

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais – PPGBTRN

Distribuição geográfica e variabilidade genética em
***Heliconia acuminata* na Amazônia Central**

RAFAEL SOARES DE ARRUDA

Manaus, Amazonas

Junho/2008

RAFAEL SOARES DE ARRUDA

**Distribuição geográfica e variabilidade genética em
Heliconia acuminata na Amazônia Central**

ORIENTADOR: WILLIAM ERNEST MAGNUSSON, Dr.

CO-ORIENTADORA: MARISTERRA RODRIGUES LEMES, Dra.

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Ecologia.

Manaus, Amazonas

Junho/2008

1 - Membros de Avaliação do Projeto de Doutorado

Membro	Instituição	Parecer
Flávia Costa, Dra.	INPA	Aprovado
Maristerra R. Lemes, Dra.	INPA	Aprovado
Tânia Sanaïotti, Dra.	INPA	Aprovado

2 - Membros de Avaliação de Aula de Qualificação

Membro	Instituição	Parecer
Antônio C. Webber, Dr.	UFAM	Aprovado
Flávia Costa, Dra.	INPA	Aprovado
Maria T. F. Piedade, Dra.	INPA	Aprovado
Maristerra R. Lemes, Dra.	INPA	Aprovado
Rogério Gribel, Dr.	INPA	Aprovado

3 – Membros de Avaliação da Tese

Membro	Instituição	Parecer
Emílio Bruna, Dr.	University of Florida	Revisão
Erich Fischer, Dr.	UFMS	Aprovado
Flávia Costa, Dra.	INPA	Aprovado
Henrique Nascimento, Dr.	INPA	Aprovado
Marina Anciães, Dra.	INPA	Aprovado
Rogério Gribel, Dr.	INPA	Revisão
Thomas Hrbek, Dr.	University of Puerto Rico	Aprovado

Ficha catalográfica

A779 Arruda, Rafael Soares de
Distribuição geográfica e variabilidade genética em *Heliconia acuminata* na Amazônia Central / Rafael Soares de Arruda
--- Manaus : [s.n.], 2008.
96 f. : il.

Tese (doutorado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2008
Orientador : William Ernest Magnusson
Co-orientador : Maristerra Rodrigues Lemes
Área de concentração: Ecologia

1. *Heliconia acuminata* – Distribuição geográfica. 2. Ecologia vegetal – Amazônia. 3. Marcadores moleculares. 4. Genética de populações. 5. Solos. I. Título.

CDD 19. ed. 584.210415

Sinopse:

A distribuição geográfica e a variabilidade genética em morfotipos de *Heliconia acuminata* foram estudadas na Amazônia. Foram determinadas as zonas de contato e a extensão da sobreposição na distribuição, bem como o grau de diferenciação genética entre os morfotipos de *H. acuminata*.

Palavras-chave:

Distribuição geográfica, ecologia vegetal, solos, marcadores moleculares, genética de populações

Dedico este trabalho a minha mãe, Hercília Magalhães,
e ao meu grande amor, Lucélia Nobre Carvalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à CAPES e IIEB (Programa BECA, B/2005/02/BDP/06, Gordon and Betty Moore Foundation) pela bolsa concedida, ao CNPQ (“Biodiversidade Amazônica: Distribuição, biomassa, conservação e utilização”, Processo 472799/03-7; “Distribuição da variabilidade genética de organismos amazônicos com potencial biotecnológico”, Processo 553997/2006-8). IBAMA, Programa ARPA, FNMA e YPÊ pelo apoio logístico e financeiro durante os trabalhos de campo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Ecologia (CPEC), Laboratório de Biologia Reprodutiva e Genética de Plantas (LABGEN) e Laboratório Temático de Solos e Plantas (LTSP) por todo o apoio logístico e financeiro.

Ao Bill Magnusson pela orientação, e por me abrir as portas para o mundo multivariado.

À Maristerra R. Lemes pela co-orientação segura, amizade e carinho com que me recebeu no laboratório de genética, mesmo sendo um aluno “que nunca havia segurado uma pipeta”. Apesar do árduo trabalho de bancada, foi um enorme prazer aprender um pouco de biologia molecular.

À Tânia Pimentel por me emprestar algumas horas de ensinamentos no laboratório de solos, e por ser uma pessoa especial, com o coração do tamanho do Universo.

Aos revisores pela avaliação da tese.

Ao motorista Lourival A. dos Santos pelo apoio logístico durante várias saídas de campo. Às secretárias Geise Pacheco, Beverly Franklin, Rose e Andressa S. de Melo, pela constante orientação com aspectos burocráticos, amizade e eficiência.

A todos os professores do curso de Ecologia que diretamente ou indiretamente acabaram participando da minha formação neste instituto de pesquisa.

Aos queridos companheiros do Laboratório de Comunidades, Domingos Rodrigues, Karl Mokross, Julio do Vale, Victor Pazin, Carolina Surgik, Viviane Layme, José Júlio Toledo, Carmozina Trindade, Maria Goretti Pinto e Pedro Ivo Simões, e agregados, Thiago Izzo, Thaise, Hélder, Murilo e Genimar pela troca de experiências, discussões, sugestões e amizade, bem como pelos divertidos bate-papo com café no intervalo do almoço, enquanto o Bill dormia.

Ao querido amigo Professor Jansen Zuanon, que mesmo não sendo diretamente ligado ao meu trabalho, foi um exemplo inspirador em vários momentos, de ética, profissionalismo e amizade, bem como pela confiança em mim depositada nas várias vezes em que colaborei na

disciplina de campo do Catalão e nas muitas discussões estatísticas. Espero um dia poder chegar perto do seu modelo de profissional.

A todos os amigos que foram surgindo durante o percurso deste trabalho, companheiros de boteco e serestas, amigos leais nos momentos de necessidade e alegria, e também amigos nos momentos em que embriagar a alma e o corpo eram tão necessários quanto ler um artigo da Ecological Monographs... André Galuch, Fernando Mendonça, Marcelo Menin, Alberto Akama, Vinicius, Domingos, Thiago, Viviane, Vitão, Rubens, Vitinha, Gislene Vilara, Leandro Sousa, Renata Frederico, Luiza, Lucélia, Luana, Fernando Madruga, Tatiana, Paulinho, Rafa Angrizani, José Júlio, Júlio do Vale e Ricardo Romero.

À querida amiga Renata Frederico pela confecção dos mapas que compõem esta tese.

Aos companheiros do laboratório de solos, Jonas, Orlando e Edvaldo pelos constantes ensinamentos na bancada e apoio até no momento de lavar toda a vidraria do trabalho da semana.

Aos amigos do laboratório de genética, Paulinho, Rafa Angrizani, Mahatma, Isabela, Gabriela, Érika, Joyce, Elisa, Carol, Milene e em especial a Tatiana pelos momentos de alegria e até nas tristezas, a convivência foi quase um casamento, mas um casamento que deu certo, muito obrigado pelo carinho, amizade e apoio para eu entender o microscópico mundo do DNA.

À toda minha família, em especial minha mãe, Hercília Magalhães, e irmãos Rodrigo Soares de Arruda e Roseane Soares de Arruda, meus exemplos máximos de vida.

Por fim, à minha querida Lucélia Nobre Carvalho, por todos os valores que me ensina, companheira de todas as horas, e por todo o amor incondicional e estímulo. Obrigado por fazer parte da minha vida e por deixá-la mais alegre e bonita.

“There is no part of natural history more interesting or instructive, than the study of the geographical distribution [...].”

Alfred Russel Wallace (Travels on the Amazon and Rio Negro, 1853).

RESUMO

Os objetivos principais deste trabalho foram determinar os potenciais limites geográficos de distribuição e as zonas de contato, bem como determinar os padrões de distribuição da variabilidade genética entre morfotipos de *Heliconia acuminata* (Heliconiaceae) na Amazônia. Esta espécie apresenta ampla variabilidade fenotípica sendo encontrados cinco morfotipos diferenciados principalmente quanto à forma e coloração de suas flores e inflorescências. Observações preliminares indicaram que estes morfotipos não co-ocorrem localmente. Análises de solo foram realizadas para determinar se a segregação local poderia ser função do tipo de solo. Além disso, foram empregados marcadores moleculares do genoma do cloroplasto para determinar o grau de diferenciação genética entre estes morfotipos. Por meio de rodovias que partem de Manaus nos sentidos Norte, Sul, Leste e Oeste, foram determinadas as zonas de contato e mapeadas a distribuição dos morfotipos de *H. acuminata*. Estes morfotipos se distribuem em manchas com pouca sobreposição. Além disso, a distribuição dos morfotipos não está associada a fortes disjunções nos tipos de solo nas zonas de contato, porque há sobreposição dos morfotipos no espaço multivariado que representa solos. Porém, dados de microssatélites do cloroplasto e de sequências de regiões não-codificadoras do DNA do cloroplasto indicaram significativa diferenciação genética e reduzido fluxo gênico entre estes morfotipos de *H. acuminata*. O morfotipo verde e laranja foi o mais diferenciado de todos os outros morfotipos, sugerindo poder já ser considerado espécie diferente dentro do complexo *H. acuminata*.

ABSTRACT

The main objectives of this study were to determine the potential limits of geographical distribution and contact zones, and distribution patterns of genetic variability among morphotypes of *Heliconia acuminata* (Heliconiaceae) in the Amazon region. This species presents wide phenotypic variability among the five recognized morphotypes, differentiated primarily on the shape and color of its flowers and inflorescences. Preliminary observations indicated that morphotypes do not co-occur locally. Analysis of soil data was carried out to determine whether the local segregation could be explained by soil type, and molecular markers from the chloroplast genome was used to determine the degree of genetic differentiation among morphotypes. Through roads departing from Manaus due North, South, East and Westward, it was possible to determine contact zones and map the distribution of morphotypes for *H. acuminata*. These morphotypes are distributed in patches with little overlap. Additionally, the distribution of morphotypes was not associated with major disjunctions in soil types across contact zones, as all morphotypes occur in the same region in the multivariate soil space. However, chloroplast microsatellites and sequences data from non-coding regions of the chloroplast DNA revealed significant genetic differentiation and reduced gene flow among morphotypes. The morphotypes with green bracts and orange flowers was the most different of all other morphotypes, suggesting could be considered different species within the complex *H. acuminata*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Distribuição Espacial em Manchas de Morfotipos de *Heliconia acuminata* (Heliconiaceae) na Amazônia Central

Tabela 1. Sumário das estatísticas descritivas das variáveis de solo medidas para os quatro morfotipos de *Heliconia acuminata*. 26

Tabela 2. Correlações entre as 13 variáveis edáficas com dois eixos de ordenação produzidos pela Análise de Componentes Principais para as variáveis de solo medidas para os quatro morfotipos de *Heliconia acuminata*. Em negrito, valores de correlação acima de 0,6. 32

CAPÍTULO 2: Variabilidade genética em morfotipos de *Heliconia acuminata* A. Rich. (Heliconiaceae) na Amazônia Central, Brasil

Tabela 1. Características dos oito locos microssatélites e de dois marcadores de regiões não-codificadoras do genoma de cloroplasto de *Heliconia acuminata*. TA: Temperatura de anelamento. Referências: *Weisinger & Gardner, 1999; **Steane et al., 2005; ***Hamilton, 1999. 58

Tabela 2. Diversidade genética estimada para as populações de *Heliconia acuminata* com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto. N: número total de indivíduos em cada população; He: diversidade genética. Denominações das siglas das populações como na Fig. 2. 58

Tabela 3. Haplótipos observados na análise de oito locos microssatélites em 12 populações de *Heliconia acuminata*. Hap: haplótipos; N: número de indivíduos. 60

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base na análise de oito locos cpSSR e sequências do cpDNA para as populações amostradas de *Heliconia acuminata*. 63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Distribuição Espacial em Manchas de Morfotipos de *Heliconia acuminata* (Heliconiaceae) na Amazônia Central

- Figura 1. Os morfotipos de *Heliconia acuminata* encontrados na Amazônia Central. (A) Vermelho e branco - VMB, (B) Vermelho e laranja - VML, (C) Vermelho e amarelo – VMA, e (D) Verde e laranja - VDL. 23
- Figura 2. Localização da área de estudo na Amazônia Central, nos Estados do Amazonas (cidades de Manaus e Presidente Figueiredo), Roraima (município de Pacaraima), Pará (município de Santarém) e Rondônia (cidade de Porto Velho). As coordenadas geográficas específicas da cada ponto estão em Material e Métodos. Os pontos brancos correspondem às ocorrências do morfotipo VMB, pontos laranja ao morfotipo VML, pontos amarelos ao VMA e pontos verdes ao morfotipo VDL. Cada ponto no mapa representa um conjunto de indivíduos. 29
- Figura 3. Localização das manchas de distribuição dos morfotipos de *Heliconia acuminata* na Amazônia Central. (A) Coletas realizadas na região de Manaus, (B) e Presidente Figueiredo e (C) Itacoatiara. As coletas mais distantes foram realizadas em (D) Porto Velho, Estado de Rondônia, (E) Pacaraima, Estado de Roraima, e Santarém, Estrado do Pará. Os pontos representam na maioria coletas individuais. Os pontos brancos correspondem às ocorrências do morfotipo VMB, pontos laranja ao morfotipo VML, pontos amarelos ao VMA e pontos verdes ao morfotipo VDL. 30
- Figura 4. Distribuição dos morfotipos de *Heliconia acuminata* ao longo dos scores do primeiro e segundo componentes principais usando como variáveis as características edáficas dos locais de ocorrência dos morfotipos VMB (B), VML (L), VMA (A) e VDL (V). O primeiro eixo foi principalmente correlacionado com fertilidade, e o segundo eixo com granulometria. 33
- Figura 5. Representação linear das zonas de contato (linha vertical pontilhada) entre os morfotipos VMB (pontos abertos) e VML (pontos fechados) de *H. acuminata* entre Presidente Figueiredo e vila de Balbina (A), e entre Manaus e Itacoatiara (B). Pontos representam o primeiro e segundo componente principal de ordenação dos dados de solo. 33

CAPÍTULO 2: Variabilidade genética em morfotipos de *Heliconia acuminata* A. Rich. (Heliconiaceae) na Amazônia Central, Brasil

Figura 1. Os morfotipos de *Heliconia acuminata* encontrados na Amazônia Central. (A) Vermelho e branco, (B) Vermelho e laranja, (C) Vermelho e amarelo, (D) Verde e laranja, e (E) Amarelo. 48

Figura 2. Localização dos pontos de coleta das populações dos morfotipos de *Heliconia acuminata*. 1 – VMB1 (Morfotipo vermelho e branco, rio Madeira); 2 – VMB2 (AM-070); 3 – VMB3 (Reserva Ducke); 4 – VMA1 (Morfotipo vermelho e amarelo, rio Madeira); 5 – VMA2 (BR-319); 6 – VML1 (Morfotipo vermelho e laranja, rio Madeira); 7 – VML2 (Faz. Santa Maria); 8 – VDL1 (Morfotipo verde e laranja, Pacaraima); 9 – VDL2 (Jundiá); 10 – VDL3 (Novo Airão); 11 – VDL4 (Faz. OPV); 12 – AMA1 (Morfotipo amarelo, Borba). 52

Figura 3. Quantificação do DNA genômico total extraído de amostras de *Heliconia acuminata*. As colunas de 1 a 3 indicam, respectivamente os marcadores de peso molecular 50, 100 e 200 ng. Nas colunas de 4 a 14, as bandas correspondem ao DNA extraídos de 11 indivíduos de *H. acuminata*. 4 e 5: morfotipo vermelho e amarelo (população 4); 6 e 7: morfotipo vermelho e branco (população 1); 8 a 14: morfotipo verde e laranja (população 7). Legendas das populações estão na Figura 2. 56

Figura 4. Fragmentos amplificados a partir da análise de oito locos cpSSR de *Heliconia acuminata*. A coluna M apresenta o marcador *1 Kb plus DNA ladder*, as colunas 1 a 5 apresentam fragmentos de DNA amplificados de diferentes indivíduos de *H. acuminata*. A) *ccmp2*, B) *ccmp3*, C) *ccmp4*, D) *ccmp5*, E) *ccmp6*, F) *ccmp7*, G) *ccmp10*, H) *emcrc67*. 59

Figura 5. Eletroferogramas mostrando alelos de dois locos microssatélites amplificados para quatro indivíduos de *Heliconia acuminata*. O tamanho dos alelos é indicado na barra superior em número de pares de base. A) Variação no tamanho de *ccmp 7*. B) Variação no tamanho de *emcrc 67*. 61

Figura 6. Frequência de haplótipos observados na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de *Heliconia acuminata*. Legendas das populações como na Fig. 2. 62

Figura 7. Relação entre distância genética de Reynolds e distância geográfica (km) para 12 populações *Heliconia acuminata*, com base na variação observada em oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto. 62

- Figura 8. Relações entre haplótipos a partir de análise de rede (*Network*), com base na variação de oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *Heliconia acuminata*. Cada círculo colorido refere-se a um haplótipo. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de ocorrência do haplótipo. As linhas representam as relações entre os haplótipos e os números, quando presentes, representam o número de mutações entre eles. Linhas que não apresentam números possuem uma única mutação. As diferentes cores referem-se a representação das populações nos haplótipos (legendas na Figura 2). 64
- Figura 9. Fragmentos amplificados a partir da análise de duas regiões não-codificadoras do cpDNA de *Heliconia acuminata*. A coluna M apresenta o marcador *1 Kb plus DNA ladder*, as colunas 1 a 5 apresentam fragmentos de DNA amplificados de diferentes indivíduos de *H. acuminata*. A) *trnH/psbA*, B) *psbB/psbF*. 65
- Figura 10. Alinhamento de sequências do genoma do cpDNA da região *trnH/psbA* de *Heliconia acuminata*. A) inserção/deleção, e B) duas substituições nucleotídicas evidenciadas pelas linhas negras. 66
- Figura 11. Relações entre os haplótipos (A) apenas com substituições nucleotídicas e (B) com inserções/deleções, obtidos a partir da análise das sequências do espaçador intergênico *trnH/psbA* do genoma do cloroplasto de *Heliconia acuminata*. Cada círculo se refere a um haplótipo. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de ocorrência do haplótipo. As linhas representam as relações entre os haplótipos. Os números pretos representam o local da substituição nucleotídica na sequência, e os números em vermelho o local da mutação. Como as mutações ocorreram em regiões próximas, a linha pontilhada representa uma relação possivelmente inexistente. As cores mostram as populações que apresentam aquele haplótipo (legendas na Figura 2). Nodos brancos representam *median vectors*. 67

SUMÁRIO

Agradecimentos	vi
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Introdução Geral	1
Objetivos Gerais	19
CAPÍTULO 1: Distribuição Espacial em Manchas de Morfotipos de <i>Heliconia acuminata</i> (Heliconiaceae) na Amazônia Central	21
Métodos	24
Área de estudo	24
Coleta de dados	24
Análises de solo	25
Análise dos dados	27
Resultados	28
Discussão	31
Literatura Citada	36
CAPÍTULO 2: Variabilidade genética em morfotipos de <i>Heliconia acuminata</i> A. Rich. (Heliconiaceae) na Amazônia Central, Brasil	45
Introdução	46
Material e Métodos	51
Coleta do material	51
Extração e quantificação do DNA	51
Amplificação e análise de locos microssatélites do genoma do cloroplasto (cpDNA)	51
Amplificação de regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto (cpDNA)	53
Sequenciamento e análise do DNA	54
Análise de dados	55
Resultados	56
Extração do DNA	56
Microssatélites	56
Sequências do cpDNA	64
Discussão	67
Referências	73
Conclusões Gerais	82

INTRODUÇÃO GERAL

Especiação ocorre com a separação de populações de plantas ou animais, originalmente aptas a entrecruzar, em unidades evolucionárias independentes. Especiação simpátrica ocorre quando populações pertencentes ao mesmo limite geográfico sofrem mutações no genoma ou passam a exibir diferenças ecológicas (Dieckmann & Doebeli 1999, Higashi *et al.* 1999, Kondrashov & Kondrashov 1999). A possibilidade de ocorrência de especiação simpátrica (surgimento de espécies sem isolamento geográfico) tem sido frequentemente desprezada (Dieckmann & Doebeli 1999). Recentes evidências mostram que especiação simpátrica pode ocorrer devido à divergência adaptativa ao longo de gradientes ambientais (Dieckmann & Doebeli 1999, Kondrashov & Kondrashov 1999, Schluter 2001, Ogden & Thorpe 2002, Doebeli & Dieckmann 2003, Schulman *et al.* 2004, Fine *et al.* 2005, Savolainen *et al.* 2006, Ryan *et al.* 2007). Na especiação alopátrica ocorre a formação de novas espécies como resultado de separação geográfica ou fragmentação da população intercruzante. Especiação alopátrica é considerado um dos principais modos de especiação geográfica na natureza (Mayr 1942, Futuyma & Mayer 1980, Futuyma 1998). De acordo com o modelo de especiação geográfica, uma população é dividida em duas ou mais sub-populações como resultado da formação de barreiras geográficas, o que evita o fluxo gênico entre as sub-populações e facilita a ocorrência de divergência suficiente para formar espécies distintas.

Algumas hipóteses relacionam eventos geoclimáticos pretéritos ocorridos na Amazônia para explicar o grande número de espécies encontrado na região, assim como os padrões de distribuição das espécies e endemismos (revisão em Haffer & Prance 2001). No final do Plioceno e do Pleistoceno a América do Sul foi marcada por mudanças nos ciclos climáticos de temperatura e umidade (Hooghiemstra & Ran 1994). As respostas da vegetação

a estas mudanças climáticas, de calor e úmido para frio e seco, ainda não são totalmente conhecidas, e o quanto estas mudanças influenciaram a distribuição de florestas e savanas no continente é objeto de contínuas discussões (van der Hammen 1974, Bush *et al.* 1990, Colinvaux *et al.* 1996, van der Hammen & Hooghiemstra 2000, Colinvaux & De Oliveira 2001). A hipótese de fragmentação da Floresta Amazônica (Haffer 1969) parece um modelo atrativo para ocorrência de especiação alopátrica, e conseqüente biodiversidade. Tuomisto & Ruokolainen (1997) ressaltaram que, além do modelo histórico, é necessário um completo e atual entendimento ecológico e ambiental, para avaliar o papel de fatores ecológicos na biodiversidade e biogeografia da Amazônia. Mesmo sendo ainda um assunto controverso, as mudanças climáticas ocorridas no Quaternário podem ter influenciado as taxas de especiação em vários grupos de organismos (Oliveira & Daly 1999).

Em vários estudos biogeográficos, a região de Manaus é indicada como um lugar onde os limites de distribuição de muitas espécies vegetais coincidem (Prance 1994a, b; Oliveira & Daly 1999). A diversidade alfa de árvores encontradas na região de Manaus está entre as maiores registradas para parcelas de um hectare na Amazônia (Oliveira & Daly 1999, Oliveira & Mori 1999). Oliveira & Daly (1999) discutiram alguns fatores geográficos e edáficos que podem explicar porque Manaus representa um limite distribucional para muitas taxa de plantas e animais. Primeiro, Manaus está localizada na confluência de três grandes rios, que podem funcionar como barreiras para a dispersão (veja Ayres & Clutton-Brock 1992), ou funcionar como barreiras para o fluxo gênico entre as populações. Segundo, há uma marcada diferença nos solos de cada lado do rio Solimões próximo a Manaus, e isto pode influenciar a distribuição geográfica de espécies especialistas edáficas.

Heliconia acuminata L. C. Rich. é uma espécie herbácea, hermafrodita e auto-incompatível, encontrada em florestas não inundáveis da Amazônia Central (Berry & Kress, 1991, Kress *et al.* 1999). Os fatores geográficos e edáficos acima mencionados podem ter

influenciado e levado à diferenciação de *H. acuminata* em morfotipos distintos que se distinguem pela coloração e morfologia da flor. Alguns destes morfotipos podem ser espécies distintas. As variedades têm distribuições extensas, mas observações preliminares indicaram que estes morfotipos de *H. acuminata* não co-ocorrem localmente. Se esta distribuição é resultado de especialização de habitat, barreiras geográficas ou amostragem inadequada ainda não está claro. De modo geral, a taxonomia de *Heliconia* (Heliconiaceae) ainda está incerta. Estimativas do número de espécies no gênero variam de 120 para mais de 400 espécies, mas uma estimativa mais conservadora indica um número entre 200 a 250 espécies (Kress 1990). No Brasil existem 37 espécies, e as duas áreas principais de ocorrência de espécies do gênero são a Floresta Atlântica, com cerca de 20 espécies, e a Floresta Amazônica, com cerca de 21 espécies, sendo muitas espécies endêmicas em uma ou outra destas regiões (Kress 1990).

Levantamentos detalhados da distribuição de cada morfotipo de *H. acuminata* na Amazônia ainda não são viáveis devido a restrições logísticas e financeiras. Entretanto, quatro morfotipos ocorrerem na região de Manaus, e as rodovias que se estendem a norte, sul, leste e oeste permitem uma amostragem detalhada das suas zonas de contato. Nesta região, os rios Solimões, Negro e Amazonas constituem potenciais barreiras geográficas na distribuição de *H. acuminata*, como postulado para espécies animais (*e.g.* primatas: Ayres & Clutton-Brock 1992, Peres *et al.* 1996, Roosmalen *et al.* 1998, 2002; aves: Hayes & Sewlal 2004; e anfíbios: Simões *et al.*, 2008). Adicionalmente, tipos de solo distintos que poderiam estar associados com especialização edáfica podem ser encontrados ao longo das rodovias. Deste modo o principal objetivo desta parte do trabalho apresentada no capítulo 1, foi determinar os potenciais limites geográficos de distribuição de quatro morfotipos de *H. acuminata*. Neste capítulo são discutidos os resultados sobre a distribuição em manchas dos morfotipos, e extensão da sua sobreposição nas suas zonas de contato.

O estabelecimento de limites taxonômicos precisos entre espécies é uma etapa fundamental para o planejamento de estratégias efetivas de conservação e uso da biodiversidade (Blackmore 2002, Ronquist & Gärdenfors 2003, Krell 2004). As helicônias possuem forte apelo comercial como plantas ornamentais, ocupando posição de destaque no mercado das exportações brasileiras (Junqueira & Peetz 2007). Entretanto, as espécies amazônicas de *Heliconia* não contribuem para este mercado, fato que pode estar associado à falta de iniciativa regional para este fim. A caracterização taxonômica de algumas espécies comerciais de helicônias vem sendo realizada com a finalidade de separar complexos de variedades entre espécies (Kumar *et al.* 1998; Sheela *et al.* 2006).

Os avanços na biologia molecular e suas aplicações no estudo de populações têm recentemente dado a oportunidade de explorar a extensão e distribuição da variabilidade genética dentro das espécies de plantas (Ennos 1999). Quando estes dados são discutidos com base na teoria da genética de populações, torna-se possível fazer inferências sobre os processos evolucionários e ecológicos que moldam a estrutura genética observada (Avice 1994, Ennos 1999). A estrutura genética de populações tem sido objeto de estudo de um crescente número de pesquisadores, particularmente os que combinam elementos de biologia evolucionária com ecologia (Frankham 1995, Lee 2002, Erickson *et al.* 2004). Então, o estudo de mecanismos ecológicos que afetam a estrutura e variabilidade genética em populações de plantas, pode ser importante para a compreensão de seu papel na distribuição geográfica de espécies vegetais.

As análises de polimorfismo em DNA mitocondrial têm sido extensivamente utilizadas para inferir relações em genética de populações e para estudos filogenéticos em animais, devido ao modo de herança uniparental, e ausência de recombinação (Avice *et al.* 1987, 1989, Moritz *et al.* 1987, Harrison 1989). Entretanto, em genoma mitocondrial de plantas, o baixo nível de substituição de nucleotídeos, aliado a uma alta frequência de

recombinação intramolecular, tem restringido o uso de DNA mitocondrial em estudos filogenéticos e de sistemática (Wolfe *et al.* 1987, Palmer *et al.* 1992). O DNA do cloroplasto não sofre recombinação, mas a baixa taxa de substituição de nucleotídeos tem limitado a sua utilização (Soltis *et al.* 1992, McCauley 1995). A descoberta das Sequências Simples Repetidas (SSR-Simple Sequence Repeats, revisão em Powell *et al.* 1996), no genoma do cloroplasto das plantas proporcionou novas oportunidades de estudos em genética de populações e sistemática em plantas (Powell *et al.* 1995, 1996, Provan *et al.* 1999a).

Marcadores moleculares têm sido utilizados para investigar variabilidade genética em espécies vegetais que apresentam diferenças morfológicas (Wilde *et al.* 1992, Yu & Pauls 1993, Lashermes *et al.* 1996, Lee *et al.* 1996, Schierenbeck *et al.* 1997, Heaton *et al.* 1999). Para determinar se a variação na coloração das flores e inflorescências em *H. acuminata* é acompanhada de diferenciação genética, serão utilizados os microssatélites do cloroplasto. Microssatélites têm sido amplamente usados como marcadores moleculares em análises de genética de populações em plantas (Powell *et al.* 1995, Collevatti *et al.* 2001, 2003; Provan *et al.* 2001, Balloux & Lugon-Moulin 2002, Lemes *et al.* 2003, 2007; Lira *et al.* 2003, Novick *et al.* 2003, Erickson *et al.* 2004, Ohsawa *et al.* 2008). As vantagens de se utilizar os marcadores microssatélites resultam de sua relativa abundância nos genomas de eucariotos, altos níveis de diversidade alélica, taxa de evolução rápida e facilidade de utilização desses marcadores via PCR (Polimerase Chain Reaction) (Provan *et al.* 1999b). Outra forma de detecção de variação em estudos genéticos ocorre por meio da identificação de polimorfismos diretamente nas sequências de nucleotídeos em regiões específicas do DNA (Ferreira & Grattapaglia 1996).

A combinação do uso de marcadores que permitam acessar regiões mais variáveis do genoma do cloroplasto (cpDNA) como os microssatélites; e os polimorfismos de nucleotídeos em sequências de regiões não-codificadoras mais conservadas podem fornecer evidências que permitam melhor diferenciar os morfotipos de *H. acuminata* e estabelecer as relações

taxonômicas entre eles. Recentemente, o uso de marcadores de regiões não-codificadoras dos genomas, tanto em plantas quanto em animais tem aumentado no campo da taxonomia, principalmente para identificação de sequências únicas na determinação de espécies (Hebert *et al.* 2003a, 2003b, 2004a, 2004b; Will & Rubinoff 2004; Kress *et al.* 2005; Savolainen *et al.* 2005; Rubinoff *et al.* 2006; Hajibabaei *et al.* 2007). Esta técnica conhecida como DNA Barcode tem sido usada como importante ferramenta da taxonomia para auxílio na identificação de espécies (Dasmahapatra & Mallet 2006, Kress & Erickson 2007, Pennisi 2007, Lahaye *et al.* 2008). Kress & Erickson (2007) propõem a utilização da região do DNA que compreende o espaçador entre os genes *trnH* e *psbA* situados no genoma do cloroplasto das plantas, bem como do espaçador intergênico ITS situado no genoma nuclear, como marcadores principais de DNA Barcode em plantas, pela alta variabilidade apresentada por esses marcadores, em comparação a outros marcadores moleculares utilizados em sistemática molecular de plantas (Kress *et al.* 2005). Deste modo o principal objetivo desta parte do trabalho apresentada no capítulo 2, foi determinar os padrões de distribuição da variabilidade genética nos morfotipos de *H. acuminata*, com base na análise da variação encontrada em oito locos microssatélites bem como em sequências do espaçador intergênico *trnH/psbA* do genoma do cloroplasto, visando determinar o grau de diferenciação genética entre esses morfotipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. New York, Chapman and Hall.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E. Lamb, T., Neigel, J. E. *et al.* 1987. Intraspecific phylogeography – the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J. C., Bowen, B. W. & Lamb, T. 1989. DNA fingerprints from hypervariable mitochondrial genotypes. *Molecular Biology and Evolution* 6: 258-269.
- Ayres, J. M. & Clutton-Brock, T. H. 1992. River boundaries and species size in Amazonian primates. *American Naturalist* 140: 531-537.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- Berry, F. & Kress, W. J. 1991. *Heliconia*: an identification guide. Washington D. C., Smithsonian Institution Press.
- Blackmore S. 2002. Biodiversity update – progress in taxonomy. *Science* 298: 365.
- Bush, M. B., Colinvaux, P. A., Wiemann, M. C., Piperno, D. R. & Liu, K-B. 1990. Late Pleistocene temperature depression and vegetation change in Ecuadorian Amazonia. *Quaternary Research* 34: 330-345.
- Colinvaux, P. A. & De Oliveira, P. E. 2001. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 166: 51-63.

- 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. O., Grattapaglia, D. & Hay, J. D. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349-356.
- Collevatti, R. O., 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.
- Dasmahapatra, K. K. & Mallet, J. 2006. DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 97: 254-255.
- Dieckmann, U. & Doebeli, M. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400: 354-357.
- Doebeli, M., & Dieckmann, U. 2003. Speciation along environmental gradients. *Nature* 421: 259-264.
- Ennos, R. A., Sinclair, W. T., Hu, X-S. & Langdon, A. 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: Hollingsworth, P. M., Bateman, R. M. & Gornall, R. J. (eds.). *Molecular systematics and plant evolution*. London, Taylor & Francis. 1-19 pp.
- Erickson, D. L., Hamrick, J. L. & Kochert, G. D. 2004. Ecological determinants of genetic diversity in an expanding population of the shrub *Myrica cerifera*. *Molecular Ecology* 13: 1655-1664.

- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN.
- Fine, P. V. A., Daly, D. C., Muñoz, G. V., Mesones, I. & Cameron, K. M. 2005. The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon. *Evolution* 59: 1464-1478.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 305-327.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sunderland, Sinauer Associates.
- Futuyma, D. J. & Mayer, G. C. 1980. Non-allopatric speciation in animals. *Systematic Zoology* 29: 254-271.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Haffer, J. & Prance, G. T. 2001. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana* 16: 579-607.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167-172.
- Harrison, R. G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 6-11.
- Hayes, F. E. & Sewlal, J. N. 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography* 31: 1809-1818.
- Heaton, H. J., Whitkus, R. & Gómez-Pompa, A. 1999. Extreme ecological and phenotypic differences in the tropical tree chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) are not matched by genetic divergence: a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Molecular Ecology* 8: 627-632.

- Hebert, P. D. N., Cywinska, N. A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812-14817.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(suppl.): S96-S99.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: e312.
- Higashi, M., Takimoto, G. & Yamamura, N. 1999. Sympatric speciation by sexual selection. *Nature* 402: 523-526.
- Hooghiemstra, H. & Ran, E. T. H. 1994. Late Pliocene-Pleistocene high resolution pollen sequence of Colombia: an overview of climatic change. *Quat. Int.* 21: 63-80.
- Junqueira, A. H. & Peetz, M. S. 2007. Las exportaciones brasileñas de flores y plantas crecen más del 124% entre 2001 y 2006. *Revista Horticultura Internacional* 56: 76-79.
- Kondrashov, A. S. & Kondrashov, F. A. 1999. Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature* 400: 351-354.
- Krell, F.-T. 2004. Parataxonomy vs. taxonomy in biodiversity studies – pitfalls and applicability of “morphospecies” sorting. *Biodiversity and Conservation* 13: 795-812.
- Kress, W. J. 1990. The diversity and distribution of *Heliconia* (Heliconiaceae) in Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 4: 159-167.

- Kress, W. J., Betancur, J & Echeverry, B. 1999. *Heliconias - Llamaradas de la selva colombiana*. Cristina Uribe Editores, Bogota. 200pp.
- Kress, W. J. & Erickson, D. L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH/psbA* spacer region. *PLoS One* 6: e508.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. & Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8369-8374.
- Kumar, P. P., Yau J. C. K. & Jin-Goh C. 1998. Genetic analyses of *Heliconia* species and cultivars with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of American Society of Horticultural Sciences* 123: 91-97.
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T. G. & Savolainen, V. 2008 DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2923-2928.
- Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F., Combes, M. C. & Charrier, A. 1996. Genetic diversity for RADP markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica* 87: 59-64.
- Lee, C. E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 386-391.
- Lee, D., Reeves, J. C. & Cooke, R. J. 1996. DNA profiling and plant variety registration: 1. The use of random amplified DNA polymorphisms to discriminate between varieties of oilseed rape. *Electrophoresis* 17: 261-265.

- Lemes, M. R., Gribel, R., Proctor, J. & Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology* 12: 2875-2883.
- Lemes, M. R., Grattapaglia, D., Grogan, J., Proctor, J. & Gribel, R. 2007. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. *Plant Ecology* 192: 169-180.
- Lira, C. F., Cardoso, S. R. S., Ferreira, P. C. G., Cardoso, M. A. & Provan, J. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology* 12: 3219-3225.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In *Species: The units of biodiversity* (Claridge, M.F., Dawah, H.A. & Wilson, M.R., Eds.). pp 381-424. Chapman & Hall, London.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. New York, Columbia University Press.
- McCauley, D. E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 198-202.
- Moritz, C., Dowling, T. E. & Brown, W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA – relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292.
- Novick, R. R., Dick, C. W., Lemes, M. R., Navarro, C., Caccone, A. & Bermingham, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 2885-2893.
- Ogden, R. & Thorpe R. S. 2002. Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 99: 13612-13615.

- Ohsawa, T., Saito, Y., Sawada, H. & Ide, Y. 2008. Impact of altitude and topography on the genetic diversity of *Quercus serrata* populations in the Chichibu Mountains, central Japan. *Flora* 203: 187-196.
- Oliveira, A. A. & Daly, D. C. 1999. Geographic distribution of tree species occurring in the region of Manaus, Brazil: implications for regional diversity and conservation. *Biodiversity and Conservation* 8: 1245-1259.
- Oliveira, A. A. & Mori, S. A. 1999. A central Amazonian terra firme Forest: I. High tree species richness on poor soils. *Biodiversity and Conservation* 8: 1205-1230.
- Palmer, J. D., Soltis, D. E. & Soltis, P. S. 1992. Large size and complex structure of mitochondrial DNA in 2 nonflowering land plants. *Current Genetics* 21: 125-129.
- Pennisi, E. 2007. Wanted: a barcode for plants. *Science* 318: 190-191.
- Peres, C. A., Patton, J. L. & Silva, M. N. F. 1996. Riverine barriers and gene flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. *Folia Primatologica* 67: 113-124.
- Powell, W., Machray, G. & Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1: 215-222.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., McNicol, J. W., Machray, G. C., Doyle, J. J., Tingey, S. V. & Rafalski, J. A. 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* 5: 1023-1029.
- Prance, G. T. 1994a. The use of phytogeographic data for conservation planning. In: Forey, P. L., Humphries, C. J. & Vane-Wright, R. I. (eds.). *Systematics and Conservation Evaluation* (Systematic Association Special Vol. 50). Oxford, Clarendon Press. 145-163 pp.

- Prance, G. T. 1994b. A comparison of the efficacy of higher taxa and species number in the assessment of biodiversity in the neotropics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 345: 89-99.
- Provan J., Powell W. & Hollingsworth, P. M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 142-147.
- Provan, J., Russel, J. R., Booth, A. & Powell, W. 1999a. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Molecular Ecology* 8: 505-511.
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N. J., McNicol, J. W., Morgante, M. & Powell, W. 1999b. The use of uniparentally inherited simple sequence repeat markers in plant population studies and systematics. In: Hollingsworth, P. M., Bateman, R. M. & Gornall, R. J. (eds.). *Molecular systematics and plant evolution*. London, Taylor & Francis. 35-50 pp.
- Ronquist, F. & Gärdenfors, U. 2003. Taxonomy and biodiversity inventories: time to deliver. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 269-270.
- Roosmalen, M. G. M., Roosmalen, T., Mittermeier, R. A. & Fonseca, G. A. B. 1998. A new and distinctive species of marmoset (Callitrichidae, Primates) from the lower river Aripuanã, State of Amazonas, central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia* 22: 1-27.
- Roosmalen, M. G. M., Roosmalen, T., Mittermeier, R. A. & Fonseca, G. A. B. 2002. A taxonomic review of the Titi Monkeys, genus *Calicebus*, Tomas, 1903, with the description of two new species, *Calicebus bernhardi* and *Calicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotropical Primates* 10: 1-52.
- Rubinoff, D., Cameron, S. & Will, K. 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends in Ecology and Evolution* 21: 1-2.
- Ryan, P. G., Bloomer, P., Moloney, C. L., Grant, T. J. & Delpont, W. 2007. Ecological speciation in South Atlantic island finches. *Science* 315: 1420-1423.

- Savolainen, V., Anstett, M.-C., Lexer, C., Hutton, I., Clarkson, J. J., Norup, M. V., Powell, M. P., Springate, D., Salamin, N. & Baker, W. J. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* 441: 210-213.
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. & Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360: 1850-1811.
- Schierenbeck, K. A., Skupski, M., Lieberman, D. & Lieberman, M. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology* 6: 137-144.
- Schluter, D. 2001. Ecology and origin of species. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 372-380.
- Schulman, L., Koivunen, H. & Ruokolainen, K. 2004. Spatio-ecological niche segregation of two sympatric species of *Clidemia* (Melastomataceae) in western Amazonian non-flooded rainforests. *Folia Geobotanica* 39: 143-160.
- Sheela, V. L., Geetha Lekshmi, P. R., Jayachandran Nair, C. S. & Rajmohan, K. 2006. Molecular characterization of *Heliconia* by RAPD assay. *Journal of Tropical Agriculture* 44: 37-41.
- Simões, P. I., Lima, A. P., Magnusson, W. E., Hödl, W. & Amézquita, A. 2008. Acoustic and morphological differentiation in the frog *Allobates femoralis*: relationships with the upper Madeira River and other potential geological barriers. *Biotropica* 40: 607-614.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Milligan B. G. 1992. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Doyle, J. J. (eds.). *Molecular Systematics of Plants*. New York, Chapman and Hall. 117-150 pp.
- Tuomisto, H. & Ruokolainen, K. 1997. The role of ecological knowledge in explaining biogeography and biodiversity in Amazonia. *Biodiversity and Conservation* 6: 347-357.

- van der Hammen, T. 1974. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. *Journal of Biogeography* 1: 3-26.
- van der Hammen, T. & Hooghiemstra, H. 2000. Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. *Quaternary Science Reviews* 19: 725-742.
- Wilde, J. Waugh, R. & Powell, W. 1992. Genetic fingerprint of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 871-877.
- Will, K. & Rubinoff, D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20: 47-55.
- Wolfe, K. H., Li, W. H. & Sharp, P. M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 9054-9058.
- Yu, K. & Pauls, K. P. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 788-794.

OBJETIVOS GERAIS

1. Determinar as zonas de contato, extensão da sobreposição e potenciais limites geográficos na distribuição dos quatro morfotipos de *H. acuminata* que ocorrem na região de Manaus;
2. Determinar os padrões de distribuição da variabilidade genética nos morfotipos de *H. acuminata* que ocorrem na Amazônia brasileira, visando determinar o grau de diferenciação genética entre esses morfotipos.

CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser submetido à Biotropica

LRH: Arruda, Lima, Magnusson and Pimentel

RRH: Distribuição de *Heliconia acuminata* na Amazônia

**Distribuição Espacial em Manchas de Morfotipos de *Heliconia acuminata*
(Heliconiaceae) na Amazônia Central¹**

Rafael Arruda^{2,4}, Albertina P. Lima², William E. Magnusson² & Tânia Pimentel³

²Coordenação de Pesquisas em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia,
69011-970, CP 478, Manaus, AM.

³Laboratório Temático de Solos e Plantas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia,
69011-970, CP 478, Manaus, AM.

¹Received _____; revision accepted _____.

⁴Corresponding author; e-mail: rsarruda@yahoo.com.br

A DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES PODE REFLETIR PROCESSOS QUE OCORRERAM NO PASSADO REMOTO (Haffer 1969, van der Hammen 1974, Bush *et al.* 1990, Colinvaux *et al.* 1996, van der Hammen & Hooghiemstra 2000, Colinvaux & De Oliveira 2001, Svenning *et al.* 2008), especialização de habitat (Clark *et al.* 1999, Svenning 1999, Webb & Peart 2000, Harms *et al.* 2001, Tuomisto *et al.* 2002, Tuomisto *et al.* 2003a, b, c; Costa *et al.* 2005, Kinup & Magnusson 2005, Ellis & Weis 2006, Poulsen *et al.* 2006), presença de barreiras geográficas (Ayres & Clutton-Brock 1992, Peres *et al.* 1996, Roosmalen *et al.* 1998, 2002; Hayes & Sewlal 2004, Simões *et al.* 2008), ou processos aleatórios combinados com limitações intrínsecas de dispersão (Hubbell 2001). A maioria das espécies existentes divergiu há milhões de anos atrás, e processos que ocorreram no passado remoto são difíceis de estudar. Entretanto, processos associados com variação intra-específica que podem representar especiação incipiente podem ser usados para inferir cladogênese.

Heliconia acuminata é uma espécie herbácea de sub-bosque amplamente distribuída na Amazônia com diferentes combinações na coloração das flores e brácteas (Berry & Kress, 1991; Kress *et al.* 1999). Esta espécie tipifica um aspecto comum à maioria das helicônias, a ocorrência de diversos morfotipos formando complexos de espécie. Alguns destes morfotipos podem ser espécies distintas, porém esta ainda é uma questão pouco explorada (e.g. Kumar *et al.* 1998; Sheela *et al.* 2006). Observações preliminares indicaram que estes morfotipos de *H. acuminata* não co-ocorrem, mas se esta distribuição é resultado de especialização de habitat, barreiras geográficas ou amostragem inadequada ainda não está totalmente elucidado.

Levantamentos detalhados da distribuição de cada morfotipo de *H. acuminata* na Amazônia ainda não são viáveis devido a restrições logísticas e financeiras. Entretanto, quatro morfotipos ocorrem na região de Manaus (Fig. 1), e as rodovias que se estendem a norte, sul, leste e oeste permitem uma amostragem detalhada das suas zonas de contato. Nesta região, os rios Solimões, Negro e Amazonas constituem potenciais barreiras geográficas da distribuição

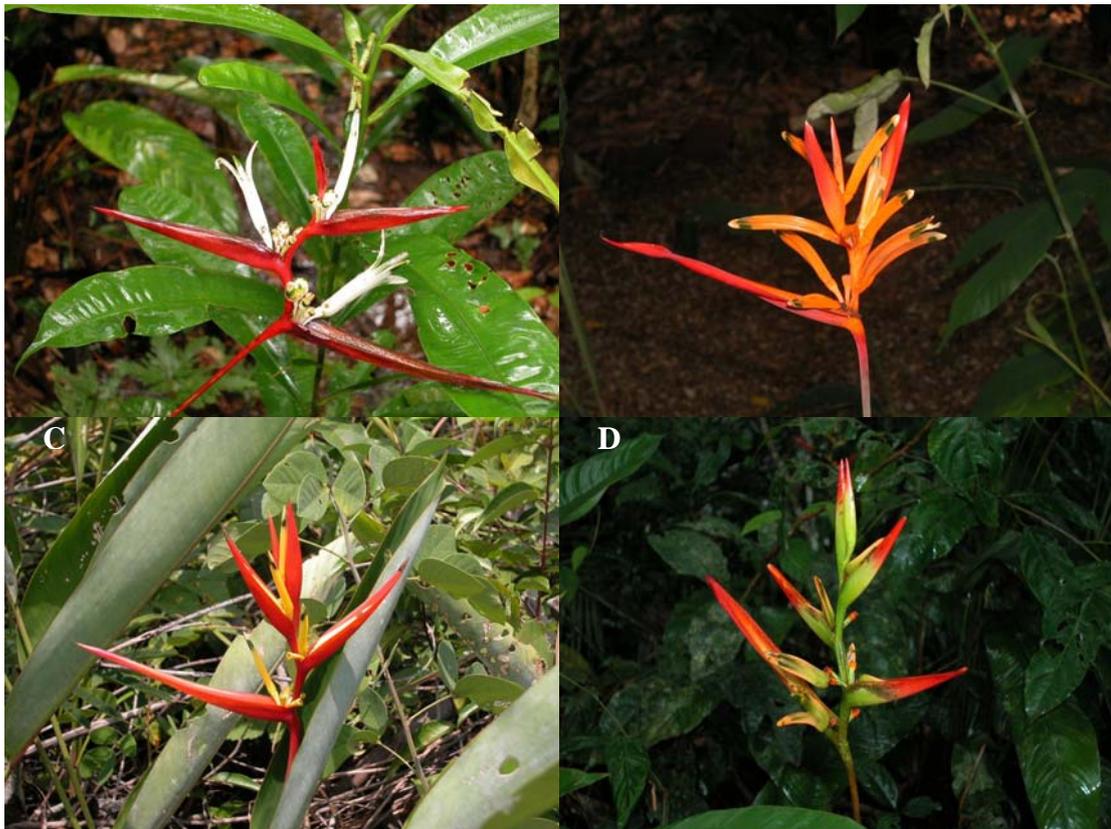


Figura 1. Os morfotipos de *H. acuminata* encontrados na Amazônia Central. (A) Vermelho e branco - VMB, (B) Vermelho e laranja - VML, (C) Vermelho e amarelo – VMA, e (D) Verde e laranja - VDL.

de *H. acuminata*, como postulado para outras espécies em diferentes regiões na Amazônia (e.g. primatas: Ayres & Clutton-Brock 1992, Peres *et al.* 1996, Roosmalen *et al.* 1998, 2002; aves: Hayes & Sewlal 2004; e anfíbios: Simões *et al.* 2008). Adicionalmente, tipos de solo distintos que poderiam estar associados com especialização edáfica podem ser encontrados ao longo das rodovias.

Neste trabalho, investigamos as zonas de contato, extensão da sobreposição, potenciais limites geográficos na distribuição dos quatro morfotipos de *H. acuminata* que ocorrem na região de Manaus, bem como sua ocorrência em locais distantes cerca de 800 km ao norte, sul, leste e oeste. Além disso, determinamos se características edáficas estão associadas com a distribuição destes morfotipos.

MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO.—O trabalho de campo foi realizado predominantemente na Amazônia Central, acompanhando as rodovias que partem da cidade de Manaus, AM (3.135650° S, 58.440780° W). A região ao leste de Manaus é formada principalmente por rochas do Cretáceo da Formação Alter do Chão, formando um cinturão cobrindo rochas do Paleozóico, e uma variedade de rochas ígneas e metamórficas do Pré-Cambriano dos Escudos das Guianas e do Brasil Central (Rossetti *et al.* 2005). As áreas a oeste de Manaus possuem depósitos do Cenozóico, cobrindo a Formação Solimões/Pebas do Mioceno (Rossetti *et al.* 2005). De maneira geral, as características geomorfológicas da Amazônia são dinâmicas no tempo e espaço, mas existe carência de dados geológicos mais específicos devido à imensa área florestal, densa cobertura da vegetação e dificuldade de acesso (Rossetti *et al.* 2005).

COLETA DE DADOS.—Entre novembro de 2004 e fevereiro de 2007, mapeamos a distribuição dos indivíduos dos quatro morfotipos de *H. acuminata* ao longo das principais estradas de saída de Manaus (3.135650° S, 58.440780° W) (Fig. 2). Ao longo da rodovia BR 174, que liga Manaus a Boa Vista no estado de Roraima (em direção ao norte), foram amostrados aproximadamente 110 km até o município de Presidente Figueiredo (2.050315° S, 60.024061° W). Ao longo da rodovia AM 240 foram amostrados aproximadamente 60 km até o distrito de Balbina (1.934256° S, 59.422302° W). Ao longo da rodovia AM 010 (leste de Manaus) foi amostrado um trecho de aproximadamente 250 km que liga Manaus ao município de Itacoatiara (3.137088 S°, 58.438339° W). Ao longo da rodovia AM 070 (oeste de Manaus) foi amostrado um trecho de aproximadamente 200 km que liga Manaus ao município de Novo Airão (2.626186 ° S, 60.94305° W). E ao longo da rodovia BR 319 (sul de Manaus) foi

amostrado um trecho de aproximadamente 250 km. Além destas coletas predominantemente ao redor de Manaus, ocorreram coletas complementares em locais mais distantes (Fig. 2), em Pacaraima (4.478165° N, 61.145016° W, cidade pertencente ao Estado de Roraima, ao norte de Manaus), em Alter do Chão, próximo ao município de Santarém (2.432030° S, 54.717630° W, Estado do Pará, leste de Manaus), e próximo a Porto Velho (8.760230° S, 63.885800° W, capital do Estado de Rondônia, sul de Manaus). Cada indivíduo de *H. acuminata* foi georeferenciado com GPS, e sua localização plotada em imagens de satélite, através do programa Arc Gis. Como unidade amostral para confeccionar os mapas de distribuição, bem como para as análises de correlação com os dados de solo, foram considerados os indivíduos dos diferentes morfotipos de *H. acuminata*. As coletas de solo foram realizadas perto do local de ocorrência dos indivíduos de cada morfotipo. No momento em que um indivíduo de *H. acuminata* era encontrado, imediatamente uma amostra de solo da camada superficial (0-20 cm) era retirada com o auxílio de um trado ao lado do indivíduo.

ANÁLISES DE SOLO.—As coletas das amostras de solo foram realizadas na camada superficial de 0 a 20 cm de profundidade. Das amostras de solo foi obtido um total de 13 atributos: C/N, P, K, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Al³⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, pH e porcentagem de Argila, Silte, Areia (Tabela 1). Todas as análises foram realizadas no Laboratório Temático de Solos e Plantas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

A acidez do solo (pH) foi medida a partir de uma solução de solo seco moído ao qual foi adicionada água destilada, na proporção solo:água de 1:2,5 ml. Ca⁺², Mg⁺², e Al³⁺ foram determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica, após serem extraídos com solução de KCl 1N. P, K e micronutrientes do solo (Mn²⁺, Fe²⁺ e Zn²⁺), também foram

Tabela 1. Sumário das estatísticas descritivas das variáveis de solo medidas para os quatro morfotipos de *Heliconia acuminata*.

Fatores	Vermelho e branco			Vermelho e laranja			Vermelho e amarelo			Verde e laranja		
	Média	Amplitude	DP	Média	Amplitude	DP	Média	Amplitude	DP	Média	Amplitude	DP
C/N	12,59	5,15-17,39	3,26	12,77	8,97-17,15	2,09	12,28	8,92-15,85	1,95	14,84	11,32-19,98	1,78
P (mg/kg)	2,90	0,44-4,99	1,21	4,05	0,00-7,31	2,52	3,33	0,36-8,78	2,04	4,18	1,11-10,88	2,11
K (cmol/kg)	0,16	0,05-0,26	0,06	0,09	0,01-0,21	0,05	0,14	0,06-0,32	0,07	0,23	0,03-0,60	0,19
Ca (cmol/kg)	0,19	0,05-1,20	0,22	0,62	0,07-2,17	0,58	0,50	0,11-4,20	0,95	1,77	0,06-6,55	2,11
Mg (cmol/kg)	0,22	0,04-1,04	0,19	0,30	0,07-1,32	0,28	0,22	0,04-1,21	0,28	0,52	0,08-1,85	0,47
Mn (mg/kg)	3,89	1,20-17,70	3,36	13,30	0,50-65,90	17,71	3,40	0,70-32,50	6,93	39,67	0,60-233,00	46,07
Al (cmol/kg)	0,45	0,03-3,09	0,57	0,47	0,00-1,62	0,51	1,09	0,05-3,49	1,32	0,52	0,00-3,45	0,84
Fe (mg/kg)	326,39	61,00-885,50	176,21	172,69	53,50-308,50	67,31	307,10	66,50-689,00	146,40	181,57	52,00-556,50	112,24
Zn(mg/kg)	1,68	0,20-3,30	1,02	1,17	0,00-4,40	1,05	1,10	0,00-3,60	1,14	2,96	0,50-6,00	1,62
Argila (%)	45,95	9,51-80,36	24,39	24,72	2,00-74,82	22,05	19,61	4,01-43,20	10,76	33,90	8,73-69,12	17,24
Silte (%)	26,09	6,39-51,37	16,49	14,21	1,39-37,24	8,73	30,72	8,34-81,22	24,54	23,58	4,37-69,65	17,01
Areia (%)	27,83	8,46-70,08	14,87	60,82	6,09-88,50	25,94	49,67	12,12-85,50	28,65	41,98	11,22-80,85	22,32
pH (em água)	4,07	3,25-4,99	0,38	4,36	3,55-5,67	0,60	4,27	3,88-5,54	0,41	4,54	3,71-5,84	0,54

determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica com solução de duplo-ácido, constituída por uma mistura de HCl 0,05 M + H₂SO₄ 0,0125 M. N e C foram determinados por cromatografia pelo método de combustão.

As análises granulométricas foram baseadas na velocidade de queda das partículas que compõem o solo em dispersante químico. Para determinação da argila, foi pipetado um volume de 20 ml da suspensão, que foi pesada após seca em estufa. A areia foi separada por peneiras, seca em estufa e pesadas para obtenção dos respectivos percentuais. O silte corresponde ao complemento dos percentuais foi obtido por diferença das outras frações em relação à amostra original.

ANÁLISE DOS DADOS.– Inicialmente, o conjunto de dados das características do solo representado por 13 variáveis foi sumarizado por meio de Análise de Componentes Principais (PCA) baseada em uma matriz de associação por Correlação. O uso de matriz de correlação atribui o mesmo peso para as variáveis.

Os eixos ortogonais resultantes da ordenação PCA foram utilizados como variáveis dependentes em uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA). A MANOVA testa a diferença nas características edáficas nos locais onde foram encontrados os morfotipos de *H. acuminata*. Os quatro morfotipos de *H. acuminata* foram utilizados como variáveis categóricas no modelo. A estatística *Pillai trace* foi utilizada para avaliar a significância da MANOVA ($P < 0,05$) por ser mais robusta às violações de premissas (Magnusson & Mourão 2003).

A Análise de Componentes Principais e a MANOVA foram realizadas com o programa SYSTAT 8.0 (Wilkinson 1998).

RESULTADOS

Na maioria dos locais amostrados na região de Manaus foi encontrado apenas um morfotipo de *H. acuminata*, e locais com o mesmo morfotipo foram geralmente agrupados, mas ocorreram zonas de contato com pouca sobreposição. A única região com mais de um morfotipo foi ao longo da BR-319 ao sul do rio Amazonas. O morfotipo vermelho e branco (VMB) ocorreu no interior das áreas de floresta, enquanto o morfotipo vermelho e amarelo (VMA) em áreas abertas e ao longo da borda da rodovia. O morfotipo VMB geralmente ocorreu apenas em áreas sombreadas no interior da floresta (74 indivíduos). Os outros morfotipos foram encontrados tanto em áreas de floresta (morfotipo vermelho e laranja - VML: 25 indivíduos), quanto ao longo de bordas da floresta (VML: 22 indivíduos; morfotipo verde e laranja - VDL: 58 indivíduos), às vezes invadindo áreas de pastagem (VMA: 53 indivíduos).

O morfotipo VML ocorreu apenas a leste da região de Manaus, e foi o único morfotipo registrado em Santarém, 570 km a leste (Fig 2 e 3B, C, F). Entretanto, este morfotipo foi também registrado em Porto Velho, 760 km a sudoeste (Fig 2 e 3D). O morfotipo verde e laranja (VDL) foi o único morfotipo registrado entre Presidente Figueiredo e savanas de Roraima, ao norte (Fig 2 e 3B, E). O morfotipo VMA é o mais distinto dos morfotipos, e apenas este pode ser distinguido dos outros quando estéril. Ele possui uma cera branca na região abaxial das folhas, como *H. tarumaensis*. Este morfotipo ocorreu apenas ao sul do rio Amazonas (Fig 2 e 3A, D). O morfotipo VMB foi completamente circundado pelos outros morfotipos na região de Manaus, num raio de 120 km ao norte do rio Amazonas e 200 km a leste do rio Negro (Fig 2 e 3A, B). Entretanto, este morfotipo ocorreu também ao sul do rio Amazonas (AM-254 e BR3-19), oeste do rio Negro, e a sudoeste próximo a Porto Velho (Fig 2 e 3A, D).

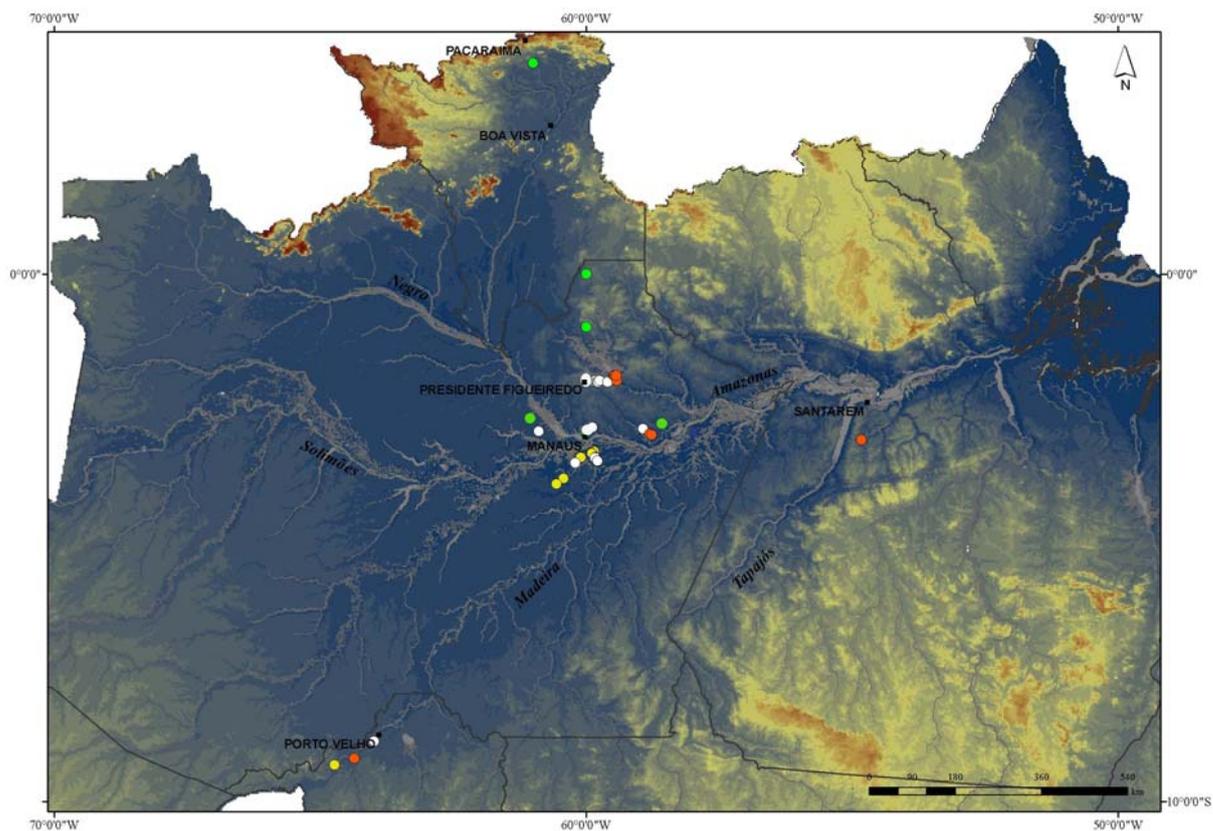


Figura 2. Localização da área de estudo na Amazônia Central, nos Estados do Amazonas (cidades de Manaus e Presidente Figueiredo), Roraima (município de Pacaraima), Pará (município de Santarém) e Rondônia (cidade de Porto Velho). As coordenadas geográficas específicas de cada ponto estão em Material e Métodos. Os pontos brancos correspondem às ocorrências do morfotipo VMB, pontos laranja ao morfotipo VML, pontos amarelos ao VMA e pontos verdes ao morfotipo VDL. Cada ponto no mapa representa um conjunto de indivíduos.

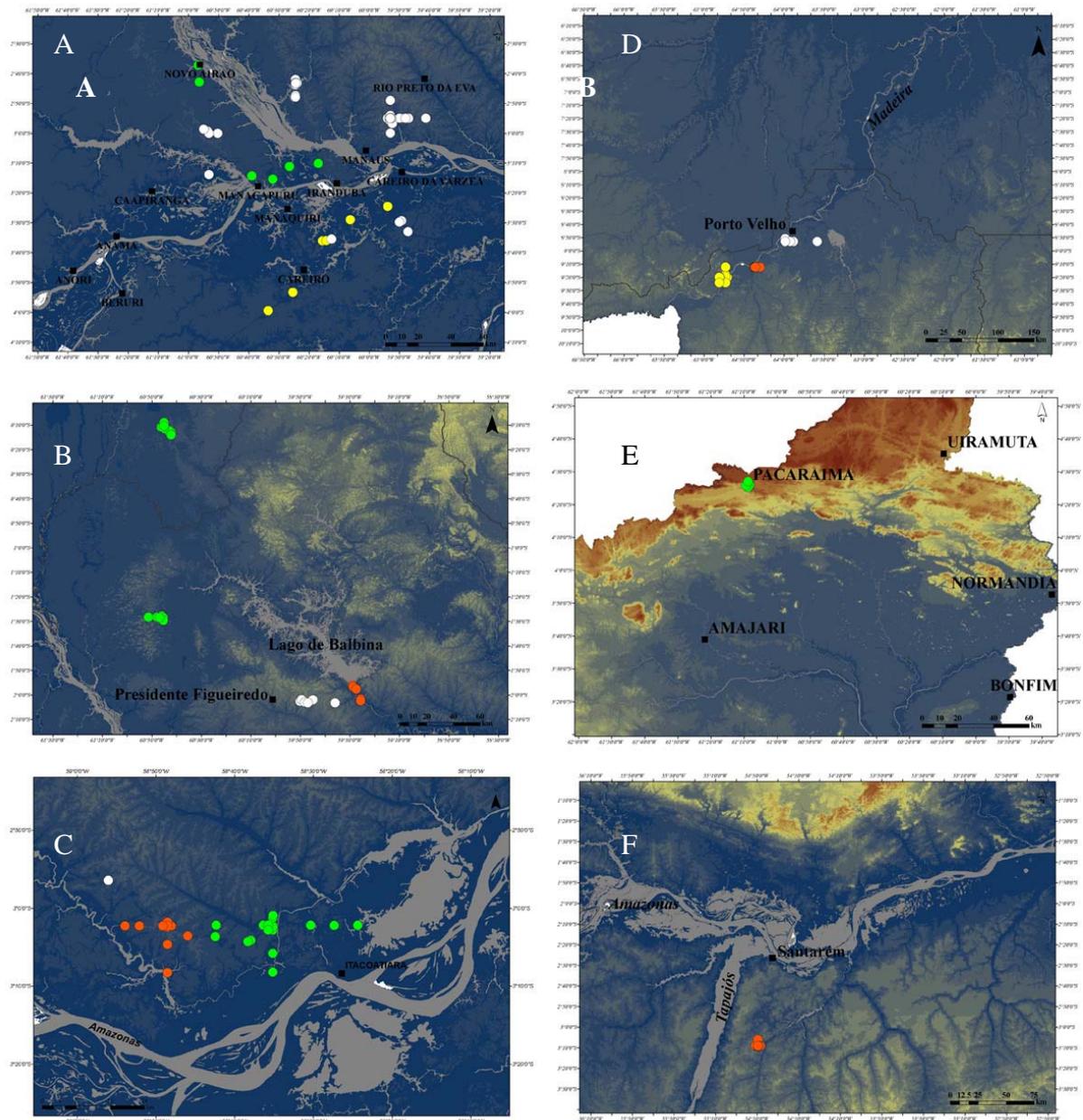


Figura 3. Localização das manchas de distribuição dos morfotipos de *H. acuminata* na Amazônia Central. (A) Coletas realizadas na região de Manaus, (B) e Presidente Figueiredo e (C) Itacoatiara. As coletas mais distantes foram realizadas em (D) Porto Velho, Estado de Rondônia, (E) Pacaraima, Estado de Roraima, e Santarém, Estrado do Pará. Os pontos representam na maioria coletas individuais. Os pontos brancos correspondem às ocorrências do morfotipo VMB, pontos laranja ao morfotipo VML, pontos amarelos ao morfotipo VMA e pontos verdes ao morfotipo VDL.

Como os morfotipos VMB e VML foram encontrados em ambos os lados do rio Amazonas e/ou Negro, não existe evidência de que os grandes rios na região sejam barreiras

entre os morfotipos. Embora existam áreas distintas dominadas por apenas um morfotipo na região de Manaus, os mesmos morfotipos reaparecem em locais a muitos quilômetros de distância. Então, não parece que as manchas monoespecíficas poderiam ser mantidas por simples limitação intrínseca de dispersão.

Os dois primeiros eixos da PCA capturaram 51,4 % da variância total nas características de solo, indicando gradientes distintos em nutrientes e granulometria (Tabela 2). O primeiro eixo representou 32,9 % da variância explicada, e foi relacionado principalmente com nutrientes, o segundo eixo representou 18,4 % da variância explicada, e foi relacionado principalmente com granulometria (Tabela 2). Embora a MANOVA tenha revelado diferenças médias significativas nas características edáficas entre as áreas ocupadas pelos quatro morfotipos de *H. acuminata* (Pillai Trace = 0,49; $F_{6,192} = 10,48$; $P < 0,001$), as populações de cada morfotipo ocuparam a maior parte do espaço multivariado representando solos (Fig. 4). Para dois morfotipos em que existem dados detalhados das zonas de contato, o limite distinto entre o morfotipo VMB e o morfotipo VML não ocorreu devido a forte disjunção na fertilidade do solo na zona de contato entre estes dois morfotipos, representado pelo primeiro eixo da PCA (Fig. 5A). No entanto, zona de contato entre o morfotipo VMB e o morfotipo VML entre Manaus e Itacoatiara observa-se leve disjunção na granulometria, representado pelo segundo eixo da PCA (Fig. 5B).

DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na manutenção das manchas distintas de distribuição dos morfotipos de *H. acuminata* que cobrem milhares de km² ainda não são claros. Muitos estudos sugerem que os rios amazônicos podem funcionar como barreiras geográficas à dispersão das espécies (Ayres & Clutton-Brock 1992, Peres *et al.* 1996, Roosmalen *et al.*

Tabela 2. Correlações entre as 13 variáveis edáficas com dois eixos de ordenação produzidos pela Análise de Componentes Principais para as variáveis de solo medidas para os quatro morfotipos de *Heliconia acuminata*. Em negrito, valores de correlação acima de 0,6.

Variáveis	PCA1	PCA2
C/N	0,24	0,36
P	0,46	-0,22
K	0,58	0,34
Ca	0,92	-0,02
Mg	0,90	-0,03
Mn	0,85	-0,15
Al	-0,32	0,39
Fé	-0,28	0,14
Zn	0,73	0,43
Argila	-0,08	0,76
Silte	0,18	0,41
Areia	-0,05	-0,95
pH	0,75	-0,28
% Variância explicada	32,94	18,44
% Variância acumulada	32,94	51,38

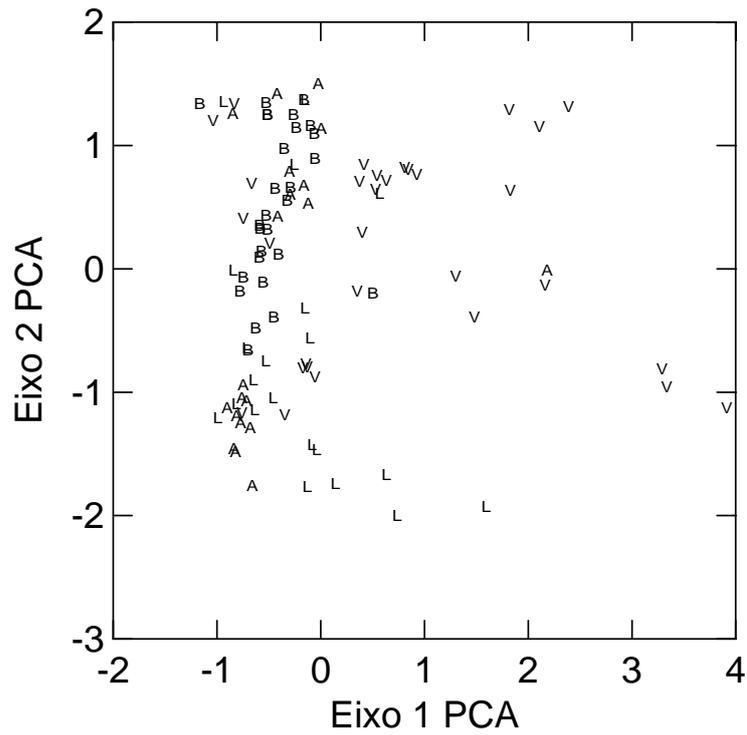


Figura 4. Distribuição dos morfotipos de *H. acuminata* ao longo dos scores do primeiro e segundo componentes principais usando como variáveis as características edáficas dos locais de ocorrência dos morfotipos VMB (B), VML (L), VMA (A) e VDL (V). O primeiro eixo foi principalmente correlacionado com fertilidade, e o segundo eixo com granulometria.

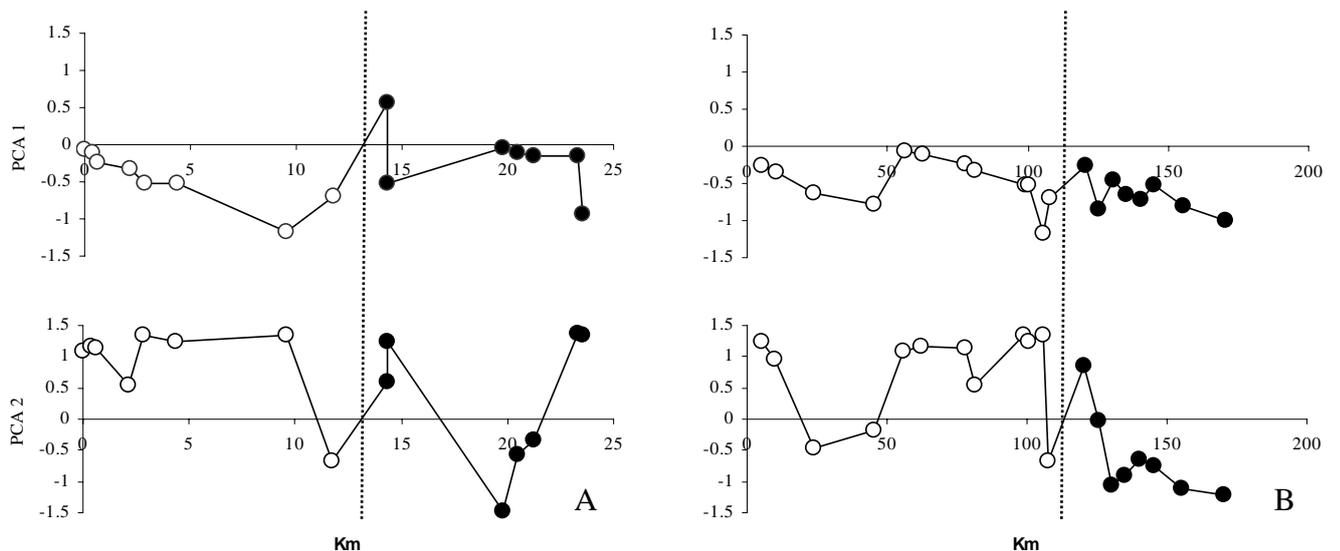


Figura 5. Representação linear das zonas de contato (linha vertical pontilhada) entre os morfotipos VMB (pontos abertos) e VML (pontos fechados) de *H. acuminata* entre Presidente Figueiredo e vila de Balbina (A), e entre Manaus e Itacoatiara (B). Pontos representam o primeiro e segundo componente principal de ordenação dos dados de solo.

1998, 2002; Hayes & Sewlal 2004, Simões *et al.* 2008). Em alguns pontos, os rios Negro e Amazonas possuem cerca de 10 km entre uma margem e outra, o que poderia afetar diretamente a distribuição dos morfotipos de *H. acuminata*, causando o padrão observado de distribuição em manchas. Entretanto, a distribuição observada neste estudo não fornece evidência que grandes rios, como o Amazonas e Negro, sejam barreiras geográficas para os morfotipos.

Além disso, não existe barreira geográfica óbvia nas zonas de contato entre os morfotipos onde a distribuição é simpátrica. Os morfotipos de *H. acuminata* ocorrem em regiões diferentes segregados espacialmente. Como evidenciado pela MANOVA, é esperado que nestes locais os tipos de solo sejam, em média, diferentes. No entanto, os morfotipos ocupam as mesmas regiões no espaço multivariado do primeiro e segundo eixos da PCA que representa os tipos de solo, mostrando que existe grande variação na ocorrência dos morfotipos em relação às características do solo. Recentes estudos realizados na Amazônia Ocidental (Tuomisto *et al.* 2002, Tuomisto *et al.* 2003a, b, c; Tuomisto & Ruokolainen 2005, Cárdenas *et al.* 2006, Tuomisto 2006), bem como na Amazônia Central (Costa *et al.* 2005, Kinup & Magnusson 2005), tem encontrado relação entre a distribuição de espécies vegetais de sub-bosque com topografia e tipo de solos. Embora existam diferenças médias significativas nas características de solo nas regiões ocupadas por cada morfotipo, não parece existir gradiente edáfico responsável para a quase completa segregação local entre os morfotipos, e todos os morfotipos ocorrem na maioria dos tipos de solo amostrados na região. Os limites distintos entre o morfotipo VMB e o morfotipo VML em duas zonas de contato distintas não foram associados a uma disjunção abrupta nas características do solo encontradas entre estes dois morfotipos.

Existem evidências de que distribuição em manchas em espécies vegetais de florestas tropicais seja determinada por dispersão localizada (*e.g.* Svenning & Wright 2005, Uriarte *et*

al. 2005, Svenning et al. 2006). Entretanto, o fato de alguns morfotipos ocorrerem em diferentes manchas vários quilômetros de distância indica que simples limitação intrínseca de dispersão não seria suficiente para manter este padrão. A distribuição em manchas dos morfotipos de *H. acuminata* pode refletir processos saltatórios de dispersão, com eventos de dispersão de longa distância dando origem a novas agregações de indivíduos. Dispersão à longa distância é considerado um evento raro e aleatório (Nathan 2006), mas explica a ocorrência no tempo presente de algumas espécies em comum à região Neotropical e a África (e.g. Dick et al. 2007), sendo considerado um processo importante para manutenção de espécies vegetais em escala regional (e.g. Soons & Ozinga 2005). A ecologia da dispersão de espécies de helicônias ainda é pouco estudada, mas observações preliminares na Amazônia Central indicam que sabiás (*Turdus* spp.) são possíveis candidatos a agentes de dispersão à longa distância de *H. acuminata* (M. Anciães, comunicação pessoal). Na Amazônia Central estão sendo realizados estudos sobre a dispersão do morfotipo VMB nas áreas do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais. As primeiras observações revelaram que os sabiás engolem os frutos de *H. acuminata*, sendo defecadas após permanecer por cerca de 30 minutos no trato digestivo (M. Anciães, comunicação pessoal). Desta forma estas aves poderiam estar aumentando o potencial de dispersão das sementes de *H. acuminata* a locais mais distantes.

Ainda que o padrão geral observado para alguns grupos de espécies vegetais encontradas na Amazônia seja distribuição associada a características edáficas, o mesmo não ocorre para os morfotipos de *H. acuminata*. Embora existam diversas hipóteses alternativas que tentam explicar padrões de distribuição (e.g. Moritz et al. 2000), principalmente para a região amazônica ainda há muito debate e controvérsia, pois é provável que simples processos não afetem os organismos da mesma maneira. Na ausência de barreiras geográficas distintas ou segregação de habitat em função dos solos onde ocorrerem, os padrões de distribuição dos

morfotipos de *H. acuminata* parecem influenciados por sutis gradientes ecológicos que podem estar associados ao tipo de solo, como a disponibilidade de água. Isto pode significar que na escala estudada, levar em conta apenas a fertilidade e textura dos solos para explicar o possível padrão de distribuição de *H. acuminata*, podem não ser suficientes. É possível que a incorporação de outras variáveis, como a disponibilidade de água no solo, possa melhorar o poder de explicação dos modelos de distribuição de *H. acuminata* na Amazônia.

LITERATURA CITADA

- AYRES, J. M., AND T. H. CLUTTON-BROCK. 1992. River boundaries and species size in Amazonian primates. *Am. Nat.* 140: 531-537.
- BLEHER, B., R. OBERRATH, AND K. BÖHNING-GAESE. 2002. Seed dispersal, breeding system, tree density and the spatial pattern of trees – a simulation approach. *Basic and Applied Ecology* 3:115–123.
- BROWN, J. H. 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *Am. Nat.* 124: 253-279.
- BUSH, M. B., COLINVAUX, P. A., WIEMANN, M. C., PIPERNO, D. R., AND LIU, K-B. 1990. Late Pleistocene temperature depression and vegetation change in Ecuadorian Amazonia. *Quaternary Research* 34: 330-345.
- CÁRDENAS, G. G., K. J. HALME, Y H. TUOMISTO. 2007. Riqueza y distribución ecológica de especies de pteridofitas em la zona del rio Yavarí-Mirín, Amazônia Peruana. *Biotropica* 39: 637-646.
- CAVENDER-BARES, J., K. KITAJIMA, AND F. A. BAZZAZ. 2004. Multiple associations in relation to habitat differentiation among 17 Floridian oak species. *Ecological Monographs* 74: 635-662.
- CHAVE, J., MULLER-LANDAU, H. C. AND LEVIN, S. A. 2002. Comparing classical community models: theoretical consequences for patterns of diversity. *Am. Nat.* 159: 1-23.
- CLARK, D. B., M. W. PALMER, AND D. A. CLARK. 1999. Edaphic factors and the landscape-scale distributions of tropical rain forest trees. *Ecology* 80: 2662-2675.
- COLINVAUX, P. A., AND DE OLIVEIRA, P. E. 2001. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 166: 51-63.

- 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.
- CONDIT, R. 1996. Defining and mapping vegetation types in mega-diverse tropical forest. *Trends Ecol. Evol.* 11: 4-5.
- CONDIT, R., N. PITMAN, E. G. LEIGHT JR., J. CHAVE, J. TERBORGH, R. B. FOSTER, P. NÚÑEZ V., S. AGUILAR, R. VALENCIA, G. VILLA, H. C. MULLER-LANDAU, E. LOSOS AND S. P. HUBBELL. 2002. Beta-diversity in tropical forest trees. *Science* 295: 666-669.
- COSTA, F. R. C. 2004. Structure and composition of the ground-herb community in a terra-firme Central Amazonian forest. *Acta Amaz.* 34: 53-59.
- COSTA, F. R. C., W. E. MAGNUSSON, AND R. C. LUIZÃO. 2005. Mesoscale distribution patterns of Amazonian understorey herbs in relation to topography, soil and watersheds. *J. Ecol.* 93: 863-878.
- DICK, C. W., E. BERMINGHAM, M. R. LEMES, AND R. GRIBEL. 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Mol. Ecol.* 16: 3039-3049.
- DIECKMANN, U., AND M. DOEBELI. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400: 354-357.
- DOEBELI, M., AND U. DIECKMANN. 2003. Speciation along environmental gradients. *Nature* 421: 259-264.
- EHRLÉN, J. & O. ERICKSSON. 2000. Dispersal limitation and patch occupancy in forest herbs. *Ecology* 81: 1667-1674.
- ELLIS, A. G., AND A. E. WEIS. 2006. Coexistence and differentiation of “flowering stones”: the role of local adaptation to soil microenvironment. *J. Ecol.* 94: 322-335.

- FIGUEROA, S., AND C. NOBRE. 1990. Precipitation distribution over central and western tropical South America. *Climanálise* 5: 36-40.
- FINE, P. V. A., D. C. DALY, G. V. MUÑOZ, I. MESONES, AND K. M. CAMERON. 2005. The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon. *Evolution* 59: 1464-1478.
- GENTRY, A. H. 1981. Distributional patterns and an additional species of the *Passiflora vitifolia* complex: Amazonian species diversity due to edaphically differentiated communities. *Plant Syst. Evol.* 137: 95-105.
- GENTRY, A. H. 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75: 1-34.
- GREENBERG, A. J., J. R. MORAN, J. A. COYNE, AND C.-I. WU. 2003. Ecological adaptation during incipient speciation revealed by precise gene replacement. *Science* 302: 1754-1757.
- HAFER, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest birds. *Science* 165: 131-137.
- HARMS, K. E., R. CONDIT, S. P. HUBBELL, AND R. B. FOSTER. 2001. Habitat associations of trees and shrubs in a 50-ha neotropical forest plot. *J. Ecol.* 89: 947-959.
- HAYES, F. E., J. N. SEWLAL. 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *J. Biogeogr.* 31: 1809-1818.
- HUBBELL, S. P. 2001. *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. Princeton University Press, Princeton. 390 pp.
- HUBBELL, S. P., FOSTER, R. B., O'BRIEN, S. T., HARMS, K. E., CONDIT, R., WECHSLER, B., WRIGHT, S. J. & LOO DE LAO, S. 1999. Lightgap disturbances, recruitment limitation, and tree diversity in a Neotropical forest. *Science* 283:554-557.
- KADMON, R., O. FARBER, AND A. DANIN. Effect of roadside bias on the accuracy of predictive maps produced by bioclimatic models. *Ecol. Appl.* 14: 401-413.

- KINUP, V. F., AND W. E. MAGNUSSON. 2005. Spatial patterns in the understory shrub genus *Psychotria* in central Amazonia: effects of distance and topography. *J. Trop. Ecol* 21: 363-374.
- KONDRASHOV, A. S., AND F. A. KONDRASHOV. 1999. Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature* 400: 351-354.
- MARTINIANO, T. M. 2004. *Biologia Floral e Diversidade de Recursos de Espécies de Sub-bosque em um Fragmento Florestal Urbano no Município de Manaus-AM*. Dissertação de mestrado. INPA-Manaus.
- MCKINNON, J. S., S. MORI, B. K. BLACKMAN, L. DAVID, D. M. KINGSLEY, L. JAMIESON, J. CHOU, AND D. SCHLUTER. 2004. Evidence for ecology's role in speciation. *Nature* 429: 294-298.
- MENDONÇA, F. P., W. E. MAGNUSSON, AND J. ZUANON. 2005. Relationships between habitat characteristics and fish assemblages in small streams of Central Amazonia. *Copeia* 4: 750-763.
- MORITZ, C., J. L. PATTON, C. J. SCHNEIDER, AND T. B. SMITH. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annu. Rev. Ecol Syst.* 31: 533-563.
- NATHAN, R. 2006. Long-distance dispersal of plants. *Science* 313: 786-788.
- NOGUCHI, H., A. ITOH, T. MIZUNO, K. SRI-NGERNYUANG, M. KANZAKI, S. TEEJUNTUK, W. SUNGPALEE, M. HARA, T. OHKUBO, P. SAHUNALU, P. DHANMMANONDA, AND T. YAMAKURA. 2007. Habitat divergence in sympatric Fagaceae tree species of a tropical montane forest in northern Thailand. *J. Trop. Ecol.* 23: 549-558.
- OGDEN, R., AND R. S. THORPE. 2002. Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 13612-13615.

- PERES, C. A., J. L. PATTON, AND M. N. F. SILVA. 1996. Riverine barriers and gene flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. *Folia Primatol.* 67: 113-124.
- POULSEN, A. D., H. TUOMISTO, AND H. BALSLEV. 2006. Edaphic and floristic variation within a 1-ha plot of lowland Amazonian rain forest. *Biotropica* 38: 468-478.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- ROOSMALEN, M. G. M., T. ROOSMALEN, R. A. MITTERMEIER, AND G. A. B. FONSECA. 1998. A new and distinctive species of marmoset (*Callitrichidae*, Primates) from the lower river Aripuanã, State of Amazonas, central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia* 22: 1-27.
- ROOSMALEN, M. G. M., T. ROOSMALEN, R. A. MITTERMEIER, AND G. A. B. FONSECA. 2002. A taxonomic review of the Titi Monkeys, genus *Calicebus*, Tomas, 1903, with the description of two new species, *Calicebus bernhardi* and *Calicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotrop. Primates* 10: 1-52.
- ROSSETTI, D. F., P. M. TOLEDO, AND A. M. GÓES. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Res.* 63: 78-89.
- RUNDLE, H. D., AND P. NOSIL. 2005. Ecological speciation. *Ecology Letters* 8: 336-352.
- RUSO, S. E., S. J. DAVIES, D. A. KING, AND S. TAN. 2005. Soil-related performance variation and distribution of tree species in a Bornean rain forest. *J. Ecol.* 93: 879-889.
- RYAN, P.G., P. BLOOMER, C. L. MOLONEY, T. J. GRANT, AND W. DELPONT. 2007. Ecological speciation in South Atlantic island finches. *Science* 315: 1420-1423.

- SAVOLAINEN, V., M.-C. ANSTETT, C. LEXER, I. HUTTON, J. J. CLARKSON, M. V. NORUP, M. P. POWELL, D. SPRINGATE, N. SALAMIN, AND W. J. BAKER. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* 441: 210-213.
- SCHLUTER, D. 2001. Ecology and origin of species. *Trends Ecol. Evol.* 16: 372-380.
- SCHULMAN, L., H. KOIVUNEN, AND K. RUOKOLAINEN. 2004. Spatio-ecological niche segregation of two sympatric species of *Clidemia* (Melastomataceae) in western Amazonian non-flooded rainforests. *Folia Geobot.* 39: 143-160.
- SIMÕES, P. I., A. P. LIMA, W. E. MAGNUSSON, W. HÖDL, AND A. AMÉZQUITA. 2008. Acoustic and morphological differentiation in the frog *Allobates femoralis*: relationships with the upper Madeira River and other potential geological barriers. *Biotropica* 40: 607-614.
- SOLLINS, P. 1998. Factors influencing species composition in tropical lowland rain forest: does soil matter? *Ecology* 79: 23-30.
- SOONS, M. B. & W. A. OZINGA. 2005. How important is long-distance seed dispersal for the regional survival of plant species. *Diversity Distrib.* 11: 165-172.
- SVENNING, J.-C. 1999. Microhabitat specialization in a species-rich palm community in Amazonian Ecuador. *J. Ecol.* 87: 55-65.
- SVENNING, J.-C., B. M. J. ENGELBRECHT, D. A. KINNER, T. A. KURSAR, R. F. STALLARD, AND S. J. WRIGHT. 2006. The relative roles of environment, history and local dispersal in controlling the distributions of common tree and shrub species in a tropical forest landscape, Panama. *J. Trop. Ecol.* 22: 575-586.
- SVENNING, J.-C., NORMAND, S., AND SKOV, F. 2008. Postglacial dispersal limitation of widespread forest plant species in nemoral Europe. *Ecography* 31: 316-326.
- SVENNING, J.-C., AND S. J. WRIGHT. 2005. Seed limitation in a Panamanian forest. *J. Ecol.* 93: 853-862.

- THOMPSON, J., BROKAW, N., ZIMMERMAN, J. K., WAIDE, R. B., EVERHAM, E.M., LODGE, D. J., TAYLOR, C.M., GARCÍA-MONTIEL, D. & FLUET, M. 2002. Land use history, environment, and tree composition in a tropical forest. *Ecol. Appl.* 12:1344–1363.
- TUOMISTO, H. 2006. Edaphic niche differentiation among *Polybotrya* ferns in western Amazonia: implications for coexistence and speciation. *Ecography* 29: 273-284.
- TUOMISTO, H., AND K. RUOKOLAINEN. 2005. Environmental heterogeneity and the diversity of pteridophytes and Melastomataceae in western Amazonia. *Biol. Skr.* 55: 37-56.
- TUOMISTO, H., K. RUOKOLAINEN, A. D. POULSEN, R. C. MORAN, C. QUINTANA, G. CAÑAS, AND J. CELI. 2002. Distribution and diversity of pteridophytes and Melastomataceae along edaphic gradients in Yasuní National Park, Ecuadorian Amazonia. *Biotropica* 34: 516-533.
- TUOMISTO, H., A. D. POULSEN, K. RUOKOLAINEN, R. C. MORAN, C. QUINTANA, J. CELI, AND G. CAÑAS. 2003a. Linking floristic patterns with soil heterogeneity and satellite imagery in Ecuadorian Amazonia. *Ecol. Appl.* 13: 352-371.
- TUOMISTO, H., K. RUOKOLAINEN, M. AGUILAR, AND A. SARMIENTO. 2003b. Floristic patterns along a 43-km long transect in an Amazonian rain forest. *J. Ecol.* 91: 743-756.
- TUOMISTO, H., K. RUOKOLAINEN, AND M. YLI-HALLA. 2003c. Dispersal, environment, and floristic variation of western Amazonian forests. *Science* 299: 241-244.
- URIARTE, M., C. D. CANHAM, J. THOMPSON, Z. K. ZIMMERMAN, AND N. BROKAW. 2005. Seedling recruitment in a hurricane-driven tropical forest: light limitation, density-dependence and the spatial distribution of parent trees. *J. Ecol.* 93: 291-304.
- VAN DER HAMMEN, T. 1974. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. *Journal of Biogeography* 1: 3-26.

- VAN DER HAMMEN, T., AND HOOGHIEMSTRA, H. 2000. Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. *Quaternary Science Reviews* 19: 725-742.
- WILKINSON, L. 1998. SYSTAT: the System for Statistics. SYSTAT Inc., Evanston, Illinois.
- WEBB, C. O., AND D. R. PEART. 2000. Habitat associations of trees and seedlings in a Bornean rain forest. *J. Ecol.* 88: 464-478.
- WHIGHAM, D. F. 2004. Ecology of woodland herbs in temperate deciduous forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 35: 583-621.

CAPÍTULO 2

Manuscrito a ser submetido à Molecular Ecology

**Variabilidade genética em morfotipos de *Heliconia acuminata* A. Rich. (Heliconiaceae)
na Amazônia Central, Brasil**

R. ARRUDA¹, M. R. LEMES^{1,2}, T. MENICUCCI², R. GRIBEL^{2,3} e W. E. MAGNUSSON¹

¹*Coordenação de Pesquisas em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, CP 478, 69011-970, Manaus, AM,* ²*Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 69011-970, CP 478, Manaus, AM,*

³*Coordenação de Pesquisas em Botânica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 69011-970, CP 478, Manaus, AM.*

Correspondência: Rafael Arruda, Coordenação de Pesquisas em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 69011-970, CP 478, Manaus, AM; E-mail:

rsarruda@yahoo.com.br

Introdução

A maioria das espécies da monogénérica família Heliconiaceae, nativa da região tropical, apresenta uma ampla variabilidade fenotípica principalmente quanto à forma e coloração de suas flores e inflorescências (Berry & Kress 1991). A variação morfológica naturalmente observada entre indivíduos e populações de helicônias é tão expressiva que frequentemente tem conduzido a dificuldades na identificação taxonômica dentro do grupo. Isto torna quase impraticável o uso de chaves de identificação das espécies sem fotografias coloridas.

O alto grau de polimorfismo observado entre espécies de helicônias tem sido interpretado como o resultado de seleção mediada por polinizadores (Stiles 1975; Kress 1985; Temeles & Kress 2003), ao passo que polimorfismos dentro das espécies são menos compreendidos. Vários processos têm sido sugeridos como forças seletivas atuando no nível intra-específico para a diferenciação de helicônias tais como isolamento geográfico, plasticidade fenotípica (Broschat *et al.* 1984; Kumar *et al.* 1998), hibridação (Berry & Kress 1991) e seleção (Temeles *et al.* 2000; Temeles & Kress 2003). O quanto tais processos estão relacionados a padrões diferenciados de distribuição da variabilidade genética em populações de espécies polimórficas de helicônias é ainda desconhecido, sendo sua compreensão de fundamental importância para o entendimento dos padrões de diversificação em Heliconiaceae.

Em função do alto grau de polimorfismos encontrado na família, a taxonomia e sistemática de *Heliconia* não são ainda bem definidas apresentando assim uma série de dificuldades para a determinação precisa das espécies. As estimativas do número de espécies de *Heliconia* variam de 120 a 400 sendo que a mais conservadora indica um número total de espécies para o gênero em torno de 200 a 250 (Kress 1990). No Brasil existem 37 espécies de *Heliconia* sendo as principais áreas de distribuição do gênero as florestas Atlântica (20

espécies) e Amazônica (21 espécies), regiões nas quais as helicônias apresentam também alto endemismo (Kress 1990).

O estabelecimento de limites taxonômicos precisos entre espécies é uma etapa fundamental para o planejamento de estratégias efetivas de conservação e uso racional da biodiversidade (Blackmore 2002; Ronquist & Gärdenfors 2003; Krell 2004). As helicônias possuem forte apelo comercial como plantas ornamentais e atualmente vêm ocupando uma posição de destaque no mercado das exportações brasileiras (Junqueira & Peetz 2007). No entanto, as espécies de *Heliconia* da região amazônica ainda não contribuem ativamente para este mercado, que pode ser reflexo da falta de iniciativas públicas na região para esta finalidade comercial. A caracterização taxonômica de algumas espécies comerciais de helicônias já vem sendo realizada com a finalidade de separar espécies dentro de complexos de morfotipos (Kumar *et al.* 1998; Sheela *et al.* 2006). Esta prática é importante, pois a correta identificação das espécies determina a melhor forma de manejo levando em consideração características ecológicas específicas.

Heliconia acuminata é uma espécie herbácea, hermafrodita e auto-incompatível, encontrada em florestas não inundáveis da Amazônia (Berry & Kress 1991). *Heliconia acuminata* é um exemplo da alta diversidade fenotípica no gênero. Na Amazônia brasileira esta espécie possui pelo menos cinco morfotipos distintos que se distinguem principalmente pela coloração das flores e inflorescências (Fig. 1). Um morfotipo apresenta brácteas vermelhas com flores brancas (Fig. 1A), um com brácteas vermelhas e flores amarelas (Fig. 1B), um morfotipo com brácteas vermelho-alaranjadas com flores laranja (Fig. 1C), um morfotipo com brácteas verde-alaranjadas e com flores de esverdeadas a alaranjadas (Fig. 1D), e um morfotipo com brácteas e flores amarelas (Fig. 1E). Os morfotipos de *H. acuminata* ocorrem geralmente em manchas que não são contínuas podendo abranger milhares de quilômetros quadrados, ocorrendo pouca sobreposição na distribuição destes morfotipos



Figura 1 Os morfotipos de *H. acuminata* encontrados na Amazônia Central. (A) Vermelho e branco, (B) Vermelho e laranja, (C) Vermelho e amarelo, (D) Verde e laranja, e (E) Amarelo.

nas regiões de sua ocorrência na Amazônia brasileira (Cap. 1). Não se conhece ainda estudos que visem determinar se os morfotipos de *H. acuminata* apresentam diferenciação suficiente para serem considerados entidades geneticamente distintas.

Marcadores moleculares têm sido utilizados para investigar a correlação entre diferenças fenotípicas e diferenciação genética entre morfotipos, variedades e subespécies em

espécies vegetais (e.g. Kumar *et al.* 1998; Heaton *et al.* 1999; Jang *et al.* 2005; Sheela *et al.* 2006). Tais estudos basicamente têm investigado a variabilidade genética por meio da análise de marcadores moleculares do genoma nuclear. Entretanto, o genoma citoplasmático também é muito importante na compreensão de padrões filogeográficos e na definição de estoques genéticos (Avisé *et al.* 1987; Avisé 1989). Isto porque o genoma do cloroplasto possui herança uniparental materna, sendo desta forma disperso via sementes (Avisé *et al.* 1987; Avisé 1989). Comparado com o genoma nuclear, o genoma do cloroplasto é mais indicado para evidenciar estruturação geográfica causada por dispersão, e adicionalmente por possuir taxa de evolução mais lenta, o genoma do cloroplasto facilita o estudo de padrões históricos mais antigos de fluxo gênico (Avisé *et al.* 1987; Avisé 1989).

Microsatélites têm sido amplamente usados como marcadores moleculares em análises de genética de populações em plantas (Powell *et al.* 1995; Collevatti *et al.* 2001, 2003; Provan *et al.* 2001; Balloux & Lugon-Moulin 2002; Lemes *et al.* 2003, 2007; Lira *et al.* 2003; Novick *et al.* 2003; Erickson *et al.* 2004; Ohsawa *et al.* 2008). As vantagens de se utilizar os marcadores microsatélites resultam de sua relativa abundância nos genomas de eucariotos, altos níveis de diversidade alélica, taxa de evolução rápida e facilidade de utilização desses marcadores via PCR (Polimerase Chain Reaction) (Provan *et al.* 1999). Outra forma de detecção de variabilidade em estudos genéticos ocorre por meio da identificação de polimorfismos diretamente nas sequências de nucleotídeos em regiões específicas do DNA (Ferreira & Grattapaglia 1996).

A combinação do uso de marcadores que permitam acessar regiões mais variáveis do genoma do cloroplasto (cpDNA) como os microsatélites; e os polimorfismos de nucleotídeos em sequências de regiões não-codificadoras mais conservadas poderão fornecer evidências que permitam melhor diferenciar os morfotipos de *H. acuminata* e estabelecer as relações taxonômicas entre eles. Recentemente, o uso de marcadores de regiões não-codificadoras dos

genomas, tanto em plantas quanto em animais tem aumentado no campo da taxonomia, principalmente para identificação de sequências únicas na determinação de espécies (Hebert *et al.* 2003a, 2003b, 2004a, 2004b; Will & Rubinoff 2004; Kress *et al.* 2005; Savolainen *et al.* 2005; Rubinoff *et al.* 2006; Hajibabaei *et al.* 2007). Esta técnica conhecida como DNA Barcode tem sido usada como importante ferramenta da taxonomia para auxílio na identificação de espécies (Dasmahapatra & Mallet 2006, Kress & Erickson 2007, Pennisi 2007, Lahaye *et al.* 2008). Kress & Erickson (2007) propõem a utilização da região do DNA que compreende o espaçador entre os genes *trnH* e *psbA* situados no genoma do cloroplasto das plantas, bem como do espaçador intergênico ITS situado no genoma nuclear, como marcadores principais de DNA Barcode em plantas, pela alta variabilidade apresentada em comparação a outros marcadores moleculares utilizados em sistemática molecular de plantas (Kress *et al.* 2005).

Este estudo tem como objetivo principal determinar os padrões de distribuição da variabilidade genética nos morfotipos de *H. acuminata* que encontrados na Amazônia Central, com base na análise da variação encontrada em oito locos microssatélites bem como em sequências do espaçador intergênico *trnH/psbA* do genoma do cloroplasto, visando determinar o grau de diferenciação genética entre esses morfotipos.

Material e Métodos

Coleta do material

Para as análises genéticas, foram coletadas amostras de folhas de 7 a 16 indivíduos de cada morfotipo de cada população de *Heliconia acuminata*, oriundos de 12 populações distribuídas na Amazônia brasileira (Fig. 2). Na figura 1 são apresentados os diferentes morfotipos de *H. acuminata* analisados no presente estudo: (A) VMB - morfotipo que apresenta brácteas vermelhas com flores brancas, (B) VMA - brácteas vermelhas e flores

amarelas, (C) VML - brácteas vermelho-alaranjadas com flores laranja, (D) VDL - brácteas verde-alaranjadas com flores de esverdeadas a alaranjadas e (E) AMA - morfotipo com brácteas e flores amarelas. As folhas coletadas foram colocadas em sacos com vedação contendo sílica gel e armazenadas a -20°C para posterior extração do DNA.

Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB (Doyle & Doyle 1987) utilizando-se protocolo otimizado por Ferreira & Grattapaglia (1998). O material vegetal foi macerado utilizando-se um disruptor celular FAST PREP (Qbiogene, USA). A quantificação do DNA extraído foi feita por comparação com padrões de massa molecular conhecida, utilizando-se DNA do bacteriófago Lambda, após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (Ferreira & Grattapaglia 1998) Em seguida, os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultra-violeta e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultra-pura e padronizadas a uma concentração de 2,5 ng/μl para utilização na amplificação do DNA.

Amplificação e análise de locos microssatélites do genoma do cloroplasto (cpDNA)

Para as análises genéticas com locos microssatélites foram inicialmente testados oito pares (*ccmp1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10*) de iniciadores (*primers*) desenvolvidos originalmente para tabaco (Weising & Gardner 1999) e quatro pares (*emcrc67, 74, 86, 90*) de *primers* desenvolvidos para eucalipto (Steane *et al.* 2005), os quais segundo os autores também amplificam com sucesso os mesmos locos em outras espécies das angiospermas. Um dos *primers* de cada par foi marcado com um fluorocromo (FAM, HEX ou TET) para posterior análise em seqüenciador automático de DNA.

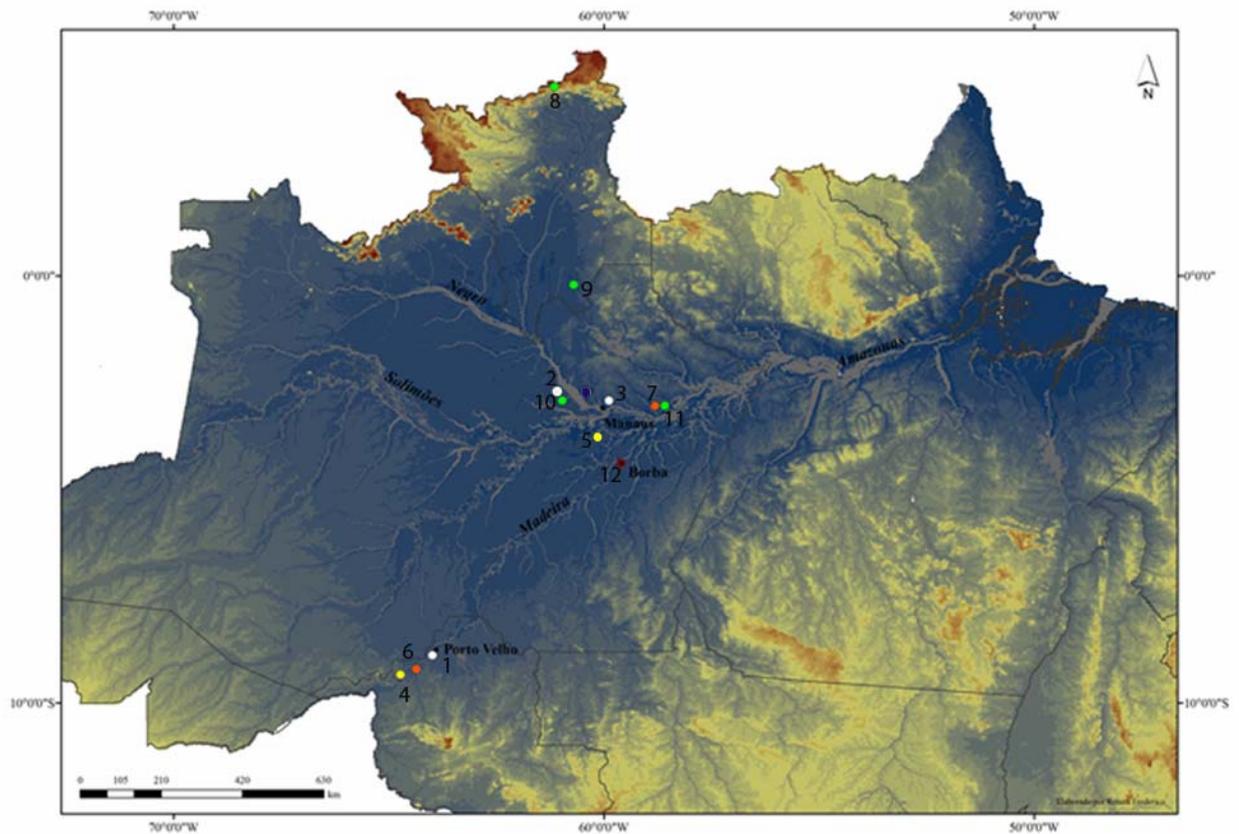


Figura 2 Localização dos pontos de coleta das populações dos morfotipos de *Heliconia acuminata*. 1 – VMB1 (Morfotipo vermelho e branco, rio Madeira); 2 – VMB2 (AM-070); 3 – VMB3 (Reserva Ducke); 4 – VMA1 (Morfotipo vermelho e amarelo, rio Madeira); 5 – VMA2 (BR-319); 6 – VML1 (Morfotipo vermelho e laranja, rio Madeira); 7 – VML2 (Faz. Santa Maria); 8 – VDL1 (Morfotipo verde e laranja, Pacaraima); 9 – VDL2 (Jundiá); 10 – VDL3 (Novo Airão); 11 – VDL4 (Faz. OPV); 12 – AMA1 (Morfotipo amarelo, Borba).

A amplificação dos locos microssatélites do DNA do cloroplasto (cpSSR) foi realizada via PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) nas seguintes condições: (1) desnaturação inicial a 94°C/5 min, seguida de (2) 30 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min; (3) anelamento na temperatura específica de cada par de *primer*/1 min (Tabela 1); e (4) extensão a 72°C/1 min, e uma etapa de extensão final a 72°C/45 min.

As reações de amplificação foram realizadas para um volume total de 10 µl de reação final contendo tampão de PCR 1X (100 mM Tris-HCl, pH 8,4, 1% Triton X-100, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 200 µM de cada nucleotídeo (dNTP), 3,75 µg de BSA (Bovine Serum

Albumin), 1,5 U de Taq polimerase, 0,4 μM de cada *primer*, 5,0 a 7,5 ng de DNA e água ultrapurificada. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Após a otimização das condições de amplificação dos locos microssatélites, os produtos amplificados foram analisados sob eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, em um seqüenciador automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems, Inc).

Antes da aplicação das amostras no gel de poliacrilamida, as reações foram diluídas e adicionadas a um padrão interno (TAMRA ou ROX GeneScan 500, ABI) para estimativa dos tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados. Os produtos fluorescentes da PCR foram então automaticamente analisados e os tamanhos dos alelos estimados utilizando-se os programas GeneScan e Genotyper (ABI).

Amplificação de regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto (cpDNA)

A análise de polimorfismos de sequências das regiões não-codificadoras do genoma do cloroplasto dos morfotipos de *H. acuminata* foi realizada testando-se inicialmente quatro pares de iniciadores que amplificam regiões não codificadoras do cpDNA das angiospermas, sendo todos espaçadores intergênicos, *trnH/psbA*, *trnS/trnG*, *psbB/psbF* (Hamilton 1999), e *atpB/rbcL* (Samuel *et al.* 1997).

A amplificação das regiões não-codificadoras do cpDNA foi realizada via PCR sob as seguintes condições: (1) desnaturação inicial a 94°C/5 min, seguida de (2) 30 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min; (3) anelamento na temperatura específica de cada par de *primer*/1 min (Tabela 1); e (4) extensão a 72°C/1 min, e uma etapa de extensão final a 72°C/7 min.

As reações de amplificação com volume final de 20 μL continham: tampão de PCR 1 X (100 mM de Tris-HCl, pH 8,4, Triton X-100, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 300 μM de

cada nucleotídeo (dNTP), 6,25 µg de BSA (Bovine Serum Albumin), 2,5 U de Taq polimerase, 0,15 µM de cada primer, 7,5 ng de DNA e água ultrapura.

Sequenciamento e análise do DNA

Os produtos amplificados das regiões não-codificadoras do cpDNA de *H. acuminata* foram purificados utilizando as enzimas *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (ExoSAP-IT - USB Corporation), visando a eliminação de reagentes em excesso. As reações de sequenciamento tiveram um volume total de 10 µl com 1,5 µl de um dos *primers* na concentração 2,0 µM, 2,0 µL do Kit Big Dye Terminator III (Applied Biosystems, INC.), 2,0 µl de tampão de diluição, 2,0 µl de DNA e 2,5 µl de água ultrapurificada. Em seguida as reações foram purificadas utilizando-se solução de Acetato de Sódio/EDTA (Acetato de Sódio 3M, 125 mM EDTA e pH 8,0) e Etanol. Os produtos amplificados foram sequenciados sob eletroforese, em gel desnaturante de poliacrilamida 5% em sequenciador automático de DNA ABI 377, utilizando-se os *primers* nos dois sentidos (*forward* e *reverse*).

As seqüências obtidas foram analisadas automaticamente utilizando o programa Sequencing Analysis 3.4.1 (Applied Biosystems Inc.). Posteriormente as seqüências foram editadas manualmente utilizando-se o programa ChromasPro versão 1.34 (Technelysium Pty Ltd). O alinhamento das seqüências obtidas nos dois sentidos (*forward* e *reverse*) e a criação da seqüência consenso foram realizados utilizando-se o programa BioEdit versão 7.0.5.3 (Hall 1999). A edição final das seqüências foi realizada com o programa MEGA (Kumar *et al.* 2004) para corrigir erros no alinhamento realizado anteriormente, e definir o comprimento das seqüências.

Análise de dados

Para caracterizar a diversidade genética das populações de morfotipos de *H. acuminata*, foram calculados, considerando-se os dados microssatélites: o número total de alelos, número de alelos por loco, número de locos polimórficos, número e frequência de haplótipos e a diversidade genética (H_e) (Nei 1987). Para os dados de seqüências foram determinados o comprimento e a composição nucleotídica das seqüências obtidas e o número de haplótipos.

Para o teste de hipótese de isolamento por distância, foram correlacionadas as matrizes de distância genética e distância geográfica (km) entre as populações de *H. acuminata*, pelo teste de Mantel no programa ARLEQUIN (Schneider *et al.* 2001). A distância genética de Reynolds *et al.* (1983) foi escolhida por ser baseada em diferenças entre os números de repetições nas regiões de microssatélites seguindo o modelo de evolução SMM (Stepwise Mutation Model) (Ellegren 2004).

Para determinar as diferenças da variabilidade genética dentro e entre as populações de morfotipos de *H. acuminata* foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992), utilizando-se o programa ARLEQUIN (Schneider *et al.* 2001), tanto para os dados de microssatélites quanto de seqüências. A significância do índice de diferenciação F_{ST} foi testada por meio de 1000 permutações utilizando-se teste não-paramétrico (Excoffier *et al.* 1992).

Para os dois conjuntos de dados (locos microssatélites e seqüências do cpDNA) foram estimadas as relações entre os haplótipos observados nas populações de *H. acuminata* por meio de uma análise de rede utilizando o algoritmo “Median-Joining” (Bandelt *et al.* 1999), com o programa NETWORK (Forster *et al.* 2000).

Resultados

Extração do DNA

A extração de amostras de DNA dos indivíduos das populações de morfotipos de *H. acuminata* foi realizada de maneira satisfatória com o método CTAB. Na figura 3 são observadas amostras de DNA extraído de diferentes indivíduos de *H. acuminata* as quais demonstram a boa quantidade e qualidade do DNA.

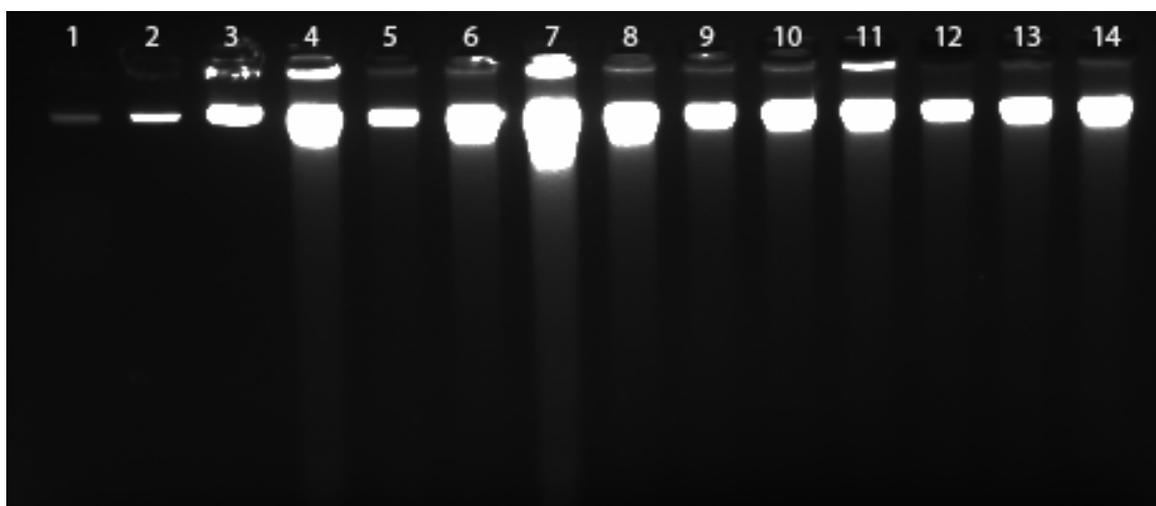


Figura 3 Quantificação do DNA genômico total extraído de amostras de *Heliconia acuminata*. As colunas de 1 a 3 indicam, respectivamente os marcadores de peso molecular 50, 100 e 200 ng. Nas colunas de 4 a 14, as bandas correspondem ao DNA extraídos de 11 indivíduos de *H. acuminata*. 4 e 5: morfotipo VMA (população 4); 6 e 7: morfotipo VMB (população 1); 8 a 14: morfotipo VDL (população 7). Legendas das populações estão na Fig. 2.

Microsatélites

Dos oito pares de *primers* microsatélites desenvolvidos para tabaco e testados no presente estudo, sete (87,5%) amplificaram com sucesso locos microsatélites do cpDNA de *H. acuminata*, e dentre os quatro pares de *primers* de eucalipto, também testados em *H. acuminata*, apenas um marcador (25%) possibilitou a amplificação do loco microsatélite correspondente para esta espécie. Dessa forma, a percentagem de transferabilidade de marcadores microsatélites do cpDNA desenvolvidos para *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) e

Eucalyptus (Myrtaceae), para *H. acuminata* foi de 58,3%. Dos oito locos microssatélites analisados, seis (*ccmp* 3, 4, 5, 6, 7 e *emcrc* 67) foram polimórficos para *H. acuminata* (Tabela 1). A figura 4 mostra os produtos amplificados obtidos após a otimização das condições da PCR para os oito locos microssatélites analisados para *H. acuminata*.

No total foram analisados 144 indivíduos de *H. acuminata* oriundos de 12 populações distribuídas na Amazônia brasileira para os oito locos. O número total de alelos observados considerando os oito locos microssatélites analisados em conjunto foi 21, variando de 1 a 5 alelos para cada loco (Tabela 1). Por tratar-se de genoma haplóide observou-se apenas um alelo por loco microssatélite analisado. Na figura 5 são apresentados eletroferogramas mostrando alelos detectados para diferentes indivíduos de *H. acuminata* para os locos *ccmp* 7 e *emcrc* 67. Os valores de diversidade genética (H_e - Nei, 1987) variaram entre 0,0 e 0,20, e a diversidade genética média total foi de 0,32 para todas as populações analisadas conjuntamente (Tabela 2).

A análise dos oito locos microssatélites mostrou a presença de 37 haplótipos nas 12 populações de *H. acuminata* (Figura 6). Deste total, três haplótipos foram os mais frequentes, representando 25% dos indivíduos amostrados. Um deles (haplótipo 3) ocorreu apenas em uma população, os outros dois (haplótipos 1 e 2) foram compartilhados por seis populações, sendo estes últimos provavelmente os haplótipos mais antigos. Dos haplótipos restantes, 13 foram representados apenas por um único indivíduo (9% do total de indivíduos), portanto provavelmente representando haplótipos recentes (Figura 6). Dos 37 haplótipos identificados, oito foram compartilhados entre indivíduos de diferentes populações, sendo o restante dos haplótipos exclusivos a alguma das populações analisadas (Figura 6). Na população VML1 (rio Madeira) foi encontrado apenas um haplótipo, que não se repetiu em qualquer outra população. Na tabela 3 são apresentados os haplótipos de microssatélites encontrados.

Tabela 1 Características dos oito locos microssatélites e de dois marcadores de regiões não-codificadoras do genoma de cloroplasto de *Heliconia acuminata*. TA: Temperatura de anelamento. Referências: *Weisinger & Gardner, 1999; **Steane *et al.*, 2005; ***Hamilton, 1999.

Código	Sequência dos primers 5'-3'	TA (°C)	Número de alelos	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>ccmp2</i> *	FAM-GATCCCGGACGTAATCCTG ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	58	1	220
<i>ccmp3</i> *	HEX-CAGACCAAAAGCTGACATAG GTTTCATTTCGGCTCCTTTAT	54	3	83 a 85
<i>ccmp4</i> *	TET-AATGCTGAATCGAYGACCTA CCAAAATATTBGGAGGACTCT	56	5	233 a 237
<i>ccmp5</i> *	FAM-TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTT AGGTTCCATCGGAACAATTAT	56	3	106 a 108
<i>ccmp6</i> *	FAM-CGATGCATATGTAGAAAGCC CATTACGTGCGACTATCTCC	54	3	97 a 99
<i>ccmp7</i> *	TET-CAACATATAACCACTGTCAAG ACATCATTATTGTATACTCTTTC	54	3	150 a 157
<i>ccmp10</i> *	HEX-TTTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	56	1	302
<i>emcrc67</i> **	FAM-CATCCTCAAATCCGTCCT TATTGCTTAGTCTGGCTTTTATC	58	2	255 a 261
<i>trnH</i> ***	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	62	8	317 a 337
<i>psbA</i> ***	CGAAGCTCCATCTACAAATGG			
<i>psbB</i> ***	GTTTACTTTTGGGCATGCTTCC	58	1	-
<i>psbF</i> ***	CGCAGTTCGTCTTGGACCAG			

Tabela 2 Diversidade genética estimada para as populações de *Heliconia acuminata* com base na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto. N: número total de indivíduos em cada população; *He*: diversidade genética. Denominações das siglas das populações como na figura 2.

Populações	N	Nº de locos polimórficos	Nº de alelos	<i>He</i>
VMB1	10	3	11	0,181
VMB2	14	4	12	0,17857
VMB3	16	5	13	0,15104
VMA1	10	3	11	0,16389
VMA2	15	2	10	0,07381
VML1	7	0	8	0,00000
VML2	16	5	13	0,20208
VDL1	10	2	10	0,05000
VDL2	10	4	12	0,16111
VDL3	10	2	10	0,14722
VDL4	16	3	12	0,10833
AMA	10	2	10	0,09167
Total	144			0,31980

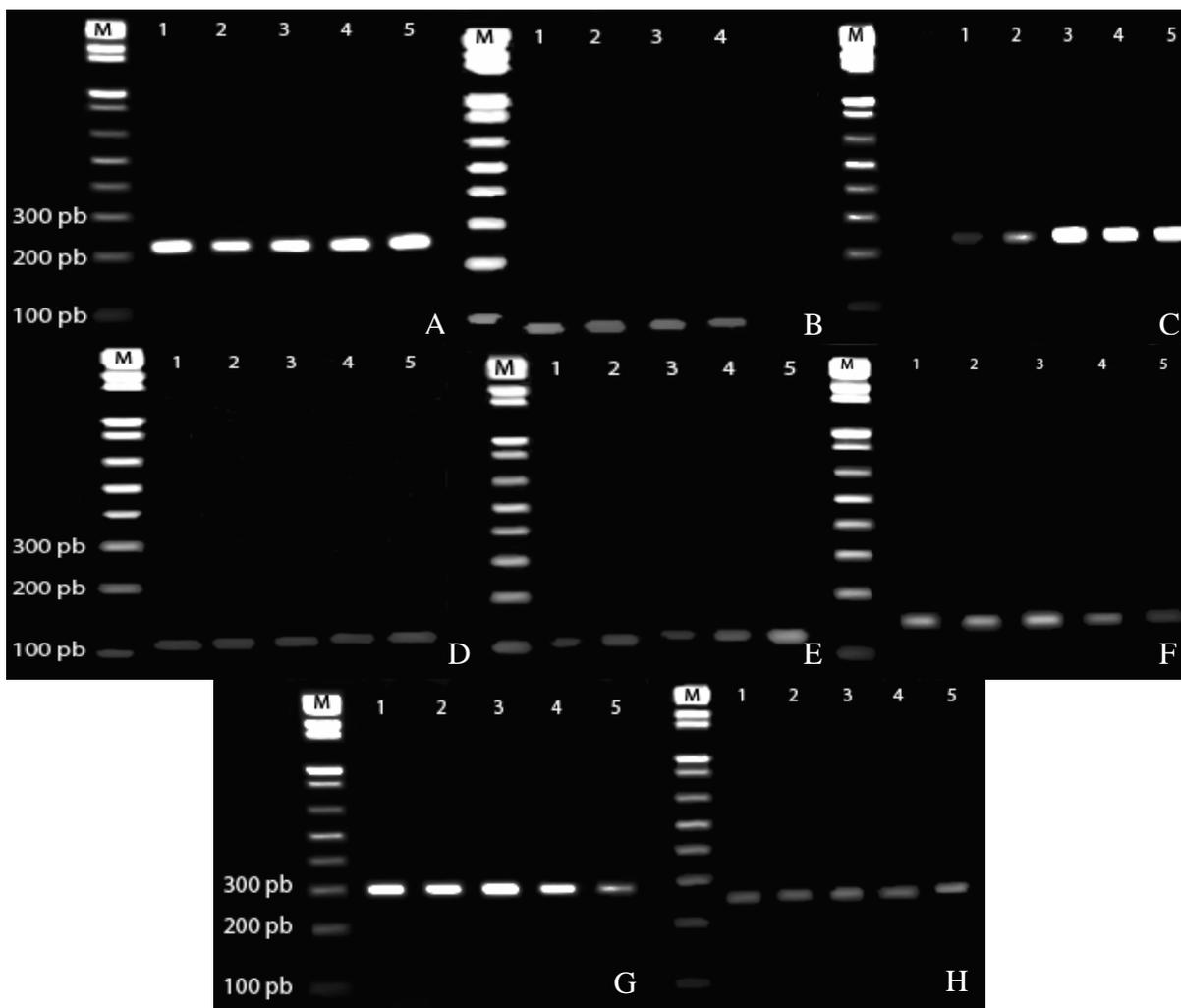


Figura 4 Fragmentos amplificados a partir da análise de oito locos cpSSR de *Heliconia acuminata*. A coluna M apresenta o marcador *1 Kb plus DNA ladder*, as colunas 1 a 5 apresentam fragmentos de DNA amplificados de diferentes indivíduos de *H. acuminata*. A) *ccmp2*, B) *ccmp3*, C) *ccmp4*, D) *ccmp5*, E) *ccmp6*, F) *ccmp7*, G) *ccmp10*, H) *emcrc67*.

Tabela 3 - Haplótipos observados na análise de oito locos microssatélites em 12 populações de *Heliconia acuminata*.

Hap: haplótipos; N: número de indivíduos.

Hap	Locos microssatélites								N
	ccmp 2	ccmp 3	ccmp 4	ccmp 5	ccmp 6	ccmp 7	ccmp 10	emcrc 67	
1	220	84	235	107	98	150	302	255	12
2	220	84	236	108	98	151	302	255	12
3	220	84	235	107	98	151	302	255	12
4	220	84	235	108	98	151	302	255	10
5	220	84	236	107	97	151	302	255	10
6	220	84	236	107	98	151	302	255	9
7	220	84	234	107	98	150	302	261	9
8	220	84	234	107	98	151	302	261	8
9	220	84	237	108	98	157	302	255	7
10	220	84	236	107	98	150	302	255	5
11	220	83	235	107	98	150	302	261	5
12	220	84	235	107	98	151	302	261	4
13	220	84	234	107	97	151	302	261	4
14	220	84	235	108	98	151	302	261	3
15	220	84	236	108	97	151	302	255	3
16	220	84	235	107	97	151	302	255	2
17	220	84	235	108	97	151	302	255	2
18	220	85	236	108	97	151	302	255	2
19	220	85	236	108	98	151	302	255	2
20	220	84	234	107	98	150	302	255	2
21	220	84	235	108	98	150	302	255	2
22	220	84	236	107	98	151	302	261	2
23	220	84	236	108	98	151	302	261	2
24	220	84	235	107	98	150	302	261	2
25	220	84	236	106	98	150	302	255	1
26	220	84	234	108	98	150	302	261	1
27	220	84	233	107	98	150	302	261	1
28	220	83	234	108	98	150	302	261	1
29	220	84	235	108	98	150	302	261	1
30	220	84	235	107	97	150	302	261	1
31	220	84	234	108	98	151	302	261	1
32	220	84	233	107	98	151	302	261	1
33	220	84	235	108	99	151	302	255	1
34	220	84	236	108	98	150	302	255	1
35	220	85	235	108	98	151	302	255	1
36	220	85	236	107	97	151	302	255	1
37	220	85	236	107	98	150	302	255	1
Total									144

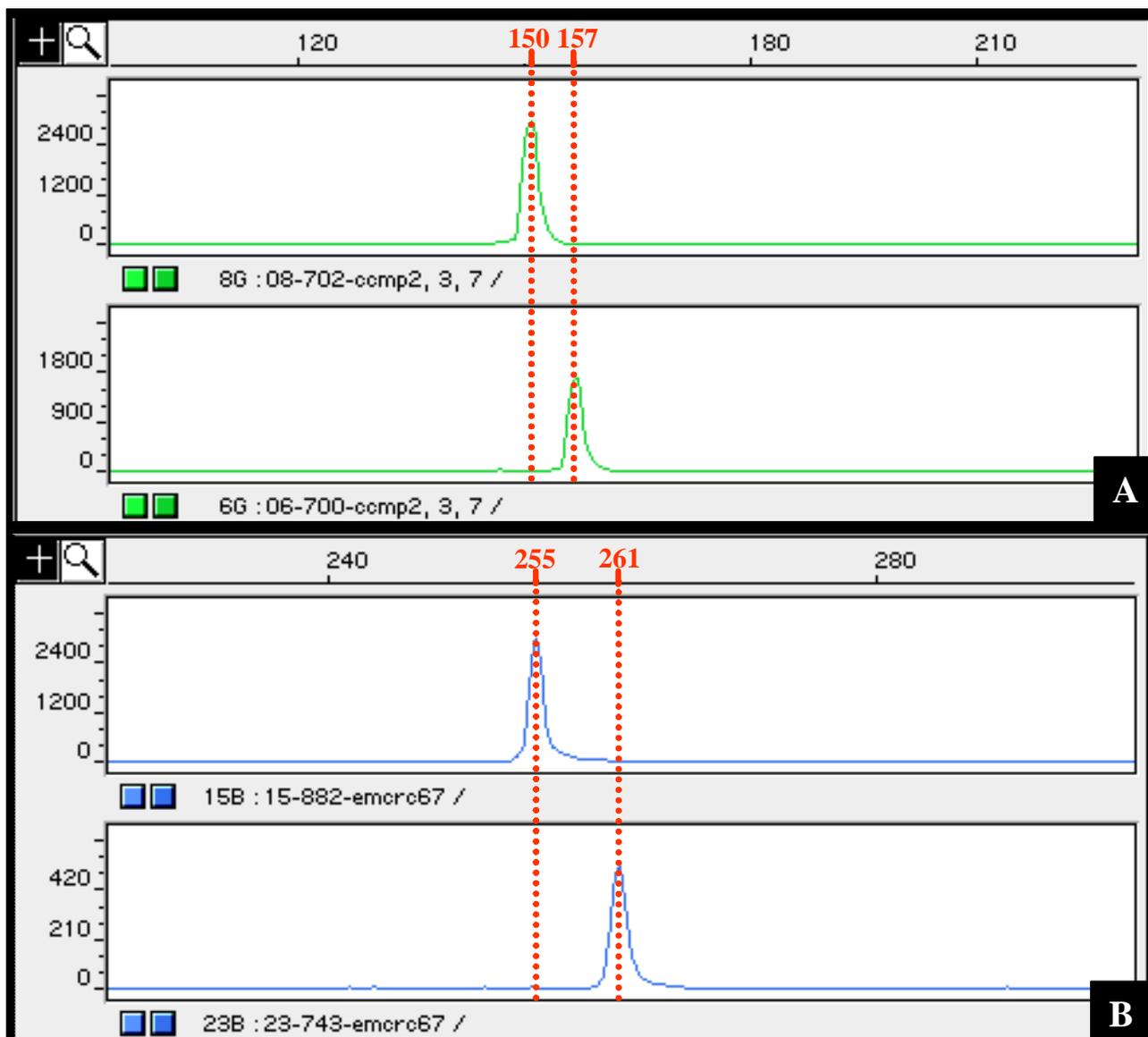


Figura 5 Eletroferogramas mostrando alelos de dois locos microssatélites amplificados para quatro indivíduos de *Heliconia acuminata*. O tamanho dos alelos é indicado na barra superior em número de pares de base. A) Variação no tamanho de *ccmp 7*. B) Variação no tamanho de *emcrc 67*.

Na figura 7 são apresentados os dados sobre a correlação entre diferenciação genética, com base na distância de Reynolds, e distância geográfica em Kilômetros, analisadas entre pares de populações de *H. acuminata*. Esta análise foi feita com base no teste de Mantel, que testa a hipótese de isolamento por distância, verificando a significância da correlação entre as matrizes de distância genética e distância geográfica para as populações de *H. acuminata*. Nesta análise, o coeficiente de correlação r encontrado foi igual a 0,17 ($P = 0,118$) indicando

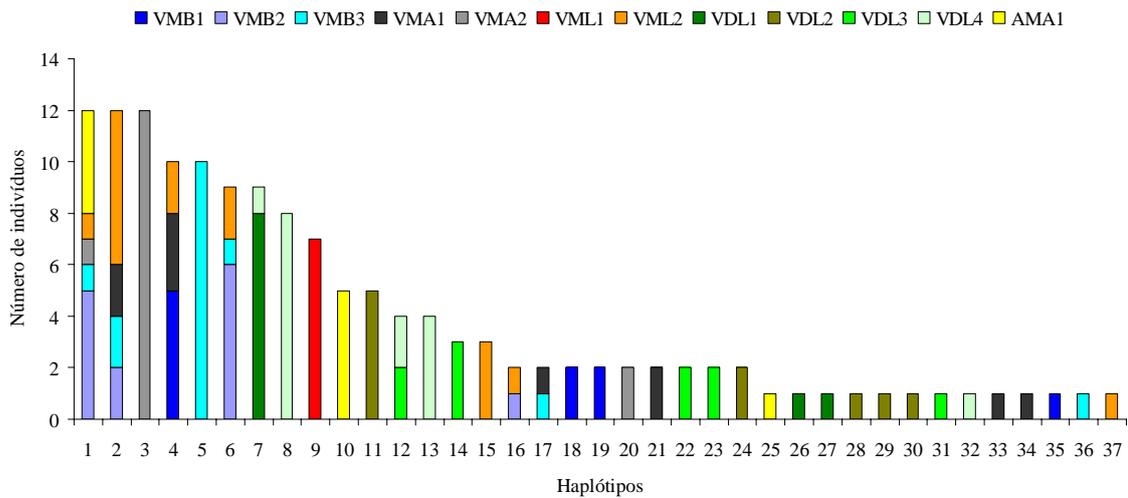


Figura 6 Frequência de haplótipos observados na análise de oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto de *Heliconia acuminata*. Legendas das populações como na Fig. 2.

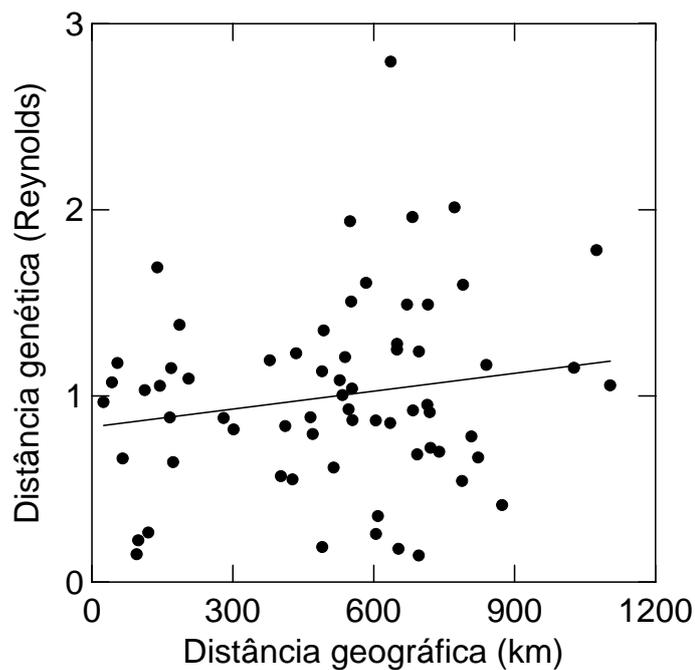


Figura 7 Relação entre distância genética de Reynolds e distância geográfica (km) para 12 populações *H. acuminata*, com base na variação observada em oito locos microssatélites do genoma de cloroplasto.

não haver uma relação significativa entre distância genética e a distancia geográfica entre as populações de *H. acuminata* na Amazônia brasileira.

A análise de variância molecular (AMOVA) baseada nos locos microssatélites para todas as populações amostradas revelou que a maior parte da variação genética encontrada

pode ser atribuída a diferenças entre as populações de *H. acuminata* ($F_{ST} = 0,62$, $P < 0,001$, Tabela 4). Tais resultados indicam que as populações dos diferentes morfotipos analisados de *H. acuminata* encontram-se de fato estruturadas na Amazônia brasileira.

Tabela 4 Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base na análise de oito locos cpSSR e sequências do cpDNA para as populações amostradas de *Heliconia acuminata*.

Fonte de variação	gL	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variação	<i>P</i>
- Microssatélites					
Entre morfotipos	4	61,611	0,279	20,06	0,012
Entre populações	7	51,606	0,585	42,02	< 0,001
Dentro das populações	132	69,707	0,528	37,91	< 0,001
Total	143	182,924	1,393		
- Sequências					
Entre morfotipos	4	29,394	0,987	66,93	0,004
Entre populações	7	6,667	0,297	20,15	0,003
Dentro das populações	21	4,000	0,190	12,92	< 0,001
Total	32	40,061	1,475		

gL, graus de liberdade

A análise das relações entre os haplótipos de microssatélites de cloroplasto de *H. acuminata*, por meio de análise de rede utilizando o método *Median-Joining*, evidenciou a presença de dois conjuntos distintos de haplótipos (Figura 8). Um conjunto foi formado pelas populações que representam os morfotipos VMB, VMA, VML e AMA. A população VML 1 do rio Madeira foi a mais diferenciada dentro do conjunto. Nesta população ocorreu apenas um haplótipo, que a diferenciou por sete mutações. O outro conjunto foi formado apenas pelas populações do morfotipo VDL. Os haplótipos foram compartilhados apenas dentro dos conjuntos.

■ VMB1 ■ VMB2 ■ VMB3 ■ VMA1 ■ VMA2 ■ VML1 ■ VML2 ■ VDL1 ■ VDL2 ■ VDL3 ■ VDL4 ■ AMA1

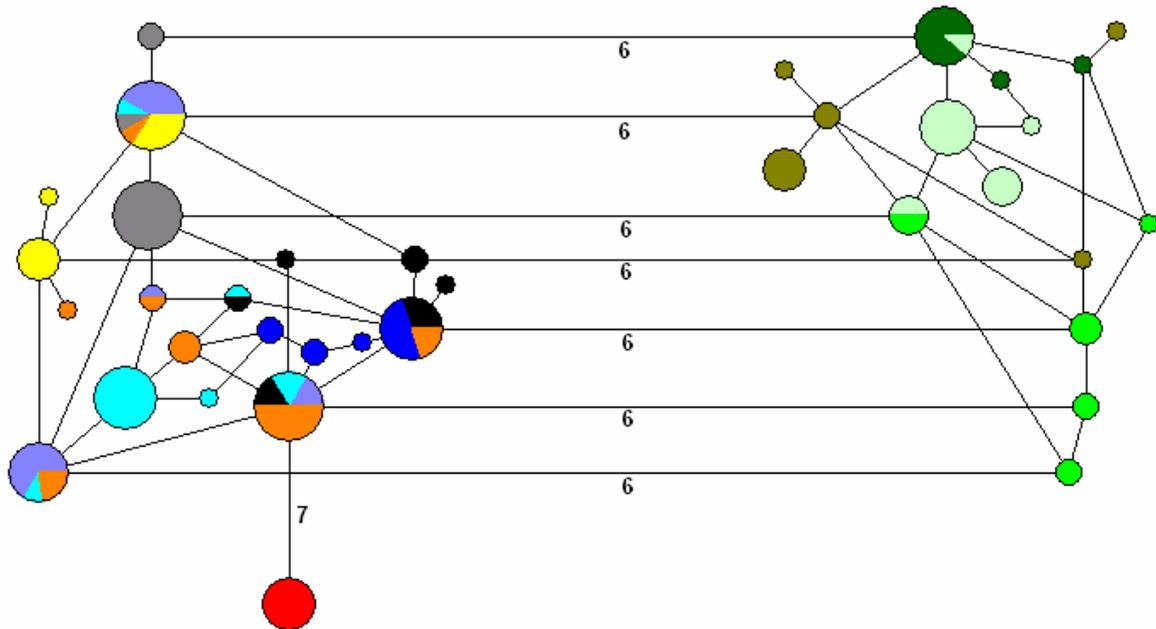


Figura 8 Relações entre haplótipos a partir de análise de rede (*Network*), com base na variação de oito locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *H. acuminata*. Cada círculo colorido refere-se a um haplótipo. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de ocorrência do haplótipo. As linhas representam as relações entre os haplótipos e os números, quando presentes, representam o número de mutações entre eles. Linhas que não apresentam números possuem uma única mutação. Para melhor visualização, a figura foi editada de forma que o comprimento das linhas não indica o número de mutações entre os haplótipos e, portanto, não reflete o grau de relação entre eles. As diferentes cores referem-se a representação das populações nos haplótipos (legendas na Fig. 2).

Sequências do cpDNA

Dos quatro pares de marcadores utilizados para a amplificação de diferentes regiões do cpDNA de *H. acuminata*, para apenas dois foi possível otimizar as condições de amplificação dos locos (Figura 9). Para determinar o conteúdo de informação dos marcadores selecionados foram realizados sequenciamentos preliminares de dois indivíduos de cada população, utilizando ambos os *primers forward* e *reverse* para as duas regiões (*trnH/psbA* e *psbB/psbF*) do cpDNA de *H. acuminata*. Nesta análise preliminar de polimorfismo foram observadas oito

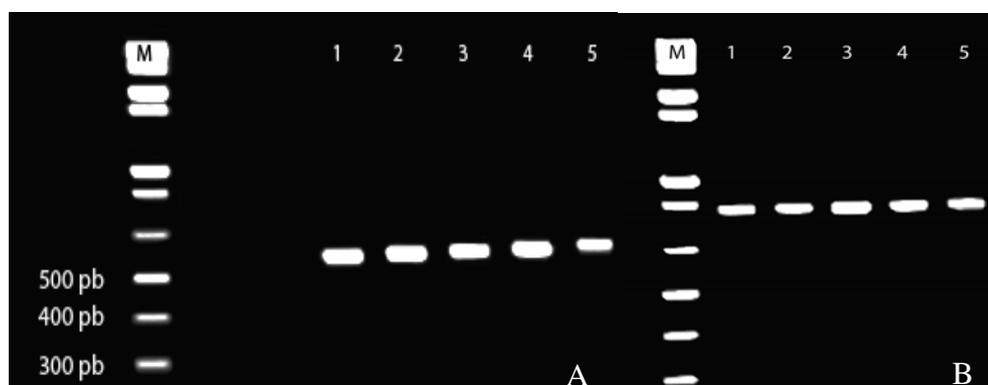


Figura 9 Fragmentos amplificados a partir da análise de duas regiões não-codificadoras do cpDNA de *H. acuminata*. A coluna M apresenta o marcador *1 Kb plus DNA ladder*, as colunas 1 a 5 apresentam fragmentos de DNA amplificados de diferentes indivíduos de *H. acuminata*. A) *trnH/psbA*, B) *psbB/psbF*.

substituições nucleotídicas para a região *trnH/psbA* e apenas uma substituição para *psbB/psbF*. Dessa forma, a região *trnH/psbA* foi a escolhida para as análises genéticas.

No total, foram obtidas 33 seqüências para a região intergênica *trnH/psbA*, em ambos os sentidos (*forward e reverse*) com base no sequenciamento do DNA de 33 indivíduos de 12 populações de *H. acuminata*. O comprimento das seqüências *trnH/psbA* variou entre 317 e 337 pb. Essa diferença no tamanho dos fragmentos deveu-se a 32 inserções/deleções, que ocorreram principalmente em regiões de repetição (TA) e a oito substituições encontradas nas seqüências, sendo consideradas nas análises apenas as variações devidas às substituições. Na figura 10 são observados os tipos de polimorfismos de seqüências detectados para *H. acuminata*. As bases nucleotídicas das seqüências analisadas ocorreram nas seguintes proporções: T: 37,9%, C: 15,6%, A: 36,3% e G: 10,2%.

A análise de variância molecular (AMOVA) baseada nas seqüências do cpDNA para todas as populações revelou que a maior parte da variação genética pode ser atribuída a diferenças encontradas entre os diferentes morfotipos de *H. acuminata* ($F_{ST} = 0,87$, $P = 0,004$, Tabela 4).

VMA, VML e AMA e o outro formado pelas populações do morfotipo VDL. O maior círculo representa o haplótipo mais frequente e diversificado nas populações de morfotipos de *H. acuminata* (Fig. 11).

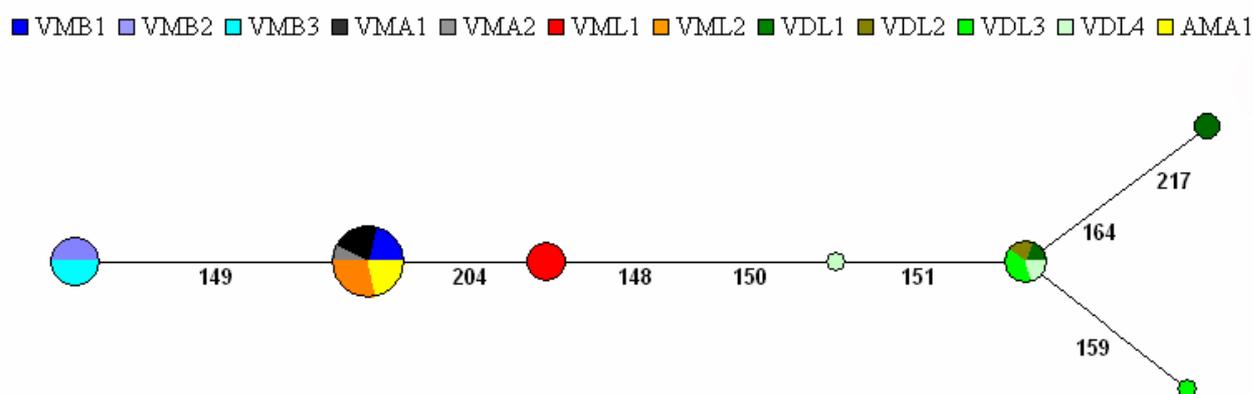


Figura 11 Relações entre os haplótipos obtidos a partir da análise das sequências do espaçador intergênico *trnH/psbA* do genoma do cloroplasto de *H. acuminata*. Cada círculo se refere a um haplótipo. O tamanho do círculo é proporcional à frequência de ocorrência do haplótipo. As linhas representam as relações entre os haplótipos. Os números pretos representam o local da substituição nucleotídica na sequência. Para melhor visualização, a figura foi editada de forma que o comprimento das linhas não indica o número de mutações entre os haplótipos, não refletindo, portanto, o grau de relação filogenética entre eles. As cores mostram as populações que apresentam aquele haplótipo (legendas na Fig. 2).

Discussão

As populações dos morfotipos de *H. acuminata* aqui investigadas apresentaram significativos níveis de diferenciação genética tanto considerando-se os dados de microssatélites quanto de sequências do genoma do cloroplasto. Os valores de F_{ST} tanto para os dados de microssatélites ($F_{ST} = 0,62$) quanto sequências do cpDNA ($F_{ST} = 0,87$) sugerem baixo fluxo gênico entre as populações de morfotipos de *H. acuminata*. Os dados da análise de variância molecular (AMOVA), realizada a partir dos marcadores microssatélites do cpDNA, indicaram diferenças genéticas significativas entre as populações de *H. acuminata*. Quanto aos dados de sequências da região *trnH/psbA* do cpDNA, a AMOVA revelou que a

maior parte da variação genética pode ser atribuída a diferenças entre os morfotipos de *H. acuminata*.

Marcadores microssatélites e marcadores de sequências do cpDNA possuem distintas taxas de mutação. Locos microssatélites são mais variáveis e possuem altas taxas de mutação (Ellegren 2004), enquanto marcadores de regiões específicas do DNA apresentam menor variação e menores taxas de mutação, sendo considerados mais conservados (Kress *et al.* 2005). Neste trabalho, tanto os marcadores microssatélites, quanto o espaçador intergênico *trnH/psbA* apresentaram resultados convergentes em detectar a diversidade genética entre as populações dos morfotipos de *H. acuminata*. A diferença entre os dois métodos (microssatélites e seqüências) ocorreu na distribuição da variabilidade genética observada entre as populações e os grupos de morfotipos. Os dados de microssatélites mostraram maior variabilidade genética detectada entre que dentro das populações de morfotipos, refletindo provavelmente uma variabilidade genética recente em função das regiões microssatélites sofrerem altas taxas de mutação. Já o padrão observado de distribuição da variabilidade genética nas regiões não-codificadoras revelou que a maior parte da variabilidade genética ocorreu entre os grupos de morfotipos. Regiões não-codificadoras apresentam menores taxas de mutação, sendo mais conservadas quando comparadas a regiões repetitivas como os locos microssatélites (Kress *et al.* 2005).

Foi observado o compartilhamento de haplótipos entre as populações dos morfotipos VMB, VMA, VML e AMA tanto para microssatélites quanto para sequências. Entretanto, entre o morfotipo VDL e os demais não ocorreu compartilhamento de haplótipos, que demonstra ocorrer diferenciação entre o morfotipo VDL e os demais morfotipos. Kress *et al.* (2001) sugerem, com base em análises do registro fóssil, a ocorrência de uma rápida diversificação da ordem Zingiberales ao final do Cretáceo, e que a maioria da diversificação dentro das famílias desta ordem (que inclui Heliconiaceae) começou no Terciário (Kress *et al.*

2001). Deste modo, estas datas revelam que a diversificação na ordem Zingiberales começou há aproximadamente 65 milhões de anos. A evidência da maior diferenciação do morfotipo VDL em relação aos outros morfotipos sugere que ocorreu tempo suficiente para este morfotipo separar do complexo de *H. acuminata*.

O baixo fluxo gênico observado entre as populações de morfotipos de *H. acuminata* com base nas análises de ambos os marcadores ($F_{ST} = 0,62$ e $F_{ST} = 0,87$ para microssatélites e seqüências, respectivamente) pode estar relacionado ao comportamento dos visitantes florais, barreiras geográficas ou limitação na dispersão. Os principais visitantes florais observados em *H. acuminata* na Amazônia Central são os beija-flores *Phaethornis superciliosus* e *P. bourcieri*, polinizadores que possuem a estratégia de forrageio em rotas de captura (“trapline”) (Kress 1985, Bruna & Kress 2005). Desta forma, os beija-flores permaneceriam limitados a locais específicos da distribuição de seus recursos alimentares (no caso, flores ou inflorescências). Temeles *et al.* (2000) e Temeles & Kress (2003) observaram que o beija-flor *Eulampis jugularis* não realizava visitas entre diferentes morfotipos de *Heliconia bihai* e *H. caribaea* nas suas zonas de contato nas ilhas caribenhas de Santa Lucia e Dominica. Dessa forma diferenças no comportamento alimentar de *E. jugularis* poderiam contribuir para a redução do fluxo gênico entre os morfotipos de *H. bihai* e *H. caribaea*. O mesmo padrão pode estar ocorrendo em *H. acuminata* nas zonas de contato entre os morfotipos considerando o comportamento dos visitantes florais. Porém esta hipótese precisa ser melhor avaliada com experimentos de campo específicos, para determinar se os beija-flores exibirão um padrão diferenciado de visitação em função da variação na coloração das flores.

A presença de barreiras geográficas poderia ser também um fator a ser considerado para explicar a redução do fluxo gênico entre as populações de morfotipos de *H. acuminata*. A região de Manaus se encontra na confluência de dois grandes rios (Solimões e Negro) que poderiam atuar como barreiras ao fluxo gênico entre os morfotipos de *H. acuminata*. Em

alguns casos, como em VMB, os morfotipos ocorrem em manchas descontínuas que reaparecem em ambas as margens dos dois rios (Cap 1). Ainda que rios amazônicos sejam considerados eficientes barreiras na distribuição geográfica de vários organismos (*e.g.* Ayres & Clutton-Brock 1992, Peres *et al.* 1996, Roosmalen *et al.* 1998, 2002; Hayes & Sewlal 2004, Simões *et al.* 2008), para *H. acuminata* os rios aparentemente não atuam como barreiras geográficas (Cap 1). Desta forma, é provável que fluxo gênico não seja afetado por rios atuando como barreiras geográficas.

Na ausência de barreiras geográficas evidentes, e na presença de zonas de contato simpátricas, uma possível explicação ao reduzido fluxo gênico entre as populações de morfotipos de *H. acuminata* seriam limitações à dispersão. A ecologia da dispersão de espécies de helicônias ainda é pouco explorada, sem evidências diretas dos possíveis agentes dispersores. No entanto na Amazônia *H. acuminata* provavelmente é dispersa localmente por pequenas aves de sub-bosque que apresentam pequeno raio de vôo. Na Amazônia Central estão sendo realizados estudos sobre a dispersão do morfotipo VMB nas áreas do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais. As primeiras observações revelaram que aves de sub-bosque ingerem os frutos de *H. acuminata*, e após permanecer por algum tempo no papo elas são regurgitadas (M. Anciães, comunicação pessoal). Além disso, aparentemente estas aves após se alimentarem de frutos permanecem em poleiros próximos (M. Anciães, comunicação pessoal). Desta forma é esperado que haja um maior número de indivíduos de *H. acuminata* estabelecendo-se próximo aos parentais. Então, provavelmente, limitações quanto à dispersão podem estar afetando o fluxo gênico entre os morfotipos de *H. acuminata*.

Outros autores buscaram determinar se as variações fenotípicas naturalmente observadas em espécies de *Heliconia* poderiam refletir diferenças genotípicas. Kumar *et al.* (1998) utilizaram marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para identificar e discriminar 16 variedades de *H. psittacorum* em Singapura. Esta espécie de helicônia, assim

como a maioria das outras espécies do gênero *Heliconia* formam complexos sem definição da existência ou não de espécies distintas. Kumar *et al.* (1998) conseguiram determinar diferenciação genética entre as variedades de *H. psittacorum*, mas sugerem que outros tipos de marcadores moleculares necessitam ser utilizados para aumentar a resolução da análise. Sheela *et al.* (2006) também utilizaram o marcador RAPD para realizar a caracterização molecular de quatro espécies com 13 variedades de helicônias, e reportaram sucesso em separar geneticamente os grupos mais relacionados. Meléndez-Ackerman *et al.* (2005) utilizando o marcador AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), para inferir processos microevolutivos em *Heliconia bihai*, concluíram que variações genéticas nesta espécie de heliconia são mais consistentes com seleção e fragmentação do habitat do que por deriva genética (Meléndez-Ackerman *et al.* 2005). Ainda que estes processos possam determinar a diferenciação genética entre morfotipos de *H. bihai*, esta discussão não foi explorada pelos autores. *Heliconia bihai* possui três morfotipos florais naquele local de estudo. Entretanto como nos estudos citados foram usados marcadores do genoma nuclear (RAPD e AFLP), de herança biparental, comparações mais detalhadas com os resultados obtidos no presente estudo devem ser feitas com cautela uma vez que aqui foram utilizados apenas marcadores do genoma do cloroplasto que evidencia, como discutido anteriormente, apenas o fluxo gênico histórico via sementes, ou seja, de origem uniparental. No entanto, em sua maioria, estes estudos mostram resultados semelhantes de diferenciação genética entre variedade e morfotipos de outras espécies de *Heliconia*, como o encontrado para *H. acuminata*.

No presente estudo foi encontrada uma significativa diferenciação genética entre os morfotipos de *H. acuminata* utilizando dois marcadores do genoma do cloroplasto com diferentes taxas de mutação. É importante ressaltar essa congruência dos resultados, mesmo considerando as diferenças intrínsecas de ambos marcadores (microsatélites e sequências do

DNA do cloroplasto) quanto às taxas de evolução. Foi possível determinar que, dentre os cinco morfotipos de *H. acuminata*, o morfotipo VDL, foi o que mais se diferenciou geneticamente dos demais. Entre os outros quatro morfotipos analisados houve também significativa diferenciação genética, mas não tão marcante quanto em VDL. No entanto, tais resultados não parecem ter relação com separação geográfica, pois as análises de distâncias genéticas e geográficas entre as populações de *H. acuminata* não foram correlacionadas. A ausência de barreiras geográficas evidentes e a ocorrência de zonas de contato simpátricas entre os morfotipos de *H. acuminata* corroboram o resultado de ausência de relação entre as distâncias geográficas e genéticas entre as populações dos morfotipos. Os resultados aqui obtidos à luz das análises de dois marcadores do genoma do cloroplasto sugerem a possibilidade de estar ocorrendo evidente processo de separação em pelo menos um morfotipo dentro do complexo *H. acuminata*.

Referências

- Avise JC (1989) Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, **43**, 1192-1208.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 422-489.
- Ayres J M, Clutton-Brock TH (1992) River boundaries and species size in Amazonian primates. *American Naturalist*, **140**, 531-537.
- Bandelt HJ, Foster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**, 155-165.
- Berry F, Kress WJ (1991) *Heliconia: an identification guide*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Blackmore S (2002) Biodiversity update – progress in taxonomy. *Science*, **298**, 365.
- Broschat TK, Donselman HM, Will AA (1984) ‘Andromeda’ and ‘Golden Torch’ heliconias. *HortScience*, **19**, 736-737.
- Bruna EM, Kress WJ (2005) Forest fragments and tropical plant reproduction in Amazonian Brazil. In: *Plant conservation: A natural history approach* (eds Krupnick G A, Kress WJ), pp. 141-146. University of Chicago Press, Chicago.
- Caicedo AL, Schaal BA (2004) Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Molecular Ecology*, **13**, 1871-1882.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 349-356.

- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (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.
- Dasmahapatra KK, Mallet J (2006) DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity*, **97**, 254-255.
- Dick CW, Abdul-Salim K, Bermingham E (2003) Molecular systematic analysis reveals cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *American Naturalist*, **162**, 691-703.
- Dick CW, Bermingham E, Lemes MR, Gribel R (2007) Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, **16**, 3039-3049.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13-15.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 435-445.
- Erickson DL, Hamrick JL, Kochert GD (2004) Ecological determinants of genetic diversity in an expanding population of the shrub *Myrica cerifera*. *Molecular Ecology*, **13**, 1655-1664.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília.
- Forster P, Bandelt HJ, Röhl A (2000) *Netwoks 3.1.1.0* Software free available at: www.fluxus-engineering.com. Fluxus Technology Ltd, Cambridge.

- Grant V (1993) Origin of floral isolation between ornithophilous and sphingophilous plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 7729-7733.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, **23**, 167-172.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**, 95-98.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521-523.
- Hamilton MB, Braverman JM, Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 1710-1721.
- Hayes FE, Sewlal JN (2004) The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography*, **31**, 1809-1818.
- Heaton HJ, Whitkus R, Gómez-Pompa A (1999) Extreme ecological and phenotypic differences in the tropical tree chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) are not matched by genetic divergence: a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Molecular Ecology*, **8**: 627-632.
- Hebert PDN, Cywinska NA, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313-321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004b) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 14812-14817.

- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270(suppl.)**, S96-S99.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004a) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, **2**, e312.
- Jang CG, Müllner AN, Greimler J (2005) Conflicting patterns of genetic and morphological variation in European *Gentianella* section *Gentianella*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **148**, 175-187.
- Junqueira AH, Peetz MS (2007) Las exportaciones brasileñas de flores y plantas crecen más del 124% entre 2001 y 2006. *Revista Horticultura Internacional*, **56**, 76-79.
- Krell F-T (2004) Parataxonomy vs. taxonomy in biodiversity studies – pitfalls and applicability of “morphospecies” sorting. *Biodiversity and Conservation*, **13**, 795-812.
- Kress WJ (1985) Pollination and reproductive biology of *Heliconia*. In: *The botany and natural history of Panama* (eds D'Árcy WG, Correa MD), pp. 267-285. Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Kress WJ (1990) The diversity and distribution of *Heliconia* (Heliconiaceae) in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, **4**, 159-167.
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH/psbA* spacer region. *PLoS One*, **6**, e508.
- Kress WJ, Prince LM, Hahn WJ, Zimmer EA (2001) Unraveling the evolutionary radiation of the families of the Zingiberales using morphological and molecular evidence. *Systematic Biology*, **50**, 926-944.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8369-8374.

- Kumar PP, Yau JCK, Jin-Goh C (1998) Genetic analyses of *Heliconia* species and cultivars with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, **123**, 91-97.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 150-163.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 2923-2928.
- Lemes MR, Gribel R, Proctor J, Grattapaglia D (2003) Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, **12**, 2875-2883.
- Lemes MR, Grattapaglia D, Grogan J, Proctor J, Gribel R (2007) Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. *Plant Ecology*, **192**, 169-180.
- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA, Provan J (2003) Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, **12**, 3219-3225.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM, Freitas LB (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany*, **95**, 799-806.
- Meléndez-Ackerman EJ, Speranza P, Kress WJ, Rohena L, Toledo E., Cortés C, Treece D, Gitzendanner M, Soltis P, Soltis D (2005) Microevolutionary processes inferred from

- AFLP and morphological variation in *Heliconia bihai* (Heliconiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **166**, 781-794.
- Miller A, Schaal B (2005) Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 12801-12806.
- Muchhala N (2003) Exploring the boundary between pollination syndromes: bats and hummingbirds as pollinators of *Burmeistera cyclostigmata* and *B. tenuiflora* (Campanulaceae). *Oecologia*, **134**, 373-380.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Novick RR, Dick CW, Lemes MR, Navarro C, Caccone A, Bermingham E (2003) Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **12**, 2885-2893.
- Ohsawa T, Saito Y, Sawada H, Ide Y (2008) Impact of altitude and topography on the genetic diversity of *Quercus serrata* populations in the Chichibu Mountains, central Japan. *Flora*, **203**, 187-196.
- Olsen KM (2002) Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Ecology*, **11**, 901-911.
- Olsen KM, Schaal BA (1999) Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5586-5591.
- Oxelman B, Lidén M, Berglund D (1997) Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **206**, 393-410.
- Pennisi E (2007) Wanted: a barcode for plants. *Science*, **318**, 190-191.
- Peres CA, Patton JL, Silva MNF (1996) Riverine barriers and gene flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. *Folia Primatologica*, **67**, 113-124.

- Powell W, Morgante M, McDevitt R, Vendramin GG, Rafalski JA (1995) Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes - applications to the population-genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7759-7763.
- Provan J, Soranzo N, Wilson NJ, McNicol JW, Morgante M, Powell W (1999) The use of uniparentally inherited simple sequence repeat markers in plant population studies and systematics. In: *Molecular systematics and plant evolution* (eds Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ), pp. 35-50. Taylor & Francis, London.
- Provan J, Powell W, Hollingsworth PM (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 142-147.
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, **105**, 767-779.
- Ronquist F, Gärdenfors U (2003) Taxonomy and biodiversity inventories: time to deliver. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 269-270.
- Roosmalen MGM, Roosmalen T, Mittermeier RA, Fonseca GAB (1998) A new and distinctive species of marmoset (Callitrichidae, Primates) from the lower river Aripuanã, State of Amazonas, central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia*, **22**, 1-27.
- Roosmalen MGM, Roosmalen T, Mittermeier RA, Fonseca GAB (2002) A taxonomic review of the Titi Monkeys, genus *Calicebus*, Tomas, 1903, with the description of two new species, *Calicebus bernhardi* and *Calicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotropical Primates*, **10**, 1-52.
- Rubinoff D, Cameron S, Will K (2006) Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 1-2.

- Samuel R, Pinsker W, Kiehn M (1997) Phylogeny of some species of *Cyrtandra* (Cesneriaceae) inferred from the *atb/rbcL* cpDNA intergene region. *Botanica Acta*, **110**, 503-510.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005) Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **360**, 1850-1811.
- Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, Excoffier L (2001) *Arlequin (Version 2001): a software for population genetic data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sheela VL, Geetha Lekshmi PR, Jayachandran Nair CS, Rajmohan K (2006) Molecular characterization of *Heliconia* by RAPD assay. *Journal of Tropical Agriculture*, **44**, 37-41.
- Simões PI, Lima AP, Magnusson WE, Hödl W, Amézquita A (2008) Acoustic and morphological differentiation in the frog *Allobates femoralis*: relationships with the upper Madeira River and other potential geological barriers. *Biotropica*, **40**, 607-614.
- Smith SD, Ané C, Baum DA (2008) The role of pollinator shifts in the floral diversification of *Iochroma* (Solanaceae). *Evolution*, **62**, 793-806.
- Steane DA, Jones RC, Vaillancourt RE (2005) A set of chloroplast microsatellite primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Molecular Ecology Notes*, **5**, 538-541.
- Stiles FG (1975) Ecology, flowering phenology and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecology*, **56**, 285-301.
- Streisfeld MA, Kohn JR (2007) Environment and pollinator-mediated selection on parapatric floral races of *Mimulus aurantiacus*. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 122-132.
- Temeles EJ, Kress WJ (2003) Adaptation in a plant-hummingbird association. *Science*, **300**, 630-633.

- Temeles EJ, Pan IL, Brennan JL, Horwitt JN (2000) Evidence for ecological causation of sexual dimorphism in a hummingbird. *Science*, **289**,441-443.
- Weising G, Gardner RC (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous Angiosperms. *Genome*, **42**, 9-19.
- Will K, Rubinoff D (2004) Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, **20**, 47-55.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os morfotipos de *H. acuminata* se distribuem manchas com pouca sobreposição em suas áreas de contato. Além disso, os rios amazônicos não são barreiras geográficas em sua distribuição.
- Embora existam características distintas de solo nas regiões ocupadas por cada morfotipo, aparentemente gradientes edáficos não estão relacionados com a segregação local entre morfotipos.
- As populações dos morfotipos de *H. acuminata* apresentam significativos níveis de diferenciação genética. A análise de rede revelou a separação de grupos distintos, onde os haplótipos observados formaram dois grupos, um com os morfotipos VMB, VMA, VML e AMA, e outro apenas com o morfotipo VDL.
- Processos relacionados à limitação de dispersão podem ser os responsáveis pela quase ausência de fluxo gênico entre os morfotipos de *H. acuminata*.
- A análise dos locos microssatélites e das sequências de regiões não-codificadoras sugerem a possibilidade de estar ocorrendo evidente processo de separação em pelo menos um morfotipo dentro do complexo *H. acuminata*.