codominantes em outros grupos de plantas que demonstraram que populações desta região apresentam diferenciação significativa em relação a populações de outras localidades (Borba *et al.*, 2001, Jesus *et al.*, 2001). Esta diferenciação é provavelmente resultado de fragmentação alopátrica durante a evolução das espécies devido à disjunção entre a Serra do Cabral e o maciço principal da Cadeia do Espinhaço.

A fragmentação alopátrica inferida no cladograma total (3-1) como o principal fator que influenciou a distribuição espacial dos haplótipos (Fig. 1.5), pode ser evidenciada pela ocorrência de vários eventos de mutação separando os cladogramas e algum tipo de barreira geográfica (Avice, 2000). A presença do haplótipo H5 (distante do haplótipo ancestral por quatro mutações) no clado 2-2 aumenta a separação deste com o clado 2-1. Além disso, há uma grande descontinuidade na cadeia de montanhas entre o Planalto de Diamantina e a região de Grão Mogol (e o restante da distribuição da espécie), o que corrobora com a hipótese de fragmentação alopátrica para *V. hirsuta*.

Apesar das análises filogeográficas de *V. hirsuta* apontarem a existência de grupos geograficamente estruturados, não ficou clara a delimitação de grupos morfológicos utilizando o sequenciamento de DNA plastidial. Análises adicionais empregando um tipo de marcador dominante nuclear (ISSR) também demonstraram não haver uma delimitação clara entre grupos de populações (Barbosa *et al.*, dados não publicados). Com este marcador foi possível inferir que, principalmente entre populações próximas geograficamente, a probabilidade de ocorrência de eventos de hibridação/introgressão é muito alta (Barbosa *et al.*, dados não publicados). A associação destes dados sugere que a não resolução da relação genética e morfológica das populações de *V. hirsuta* não seja uma limitação dos marcadores, mas uma característica desta espécie. Cronk (1998) defende a necessidade do conceito de oloespécie para tratar espécies de plantas como *V. hirsuta*. Uma oloespécie é uma espécie polimórfica com variação infraespecífica aparentemente caótica, com características que variam de forma independente e estão parcialmente relacionadas à distribuição geográfica ou ecológica, e por estes motivos é difícil de ser

acomodada em tratamentos taxonômicos formais (Cronk, 1998; White, 1998). O complexo padrão de diversidade de uma espécie pode estar associado a eventos antigos de hibridação/introgressão, mas nunca entre espécies atualmente reconhecidas, e a eventos de expansão e retração das populações durante o Pleistoceno.

Segundo a teoria de refúgios no Pleistoceno (Prance, 1982) as mudanças climáticas ocorridas na máxima glacial teriam alterado a distribuição das espécies. Com a diminuição da temperatura e da umidade, as populações de espécies florestais teriam se fragmentado e permanecido em áreas de refúgios por um tempo, se diferenciando devido a eventos de deriva genética, efeito fundador e de gargalo (*bottleneck*). Com a retomada de condições adequadas para a expansão de florestas, espécies com boa capacidade de dispersão colonizaram novas áreas e eventos de hibridação com populações anteriormente separadas teriam ocorrido, originando padrões de variação genética distintos mesmo em populações morfologicamente homogêneas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Palma-Silva *et al.*, 2009). Já para espécies de cerrado, os eventos climáticos que teriam contribuído para a formação de áreas de refúgio teriam acontecido no último período glacial. Desta forma, a distribuição atualmente conhecida destas espécies corresponderia aos refúgios que foram iniciados no Pleistoceno (Colevatti *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009). As análises da NCA em *V. hirsuta* apontaram fragmentação alopátrica como resultado de processo histórico, e a comparação da rede de haplótipos com os morfotipos revelou uma maior estruturação geográfica dos haplótipos do que dos morfotipos apoiando a hipótese de refúgios no Pleistoceno.

É provável que o padrão de variação das populações de *V. hirsuta* esteja relacionado a alterações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno no Brasil tropical (Salgado-Laboriau *et al.*, 1998) assim como inferido para outras espécies de cerrado (Colevatti *et al.*, 2003, 2009; Ramos *et al.*, 2008, 2009; Feres *et al.*, 2009; Lage-Novaes *et al.*, 2010) e de mata atlântica (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005, 2006; Palma-Silva *et al.*, 2009). Durante as alterações do clima no Pleistoceno, a diminuição da temperatura e da umidade, teria contribuído para a redução das florestas e favorecido a expansão de espécies vegetais do cerrado, como evidenciado nos registros fósseis de espécies de *Araucaria* (Ledru, 1993) e *Podocarpus* (Colinvaux *et al.*, 1996). Assim como em populações disjuntas de *Lychnophora ericoides* (Colevatti *et al.*, 2009) e *Hymanaea stigonocarpa* (Ramos *et al.*, 2009), as populações de *V. hirsuta* teriam se expandido além das áreas elevadas dos campos rupestres neste período ocupando grandes áreas com solo quartzítico em terrenos

mais baixos, ambiente propício para o desenvolvimento desta espécie. A distribuição dos haplótipos, as inferências da *Nested Clade Analysis* e grupos formados na análise Bayesiana sugerem que a região central da distribuição da espécie tenha sido o centro de diversificação de *V. hirsuta*, pois apresenta uma maior diversificação genética, o maior número de haplótipos por população, além de o haplótipo mais frequente nesta região ser compartilhado com *V. geotegens*, uma espécie filogeneticamente muito próxima a *V. hirsuta*. Durante esta expansão, as novas populações fundadas teriam uma composição alélica diferenciada, por eventos como efeito do fundador, o que não necessariamente causaria um aumento na diversidade da espécie como um todo. No final da glaciação, com o aumento de temperatura e umidade, as áreas florestais teriam voltado a se expandir, como inferido por estudos de espécies de mata atlântica (e.g., Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Palma-Silva *et al.*, 2009). Esta expansão das florestas teria levado a uma restrição de ocorrência dos campos rupestres a áreas acima de 800 metros de altitude, e é provável que populações ocorrentes em menores altitudes destes campos rupestres tenham sido extintas. Em *V. hirsuta* as populações destas áreas baixas teriam sido extintas e as que restaram ficaram restritas ao Planalto de Diamantina, à Serra do Cabral em Joaquim Felício, à região da Serra de Grão Mogol e ao extremo norte de Minas Gerais, sendo estas áreas os atuais refúgios de diversidade da espécie. Como, possivelmente, as populações acumularam diferenças genéticas ao longo do processo de evolução da espécie, após este isolamento, a diferenciação genética entre as populações se tornou mais acentuada, pois, desde então, estes grupos de populações vêm evoluindo de forma independente. Ainda, dentre as populações de cada uma dessas áreas geográficas é possível que tenham ocorrido eventos de hibridação/introgressão no passado, o que pode ser sustentado pelo padrão de homogeneidade genética observado entre as populações locais. Estes últimos eventos explicariam os padrões de diferenciação encontrados entre as populações de *V. hirsuta*.

Implicações taxonômicas

Mesmo se tratando de uma oloespécie, para a qual o tratamento taxonômico formal é pouco aplicável (Cronk, 1998), era esperado que a combinação de caracteres morfológicos pudesse definir, ao menos informalmente, grupos apontados nas análises genéticas. Entretanto, para *V. hirsuta* os padrões não puderam ser claramente determinados. Nenhuma das espécies sinonimizadas sob *V. hirsuta* formaram grupos que

se sustentaram nas análises genéticas. *V. leucanthos*, representada pela população GMOG-4 (padrão 3) compartilha haplótipos com outras populações geograficamente próximas, mas de padrões morfológicos variados. *V. maguirei/V. riedeliana* que apresentam o padrão 5, representadas pela população PKUB, também não se destacaram como um grupo reconhecível e, uma vez que possuem o haplótipo ancestral, nada pode ser inferido sobre estas espécies. Esta é a mesma situação de *V. markgrafii*, representada pelas populações JURA e GMOG-2, de padrão 6. Da mesma forma que os padrões morfológicos não se sustentam individualmente, quando associados nos subgrupos “*V. hirsuta*” e “*V. markgrafii*”, nenhuma estruturação se manteve, sendo, portanto, inviável esta divisão. O uso de marcadores moleculares ISSR que são mais variáveis, também não sustentou a delimitação de nenhum dos táxons nomeados acima (Barbosa *et al.*, dados não publicados).

Por outro lado, a estruturação geográfica revelada para a espécie é parcialmente devida ao grupo formado pelas populações do norte de Minas Gerais e sul da Bahia. Este grupo, representado por padrões morfo-anatômicos só encontrados nestas regiões (10, 12 e 13) apresenta, além da diferenciação morfológica relatada por Mello-Silva (2005b, no prelo), uma diferenciação genética evidenciada pelos haplótipos exclusivos das suas populações e divergentes por no mínimo duas mutações do haplótipo mais frequente e ancestral. Esta diferenciação genética revelada pelos dados plastidiais em associação com o isolamento geográfico e a diferenciação morfológica deste grupo, indicam que o mesmo possa ser reconhecido como um táxon a parte do restante das populações amostradas de *V. hirsuta*. Também as análises genéticas empregando ISSR possibilitam a sugestão da delimitação taxonômica deste grupo (Barbosa *et al.*, dados não publicados). Considerando os conceitos sobre unidades de conservação propostos por Moritz (1994), este grupo de população do norte da distribuição poderia compor uma *ESU*, pois apresentou diferenciação genética em relação às outras populações tanto nas análises com DNA plastidial quanto com DNA nuclear. Isto é uma evidência que estas populações podem se diferenciar a tal ponto que venham a constituir uma espécie diferente. Quanto às populações do grupo central e do Planalto de Diamantina, é possível que, de fato, as populações de cada grupo pertençam a um mesmo táxon ou a táxons muito próximos. Isto, no passado teria permitido uma grande taxa de hibridação, levando à homogeneidade das características genéticas de cada população dentro dos grupos. Entretanto, particularmente para este grupo central de populações, serão necessárias análises referentes à biologia

reprodutiva destas populações para que as delimitações taxonômicas nestes grupos tenham mais suporte. Estes grupos central e do sul, assim como a população da Serra do Cabral, poderiam ser consideradas *MUs*, pois apresentam cada um deles haplótipos exclusivos e compõe *pools* gênicos únicos, que não são encontrados nos outros grupos populacionais (Moritz, 1994). De modo geral, nossos resultados corroboram com o posicionamento de Mello-Silva (2005, no prelo) de sinonimizar *V. leucanthos*, *V. maguirei*, *V. riedeliana* e *V. markgrafii* sob *Vellozia hirsuta* sendo esta uma única espécie que comporta uma grande variação morfológica, e considerada, portanto, uma ocloespécie, indiferentemente da possibilidade de se reconhecer as populações do norte de Minas Gerais e sul da Bahia como um táxon a parte, pois o nome *V. hirsuta* seria mantido para o grupo formado pelas demais populações, uma vez que a população de onde o holótipo desta espécie foi coletado pertenceria a este grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonelli, A., Verola, C. F., Parisod, C. & Gustafsson, A. L. S. 2010. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 597-607.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Ayusen, E. S. 1973. Phylogeography and evolution of the Velloziaceae. In: Meggers, B. J., Ayensu, E. S. & Dukworth, W. D. (eds.), *Tropical forest ecosystems in Africa and South America: comparative review*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 105-119.
- Azevedo, M. T. A., Borba, E. L., Semir, J. & Solferini, V. N. 2007. Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 33-40.
- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Beheregaray, L. B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17, 3754-3774.
- Birky, C. W., Maruyama, T. & Fuerst, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103: 513-527.
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini, V. N. & Semir, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.
- Borba, E. L., Funch, R. R., Ribeiro, P. L., Smidt, E. C. & Silva-Pereira, V. 2007. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 267: 129-146.

- Cavers, S., Navarro, C. & Lowe, A. J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology* 12: 1451-1460.
- Colinvaux, P. A., de Oliveira, P. E., Moreno, J. E., Miller, M. C. & Bush, M. B. 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science* 274: 85-88.
- Collevatti, R. G., Grattapaglia, D. & Hay, J. D. 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology* 12: 105-115.
- Collevatti, R. G., Rabelo, S. G. & Vieira, R. F. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany* 104: 655-664.
- Cronk, Q. C. B. 1998. The ochlospecies concept. In: Huxley, C. R., Lock, J. M. & Cutler, D. F. (eds.), *Chorology, taxonomy and ecology of the floras of Africa and Madagascar*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 155-170.
- Diniz-Filho, J. A. F., Telles, M. P. C., Bonatto, S. L., Eizirik, E., Freitas, T. R. O., Marco Jr, P., Santos, F. R., Sole-Cava, A. & Soares, T. N. 2008. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography* 35: 753-763.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dutra, V. F., Garcia, F. C. P., Lima, H. C. & Queiroz, L. P. 2008. Diversidade florística de Leguminosae Adans. em áreas de campos rupestres. *Megadiversidade* 4: 117-125.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Feres, F., Zucchi, M. I., Souza, A. P., Amaral, M. C. E. & Bittrich, V. 2009. Phylogeographic studies of Brazilian “campo-rupestre” species: *Wunderlichia mirabilis* Riedel ex Baker (Asteraceae). *Biotemas* 22: 17-26.
- Fluxus Technology Ltd. NETWORK 4.5.1.6. Software free available at: www.fluxus-engineering.com. Cambridge.

- Franceschinelli, E. V., Jacobi, C. M., Drummond, M. G. & Resende, M. F. S. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany* 97: 585-592.
- Fu, Y. X. & Li, W. H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. & Cosson, J. F. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261-1280.
- Guillot, G., Santos, F. & Estoup, A. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24: 1406-1407.
- Giulietti, A. M.; Harley, R. M.; Queiroz, L. P.; Wanderley, M. G. L. & Pirani, J. R. 2000. Caracterização e endemismo nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. In: Cavalcanti, T. B. & Walter, B. M. (eds.), *Tópicos atuais em Botânica*. SBB/EMBRAPA, Brasília, pp. 311-318.
- Giulietti, A. M. & Pirani, J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (eds.), *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp.39-69.
- Goldblatt, P. & Poston, M. E. 1988. Observations on the chromosome cytology of Velloziaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 192-195.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hardy, O. J. 2009. How fat is the tail? *Heredity* 103: 437-438.
- Inda, L. A., Segarra-Moragues, J. G., Müller, J., Peterson, P. M. & Catalán, P. 2008. Dated historical biogeography of the temperate Loliinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 932-957.
- Jacobi, C. M. & del Sarto, M. C. L. 2007. Pollination of two species of *Vellozia* (Velloziaceae) from high-altitude quartzitic grasslands, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 325-333.

- Jesus, F. F., Abreu, A. G., Semir, J. & Solferini, V. N. 2001. Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 277:187-196.
- Jesus, F. F., Solferini, V. N., Semir, J. & Prado, P. I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 226: 59-68.
- Joly, A. B. 1970. *Conheça a vegetação brasileira*. EDUSP, São Paulo.
- Lage-Novaes, R. M., Lemos-Filho, J. P., Ribeiro, R. A. & Lovato, M. B. 2010. Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* 19: 985-998.
- Lambert, S. M., Borba, E. L., Machado, M. C. & Andrade, S. C. S. 2006a. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany* 97: 389-403.
- Lambert, S. M., Machado, M. C. & Borba, E. L. 2006b. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus xalbicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in North-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21:93-108.
- Ledru, M. P. 1993. Late Quaternary environmental and climatic change in central Brazil. *Quaternary Research* 39: 90-98.
- Lorenz-Lemke, A. P., Muschner, V. C., Bonatto S. L., Cervi, A. C., Solzano, F. M. & Freitas, L. B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany* 95: 799-806.
- Lorenz-Lemke, A. P., Mäder, G., Muschner, V. C., Stehmann, J. R., Bonatto S. L., Solzano, F. M. & Freitas, L. B. 2006. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology* 15: 4487-4497.
- Lousada, J. M., 2010. *Genética da conservação de duas espécies de Vellozia (Velloziaceae), V. gigantea e V. compacta, endêmicas dos campos rupestres da*

- Cadeia do Espinhaço*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Mello-Silva R. 1990. Morphological and anatomical differentiation of *Vellozia hirsuta* populations (Velloziaceae). *Plant Systematics and Evolution* 173: 197-208.
- Mello-Silva, R. 2000. Partial cladistic analysis of *Vellozia* and characters for the phylogeny of Velloziaceae. In: Wilson, K. L. & Morrison, D. A. (eds.), *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne.
- Mello-Silva, R. 2005a. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 157-173.
- Mello-Silva, R. 2005b. Circumscribing *Vellozia hirsuta* and *V. tubiflora* (Velloziaceae). *Abstracts of the 17^o International Botanical Congress*. Viena, Áustria.
- Mello-Silva, R. No prelo. Circumscribing *Vellozia hirsuta* and *V. tubiflora* (Velloziaceae). *Hoehnea*.
- Menezes, N. L., Mello-Silva, R. & Mayo, S. J. 1994. Cladistic analysis of the Velloziaceae. *Kew Bulletin* 49: 71-92.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Oliveira, H. O. 2010. *Biossistemática de Cyrtopodium poecilum (Orchidaceae): biologia reprodutiva, isolamento reprodutivo e variabilidade genética*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, G. M., Barbará, T., Bered, F. & Bodanese-Zanettini, M. H. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503-512.
- Panchal, M., 2007. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics* 23: 509-510.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pena, M. A. 2009. *Florística de afloramentos rochosos na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Petit, R. J., Aguinalalde, I., de Beaulieu, J. L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J. P., Rendell, S. & Vendramin, G. G.

2003. Glacial refugia, hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1565-1565.
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G. G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 89-701.
- Petit, R. J., Latouche-Halle, C. & Wagner, D. B. 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 122-128.
- Prance, G. T. 1982. Forest refuges: evidence from wood Angiosperms. In: Prance, G. T. (ed.). *Biological diversification in the Tropics*. Columbia University Press, New York, pp. 137-15.
- Ramos, A. C. S., Lemos-Filho, J. P. & Lovato, M. B. 2009. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from cerrado. *Journal of Heredity* 100: 206-216.
- Ramos, A. C. S., Lemos-Filho, J. P., Ribeiro, R. A., Santos, F. R. & Lovato, M. B. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. *Annals of Botany* 100: 1219-1228.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. DNASP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., Mello-Silva, R., van Sluys, M. A, Giannasi, D. E. & Price, R. A. 2001. Phylogenetic inference in Velloziaceae using chloroplast *trnL-F* sequences. *Systematic Botany* 26: 92-103.
- Salgado-Labouriau, M. L., Barberi, M., Ferraz-Vicentini, K. R. & Parizzi, M. G. 1998. A dry climatic event during the late Quaternary of tropical Brazil. *Review of Paleobotany and Palynology* 99: 115-129.
- Salgueiro, F., Felix, D., Caldas, J. F., Margis-Pinheiro, M. & Margis, R. 2004. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Diversity Distribution* 10: 201-210.

- Santos, M. F. 2009. *Análise florística em floresta estacional semidecidual na encosta leste da Serra do Cipó*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Sazima, M. 1978. *Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Sazima, M. & Sazima, I. 1990. Hummingbird pollination in two species of *Vellozia* (Liliiflorae: Velloziaceae) in Southeastern Brazil. *Botanica Acta* 103: 83-86.
- Shaw, J., Lickey, E. D., Schilling, E. E. & Small, R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Silva, R. M., Fernandes, G. W. & Lovato, M. B. 2007. Genetic variation in two *Chamaecrista* species (Leguminosae), one endangered and narrowly distributed and another widespread in the Serra do Espinhaço, Brazil. *Canadian Journal of Botany* 85: 629-636.
- Smith, L. B. & Ayensu, E. S. 1974. Classification of Old World Velloziaceae. *Kew Bulletin* 29: 181-205.
- Staden, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5: 233-241.
- Volz, S. M. & Renner, S. S. 2009. Phylogeography of the ancient Eurasian medicinal plant genus *Bryonia* (Cucurbitaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequences. *Taxon* 58: 550-560.
- Wang, Y.-L., Li, X., Guo, J., Guo, Z.-G., Li, S.-F. & Zhao, G.-F. 2010. Chloroplast DNA phylogeography of *Clintonia udensis* Trautv. & Mey. (Liliaceae) in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 721-732.
- White, F. 1998. The vegetative structure of African Ebenaceae and the evolution of rheophytes and ring species. In: Hopkins, H. C. F., Huxley, C. R., Pannell, C. M., Prance, G. T., White, F. (eds.), *The biological monograph: the importance of field studies and functional syndromes for taxonomy and evolution of tropical plants*. Royal Botanic Gardens, pp. 95-113.
- Yamaji, H., Fukuda, T., Yokoyama, J., Pak, J.-H., Zhou, C.-Z., Yang, C.-S. Kondo, K., Morota, T. Takeda, S., Sasaki, H. & Maki, M. 2007. Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (Aristolochiaceae) documented in

internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 863-884.

CAPÍTULO 2

Gradiente de variação genética revelado por marcadores ISSR ao longo da distribuição geográfica de populações do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae)

Gradiente de variação genética revelado por marcadores ISSR ao longo da distribuição geográfica de populações do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae)

RESUMO

Vellozia hirsuta, espécie que ocorre nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, apresenta grande variação quanto à morfologia externa e anatomia foliar. Esta variação levou à sinonimização de outras quatro espécies sob o nome de *V. hirsuta* e ao reconhecimento de 14 padrões morfo-anatômicos. Foi determinada, utilizando marcadores ISSR, a variabilidade e a estruturação genética de populações dessa espécie a fim de verificar a existência de relações entre os padrões genéticos e morfológicos que auxiliem na delimitação de possíveis táxons na espécie. A heterozigosidade média das populações (0,216) apresentou valores inferiores a espécies de mesmas características. A AMOVA apontou alta variação dentro das populações (84-86%) e baixa divergência entre as populações (11-14%). A análise Bayesiana indicou a ocorrência de estruturação em um gradiente geográfico norte-sul, com o grupo formado pelas populações do norte de Minas Gerais e sul da Bahia mais diferenciado geneticamente. Este resultado, associado ao isolamento geográfico e diferenciação morfológica deste grupo, permite a sugestão de que o mesmo possa ser reconhecido como um táxon distinto das demais populações. Além disso, nenhum dos táxons sinonimizados sob *V. hirsuta* receberam suporte para seu reconhecimento. Mesmo que o grupo do norte da distribuição seja reconhecido como novo táxon, as demais populações corresponderiam a uma única espécie com grande variação morfológica, podendo ser tratada como uma oloespécie.

Palavras-chave: genética de populações, ISSR, oloespécie, *Vellozia hirsuta*, Velloziaceae.

INTRODUÇÃO

Estudos de variabilidade genética de populações de plantas que ocupam habitat descontínuos, semelhantes a ilhas oceânicas, em termos de isolamento espacial e restrição de fluxo gênico, são instrumentos importantes para promover o entendimento dos padrões de distribuição das espécies bem como para a análise dos processos evolutivos (Avice, 1994). Além de marcas históricas deixadas na espécie, como processos de divergência e especiação durante a radiação adaptativa, análises com marcadores apropriados podem responder questões relacionadas aos sistemas de reprodução e aos mecanismos de dispersão de pólen e sementes que evoluem de modo diferenciado nos ambientes descontínuos (Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick & Loveless, 1986; Nybom & Bartish, 2000).

Os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, que constituem um exemplo de habitat naturalmente descontínuos, apresentem muitos elementos endêmicos, principalmente no nível específico (Giulietti & Pirani, 1988). Cerca de 30% dos táxons ocorrentes nos campos rupestres são restritos a este tipo vegetacional, com certos grupos taxonômicos, como as Velloziaceae, mostrando altos níveis de riqueza e endemismos e microendemismos. Nas espécies rupícolas, o padrão de distribuição em populações disjuntas é ainda mais evidente devido à descontinuidade dos afloramentos rochosos. Este elevado endemismo encontrado nas áreas de campos rupestres tem sido apontado como resultado da diferenciação das populações nelas ocorrentes disjuntamente (Giulietti & Pirani, 1988).

Esta distribuição disjunta das espécies de afloramentos rochosos resultando na diferenciação das populações tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo surgimento dos padrões de distribuição da variabilidade genética observados nestas espécies (Barbará *et al.*, 2007, 2008, 2009; Ribeiro *et al.*, 2008). Eventos recentes, como fluxo gênico através do pólen, dispersão de sementes, crescimento clonal, hibridação/introgressão entre populações simpátricas, mecanismos de reprodução e história de vida do indivíduo, também são responsáveis pela distribuição da diversidade genética nas espécies (Hamrick & Godt, 1990; Nybom & Bartish, 2000). Marcadores moleculares que são modelados por eventos deste tipo têm sido muito utilizados na tentativa de explicar quais fatores atuaram sobre as diferentes espécies de campos rupestres. A variabilidade

genética e a partição da mesma nas populações reveladas através deste marcador têm auxiliado na determinação de possíveis híbridos entre espécies simpátricas (Lambert *et al.*, 2006a, Oliveira, 2010) e em delimitações taxonômicas em complexos de espécies (Ribeiro *et al.*, 2008). Marcadores alozimáticos têm revelado nestes ambientes diferenciados graus de variabilidade em espécies de *Pleurothallis* (Borba *et al.*, 2001), *Proteopsis* (Jesus *et al.*, 2001), *Melocactus* (Lambert *et al.*, 2006a, 2006b), *Vellozia* (Franceschinelli *et al.*, 2006), *Syngonanthus* (Pereira *et al.*, 2007), *Chamaecrista* (Conceição *et al.*, 2009) e *Bulbophyllum* (Ribeiro *et al.*, 2008). Em alguns destes casos a partição da variabilidade genética nas populações têm sido apontada como um recurso para auxiliar na delimitação taxonômica de complexos de espécies. Um segundo tipo de marcador codominante, os microssatélites, também revelaram altos valores de diversidade em espécies de *Alcantarea* ocorrentes em populações sob afloramentos rochosos e, ainda, uma elevada estruturação genética relacionada a esta distribuição disjunta (Barbará *et al.*, 2007, 2009). Marcadores dominantes, como ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*; Zietkiewicz *et al.*, 1994), com níveis de polimorfismo relativamente mais altos do que os encontrados com alozimas, mas similar aos revelados por microssatélites, têm mais recentemente sido utilizados em estudos de genética de população, com a vantagem de empregar técnicas mais baratas e menos laboriosas. No Brasil, estes estudos ainda são raros (Manica-Cattani *et al.*, 2009; Lüdtkke *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Souza & Lovato, 2010), principalmente para plantas de campos rupestres, e estão concentrados nas famílias Orchidaceae (Cruz, 2007; Silva, 2008; Oliveira, 2010) e Velloziaceae (Lousada, 2010; Lousada *et al.*, no prelo).

Velloziaceae, família com cerca de 240 espécies, apresenta distribuição predominantemente Neotropical (Ayensu, 1973), com maior diversidade e elevados níveis de endemismos nas montanhas do leste do Brasil, especialmente na Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia (Menezes *et al.*, 1994). *Vellozia*, com cerca de 100 espécies, constitui o maior gênero da família, englobando quase 45% das espécies, conhecidas popularmente como canela-de-ema e são elementos típicos dos campos rupestres brasileiros (Giulietti & Pirani, 1988).

Vellozia hirsuta Goethart & Henrard esta incluída na seção *Radia* L.B.Smith & Ayensu e é caracterizada por flores com hipanto longo (Mello-Silva, 1990). Diferentemente da maioria das espécies de Velloziaceae, esta apresenta uma distribuição geográfica moderadamente ampla, ocorrendo ao longo da Cadeia do Espinhaço, do

município de Santa Bárbara em Minas Gerais, até o sul da Bahia (Mello-Silva, 1990, 2005, no prelo). Esta espécie apresenta grande variação quanto à morfologia externa e anatomia foliar o que levou Mello-Silva (1990) inicialmente a descrever cinco variantes anatômicos (1-5) e três morfológicos (A-C), nos quais as populações até então conhecidas foram enquadradas. Estes padrões anatômicos divergem entre si quanto à presença/ausência de células esclerificadas nas fissuras da face abaxial e a distribuição do feixe de células esclerificadas na epiderme adaxial. Quanto aos padrões morfológicos, às características das bainhas foliares, distribuição das folhas ao longo do caule, presença/ausência e densidade de tricomas nas superfícies foliares, existência de folhas marcescentes ou caducas, altura média das plantas, tamanho do pedicelo floral e tipo das emergências do hipanto são as características que diferenciam os padrões. Análises de novas populações indicaram a ocorrência de novos padrões morfo-anatômicos (Mello-Silva, 2005, no prelo), sendo que atualmente são reconhecidos 14 padrões distribuídos nas cerca de 30 populações conhecidas. A variação destas populações isoladas nas diferentes cadeias de montanhas é complexa, não seguindo um padrão geográfico claro e desafiando a classificação taxonômica formal (Mello-Silva, 1990). Isso levou à sinonimização de quatro espécies sob o nome *V. hirsuta*: *V. leucanthos* Goethart & Henrard (padrão #3), *V. maguirei* L.B.Smith (padrão #5), *V. markgrafii* Schulze-Menz (padrão #6) e *V. riedeliana* Goethart & Henrard (padrão #5) (Mello-Silva, 2005, no prelo). Ainda segundo este autor, é possível a separação destes 14 padrões em dois subgrupos: “*V. hirsuta*” compreendendo os padrões de 1 a 5 e “*V. markgrafii*”, os padrões de 6 a 11. Os padrões restantes (12 a 14) não poderiam ser encaixados em nenhum dos dois grupos, apresentando características morfológicas intermediárias aos padrões dos dois subgrupos.

V. hirsuta, por apresentar estas características pode ser tratada sob o conceito de ocloespécies, sugerido por Cronk (1998). Segundo este autor, uma ocloespécie é uma espécie que apresenta uma variação fortemente polimórfica, mas fracamente politípica; as características morfológicas variam independentemente podendo a distribuição das mesmas apresentar correlação parcial com a geografia e a ecologia da espécie, além da complexidade da variação morfológica não ser devido à hibridação entre espécies comumente reconhecíveis, tampouco, a um sistema de reprodução especializado. Ainda, estas espécies frequentemente apresentam ampla distribuição geográfica e ecológica e um grande número de sinônimos (Cronk, 1998). Por apresentar características peculiares, uma

ocloespécie não se enquadra facilmente em um tratamento taxonômico formal, sendo sugerido o estudo das relações históricas das populações que podem ser inferidas através de uma abordagem evolutiva (White, 1998), como realizado para populações do complexo *V. hirsuta* utilizando seqüências de DNA plastidial (Barbosa *et al.*, dados não publicados).

Em *V. hirsuta*, a determinação dos padrões de variabilidade genética em associação aos padrões morfológicos das populações indicaria se de fato essa entidade taxonômica corresponde a um complexo de várias espécies com distribuição restrita, sendo microendêmicas, ou se corresponde a uma única espécie com grande variação morfo-anatômica e ampla distribuição. Assim, o presente estudo teve por objetivo determinar a variabilidade genética de populações de *Vellozia hirsuta*, amostradas ao longo da distribuição geográfica e abrangendo a amplitude morfológica, assim como a partição dessa variabilidade na espécie, a fim de verificar a existência de relações entre os padrões genéticos e morfológicos, que auxiliariam na delimitação de possíveis táxons no complexo.

METODOLOGIA

Amostragem populacional

Foram coletadas folhas jovens de 13 a 18 indivíduos de 23 populações de *Vellozia hirsuta*, abrangendo a quase totalidade da distribuição geográfica da espécie e 13 dos 14 padrões morfo-anatômicos descritos por Mello-Silva (2005, no prelo) (Tab. 2.1, Fig. 2.1). Apesar dos esforços de coleta, não foi possível amostrar o 14º padrão, conhecido apenas por uma população localizada na Serra do Cabral (Joaquim Felício-MG), que não pode ser encontrada. As populações de onde foram coletados os holótipos de *V. hirsuta* e *V. maguirei* foram amostradas (DIAM-2 e PKUB, respectivamente). Porém, para os outros três táxons descritos (*V. leucanthos*, *V. markgrafii* e *V. riedeliana*) foram incluídos apenas os padrões morfológicos aos quais elas pertenciam: padrão 3 (GMOG-4), padrão 6 (JURA e GMOG-2) e padrão 5 (PKUB, mesmo padrão de *V. maguirei*) (Tab. 2.1). A figura 2 apresenta parte da variação morfológica dos padrões descritos para a *V. hirsuta*. Voucher de todas as populações amostradas foram depositados nos herbários SPF e BHCB.

Extração de DNA e amplificação

DNA total foi extraído de todo o material coletado, seguindo protocolo de Doyle & Doyle (1987) com modificações no tempo de precipitação do DNA com isopropanol. Os produtos de extração foram visualizados em gel de agarose 0,8% e tampão TAE 1x, corados em solução 0,5 µg/ml de brometo de etídio e fotografados em aparelho de fotodocumentação. Foram realizadas reações de amplificação com 20 *primers* de ISSR de sequências aleatórias, em um volume final de 20 µl. As reações constituíram de tampão 1x com MgCl₂ a 1,5 mM, dNTP a 0,2 mM, um *primer* a 0,3 µM, 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase e DNA genômico. As amplificações foram realizadas em programa com pré-melting a 94° C por 4 minutos, 37 ciclos com etapa de denaturação a 94° C por 1 minuto, etapa de anelamento a 46; 47,5 e 50° C por 2 minutos e etapa de extensão a 72° C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final a 72° C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 0,5X, correndo em voltagem de 70 V por aproximadamente 4 horas. Os géis foram posteriormente corados em solução 0,5 µg/ml de brometo de etídio e fotodocumentados. O tamanho molecular dos fragmentos foi estimado utilizando Ladder de 100 pb (Ludwig Biotechnology).

Análises da variabilidade genética das populações

Os perfis eletroforéticos obtidos nas amplificações com os *primers* ISSR foram codificados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda e uma matriz de fenótipos de ISSR foi construída utilizando-se o programa Transformer-3 (Caujapé-Castells & Baccarani-Rosas, 2005). Locos que apresentaram baixa resolução foram excluídos da análise. Foram consideradas homólogas todas as bandas de igual tamanho molecular em um mesmo *primer* (Williams *et al.*, 1993; Thormann *et al.*, 1994; Rieseberg, 1996). Foram avaliados parâmetros iniciais de variabilidade genética como número de locos polimórficos e exclusivos e heterozigosidade média esperada para as populações e para a espécie. A partir da matriz de fenótipos ISSR, foi construída uma matriz de distância euclidiana quadrada e realizada a análise de variância molecular (AMOVA), utilizando o programa GenAlEx 6.3 (Peakall & Smouse, 2009). Com a AMOVA foi possível quantificar a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferenciação interpopulacional. A análise da estrutura genética, ou seja, da perda de diversidade causada pela subdivisão populacional foi feita através do Φ_{ST} (estatística F de Wright, 1921). Para as populações de *V. hirsuta* foram testados os seguintes agrupamentos: 1- três padrões

anatômicos; 2- treze padrões morfo-anatômicos; 3- dois grupos morfológicos, “*V. hirsuta*” x “*V. markgrafii*”; 4- três grupos morfológicos, “*V. hirsuta*” x “*V. markgrafii*” x padrões 12 e 13; e 5- quatro grupos geográficos (Fig. 1). Utilizando o programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans, 2002) foram construídas duas matrizes de distância (uma com distância de Nei e a outra com os valores de Φ_{ST} entre todos os pares de populações). Estas matrizes foram utilizadas para construir dendrogramas utilizando o algoritmo *neighbour-joining* implementado no pacote Neighbor através do programa PHILIP (Felsenstein, 1993), e visualizados através do Treeview (Page, 1996). O suporte estatístico dos ramos foi calculado a partir do pacote Consense do PHILIP. O programa GenAlEx 6.3 também foi utilizado para realização de uma Análise de Coordenadas Principais (PCO) que demonstra a ordenação entre as populações. Além disso, foi realizada uma análise Bayesiana utilizando o software STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) para inferir o número de agrupamentos genéticos nas populações amostradas. O número de populações presumidas (K) foi extraído de K=1 a K=23 e oito corridas independentes foram feitas para cada K. Cada corrida conteve 1.000.000 interações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com um *burn-in* inicial de 100.000 interações, com *admixture model* com alelos correlacionados entre populações. Para inferir o número de agrupamentos genéticos, foi calculado a média de cada valor de probabilidade K, “log da probabilidade” [LnP(D)], através de todas as corridas, como sugerido por Evanno *et al.* (2005).

RESULTADOS

Baseado na qualidade das amplificações dos 20 *primers*, foram selecionados cinco que produziram 108 locos de boa qualidade. Fragmentos de difícil identificação foram excluídas das análises. O número de fragmentos amplificados por *primer* variou de 19 a 28, com tamanhos entre 300 a 1.400 pb, aproximadamente (Tab. 2.2). A população JFEL foi a única a apresentar algum fragmento exclusivo. A proporção de locos polimórficos variou de 63,89% (GMOG-5) a 78,70% (BOTU-1). A população BOTU-4 apresentou o maior heterozigidade média esperada (0,242), seguida pela população de DIAM-2 (0,236), sendo que a menor média foi encontrada na população CORD (0,191) (Tab. 2.3). A variabilidade genética estimada a partir da análise de variância (AMOVA) para os cinco agrupamentos testados demonstrou alta variação dentro das populações (84-86%) e baixa

divergência entre as populações (0-5%). O valor da estruturação genética calculada pelo Φ_{ST} variou de 0,142 a 0,157 (Tab. 2.4).

A maior similaridade genética ocorreu entre as populações de ITAC-1 e ITAC-3 e entre MVER-1 e CORD (0,992), e menor similaridade (0,921) entre GOUV e JURA, enquanto os maiores valores de Φ_{ST} foram entre PKUB e JFEL (0,215), seguida de 0,213 entre GMOG-3 e JFEL, e menor valor (0,051) entre SJPA e CORD. Na análise de coordenadas principais (PCO), os três primeiros eixos corresponderam a 66,36% da variância observada, sendo que o primeiro eixo explica 30,67% dessa variância, separando as populações localizadas no norte de Minas Gerais e no sul da Bahia das populações da região central da distribuição da espécie (região de Grão Mogol), porém não as separa das populações do Planalto de Diamantina e da Serra do Cabral (JFEL). O segundo eixo explica 18,96% da variância, separando as populações do Planalto de Diamantina das demais. Já o terceiro eixo explica 16,73% da variação, entretanto não separou claramente nenhum grupo específico (Fig. 2.3).

Nas análises de agrupamento usando o algoritmo *neighbor-joining* realizadas com a distância genética de Nei (1978) e os valores de Φ_{ST} , foi gerada a mesma topologia de agrupamento. Porém, poucos grupos obtiveram suporte estatístico acima de 50%, mas sempre com valores que não ultrapassaram 70%. Utilizando a distância de Nei, o grupo contendo as populações JFEL e MVER-2 apresentam suporte de *bootstrap* de 58%, o grupo SJPA e CORD apresenta 65%, e este último grupo com MVER-1 apresenta 64% de suporte. Todo este grupo recebeu suporte apenas nas análises com Φ_{ST} (50%). Além disso, os agrupamentos GOUV e DIAM-1, DIAM-2 e PKUB, JURA e ITAC-1, receberam suporte de 60%; 57% e 51%, respectivamente (Fig. 2.4).

Na análise Bayesiana realizada, os valores de $\text{LnP}(D)$ e ΔK indicaram um número de três agrupamentos genéticos (Fig. 2.5). Porém, nenhuma população apresentou todos os indivíduos com elevada probabilidade posterior de pertencer a um mesmo agrupamento genético. Um dos agrupamentos genéticos identificados foi predominante nas populações do norte de Minas Gerais e sul da Bahia, juntamente com a população isolada da Serra do Cabral (JFEL). O segundo grupo foi predominante nas populações do Planalto de Diamantina, além de duas populações de Botumirim. Apenas duas populações apresentaram predominantemente o terceiro grupo, GMOG-4 e GMOG-5. As demais populações apresentaram grande mistura de pelo menos dois agrupamentos genéticos.

Pode-se notar uma tendência de gradiente norte-sul na composição relativa dos três agrupamentos genéticos nas populações estudadas.

Tabela 2.1: Populações de *Vellozia hirsuta* utilizadas nas análises genéticas empregando ISSR. Vouchers depositados nos herbários SPF e BHC.B.

Espécie/População	Nome	Nº indiv. utilizados	Padrão morfo-anatômico	Padrão anatômico	Coordenadas	Voucher
<i>Vellozia hirsuta</i>						
Diamantina/MG	DIAM-2 [*]	15	1	1	18°11'27,4"S; 43°37'36,1"W	Mello-Silva 407
Gouveia/MG	GOUV	15	2	1	18°34'47,1"S; 43°52'33,4"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3176
Botumirim/MG	BOTU-3	16	2	1	16°54'07,7"S; 42°59'28,7"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3196
Grão-Mogol/MG	GMOG-1	16	2	1	16°35'48,0"S; 42°54'23,7"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3202
Joaquim Felício/MG	JFEL	15	2	1	17°41'34,0"S; 44°11'41,5"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3222
Diamantina/MG	DIAM-1	15	2	1	18°17'48,7"S; 43°44'26,5"W	Mello-Silva & Forzza 2698
Grão-Mogol/MG	GMOG-4 ¹	15	3	5	16°35'31,8"S; 42°57'50,1"W	Mello-Silva 465
Grão-Mogol/MG	GMOG-3	15	4	3	16°35'23,0"S; 42°55'09,2"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3204
Grão-Mogol/MG	GMOG-5	15	4	3	16°35'29,6"S; 42°54'09,4"W	Mello-Silva 475
Pres. Kubitschek/MG	PKUB ^{§-3}	15	5	1	18°34'21,7"S; 43°35'30,8"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3177
Grão-Mogol/MG	GMOG-2 ²	18	6	1	16°34'49,6"S; 42°53'48,5"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3203
Juramento/MG	JURA ²	14	6	1	16°57'49,3"S; 43°32'14,8"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3180
Itacambira/MG	ITAC-1	15	7	1	16°58'19,7"S; 43°20'50,9"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3185
Itacambira/MG	ITAC-3	18	7	1	17°02'04,6"S; 43°20'40,5"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3190
Itacambira/MG	ITAC-2	17	8	1	17°00'28,0"S; 43°20'12,7"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3189
Botumirim/MG	BOTU-4	14	9	1	16°45'54,1"S; 43°03'34,7"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3197
Mato Verde/MG	MVER-2	15	10	1	15°23'13,3"S; 42°46'31,4"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3221
Botumirim/MG	BOTU-2	13	11	1	16°53'58,4"S; 42°59'29,6"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3193
Botumirim/MG	BOTU-1	16	11	1	16°53'05,2"S; 43°00'54,7"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3191
Caetité/BA	CAET	15	12	1	14°16'45,0"S; 42°31'53,0"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3218
Mato Verde/MG	MVER-1	17	12	1	15°23'13,3"S; 42°46'31,4"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3220
S. João do Paraíso/MG	SJPA	18	13	3	15°26'42,2"S; 42°03'44,1"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3205
Cordeiros/BA	CORD	18	13	3	15°08'06,1"S; 41°58'08,2"W	Mello-Silva <i>et al.</i> 3206

*- Pop. em que foi coletado o holótipo de *V. hirsuta*, §- Pop. em que foi coletado o holótipo de *V. maguirei*. As populações das quais foram coletados os holótipos de *V. leucanthos*, *V. markgrafii* e *V. riedeliana* não foram amostradas. **1-** Padrão morfológico ao qual pertence *V. leucanthos*; **2-** Padrão morfológico ao qual pertence *V. markgrafii*; **3-** Padrão morfológico ao qual pertence *V. riedeliana*.

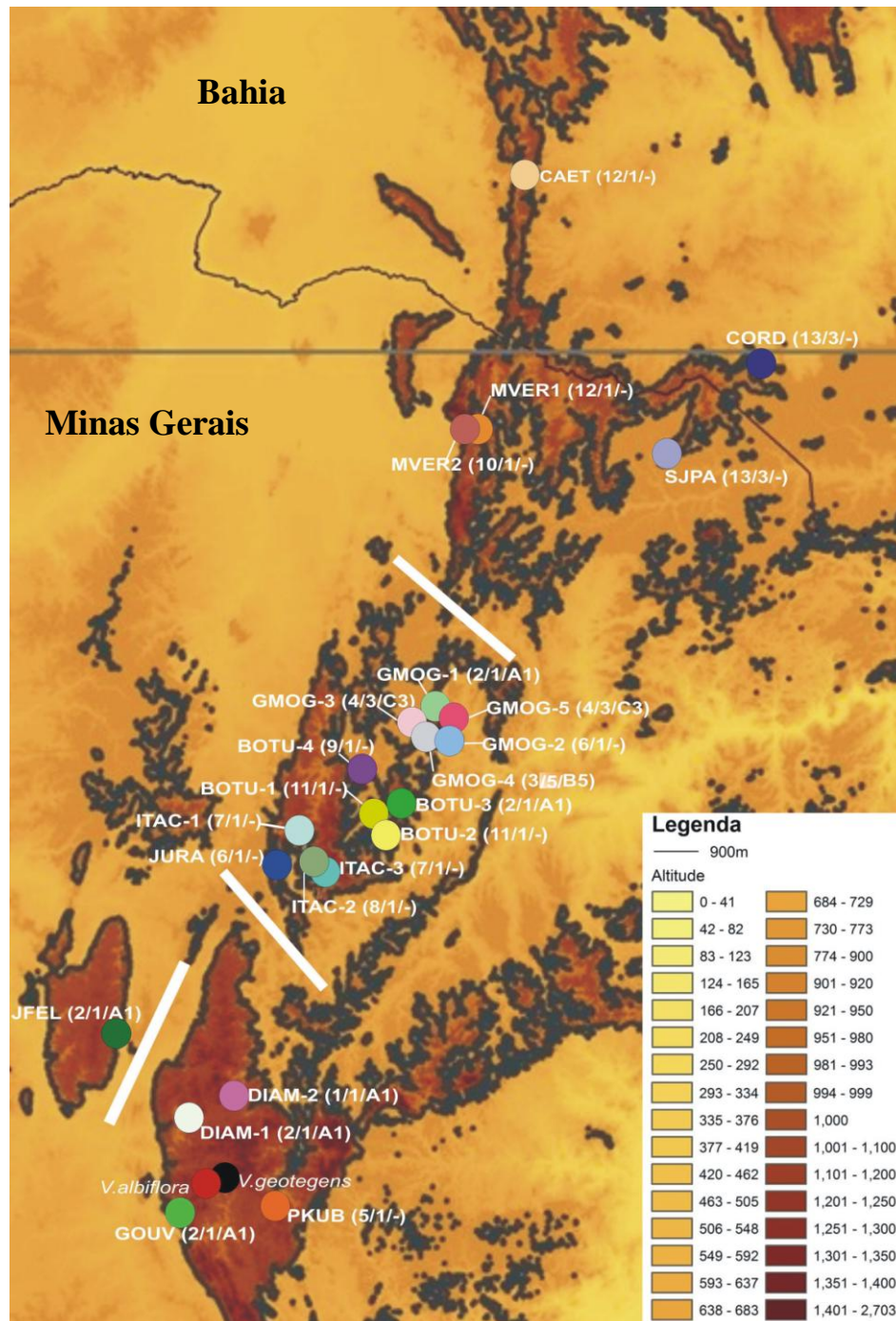


Figura 2.1: Localização geográfica das populações de *Vellozia hirsuta*, *V. geotegens* e *V. albiflora* estudadas, indicando os quatro grupos geográficos utilizados na AMOVA (região de Grão-Mogol, Planalto de Diamantina, Joaquim Felício, e norte de Minas Gerais com sul da Bahia). Entre parênteses são apresentados os padrões morfológico e anatômico de acordo com Mello-Silva (2005b) e padrão morfo-anatômico anteriormente descrito em Mello-Silva (1990). Populações que não apresentam este último parâmetro não foram estudadas por Mello-Silva (1990). Veja Tabela 2.1 para nomes das populações.

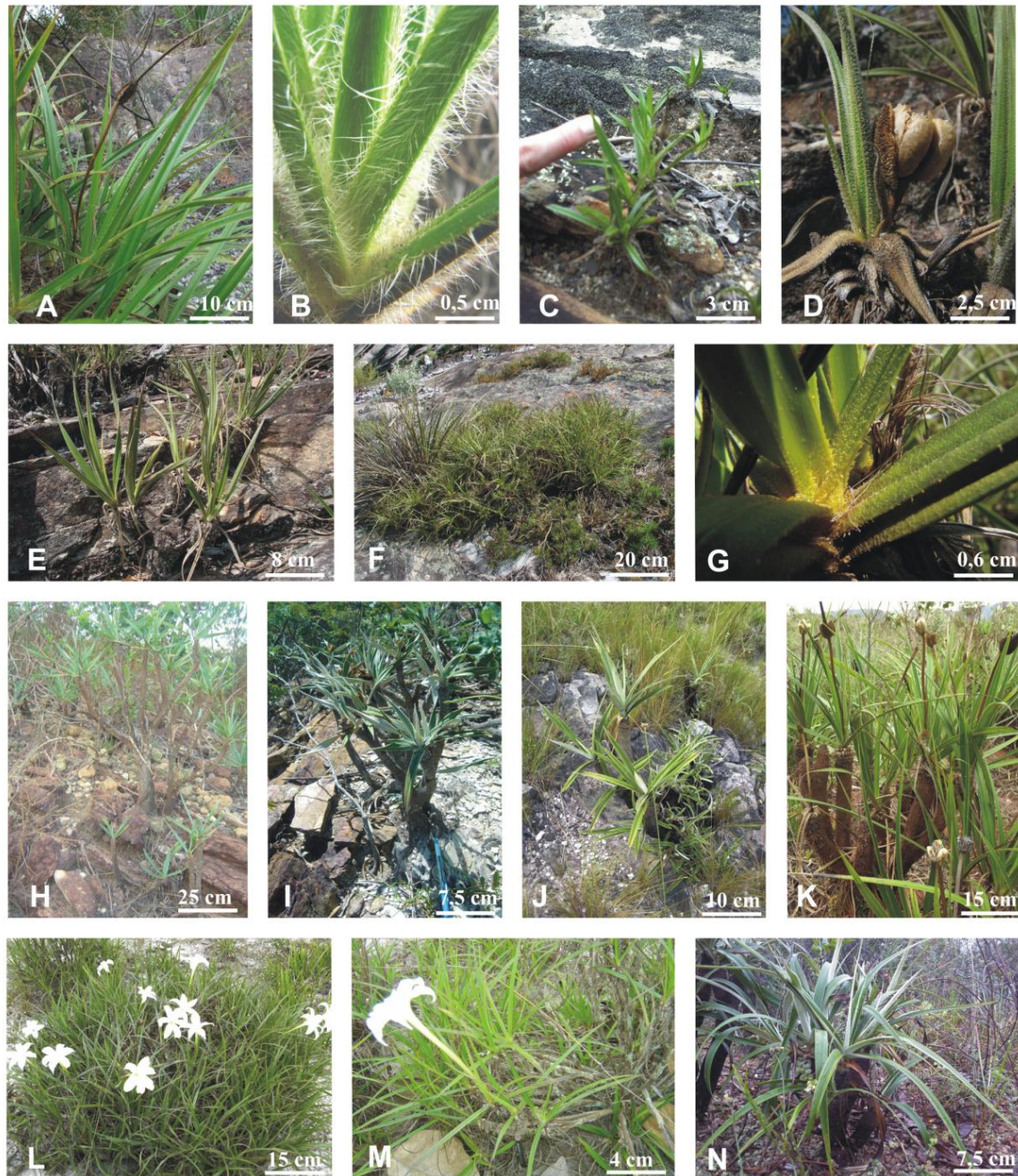


Figura 2.2: Variação morfológica em algumas das populações de *Vellozia hirsuta* estudadas. A-B: DIAM-2, padrão 4 (população onde foi coletado o holótipo de *V. hirsuta*); C: GMOG-4, padrão 3; D-E: PKUB, padrão 5 (população onde foi coletado o holótipo de *V. maguirei*); F-G: DIAM-1, padrão 2; H: GMOG-2, padrão 6; I: ITAC-1, padrão 7; J: BOTU-1, padrão 11; K: GMOG-1, padrão 2; L-M: GMOG-5, padrão 4; N: BOTU-4, padrão 9. Veja Tabela 2.1 para nomes das populações.

Tabela 2.2: Sequência, temperatura de anelamento ideal, número de fragmentos e variação de tamanho de fragmentos (em pares de bases – pb) dos *primers* utilizados na análise de variabilidade genética baseada em padrões de ISSR em 23 populações de *Vellozia hirsuta* ocorrentes nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço

<i>Primer</i>	Sequência	Temp. de anelamento	Nº de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
UBC 808	5'-(AG) ₈ C-3'	50,0° C	28	300-1200
UBC 827	5'-(AC) ₈ G-3'	47,5° C	19	500-1400
UBC 840	5'-(GA) ₈ YT-3'	50,0° C	20	300-1100
UBC 899	5'-(CA) ₆ RG-3'	47,5° C	20	300-1100
OMAR	5'-(GAG) ₄ RC-3'	50,0° C	21	300-1000

Tabela 2.3: Variabilidade genética encontrada em 108 locos de ISSR em 23 populações de *Vellozia hirsuta*. N: total de fragmentos encontrados em cada população; P: percentual de locos polimórficos; H_e : heterozigidade média esperada dentro da população obtida pela diversidade gênica de Nei (1973). Veja a Tabela 2.1 para nome das populações.

População	Nº de fragmentos	Polimorfismo (%)	H_e
GOUV	87	74,07%	0,213
PKUB	85	73,15%	0,231
DIAM-1	83	70,37%	0,217
DIAM-2	87	75,00%	0,236
JURA	76	64,81%	0,197
ITAC-1	87	75,93%	0,229
ITAC-2	86	74,07%	0,218
ITAC-3	83	74,07%	0,216
BOTU-1	88	78,70%	0,226
BOTU-2	85	74,07%	0,231
BOTU-3	82	73,15%	0,218
BOTU-4	82	74,07%	0,242
GMOG-1	83	72,22%	0,219
GMOG-2	79	70,37%	0,198
GMOG-3	84	67,59%	0,201
GMOG-4	83	72,22%	0,228
GMOG-5	74	63,89%	0,216
SJPA	84	75,00%	0,198
CORD	86	76,85%	0,191
CAET	81	71,30%	0,211
MVER-1	83	74,07%	0,220
MVER-2	76	69,44%	0,206
JFEL	86	77,78%	0,211
média	83	72,71%	0,216
espécie	108	100%	0,337

Tabela 2.4: Análise de variância molecular (AMOVA) para cinco diferentes agrupamentos testados para 23 populações de *Vellozia hirsuta* ocorrentes em campos rupestres da Cadeia do Espinhaço: 1) três padrões anatômicos; 2) treze padrões morfo-anatômicos; 3) dois grupos morfológicos “*V. hirsuta*” x “*V. markgrafii*”; 4) três grupos morfológicos “*V. hirsuta*” x “*V. markgrafii*” x padrões 12 e 13; e 5) quatro grupos geográficos. Veja Figura 2.1 para grupos geográficos e texto para explicação dos agrupamentos. * $p < 0,001$.

Fonte de variação	Porcentagem de variação (%)				
	Padrão anatômico 3 padrões	Padrão morfológico (todos os padrões)	" <i>V. hirsuta</i> " x " <i>V. markgrafii</i> " padrões (1-5) X (6-11)	" <i>V. hirsuta</i> " x " <i>V. markgrafii</i> " padrões (1-5) X (6-11) X (12 e 13)	Grupo geográfico 4 grupos
Entre grupos	1	2	1	2	5
Entre populações dentro dos grupos	14	12	14	13	11
Dentro das populações	85	86	86	85	84
Fst (pop/total)	0,145*	0,144*	0,142*	0,149*	0,157 *

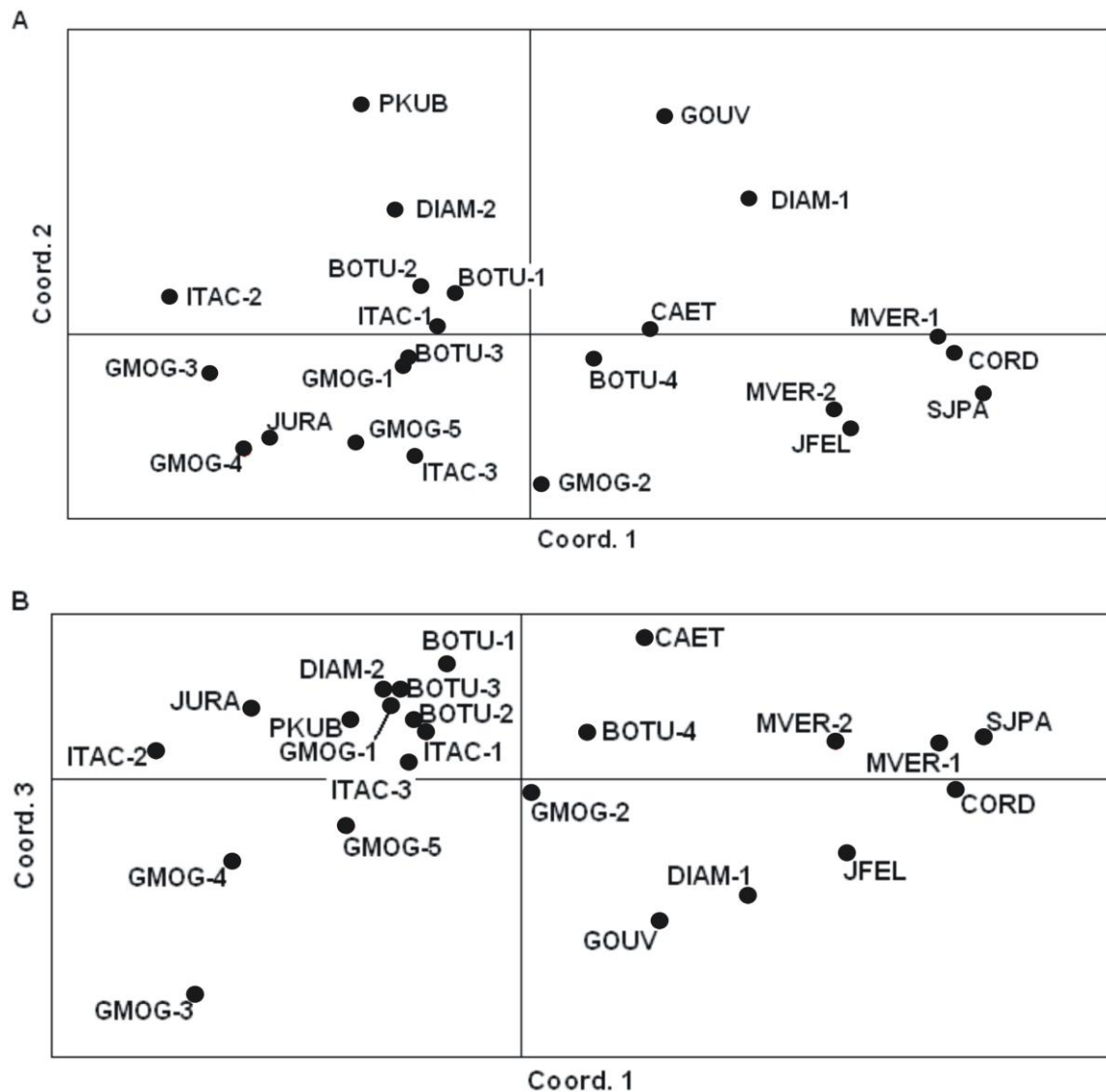


Figura 2.3: Análise de coordenadas principais (PCO) de 23 populações de *Vellozia hirsuta*, ocorrentes na Cadeia do Espinhaço, baseada em 108 locos de ISSR. A variação acumulada nos três primeiros eixos corresponde a 66,36% (eixo 1: 30,67%; eixo 2: 18,96%; eixo 3: 16,73%). A- eixos 1 e 2; B- eixos 1 e 3. Veja a Tabela 2.1 para nome das populações.

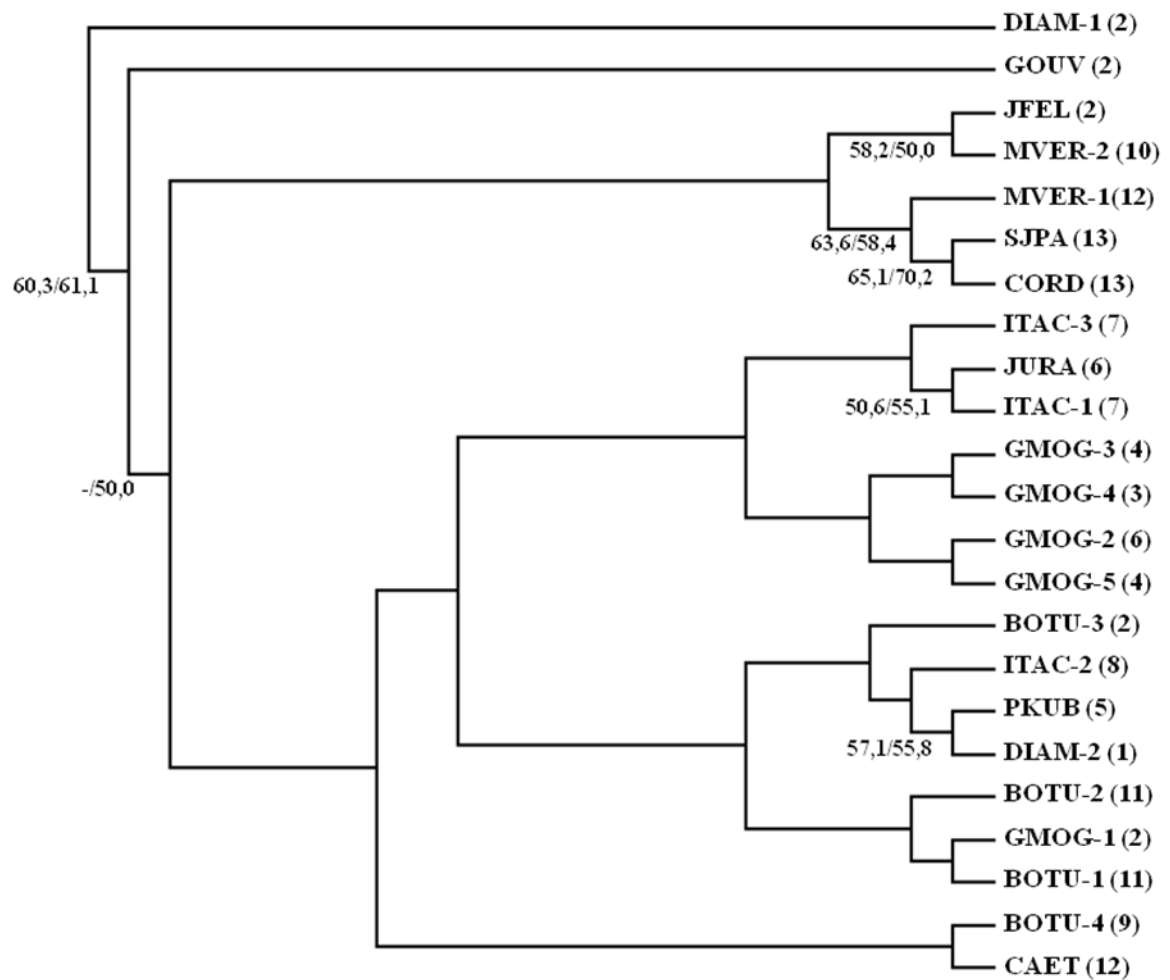


Figura 2.4: Dendrograma mostrando as relações entre as 23 populações de *Vellozia hirsuta* utilizando *neighbor-joining* como algoritmo de agrupamento baseado em 108 locos de ISSR. Os números abaixo dos ramos representam os resultados de *bootstrap* com suporte acima de 50%, gerados a partir da distância genética de Nei (1978) e dos valores de θ_{ST} (em 1.000 permutações). Os números entre parênteses indicam o padrão morfo-anatômico ao qual a população pertence. Veja a Tabela 2.1 para nome das populações.

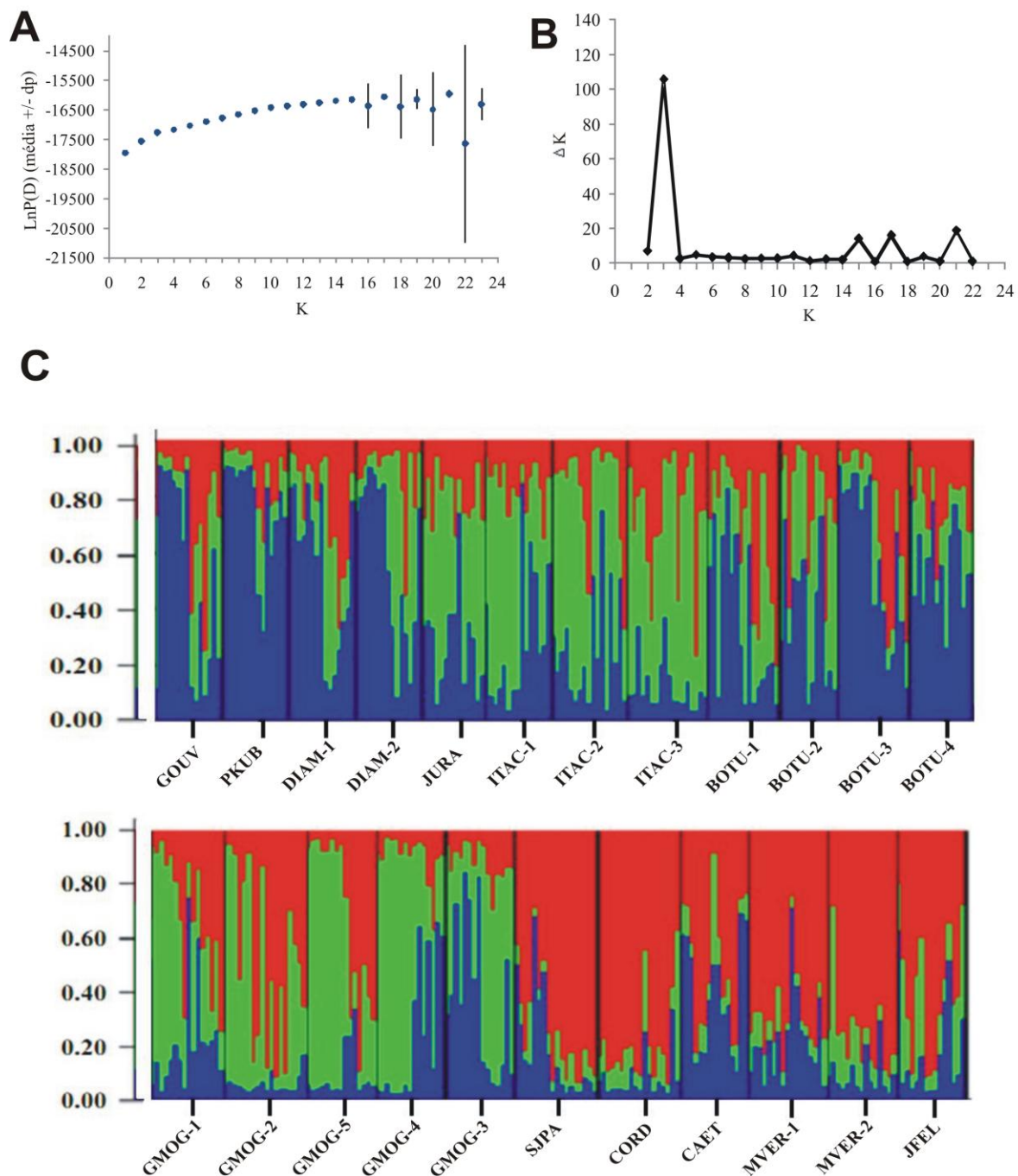


Figura 2.5: Análise Bayesiana de 23 populações de *Vellozia hirsuta* ocorrentes nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, baseado em 108 locos de ISSR. A- média \pm desvio padrão de LnP(D) para oito corridas; B- gráfico de ΔK ; C- Representação gráfica dos diferentes agrupamentos genéticos para K=3, com a probabilidade posterior de cada indivíduo de pertencer a cada um dos grupos. As populações estão separadas por barras verticais. Veja a Tabela 2.1 para nome das populações.

DISCUSSÃO

As populações de *Vellozia hirsuta* apresentaram baixos valores de diversidade genética ($H_{e-pop} = 0,216$), se comparada a plantas com características semelhantes, herbáceas perenes (0,242) e alógamas (0,260), analisadas com marcador similar, RAPD (Nybom & Bartish, 2000). As espécies de Velloziaceae apresentam crescimento lento (Souza & Lorenzi, 2005), permanecendo no ambiente por muitos anos. Já quanto ao sistema de reprodução, para *V. hirsuta*, nenhum trabalho foi desenvolvido, porém, autoincompatibilidade em diferentes graus tem sido descrita para espécies congênicas (Sazima, 1978; Jacobi & del Sarto, 2007). A heterozigosidade encontrada para *V. hirsuta* apresentou valor superior ao relatado para espécies autocóricas/barocóricas (0,212) (Nybom & Bartish, 2000). Apesar de estudos relacionados à dispersão de sementes nesta espécie não terem sido realizados, observações em campo corroboram com o relatado para outras espécies autocóricas do gênero (Conceição *et al.*, 2007). É possível que dispersão por vento ou secundária por água ocorra em espécies de *Vellozia*, mas a distância de dispersão em relação à planta mãe deve, ainda, ser limitada. Para *V. hirsuta*, esta dispersão secundária contribuiria para o aumento da diversidade em relação a um sistema exclusivamente barocórico. Da mesma forma, os valores de diversidade genética desta espécie se mostraram superiores aos relatados para *V. gigantea* ($H_{e-pop} = 0,183$), espécie microendêmica da Serra do Cipó, em Minas Gerais (Lousada *et al.*, no prelo) e para de *V. compacta* ($H_{e-pop} = 0,134$), espécie com amplitude de distribuição geográfica mais restrita do que *V. hirsuta* (Lousada, 2010). Os altos níveis de diversidade genética de *V. hirsuta* ($H_{e-sp} = 0,337$) ficaram acima do esperado para uma espécie de distribuição regional (0,22) (Nybom, 2004). Isto corrobora com a relação entre estas espécies congênicas em que a espécie com maior amplitude de distribuição geográfica tende a apresentar maiores valores de heterozigosidade (Nybom & Bartish, 2000; Nybom, 2004).

Baixos níveis de diversidade genética têm sido relatados para populações de *Proteopsis* (Jesus *et al.*, 2001), *Chamaecrista* (Silva *et al.*, 2007) e *Melocactus* (Lambert *et al.*, 2006a, 2006b) ocorrentes em campos rupestres. Em *Vellozia*, Franceschinelli e colaboradores (2006) também relataram baixa diversidade genética para *V. leptopetala* e *V. epidendroides*. A baixa diversidade genética em espécies desta formação vegetacional pode estar relacionada à ocorrência disjunta de suas populações, com área geográfica

ocupada restrita. Este isolamento tende à homogeneização e diferenciação das populações, devido à elevada frequência de endogamia biparental, raridade na chegada de alelos novos e efeitos de deriva genética. Desta forma, essencialmente apenas novos eventos mutacionais contribuiriam para o aumento da diversidade dentro das populações. Entretanto, para espécies rupícolas de Orchidaceae, ocorrentes na Cadeia do Espinhaço, estes valores têm se demonstrado mais elevados (Borba *et al.*, 2001, 2007; Azevedo *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008), possivelmente devido à autoincompatibilidade e elevada capacidade de dispersão de sementes (Tremblay, 1997; Tremblay *et al.*, 2005). Já em *V. hirsuta*, os valores altos a moderados de diversidade encontrada para as populações pode estar relacionada ao grande tamanho das mesmas, o que acomodaria uma maior diversidade genética reduzindo o efeito da endogamia e mantendo a heterozigosidade da população nos níveis observados.

O valor de Φ_{ST} (0,143) demonstrado pela análise de variância (AMOVA) foi inferior aos de outras espécies de *Vellozia* (*V. gigantea* = 0,280; Lousada *et al.*, no prelo, e *V. compacta* = 0,435; Lousada, 2010) obtidos com este mesmo marcador. Este valor também foi inferior aos obtidos por RAPD para espécies com características similares à *V. hirsuta*, espécies perenes (0,25), barocóricas (0,44) e alógamas (0,28) (Nybom & Bartish, 2000). Dentre os fatores que podem influenciar a estruturação genética de populações de plantas, principalmente os mecanismos de dispersão de pólen e semente exercem grande influência (Hamrick e Godt, 1990). As espécies de campos rupestres, como resultado da distribuição em populações disjuntas, geralmente apresentam elevados níveis de estruturação das populações (Borba *et al.*, 2001, Jesus *et al.*, 2001) devido à restrição de fluxo gênico entre as populações. Em *V. hirsuta*, entretanto, a baixa estruturação populacional pode estar relacionada à manutenção de fluxo gênico recente entre as populações de uma mesma área geográfica e à manutenção da similaridade gênica antiga, principalmente entre grupos geográficos. Apesar da ausência de estudos referentes à biologia reprodutiva desta espécie, as flores de *V. hirsuta* apresentam características típicas de plantas que apresentam mariposas Sphingidae como vetores de pólen, com hipanto formando um tubo estreito e longo, onde o pólen fica relativamente escondido, perfume adocicado e cor esbranquiçada. Este grupo de polinizador pode promover fluxo gênico polínico capaz de contribuir para maior coesão das populações localmente (Proctor *et al.*, 1996). Em *V. hirsuta* seria preciso avaliar em detalhes qual a contribuição do

polinizador desta espécie no surgimento ou na manutenção de uma estruturação genética, mas possivelmente estaria relacionada à estruturação entre populações geograficamente próximas, uma vez que as longas distâncias entre os grupos geográficos poderiam ser barreiras ao fluxo gênico. Padrões similares têm sido observados em espécies esfingófilas de *Discocactus* em regiões de campos rupestres e caatinga (Machado, 2005).

Para algumas espécies de Cactaceae (Lambert *et al.*, 2006a, 2006b), Eriocaulaceae (Pereira *et al.*, 2007) e Orchidaceae (Borba *et al.*, 2001), as discontinuidades entre as principais áreas do Espinhaço (Planalto de Diamantina, Serra do Cabral, Serra de Grão Mogol, Chapada Diamantina) aparece de forma incisiva na diferenciação de grupos de populações. Em *V. hirsuta*, entretanto, a alta similaridade genética entre as populações das principais áreas geográfica ocupada pela espécie pode estar relacionada a um compartilhamento antigo de um estoque gênico único, sugerido pelo padrão de homogeneização de variabilidade genética na espécie, seguido de divergência diferenciada em cada uma das áreas geográficas. Neste caso, a similaridade entre populações seria devida à diferenciação incipiente (*a priori*) e não por hibridização (*a posteriori*). Panorama similar é relatado para populações de *Bulbophyllum exaltatum* para as quais, a similaridade parece estar relacionada à baixa diversidade alélica na espécie (Ribeiro *et al.*, 2008).

Já em uma escala local, a similaridade entre as populações de uma mesma área geográfica poderia ser resultado da ocorrência de eventos de hibridização/introgressão antigos entre táxons co-existentes naquele local. Barbará e colaboradores (2007) descrevem panorama similar para espécies de *Alcantarea imperialis* e *A. geniculata* em que existe uma maior similaridade genética entre populações simpátricas de espécies diferentes do que entre populações conspecíficas parapátricas. Essa sugestão aparentemente é condizente com o padrão observado, onde os grupos de populações são baseados principalmente na distribuição geográfica e não em similaridade morfológica. As populações da região central da distribuição da espécie exibem uma complexa combinação de genótipos em diferentes proporções. Este padrão pode ser resultado de uma maior divergência dessas populações em relação às de outras regiões, passando por eventos que teriam alterado a frequência e criando novos alelos. Além disso, eventos de hibridização antiga entre táxons co-existentes naquele local poderia ter levado a esta divergência genética e morfológica às populações da região central.

Estruturação genética em gradiente norte-sul, similar à encontrada para *V. hirsuta*, foi descrita para complexo *Bulbophyllum exaltatum* ocorrente ao longo do Espinhaço nos estados de Minas Gerais e Bahia (Ribeiro *et al.*, 2008). Os autores deste trabalho relatam que os dados genéticos associados à diferenciação morfológica entre populações destes estados permitiram o reconhecimento de duas unidades taxonômicas distintas. Em *V. hirsuta*, porém, não há correlação entre a estruturação genética das populações e padrões morfo-anatômicos anteriormente descritos por Mello-Silva (2005b, no prelo). Esta ausência de correlação entre estruturação genética e morfologia também foi relatada em um estudo filogeográfico realizado com as mesmas populações do presente trabalho, corroborando estes resultados (Barbosa *et al.*, dados não publicados). Isto demonstra que a não delimitação de táxons no grupo estudado não é uma limitação do marcador utilizado, se repetindo em um marcador de natureza distinta, e sim uma característica da própria espécie. Esta não-correlação entre estruturação genética e morfologia evidenciada com o uso de marcadores ISSR, que permitem o acesso às influências de eventos recentes sobre as populações, é reforçada pela estruturação geográfica em gradiente norte-sul encontrada para a espécie.

Implicações taxonômicas

A estruturação genética em gradiente revelada para as populações *Vellozia hirsuta*, relacionando a variabilidade genética com a distribuição geográfica e não com os padrões morfo-anatômicos, indica que nenhum dos táxons descritos envolvidos neste complexo de espécie (Mello-Silva, 2005, no prelo) tem sustentação para ser mantido como um táxon específico. Além disso, a alta similaridade entre as populações de *V. hirsuta* é condizente com táxons que pertençam a uma mesma espécie (Lousada, 2010). Uma vez que não há correlação entre a estruturação genética e os morfotipos, os subgrupos “*V. hirsuta*” e “*V. markgrafii*” (Mello-Silva, 2005, no prelo), baseados em padrões morfológicos, também não têm sustentação taxonômica.

Apesar das análises demonstrarem uma tendência em separar três agrupamentos de populações, equivalentes aos extremos norte e sul da distribuição da espécie e a região central, não há descontinuidades genéticas significativas entre os três grupos. Entretanto o *pool* gênico predominante nas populações do norte da distribuição faz com que sejam geneticamente similares entre si e se diferenciem das demais populações amostradas.

Além da diferenciação genética, estas populações também são morfológicamente distintas e estão geograficamente isoladas das demais. A associação dessas características poderia ser utilizada para sugerir o reconhecimento destas populações como um táxon distinto das outras regiões. Apesar da população da Serra do Cabral (JFEL) também aparecer neste grupo, dificilmente esta similaridade entre ela e as populações do norte é devida a fluxo gênico atual. O mais plausível, devido à distância geográfica entre as duas áreas de ocorrência destas populações, é que esta alta similaridade genética seja devido a um compartilhamento antigo de estoque gênico, que teria sido preservado por uma baixa divergência entre as populações. Os resultados do estudo filogeográfico também indicam que as populações do norte da distribuição possam ser reconhecidas como um táxon distinto (Barbosa *et al.*, dados não publicados). O compartilhamento de locos nucleares e haplótipos pode ser devido a contato entre as populações ocorrido no último período de glaciação em que as mesmas ocupavam uma maior área do que a atualmente conhecida, e ainda não se apresentavam disjuntas. Considerando que este grupo de população do norte da distribuição apresentou diferenciação genética em relação às outras populações tanto nas análises com DNA nuclear quanto com DNA plastidial, o mesmo poderia compor uma *ESU* segundo os conceitos utilizados em políticas de conservação (Moritz, 1994). Já à população da Serra do Cabral, às populações do Planalto de Diamantina e às da região central da distribuição, poderia ser aplicado o conceito de *MUs*, pois cada uma destas regiões apresentam uma composição gênica diferente (Moritz, 1994).

Uma abordagem taxonômica diferenciada sob o conceito de *ocloespécie* parece, de fato, a mais apropriada para *V. hirsuta*, indiferente do reconhecimento das populações do norte da distribuição como um táxon a parte, pois, esta espécie acomodaria uma grande variação morfológica, uma das características peculiares de uma *ocloespécie*. Desta forma, nossos resultados corroboram com o posicionamento de Mello-Silva (2005, no prelo) em sinonimizar *V. leucanthos*, *V. maguirei*, *V. markgrafii* e *V. riedeliana* que demonstravam variantes intermediários do que era reconhecido como *Vellozia hirsuta*, sob o nome desta última espécie, de forma que uma única espécie comporta toda a variação morfológica observada entre as populações conhecidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York.
- Ayusen, E. S. 1973. Phytogeography and evolution of the Velloziaceae. In: Meggers, B. J., Ayensu, E. S. & Dukworth, W. D. (eds.), *Tropical forest ecosystems in Africa and South America: comparative review*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 105-119.
- Azevedo, M. T. A., Borba, E. L., Semir, J. & Solferini, V. N. 2007. Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 33-40.
- Barbará, T., Martinelli, G., Fay, M. F., Mayo, S. J. & Lexer, C. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981-1992.
- Barbará, T., Lexer, C., Martinelli, G., Mayo, S. J., Fay, M. F. & Heuertz, M. 2008. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity* 101: 285-296.
- Barbará, T., Martinelli, G., Palma-Silva, C., Fay, M. F., Mayo, S. J. & Lexer, C. 2009. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65-77.
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini, V. N. & Semir, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.
- Caujapé-Castells, J. & Baccarani-Rosas, M. 2004. Transformer-3: a program for the analysis of molecular population genetic data. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” and Instituto Tecnológico de Canarias, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Conceição, A. A., Funch, L. S. & Pirani, J. R. 2007. Reproductive phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the “Chapada

- Diamantina”, northeastern Brazil: population and community analyses. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 475-485.
- Conceição, A. S., Queiroz, L. P. & Borba, E. L. 2009. Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution* 271:19-27.
- Cronk, Q. C. B. 1998. The ochlospecies concept. In: Huxley, C. R., Lock, J. M. & Cutler, D. F. (eds.), *Chorology, taxonomy and ecology of the floras of Africa and Madagascar*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 155-170.
- Cruz, D. T. 2007. *Variabilidade genética e morfológica em populações de Cattleya elongata Barb. Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Franceschinelli, E. V., Jacobi, C. M., Drummond, M. G. & Resende, M. F. S. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany* 97: 585-592.
- Giulietti, A. M. & Pirani, J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (eds.), *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 39-69.
- Hamrick J. L. & Godt M. J. W. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. & Weir, B. S (eds.), *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer, Sunderland, pp. 43-63.
- Hamrick, J. L. & Loveless, M. D. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: Estrada A. & Fleming, T. H. (eds.) *Frugivores and Seed Dispersal*, Junk Publisher, The Hague, Netherlands, pp. 211-223.

- Jacobi, C. M. & del Sarto, M. C. L. 2007. Pollination of two species of *Vellozia* (Velloziaceae) from high-altitude quartzitic grasslands, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 325-333.
- Jesus, F. F., Solferini, V. N., Semir, J. & Prado, P. I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 226: 59-68.
- Lambert, S. M., Borba, E. L., Machado, M. C. & Andrade, S. C. S. 2006a. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany* 97: 389-403.
- Lambert, S. M., Machado, M. C. & Borba, E. L. 2006b. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus xalbicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in North-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21:93-108.
- Lousada, J. M., 2010. *Genética da conservação de duas espécies de Vellozia (Velloziaceae), V. gigantea e V. compacta, endêmicas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Lousada, J. M., Borba, E. L., Ribeiro, K. T, Ribeiro, L. C. & Lovato, M. B. No prelo. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with landscape in Espinhaço Range, southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica*.
- Loveless, M. D. & Hamrick, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Machado, M. C. 2005. *O gênero Discocactus Pfeiff. (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil: variabilidade morfológica, variabilidade genética, taxonomia e conservação*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Manica-Cattani, M. F., Zacaria, J., Pauletti, G., Atti-Serafini, L. & Echeverrigaray, S. 2009. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology* 69: 375-380.

- Mello-Silva R. 1990. Morphological and anatomical differentiation of *Vellozia hirsuta* populations (Velloziaceae). *Plant Systematics and Evolution* 173: 197-208.
- Mello-Silva, R. 2005. Circumscribing *Vellozia hirsuta* and *V. tubiflora* (Velloziaceae). *Abstracts of the 17^o International Botanical Congress*. Viena, Áustria.
- Mello-Silva, R. No prelo. Circumscribing *Vellozia hirsuta* and *V. tubiflora* (Velloziaceae). *Hoehnea*.
- Menezes, N. L., Mello-Silva, R. & Mayo, S. J. 1994. Cladistic analysis of the Velloziaceae. *Kew Bulletin* 49: 71-92.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Nybom, H. & Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 93-114.
- Oliveira, H. O. 2010. *Biossistemática de Cyrtopodium poecilum (Orchidaceae): biologia reprodutiva, isolamento reprodutivo e variabilidade genética*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Oliveira, L. O., Venturini, B. A., Rossi, A. A. B. & Hastenreiter, S. S. 2010. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetics and Molecular Biology* 33: 86-93.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computational and Applied Biosciences* 12: 357-358.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pereira, A. C. S., Borba, E. L. & Giulietti, A. M. 2007. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 401-416.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996. *The natural history of pollination*. Harper Collins, New York.
- Ribeiro, P. L.; Borba, E. L.; Smidt, E. C.; Lambert, S. M.; Schnadelbach, A. S. & van den Berg, C. 2008. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian "campos rupestres": implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* 270: 109-137.
- Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359-389.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., Mello-Silva, R., van Sluys, M. A, Giannasi, D. E. & Price, R. A. 2001. Phylogenetic inference in Velloziaceae using chloroplast *trnL-F* sequences. *Systematic Botany* 26: 92-103.
- Sazima, M. 1978. *Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Silva, J. R. S. 2008. *Variabilidade populacional de Cattleya pfisteri (Pabst & Senghas) van den Berg (Orchidaceae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Silva, R. M., Fernandes, G. W. & Lovato, M. B. 2007. Genetic variation in two *Chamaecrista* species (Leguminosae), one endangered and narrowly distributed and another widespread in the Serra do Espinhaço, Brazil. *Canadian Journal of Botany* 85: 629-636.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Souza, H. A. V. & Lovato, M. B. 2010. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 49-56.
- Thormann, C. E., Ferreira, M. E., Camargo, L. E. A., Tivang, J. G. & Osborn T. C. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 973-980.
- Tremblay, R. L. 1997. Distribution and dispersion patterns of individuals in nine species of *Lepanthes* (Orchidaceae). *Biotropica* 29: 38-45.

- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. & Calvo, R. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *The Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54.
- Vekemans, X. 2002. *AFLP-SURV version 1.0*. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- White, F. 1998. The vegetative structure of African Ebenaceae and the evolution of rheophytes and ring species. In: Hopkins, H. C. F., Huxley, C. R., Pannell C. M., Prance, G. T. & White, F. (eds.), *The biological monograph: the importance of field studies and functional syndromes for taxonomy and evolution of tropical plants*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 95-113.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. & Tingey S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods on Enzymology* 218: 704-740.
- Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos filogeográficos e de variabilidade e estruturação genética de populações do complexo *Vellozia hirsuta* a fim de investigar a existência de correlação entre os padrões genéticos aqui apresentados e os morfo-anatômicos descritos por Mello-Silva (2005b, no prelo).

A utilização de dois tipos de marcadores, cada um com suas peculiaridades e apropriados para cada tipo de abordagem, nos permitiu obter um panorama mais amplo a respeito do padrão de distribuição da variabilidade genética atual das populações e dos possíveis eventos que moldaram historicamente a variação genética e morfológica da espécie. Do mesmo modo, a utilização de dois marcadores distintos nos assegurou apontar com suporte em dados genéticos as definições taxonômicas mais apropriadas para o complexo *V. hirsuta*. Os resultados das análises utilizando os dois marcadores moleculares foram congruentes em indicar a possibilidade de reconhecimento do grupo formado pelas populações do norte da distribuição da espécie como um táxon diferente das demais populações amostradas de *V. hirsuta*. Estes dados endossam o observado quanto às características morfológicas e ao isolamento geográfico deste grupo, possibilitando um novo posicionamento taxonômico diante do complexo. Ainda, nossos resultados corroboram com o posicionamento de Mello-Silva (2005b, no prelo) e sustenta a sinonimização de *V. leucanthos*, *V. maguirei*, *V. markgrafii* e *V. riedeliana* sob o nome *V. hirsuta*. Mesmo que o grupo do norte da distribuição possa vir a receber o *status* de um novo táxon, as demais populações receberiam o nome de *V. hirsuta*, uma vez que a população de origem do holótipo de *V. hirsuta* pertenceria a este grupo, e corresponderiam a uma única espécie sendo esta considerada uma oloespécie por acomodar uma grande variação morfológica parcialmente associada com a distribuição geográfica da espécie.

A utilização do marcador organelar que reflete herança genética materna e, portanto, nos informar apenas quanto ao fluxo gênico mediado por dispersão de sementes, indicou que os grupos de populações da região central e do sul da distribuição aparentemente apresentam um relacionamento histórico mais próximo em relação às daquelas do norte de Minas Gerais e sul da Bahia, evidenciado tanto pelo compartilhamento de haplótipos entre populações destas áreas quanto pelas afinidades morfológicas persistentes atualmente, uma vez que um mesmo padrão morfo-anatômico pode ser encontrado nas duas áreas. Apesar deste tipo de marcador informar apenas sobre processos evolutivos históricos de médio e

longo prazo, este panorama parece se suportar, pois a utilização de marcadores de polimorfismo genômico nuclear, que reflete a variabilidade genética modelada também pelo fluxo gênico polínico recente, também aponta para uma maior similaridade entre estes dois grupos, apoiado no compartilhamento de *pools* gênicos entre suas populações.

Em uma escala local, a coesão genética das populações pode ser feita por fluxo gênico mediado pela dispersão polínica. Entretanto, possivelmente o fator que manteve os grupos populacionais interligados, compondo um gradiente de variação genética ao longo da distribuição geográfica da espécie, foi a baixa divergência entre estes grupos, com a manutenção de um estoque genético similar. Aparentemente, o complexo padrão de distribuição da variação morfológica em *V. hirsuta* é resultado de processos antigos de hibridização/introgressão ocorridos posteriormente ao isolamento de linhagens morfológicas distintas por um contato secundário nestas áreas geográficas atualmente ocupadas pela espécie, especialmente na região central de distribuição.

Os resultados apresentados nesta dissertação, apesar da sugestão de possibilidade de nova delimitação taxonômica para uma pequena parte das populações, corroboram com as decisões prévias do taxonomista do grupo, diferentemente, de vários outros trabalhos realizados com espécies vegetais ocorrentes nos campos rupestres nos quais novos direcionamentos taxonômicos foram sugeridos após associação dos dados genéticos com os morfológicos. Apesar desta dissertação não trazer alterações significativas na taxonomia do grupo em estudo, os dados genéticos deram suporte aos macromorfológicos. Este trabalho, ainda, auxiliou a compreensão de quais os processos existentes por trás do complexo padrão de variação morfológica observado no grupo, e como eles estariam atuando nas populações e como o efeito seria refletido em toda a espécie. Nossas análises apontam que os processos ocorridos ao longo da evolução das espécies, não necessariamente vão moldar padrões congruentes com uma classificação taxonômica idealizada por taxonomistas e sistematas, uma vez que, a taxonomia é apenas uma forma de nós cientistas tentarmos, a partir de padrões discretos que nem sempre ocorrem, ou mesmo são óbvios, enquadrar toda a variação que observamos na natureza em classes de objetos.

Este trabalho abre a perspectiva de novos estudos relacionados principalmente à biologia da reprodução de *V. hirsuta* e que poderiam ter implicações na delimitação taxonômica da espécie. Estudos deste tipo seriam fontes de informação sobre a biologia

floral da espécie, os sistemas de reprodução encontrados nas populações, quais seus principais polinizadores, como o comportamento destes polinizadores estaria influenciando a estruturação genética das populações e se estes eventos podem determinar de algum modo o isolamento reprodutivo entre os grupos populacionais. Todas estas são questões que se associadas sob uma abordagem biossistemática, poderiam trazer novas respostas e eventualmente um novo entendimento para a classificação de *V. hirsuta*. Considerando a grande diversidade das áreas tropicais, estudos biossistemáticos que associam diferentes técnicas, são excelentes ferramentas para o melhor entendimento da dinâmica das espécies. Para os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, esta abordagem parece ser ainda mais apropriada para solucionar os diversos casos onde há problemas de identificação específica em grupos de plantas endêmicas, agregando informações importantes para a compreensão de quais os principais mecanismos estão por traz dos processos de especiação em plantas características e altamente diversas nestas formações tão peculiares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Antonelli, A., Verola, C. F., Parisod, C. & Gustafsson, A. L. S. 2010. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 597-607.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Ayusen, E. S. 1973. Phylogeography and evolution of the Velloziaceae. In: Meggers, B. J., Ayensu, E. S. & Dukworth, W. D. (eds.), *Tropical forest ecosystems in Africa and South America: comparative review*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 105-119.
- Azevedo, C. O. & van den Berg, C. 2007. Análise comparativa de áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais) baseada em espécies de Orchidaceae. *Sitientibus, série Ciências Biológicas* 7: 199-210.
- Azevedo, M. T. A., Borba, E. L., Semir, J. & Solferini, V. N. 2007. Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 33-40.
- Bandelt, H-J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barbará, T., Lexer, C., Martinelli, G., Mayo, S. J., Fay, M. F. & Heuertz, M. 2008. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity* 101: 285-296.
- Barbará, T., Martinelli, G., Fay, M. F., Mayo, S. J. & Lexer, C. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to

- neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981-1992.
- Barbará, T., Martinelli, G., Palma-Silva, C., Fay, M. F., Mayo, S. J. & Lexer, C. 2009. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65-77.
- Beheregaray, L. B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17, 3754-3774.
- Behnke, H.-D., Treutlein, J., Wink, M., Kramer, K., Schneider, C., & Kao, P. C. 2000. Systematics and evolution of Velloziaceae, with special reference to sieve-element plastids and *rbcL* sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 134: 93-129.
- Birky, C. W., Maruyama, T. & Fuerst, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103: 513-527.
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini, V. N. & Semir, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.
- Borba, E. L., Funch, R. R., Ribeiro, P. L., Smidt, E. C. & Silva-Pereira, V. 2007. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 267: 129-146.
- Caujapé-Castells, J. & Baccarani-Rosas, M. 2004. Transformer-3: a program for the analysis of molecular population genetic data. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” and Instituto Tecnológico de Canarias, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Cavallari, M. M., Forzza, R. C., Veasey, E. A., Zucchi, M. I. & Oliveira, G. C. X. 2006. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation* 15: 4357-4373.
- Cavers, S., Navarro, C. & Lowe, A. J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology* 12: 1451-1460.

- Colinvaux, P. A., de Oliveira, P. E., Moreno, J. E., Miller, M. C. & Bush, M. B. 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science* 274: 85-88.
- Collevatti, R. G., Grattapaglia, D. & Hay, J. D. 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology* 12: 105-115.
- Collevatti, R. G., Rabelo, S. G. & Vieira, R. F. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany* 104: 655-664.
- Conceição, A. A., Funch, L. S. & Pirani, J. R. 2007. Reproductive phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the “Chapada Diamantina”, northeastern Brazil: population and community analyses. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 475-485.
- Conceição, A. A., Rapini, A., Pirani, J. R., Giulietti, A. M., Harley, R. M., Silva, T. R. S., Santos, A. K. A., Cosme, C., Andrade, I. M., Costa, J. A. S., Souza, L. R. S., Andrade, M. J. G, Funch, R. R., Freitas, T. A., Freitas, A. M. M. & Oliveira, A. A. 2005. Campos rupestres. In: Jun-cá, F. A., Funch, L. & Rocha, W. (eds.), *Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 153-180.
- Conceição, A. A.; Pirani, J. R. & Meirelles, S. T. 2007. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of "Chapada Diamantina", Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 641-656.
- Conceição, A. S., Queiroz, L. P. & Borba, E. L. 2009. Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution* 271: 19-27.
- Costa, F. N. 2006. Three new species of *Actinocephalus* Sano (Eriocaulaceae) from Minas Gerais, Brazil. *Novon* 16: 212-215.
- Crandal, K. A., Bininda-Emonds, O. R. P., Mace, G. M. & Wayne, R. K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 290-295.

- Cronk, Q. C. B. 1998. The ochlopecies concept. In: Huxley, C. R., Lock, J. M. & Cutler, D. F. (eds.), *Chorology, taxonomy and ecology of the floras of Africa and Madagascar*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 155-170.
- Cruz, D. T. 2007. *Variabilidade genética e morfológica em populações de Cattleya elongata Barb. Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Diniz-Filho, J. A. F., Telles, M. P. C., Bonatto, S. L., Eizirik, E., Freitas, T. R. O., Marco Jr, P., Santos, F. R., Sole-Cava, A. & Soares, T. N. 2008. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography* 35: 753-763.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dutra, V. F., Garcia, F. C. P., Lima, H. C. & Queiroz, L. P. 2008. Diversidade florística de Leguminosae Adans. em áreas de campos rupestres. *Megadiversidade* 4: 117-125.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Feres, F., Zucchi, M. I., Souza, A. P., Amaral, M. C. E. & Bittrich, V. 2009. Phylogeographic studies of Brazilian “campo-rupestre” species: *Wunderlichia mirabilis* Riedel ex Baker (Asteraceae). *Biotemas* 22: 17-26.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA/CENARGEN, Brasília.
- Fluxus Technology Ltd. NETWORK 4.5.1.6. Software free available at: www.fluxus-engineering.com. Cambridge.
- Franceschinelli, E. V., Jacobi, C. M., Drummond, M. G. & Resende, M. F. S. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany* 97: 585-592.

- Frankham, R., Bollou, J. D & Briscoe, D. A. 2002. The broader context: population viability analysis (PVA). In: Frankham, R., Bollou, J. D & Briscoe, D. A. (eds.), *Introduction in conservation genetics*. Cambridge University Press, New York, pp. 502-528.
- Fraser, D. J. & Bernatchez, L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741-2752.
- Fu, Y. X. & Li, W. H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Giulietti, A. M. & Pirani, J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (eds.), *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 39-69.
- Giulietti, A. M., Pirani, J. R. & Harley, R. M. 1997. Espinhaço Range region - Eastern Brazil. In: Davis, S. D., Heywood, V. H., Herrera-MacBryde, O., Villa-Lobos, J. & Hamilton, A. C. (eds.), *Centres of Plant Diversity, a guide and strategy for their conservation*. IUCN Publications Unit, Cambridge, UK, pp. 397-404.
- Giulietti, A. M.; Harley, R. M.; Queiroz, L. P.; Wanderley, M. G. L. & Pirani, J. R. 2000. Caracterização e endemismo nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. In: Cavalcanti, T. B. & Walter, B. M. (eds.), *Tópicos atuais em Botânica*. SBB/EMBRAPA, Brasília, pp. 311-318.
- Goldblatt, P. & Poston, M. E. 1988. Observations on the chromosome cytology of Velloziaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 192-195.
- Gomes, V., Collevatti, R. G., Silveira, F. A. O. & Fernandes, G. W. 2004. The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. *Conservation Genetics* 5: 157-165.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. & Cosson, J. F. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261-1280.
- Guillot, G., Santos, F. & Estoup, A. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24: 1406-1407.

- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hamrick J. L. & Godt M. J. W. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. & Weir, B. S. (eds.), *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer, Sunderland, pp. 43-63.
- Hamrick, J. L. & Loveless, M. D. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: Estrada A. & Fleming, T. H. (eds.) *Frugivores and Seed Dispersal*, Junk Publisher, The Hague, Netherlands, pp. 211-223.
- Hardy, O. J. 2009. How fat is the tail? *Heredity* 103: 437-438.
- Harley, R. M. 1995. Introdução. In: Stannard, B.L. (ed.) *Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 43-78.
- Inda, L. A., Segarra-Moragues, J. G., Müller, J., Peterson, P. M. & Catalán, P. 2008. Dated historical biogeography of the temperate Loliinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 932-957.
- Jacobi, C. M. & del Sarto, M. C. L. 2007. Pollination of two species of *Vellozia* (Velloziaceae) from high-altitude quartzitic grasslands, Brazil. *Acta Botanica Brasiliensis* 21: 325-333.
- Jakob, S. S., Martinez-Meyer, E. & Blattner, F. R. 2009. Phylogeographic analyses and paleodistribution modeling indicate Pleistocene in situ survival of *Hordeum* species (Poaceae) in Southern Patagonia without genetic or spatial restriction. *Molecular Biology and Evolution* 26: 907-923.
- Jesus, F. F., Abreu, A. G., Semir, J. & Solferini, V. N. 2001. Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 277:187-196.
- Jesus, F. F., Abreu, A. G., Semir, J. & Solferini, V. N. 2009. Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 277:187-196.

- Jesus, F. F., Solferini, V. N., Semir, J. & Prado, P. I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 226: 59-68.
- Joly, A. B. 1970. *Conheça a vegetação brasileira*. EDUSP, São Paulo.
- Lage-Novaes, R. M., Lemos-Filho, J. P., Ribeiro, R. A. & Lovato, M. B. 2010. Phylogeography of *Plathymania reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* 19: 985-998.
- Lambert, S. M., Borba, E. L., Machado, M. C. & Andrade, S. C. S. 2006a. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany* 97: 389-403.
- Lambert, S. M., Machado, M. C. & Borba, E. L. 2006b. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus xalbicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in North-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21:93-108.
- Ledru, M. P. 1993. Late Quaternary environmental and climatic change in central Brazil. *Quaternary Research* 39: 90-98.
- Leme, E. M. C. & Funch, R. 1988. Bromeliads of the Chapada Diamantina National Park. *Journal of the Bromeliad Society* 38: 3-6.
- Lorenz-Lemke, A. P., Mäder, G., Muschner, V. C., Stehmann, J. R., Bonatto S. L., Solzano, F. M. & Freitas, L. B. 2006. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology* 15: 4487-4497.
- Lorenz-Lemke, A. P., Muschner, V. C., Bonatto S. L., Cervi, A. C., Solzano, F. M. & Freitas, L. B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany* 95: 799-806.
- Lousada, J. M., 2010. *Genética da conservação de duas espécies de Vellozia (Velloziaceae), V. gigantea e V. compacta, endêmicas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

- Lousada, J. M., Borba, E. L., Ribeiro, K. T., Ribeiro, L. C. & Lovato, M. B. No prelo. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with landscape in Espinhaço Range, southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica*.
- Loveless, M. D. & Hamrick, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Lüdtke, R., Agostini, G., Miotto, S. & Souza-Chies, T. 2010. Characterizing *Polygala* L. (Polygalaceae) species in Southern Brazil using ISSR. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 317-323.
- Machado, M. C. 2005. *O gênero Discocactus Pfeiff. (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil: variabilidade morfológica, variabilidade genética, taxonomia e conservação*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Manica-Cattani, M. F., Zacaria, J., Pauletti, G., Atti-Serafini, L. & Echeverrigaray, S. 2009. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology* 69: 375-380.
- Mello-Silva R. 1990. Morphological and anatomical differentiation of *Vellozia hirsuta* populations (Velloziaceae). *Plant Systematics and Evolution* 173: 197-208.
- Mello-Silva, R. 1996. Two new species of *Vellozia* (Velloziaceae) from Minas Gerais, Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 120: 257-263.
- Mello-Silva, R. 1999. Two new Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia gigantea* and a key to the related dracenoid species of *Vellozia*. *Novon* 9: 536-541.
- Mello-Silva, R. 2000. Partial cladistic analysis of *Vellozia* and characters for the phylogeny of Velloziaceae. In: Wilson, K. L. & Morrison, D. A. (eds.), *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne.
- Mello-Silva, R. 2005a. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 157-173.
- Mello-Silva, R. 2005b. Circumscribing *Vellozia hirsuta* and *V. tubiflora* (Velloziaceae). *Abstracts of the 17^o International Botanical Congress*. Viena, Áustria.
- Mello-Silva, R. 2008. Three new combinations in *Barbacenia* (Velloziaceae). *Neodiversity* 3: 1-2.

- Mello-Silva, R. No prelo. Circumscribing *Vellozia hirsuta* and *V. tubiflora* (Velloziaceae). *Hoehnea*.
- Menezes, N. L., Mello-Silva, R. & Mayo, S. J. 1994. Cladistic analysis of the Velloziaceae. *Kew Bulletin* 49: 71-92.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Nybom, H. & Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 93-114.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Oliveira, H. O. 2010. *Biosistemática de Cyrtopodium poecilum (Orchidaceae): biologia reprodutiva, isolamento reprodutivo e variabilidade genética*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Oliveira, L. O., Venturini, B. A., Rossi, A. A. B. & Hastenreiter, S. S. 2010. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetics and Molecular Biology* 33: 86-93.
- Oliveira, R. S. 2006. *Flora da Cadeia do Espinhaço: Zephyranthes Herb. & Habranthus Herb. (Amaryllidaceae)*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computational and Applied Biosciences* 12: 357-358.
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, G. M., Barbará, T., Bered, F. & Bodanese-Zanettini, M. H. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503-512.
- Panchal, M., 2007. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics* 23: 509-510.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2006. GenA1Ex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pena, M. A. 2009. *Florística de afloramentos rochosos na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Pereira, A. C. S., Borba, E. L. & Giulietti, A. M. 2007. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from

- the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 401-416.
- Petit, R. J. & Excoffier, L. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 386-393.
- Petit, R. J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J. L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J. P., Rendell, S. & Vendramin, G. G. 2003. Glacial refugia, hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1565-1565.
- Petit, R. J., Csaikl, U., Bordacs, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., Dam, B., Deans, J., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaza, I., Goicoechea, P., Jensen, J., König, A., Lowe, A., Madsen, S., Mátyás, G., Munro, R., Olalde, M., Pemonge, M.-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., Vries, S., Ziegenhagen, B. & Kremer, A. 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2,600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G. G., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 89-701.
- Petit, R. J., Latouche-Halle, C. & Wagner, D. B. 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 122-128.
- Pirani, J. R., Mello-Silva, R. & Giulietti, A. M. 2003. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21: 1-24.
- Prance, G. T. 1982. Forest refuges: evidence from wood Angiosperms. In: Prance, G. T. (ed.), *Biological diversification in the Tropics*. Chicago University Press, Chicago, pp. 137-157.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996. *The natural history of pollination*. Harper Collins, New York.

- Ramos, A. C. S., Lemos-Filho, J. P. & Lovato, M. B. 2009. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from cerrado. *Journal of Heredity* 100: 206-216.
- Ramos, A. C. S., Lemos-Filho, J. P., Ribeiro, R. A., Santos, F. R. & Lovato, M. B. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. *Annals of Botany* 100: 1219-1228.
- Rapini, A., Mello-Silva, R. & Kawasaki, M. L. 2001. Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 19: 55-169.
- Rapini, A., Mello-Silva, R. & Kawasaki, M. L. 2002. Richness and endemism in Asclepiadoideae (Apocynaceae) from the Espinhaço Range of Minas Gerais, Brazil – A conservationist view. *Biodiversity and Conservation* 11: 1733-1746.
- Rapini, A., Ribeiro, P. L., Lambert, S. & Pirani, J. R. 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 16-24.
- Ribeiro, P. L.; Borba, E. L.; Smidt, E. C.; Lambert, S. M.; Schnadelbach, A. S. & van den Berg, C. 2008. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian "campos rupestres": implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* 270: 109-137.
- Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359-389.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. DNASP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 9-10.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., Mello-Silva, R., van Sluys, M. A, Giannasi, D. E. & Price, R. A. 2001. Phylogenetic inference in Velloziaceae using chloroplast *trnL-F* sequences. *Systematic Botany* 26: 92-103.

- Salgado-Labouriau, M. L., Barberi, M., Ferraz-Vicentini, K. R. & Parizzi, M. G. 1998. A dry climatic event during the late Quaternary of tropical Brazil. *Review of Paleobotany and Palynology* 99: 115-129.
- Salgueiro, F., Felix, D., Caldas, J. F., Margis-Pinheiro, M. & Margis, R. 2004. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Diversity Distribution* 10: 201-210.
- Sano, P. T. 1998. *Paepalanthus humilis* Sano, a new species of Eriocaulaceae from Bahia State, Brazil. *Novon* 8: 298-300.
- Santos, M. F. 2009. *Análise florística em floresta estacional semidecidual na encosta leste da Serra do Cipó*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Sazima, M. & Sazima, I. 1990. Hummingbird pollination in two species of *Vellozia* (Liliiflorae: Velloziaceae) in Southeastern Brazil. *Botanica Acta* 103: 83-86.
- Sazima, M. 1978. *Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Shaw, J., Lickey, E. D., Schilling, E. E. & Small, R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Silva, J. R. S. 2008. *Variabilidade populacional de Cattleya pfisteri (Pabst & Senghas) van den Berg (Orchidaceae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Silva, R. M., Fernandes, G. W. & Lovato, M. B. 2007. Genetic variation in two *Chamaecrista* species (Leguminosae), one endangered and narrowly distributed and another widespread in the Serra do Espinhaço, Brazil. *Canadian Journal of Botany* 85: 629-636.
- Smith, L. B. & Ayensu, E. S. 1974. Classification of Old World Velloziaceae. *Kew Bulletin* 29: 181-205.
- Souza, H. A. V. & Lovato, M. B. 2010. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 49-56.

- Souza, V. C. & Lorenzi, H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Staden, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5: 233-241.
- Stehlik, I. 2002. Glacial history of the alpine herb *Rumex nivalis* (Polygonaceae): a comparison of common phylogeographic methods with Nested Clade Analysis. *American Journal of Botany* 89: 2007-2016.
- Stevens P. F. (2001 onwards). *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 6, May 2005 (and more or less continuously updated since) [http:// www.mobot.org /MOBOT/ research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/).
- Thormann, C. E., Ferreira, M. E., Camargo, L. E. A., Tivang, J. G. & Osborn T. C. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 973-980.
- Tremblay, R. L. 1997. Distribution and dispersion patterns of individuals in nine species of *Lepanthes* (Orchidaceae). *Biotropica* 29: 38-45.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. & Calvo, R. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *The Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54.
- Trovó, M. & Sano, P. T. 2010. *Actinocephalus verae* (Eriocaulaceae), a new species from the Brazilian Campos Rupestres. *Brittonia* 62: 35-38.
- Vekemans, X. 2002. *AFLP-SURV version 1.0*. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Viccini, L. F., Costa, D. C. S., Machado, M. A. & Campos, A. L. 2004. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution* 246: 1-8.
- Volz, S. M. & Renner, S. S. 2009. Phylogeography of the ancient Eurasian medicinal plant genus *Bryonia* (Cucurbitaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequences. *Taxon* 58: 550-560.
- Wang, Y.-L., Li, X., Guo, J., Guo, Z.-G., Li, S.-F. & Zhao, G.-F. 2010. Chloroplast DNA phylogeography of *Clintonia udensis* Trautv. & Mey. (Liliaceae) in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 721-732.

- White, F. 1998. The vegetative structure of African Ebenaceae and the evolution of rheophytes and ring species. In: Hopkins, H. C. F., Huxley, C. R., Pannell C. M., Prance, G. T. & White, F. *The biological monograph: the importance of field studies and functional syndromes for taxonomy and evolution of tropical plants*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 95-113.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. & Tingey S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods on Enzymology* 218: 704-740.
- Wolfe, A. D., Xiang, Q. Y. & Kephart, S. R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penetemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125.
- Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Yamaji, H., Fukuda, T., Yokoyama, J., Pak, J.-H., Zhou, C.-Z., Yang, C.-S. Kondo, K., Morota, T. Takeda, S., Sasaki, H. & Maki, M. 2007. Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 863-884.
- Zappi, D. C.; Lucas, E.; Stannard, B.; Lughadha, E. N.; Pirani, J. R.; Queiroz, L. P.; Atkins, S.; Hind, D. J. N.; Giulietti, A. M. & Harley, R. M. 2003. Lista das plantas vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21: 345-398.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.