Capitolul 1

Consideraţii generale

Plantele constituie o sursă importantă de energie pentru supravieţuirea şi evoluţia speciilor. Descoperirea markerilor moleculari a contribuit la dezvoltarea unui nou domeniu şi anume genomica. În ultimii ani, markerii moleculari au devenit utili pentru analiza genomului plantelor, fiind utilizaţi în studiul unor aspecte variate cum sunt taxonomia, filogenia, ecologia, genetica sau cultura plantelor. Iniţial, strategiile clasice incluzând anatomia comparată, fiziologia şi embriologia au fost utilizate în analiza genetică pentru a determina variabilitatea genetică inter- şi intraspecifică. Markerii moleculari au completat foarte rapid strategiile clasice de analiză. Aceşti markeri includ constituenţii biochimici (ex. metaboliţii secundari de la plante) şi macromoleculele (ex. proteinele, ADN). Analiza metaboliţilor secundari este restricţionată la acele plante care produc metaboliţi care pot fi uşor analizaţi şi pe baza cărora se poate face diferenţa dintre varietăţi. Pentru a putea fi utilizaţi ca markeri, aceşti metaboliţi trebuie să fie neutri la efectele condiţiilor de mediu sau practicile agricole. Astfel, dintre markerii moleculari utilizaţi, cei bazaţi pe analiza ADN sunt cei mai potriviţi şi prezenţi la toate organismele vii.

Dezvoltarea şi utilizarea markerilor moleculari pentru detectarea şi exploatarea polimorfismului ADN reprezintă una din cele mai semnificative realizări în domeniul geneticii moleculare. Existenţa unor variate tipuri de markeri moleculari ce diferă în ce priveşte principiul, metodologia şi aplicaţiile, necesită atenţie în alegerea uneia sau alteia dintre metode pentru un anume scop. În prezent nu există un tip de marker molecular care să asigure toate necesităţile cercetării moderne. În funcţie de scopul urmărit se poate alege un anume tip de marker molecular (Semagn şi colab., 2006).

1.1. Principalele clase de markeri moleculari

Markerii moleculari pot fi clasificaţi în markeri tradiţionali şi markeri bazaţi pe reacţia de amplificare in vitro a ADN prin PCR (Weising şi colab., 2005). Din prima categorie fac parte markerii proteici (în marea lor majoritate izoenzime), markerii RFLP şi cei rezultaţi din secvenţierea ADN-ului (SNPs şi alte tipuri de polimorfisme). Din categoria markerilor bazaţi pe PCR fac parte markerii RAPD cu toate variantele dezvoltate ulterior, mini- şi microsateliţii, AFLP, SSCP, RLGS.

1.2. ADN repetitiv, sursa variabilităţii în genomul eucariot

Analiza comparativă a diferitelor genomuri eucariote a arătat faptul că aproximativ 30–90% din genomul acestor specii este constituit din regiuni de ADN repetitiv, care este înalt polimorf. Aceste regiuni conţin loci ce cuprind sute de alele care diferă de la un individ la altul în ce priveşte lungimea, secvenţa, sau ambele; regiunile polimorfe sunt răspândite în tot genomul şi sunt aranjate în tandem. Rolul ADN repetitiv nu este pe deplin înţeles dar se pare ca joacă un rol important în amortizarea mutaţiilor din genom. Dintre mutaţiile care apar în genom numai cele moştenite au rol în generarea polimorfismelor şi în evoluţie. Mutaţiile/rearanjările la nivelul ADN repetitiv reprezintă un element de bază pentru anumite sisteme de markeri utili pentru variate aplicaţii în analiza genomului plantelor.

Mutaţiile din structura ADN-lui apar la nivel individual; prin urmare, într-o populaţie pot exista mai multe variante genetice, pentru un locus dat. Aceste variante se numesc alele. Tot de alele vorbim şi când ne referim la numărul de repetiţii dintr-o regiune de ADN repetitiv, cum ar fi ADN-ul microsatelit. Presupunând că pentru un locus microsatelit, într-o populaţie întâlnim indivizi cu un număr de repetiţii cuprins între 15–20, fiecare din acest număr este considerat a fi o alelă. De fapt, în acest caz alelele sunt reprezentate de secvenţe de ADN care diferă între ele printr-un număr întreg de repetiţii ale unităţii de bază a secvenţei microsatelit.

Luând în considerare aceste aspecte, putem da o definiție generală a termenului de alelă: o variantă a unui caracter analizat. La nivel molecular (al ADN-ului) diferitele variante ale aceluiași caracter sunt rezultatul substituției, inserției sau deleției de nucleotide. În cazul secvenței microsateliților numărul diferit de unități repetitive este dat de un fenomen de inserție sau deleție a unității repetitive în cursul replicării ADN-ului).

Fenomenul de polimorfism genetic se referă la existența a mai mult decât o variantă alelică a unui caracter într-o populație (genă în sens clasic, sau secvența ADN de interes în sens general) (Weising și colab., 2005).

1.3. Clasificarea markerilor moleculari

În prezent sunt acceptate mai multe modalități de clasificare a markerilor de ADN. Din punct de vedere al mecanismului intrinsec de apariție a markerilor polimorfici studiați, distingem:

Markeri unici: este vorba despre polimorfisme apărute în urma unui fenomen mutațional a cărui frecvență este atât de mică, încât se consideră că respectiva mutație este unică în populația studiată (substituțiile sau inserțiile/delețiile). Deoarece fenomenul mutațional care a generat polimorfismul a avut loc o singură dată, înseamnă că există doar două stări ale markerului. Din acest motiv aceşti markeri se mai numesc şi markeri binari. Cele două stări ale markerului se numesc ancestrală şi derivată. Pentru a se stabili care stare este cea ancestrală şi care este cea derivată se pot aplica diferite metode, cea mai comună fiind compararea secvenței polimorfe analizate cu secvența corespunzătoare de la o specie înrudită.

Markeri recurenți: este vorba de polimorfisme apărute prin mecanisme a căror frecvență este sensibil mai mare decât în cazul precedent. Astfel de markeri sunt cei care se bazează pe existența ADN repetitiv, respectiv microsateliți şi sateliți ADN (Weising şi colab., 2005).

În ultimele două decenii au fost propuse mai multe metode de evidențiere a polimorfismelor prezente în secvența ADN-ului; aceste metode au fost utilizate pentru descrierea/caracterizarea unui număr mare de markeri moleculari de diferite tipuri. Una din modalitățile de

clasificare a markerilor moleculari, probabil cea mai practică, ia în considerare tehnica utilizată pentru evidențierea acestora. În cele ce urmează vom aminti, în ordine alfabetică, o mare parte din aceste metode ce generează, în mare parte, markeri specifici (Semagn și colab., 2006): ASAP (allele specific associated primers, Gu și colab., 1995), ASO (allele specific oligo, Beckmann, 1988), AS-PCR (allele specific chain reaction, Landegren și colab., 1988), AFLP (amplified fragment length polymorphism, Vos și colab., 1995), AMP-PCR (anchored microsatellite primed PCR, Zietkiewicz și colab., 1994), ASSR (anchored simple sequence repeats, Wang și colab., 1998), AP-PCR (arbitrarily primed polymerase chain reaction, Welsh și McClelland, 1990), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence, Konieczny și Ausubel, 1993), DArT (diversity arrays technology, Jaccoud și colab., 2001), DAF (DNA amplification fingerprinting, Caetano-Anollés și colab., 1991), EST (expressed sequence tags Adams și colab., 1991), ISSR (inter-simple sequence repeat, Zietkiewicz și colab., 1994), IPCR (inverse PCR, Triglia și colab., 1988), ISTR (inverse sequence-tagged repeats, Rohde, 1996), MP-PCR (microsatellite primed PCR, Meyer și colab., 1993), MASDA (multiplexed allele-specific diagnostic assay, Shuber și colab., 1997), RAMP (random amplified microsatellite polymorphisms, Wu și colab., 1994), RAM (random amplified microsatellites, Hantula și colab., 1996), RAPD (random amplified polymorphic DNA, Williams și colab., 1990), RFLP (restriction fragment length polymorphism, Botstein și colab., 1980), SAMPL (selective amplification of microsatellite polymorphic loci, Morgante și Vogel, 1994), SCAR (sequence characterized amplified regions, Paran și Michelmore, 1993), S-SAP (sequence specific amplification polymorphisms, Waugh și colab., 1997), STMS (sequence tagged microsatelite site, Beckmann și Soller, 1990), STS (sequence tagged site, Olsen și colab., 1989), STR (short tandem repeats, Hamada și colab., 1982), SSLP (simple sequence length polymorphism, Dietrich și colab., 1992), SSR (simple sequence repeats, Akkaya și colab., 1992), SNP (single nucleotide polymorphism, Jordan și Humphries 1994), SPAR (single primer amplification reactions, Gupta și colab., 1994), SSCP (single stranded conformational polymorphism, Orita și colab., 1989), SSI (site-selected insertion PCR, Koes și colab., 1995), SDA (strand displacement amplification, Walker și colab., 1992) și VNTR (variable number of tandem repeat, Nakamura și colab., 1987).

Unii dintre aceşti markeri sunt foarte asemănători (ex. ASAP, ASO şi AS-PCR), unii sunt sinonimi (ex. ISSR, RAMP, RAM, SPAR, AMP-PCR, MP-PCR, ASSR, Reddy şi colab., 2002), iar alții sunt identici (ex. SSLP, STMS, STR şi SSR).

1.4. Domenii de aplicare a markerilor moleculari

Aşa cum am mai arătat anterior, polimorfismul genetic este definit ca fiind apariția simultană în populații, a două sau mai multe genotipuri. Secvențierea ADN este cea mai bună metodă de identificare a unei variații la nivelul unui locus, dar dacă se ia în considerare analizarea unui număr mare de gene şi de indivizi, această metodă este încă relativ scumpă şi laborioasă. Din acest considerent, pentru a se identifica sau caracteriza polimorfismele prezente la nivelul unui număr mare de loci anonimi precum şi la un număr considerabil de eşantioane/indivizi s-au dezvoltat metodele prezentate în subcapitoul anterior.

Termenul de amprentare ADN (DNA-fingerprinting) a fost introdus pentru prima dată de Alec Jeffrey în 1985 (Jeffrey şi colab., 1985), pentru a descrie patternul de fragmente ADN rezultat în urma separării electroforetice a ADN-ului genomic digerat cu enzime de restricție şi hibridat cu probe specifice. Patternurile obținute ilustrează o trăsătură unică a individului analizat şi sunt utilizate curent pentru individualizarea biologică. Recent, termenul de amprentare ADN descrie utilizarea combinată a anumitor sisteme de detecție a unui locus unic, fiind unelte versatile pentru investigarea unor aspecte variate ale genomului plantelor. Acestea includ caracterizarea variabilității genetice, amprentarea genetică, cartarea genetică, analiza evoluției genomului, genetica populațiilor, taxonomia, cultura plantelor şi diagnosticul unor boli sau dăunători.

1.5. Proprietățile markerilor moleculari

Pentru ca un marker molecular să fie ideal este necesar să îndeplinească anumite criterii. Markerii moleculari trebuie să:

(1) aibă o natură înalt polimorfă;

- prezinte o transmitere codominantă în descendență (să permită determinarea statutului homozigot sau heterozigot al organismelor diploide);
- aibă o frecvență mare în populații (peste 10%);
- prezinte un comportament selectiv neutru (secvențele ADN ale unui organism să fie neutre față de condițiile de mediu sau diferitele activități aplicate culturilor de plante);
- fie determinați rapid, la un cost cât mai redus;
- prezinte o reproductibilitate mare;
- ofere posibilitate de schimb a datelor între laboratoare.

Este extrem de greu de găsit un marker molecular care să întrunească toate criteriile enumerate mai sus. În funcție de tipul studiului ce urmează a fi realizat se identifică un sistem de markeri care să îndeplinească cel puțin unele din caracteristicile de mai sus (Weising și colab., 1995).

clarificarea acestui aspect ar fi necesară analiza mai multor markeri moleculari, mult mai specifici decât markerii RAPD, cum ar fi microsateliţii. În ce priveşte genul *Dianthus* există rezultate privind utilizarea microsateliţilor în discriminarea speciilor şi la evidenţierea polimorfismului genetic intrapopulaţional (Smulders şi colab., 2000; Yagi şi colab., 2006).

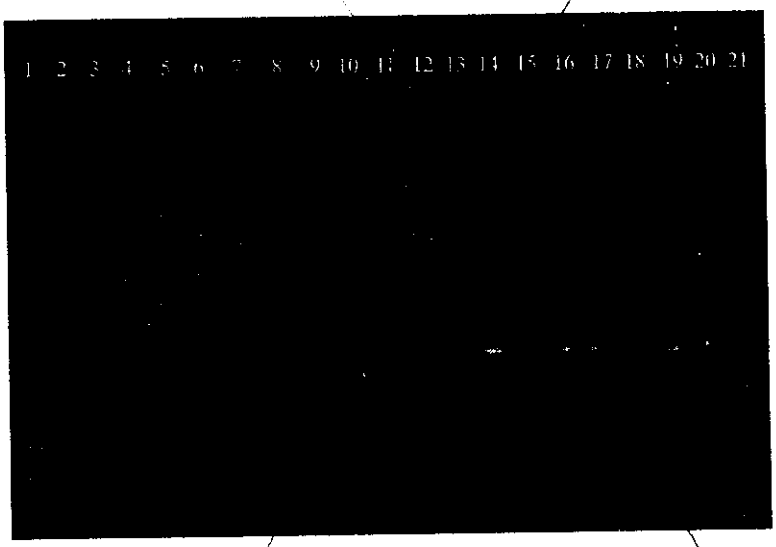


Fig. 27. Patternul de amplificare al ADN izolat din frunzele plantelor de *Dianthus giganteus* cu diferite amorse (1 – marker de greutate moleculară; 2–6 – *Dianthus giganteus* din Munţii Mehedinţi, amplificare cu amorsa OPA–13; 7 – *Dianthus leptopetalus*, amplificare cu OPA–13; 8–12 – *Dianthus giganteus* din Grădina Botanică, Cluj – Napoca, amplificare cu amorsa OPA–13; 13 – *Dianthus barbatus*, amplificare cu amorsa OPA–13, 14–17 – *Dianthus giganteus*, amplificare cu amorsa OPB–07; 18 – *Dianthus leptopetalus*, amplificare cu OPB–07, 19–21 – *Dianthus giganteus* din Grădina Botanică, amplificare cu amorsa OPB–07. Marker de greutate moleculară – plasmidul pBR 322 digerat cu enzima de restricţie *Alu I*, fragmente de restricţie de 908, 659, 521, 403, 281, 257, 226, 100 şi 90 pb.). Separare în gel de agaroză 1,5%, vizualizare cu bromură de etidium.

4.8. Utilizarea markerilor moleculari în studii de filogeografie

Filogeografia este o disciplină în plină dezvoltare al cărui scop este studiul principiilor şi a proceselor istorice ce guvernează

distribuția geografică a descendențelor genealogice (Avise și colab., 1987). Spre deosebire de genetica populațiilor clasică, care se bazează pe distribuția frecvențelor alelice, studiile filogeografice presupun separarea structurii populațiilor de istoria populațiilor.

În principiu, studiile filogeografice se pot baza pe informația conținută în ADN nuclear, ADNmt și ADNcp. În practică, markerii organelari sunt preferabili datorită faptului că ei se moștenesc într-o manieră uniparentală. Astfel, ei oferă informații despre istoria migrațională din trecut cu o probabilitate mai mare decât markerii nucleari. Genomurile organelare împărtășesc anumite caracteristici particulare distinctive față de genomul nuclear: 1. există doar un singur cromosom circular, prezent în copii numeroase, în locul a numeroși cromosomi nucleari, liniari; 2. genomul organelar este haploid; 3. de obicei nu există recombinări, anumite polimorfisme ale unor secvențe individuale pot fi informative și pot fi combinate pentru a forma haplotipuri; 4. genomul organelar este moștenit uniparental.

Majoritatea studiilor de filogeografie la plante se bazează pe analiza ADN cloroplastic. Polimorfismul intraspecific la nivelul ADNcp este investigat prin una din următoarele 3 metode: 1. polimorfismul situsurilor de restricție la nivelul ADNcp (ADNcp-CAPS); 2. microsateliți cloroplastici (SSRcp); 3. secvențierea comparativă a unor regiuni necodificatoare de ADNcp amplificate prin PCR. Oricare dintre metode este utilizată, următorul pas este combinarea polimorfismelor unice în haplotipuri distincte urmată de analiza distribuției și frecvențelor haplotipurilor de-a lungul unor regiuni geografice diferite, cuantificarea divergenței genetice între haplotipuri și evaluarea relațiilor genetice dintre acestea.

Un exemplu important în acest sens îl reprezintă un studiu filogeografic prin care s-au descoperit refugiile glaciare în regiunile Arctice neînghețate și în Europa de S sau SE (Taberlet și colab., 1998; Ennos și colab., 1999; Newton și colab., 1999), precum și istoria populațiilor de conifere din regiunile temperate și a populațiilor de angiosperme lemnoase din regiunile tropicale.

Schimbările climatice au modelat peisajul European de-a lungul Pleistocenului, iar speciile de plante au fost forțate în mod repetat să se retragă din calea glaciațiunilor în timpul erelor glaciare. Până recent, distribuția istorică a speciilor de plante și soarta indivi-

dual㠠a arborilor şi arbuştilor termofili după glaciaţiune a putut fi evaluată doar pe baza urmelor fosile, în special a sedimentelor de polen. Aceste constatări pot fi în prezent completate cu studii moleculare ale materialului vegetal existent. Recent, markerii ADN cloroplastici au fost utilizaţi pentru reconstruirea rutelor de recolonizare a câmpiilor Europei Centrale şi Nordice cu specii de plante lemnoase incluzând *Quercus petraea* şi *Quercus robur* (Dumolin-Lapègue şi colab., 1997), *Fagus silvatica* (Demesure şi colab., 1996), *Alnus glutinosa* (King şi Ferris, 2000), *Corylus avellana* (Palmé şi Vendramin, 2002), *Carpinus betulus* (Grivet şi Petit, 2003), *Calluna vulgaris* (Rendell şi Ennos, 2002) şi *Hedera helix* (Grivet şi Petit, 2002).

Grivet şi Petit, (2003) au studiat filogeografia carpenului din Europa. Autorii au analizat ADNcp din 36 de populaţii de *Carpinus betulus* şi 5 populaţii de *Carpinus orientalis* din Europa. Au fost studiate comparativ trei tipuri de markeri, DNAcp-CAPS, SSRcp şi secvenţierea comparativă a intronilor *trn*K şi *trn*L. Cu ajutorul acestor markeri s-au evidenţiat şase haplotipuri specifice pentru *C. betulus* şi două pentru *C. orientalis*. Nici unul dintre haplotipuri nu a fost comun celor două specii ceea ce a indicat absenţa unui flux de gene. Un tip particular de haplotip a fost constant în toate populaţiile din vestul şi nordul Europei, în populaţiile din Balcani fiind evidenţiată o mare diversitate genetică. Această din urmă regiune a servit probabil ca refugiu glaciar, pe când diversitatea genetică limitată de-a lungul Europei este cel mai probabil datorată blocajului de răspândire din timpul recolonizării.

Principalele concluzii ale acestor studii sunt: 1. recolonizarea din timpul ultimei perioade interglaciare a fost foarte rapidă (până la 10 km/generaţie); 2. haplotipurile au fost adesea neuniform dispersate, grupuri de haplotipuri identice acoperind arii largi; 3. cel mai mare nivel de diversitate genetică a fost reţinut în refugiile Europei de Sud; 4. cea mai redusă variabilitate genetică a fost întâlnită în Europa Centrală şi de Nord.

Un număr tot mai mare de studii filogeografice vizează arborii tropicali. Lira şi colaboratorii (2003) au utilizat 7 markeri SSRcp pentru a analiza diversitatea genetică a speciei periclitate *Caesalpinia echinata* din regiunea tropicală a Braziliei. S-au analizat câte 29 de indivizi din 7 populaţii localizate în 3 regiuni. Cu ajutorul acestor

markeri moleculari s-a evidențiat o variabilitate genetică extrem de redusă. Cinci din cele șapte populații au prezentat doar un haplotip. S-au evidențiat diferențe mari între regiuni (36% din totalul variației) și între populațiile din aceeași regiune (55%). Distribuția evidențiată este în concordanță cu existența unor refugii glaciare separate și nu pare a fi cauzată de influența antropogenă recentă.

Vogel și colaboratorii (2003) au utilizat perechile de amorse *ccmp*, elaborate de Weising și Gardner (1999) pentru screeningul regiunilor polimorfe din genomul cloroplastic la *Macaranga*. S-au utilizat cinci perechi de amorse și s-au evidențiat 2–8 benzi de dimensiune variată per locus, combinate în 17 haplotipuri printre indivizii a 10 specii de *Macaranga*. S-a observat că distribuția haplotipurilor a fost mai degrabă corelată cu regiunile geografice decât cu apartenența taxonomică. Un pattern al distribuției haplotipurilor cloroplastice, independent de specie dar corelat geografic a fost observat și la alte genuri (Dumolin-Lapègue și colab., 1997, McKinnon și colab., 2001) și sugerează un nivel considerabil al schimburilor interspecifice al ADNcp la acești taxoni. Studiile filogeografice bazate pe variația ADNcp susțin astfel conceptul elaborat de Riesenberg și Soltis (1991) conform căruia schimbul citoplasmatic între speciile de plante congenerice este un eveniment comun.

În ce privește studiile filogeografice efectuate la gimnosperme, majoritatea au fost realizate tot cu ajutorul microsateliților cloroplastici (Echt și colab., 1998; Wu și colab., 1998; Parducci și colab., 2001; Viard și colab., 2001; Gómez și colab., 2003), probabil datorită existenței unor amorse universale SSRcp obținute prin secvențierea completă a genomului cloroplastic de la specia *Pinus thunbergii* (Vendramin și colab., 1996). Anumite studii au fost realizate la genul *Abies*. Vendramin și Ziegenhagen (1997) au arătat că 2 din 11 perechi de amorse SSRcp de la *Pinus thunbergii* au evidențiat variabilitate și la *Abies alba*. Cu ajutorul acestor markeri moleculari s-au evidențiat 36 haplotipuri printre cele 70 de plante analizate din 7 populații. Vendramin și colaboratorii (1999) au realizat un studiu mai amplu analizând 714 indivizi din 17 populații din Europa și au evidențiat 90 de haplotipuri diferite, din care 38 haplotipuri (42%) au fost specifice anumitor populații.

Studii similare au fost realizate şi la *Pinus pinaster*. Vendramin şi colaboratorii (1998) au evidenţiat 34 de haplotipuri în 10 populaţii de-a lungul regiunii Mediteraneene vestice. În contrast, Ribeiro şi colaboratorii (2001) nu au identificat variabilitate genetică în cadrul a 12 populaţii aparţinând aceleiaşi specii din Portugalia. Autorii au emis ipoteza că lipsa variabilităţii se poate datora amestecării materialului genetic utilizat pentru plantare în unele regiuni. Într-un studiu ulterior, Ribeiro şi colaboratorii (2002) au utilizat markerii SSRcp şi AFLP pentru analiza a 12 populaţii de *Pinus pinaster* din Portugalia şi alte 12 populaţii din Franţa. Cu toate că markerii SSRcp au evidenţiat un nivel mai înalt de variabilitate decât markerii AFLP (datorită ratei mutaţionale mai mari în cazul microsateliţilor), cele două tipuri de markeri moleculari au reliefat nivele similare de diferenţiere genetică între populaţii.

Existenţa unui număr mai redus de studii filogeografice la plante comparativ cu cele de la animale se datorează în principal nivelurilor reduse de variaţie intraspecifică al ADN organelar de la plante. O alternativă şi totodată o potenţială sursă utilă de variaţie intraspecifică este generată de regiunile necodificatoare, intronii) ale unor gene nucleare prezente într-o singură copie (Strand şi colab., 1997; Hare, 2001). Studiile filogeografice bazate pe analiza ADN nuclear sunt atractive, dar sunt mult mai laborioase în comparaţie cu cele bazate pe analiza ADN cloroplastic. În primul rând trebuie realizat un studiu pilot de hibridare Southern pentru confirmarea faptului că genele candidate sunt într-adevăr într-o singură copie în genomul taxonilor investigaţi. Consecutiv, vor fi amplificate două alele de la heterozigoţi ceea ce face ca secvenţierea directă a produşilor PCR să fie dificilă, motiv pentru care este necesară clonarea prealabilă a produşilor PCR. În al treilea rând, trebuie ţinut cont de faptul că pot să apară recombinări intralocus ce pot rezulta din distrugerea haplotipurilor. În ciuda acestor dificultăţi, secvenţele intronice ale genelor nucleare aflate în număr redus de copii au fost foarte utile în studii filogeografice la animale. Fezabilitatea utilizării markerilor nucleari în studiile filogeografice la plante a fost demonstrată pentru prima dată de Olsen şi Schaal (1999), care au secvenţiat 962 pb din gena ce codifică gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*G3pdh*), care este prezentă într-o singură copie în genomul speciei *Manihot esculenta* şi speciile sălbatice înrudite *M. esculenta* subsp.

flabellifolia și *M. pruinosa*. Regiunea secvențiată a cuprins patru introni și trei exoni. Au fost evidențiate 64 de situsuri polimorfice combinate în 28 de haplotipuri la cei 212 indivizi analizați (424 alele). Rezultatele obținute din analiza genei *G3pdh* au fost coroborate cu cele obținute dintr-un studiu privind variația genetică la nivelul a cinci loci microsatelit, utilizându-se aceiași indivizi (Olsen și Schaal 2001). Alelele microsatelit prezente la specia cultivată *M. esculenta* sunt un subset al celor de la *M. esculenta* subsp. *flabellifolia*. Ulterior, Olsen (2002) a studiat în detaliu 27 haplotipuri obținute din analiza genei *G3pdh*, identificate în *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* și *M. pruinosa*. Distribuția geografică a haplotipurilor a indicat că *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* a apărut prin izolare datorată distanței. Doar populațiile nord-estice și vestice prezintă similarități puternice unele cu altele. Analizele statistice au sugerat că aceste regiuni au fost conectate prin fluxul de gene până recent. Fragmentarea ar putea fi consecința modificărilor majore de habitat din bazinul Amazonului, care se știe că au avut loc în Pleistocen.