

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Filogeografia e Variabilidade Genética de *Calibrachoa  
heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae)**

**Geraldo Mäder**

Orientadora: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Porto Alegre**

**Fevereiro de 2008**

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS
- Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Programa Especial em Taxonomia – PROTAX (MCT/CNPq/CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS)

## **AGRADECIMENTOS**

Esse trabalho marca mais uma etapa na minha vida profissional, nem sempre é possível lembrar o nome de todas as pessoas que me ajudaram nesse período, entretanto não posso deixar de agradecer a algumas delas:

À minha orientadora Dra. Loreta Brandão de Freitas, pela amizade, disponibilidade e atenção me auxiliando sempre que tive dúvidas, além de acreditar no meu potencial. Por buscar soluções e transmitir tranquilidade sempre que surgiu um novo obstáculo durante esses dois anos.

Ao colaborador Dr. João R. Stehmann pelo auxílio na averiguação das exsiccatas.

À Dra. Aline P. Lorenz Lemke, pela amizade e dedicação nos ensinamentos desde utilização dos programas para a análise dos resultados até dicas fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Evolução Molecular pela amizade no dia-a-dia, auxílio nas coletas e atividades de laboratório, além de idéias para o desenvolvimento dessa dissertação: Aline R., Carol, Clênio, Jéferson, Pakisa, Priscilla, Raquel e Tielli.

Aos professores e demais colegas do Departamento de Genética que muito me ensinaram nesses anos, não esquecendo também dos colegas do Departamento de Botânica com os quais aprendi a interpretar as questões com outros olhos.

Ao Elmo e à Ellen pela presteza em resolver tantas questões burocráticas.

À minha família que sempre me apoiou e incentivou a chegar até aqui.

Aos amigos, colegas de graduação e do futebol pelos momentos de descontração durante a composição deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Instituições e Fontes Financiadoras.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Sinopse histórica do gênero <i>Calibrachoa</i> Cerv. ex La Llave & Lex.....	12
1.2. Caracterização do grupo de estudo.....	14
1.3. Utilização e potencial ornamental.....	16
1.4. <i>Calibrachoa heterophylla</i> (Sendtn.) Wijsman.....	17
1.5. A Planície Costeira do Rio Grande do Sul.....	19
1.6. Especiação e fluxo gênico.....	26
1.7. Filogeografia e conservação.....	29
1.8. Marcadores moleculares.....	32
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Coletas.....	37
3.2. Extração do DNA.....	39
3.3. Amplificação e seqüenciamento.....	40
3.4. Análise das seqüências.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Caracterização das seqüências obtidas.....	46
4.2. Estrutura populacional.....	49

4.3. Detecção de barreiras biogeográficas.....	57
4.4. Dinâmica populacional.....	62
5. DISCUSSÃO.....	66
5.1. A diversidade dos marcadores utilizados.....	66
5.2. Geologia da Planície Costeira vs filogeografia de <i>C. heterophylla</i> .....	66
5.3. Expansão ou estabilidade populacional.....	71
5.4. Conservação do ambiente.....	72
5.5. Distribuição da espécie.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

## RESUMO

O gênero *Calibrachoa* (Solanaceae) é tipicamente Sul-americano, atingiu o sudeste brasileiro através de uma provável rota migratória andino-pampeana. As espécies de *Calibrachoa* não possuem mecanismos de dispersão de sementes a longas distâncias nem qualquer estratégia de multiplicação vegetativa. *Calibrachoa heterophylla* é uma espécie que habita dunas e campos arenosos, preferencialmente ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (RS). Essa região pode ser considerada como uma área altamente dinâmica do ponto de vista da geografia histórica. Oscilações periódicas no clima e na disponibilidade de habitats, especialmente durante o Pleistoceno, tiveram grande efeito na distribuição e história evolutiva de muitos grupos biológicos. Na Planície Costeira do RS, áreas que conservam a fisionomia natural são cada vez mais raras e fragmentadas, devido à urbanização e atividades agrônômicas, fazendo com que muitas espécies vegetais e animais estejam cada vez mais ameaçadas de extinção. A disponibilidade e o avanço das técnicas moleculares, além do enriquecimento das análises filogenéticas intra-específicas, têm possibilitado de maneira eficaz a interpretação de possíveis cenários evolutivos. Dados filogeográficos permitem estabelecer uma estratégia que prioriza a conservação de grupos que incluam representantes da maior parte da história evolutiva das espécies.

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar, através de marcadores moleculares plastidiais, a variabilidade genética da espécie *C. heterophylla* ao longo de toda sua distribuição geográfica conhecida, fornecendo dados sobre sua evolução, taxonomia e filogeografia, associando-os à geologia da Planície Costeira.

Foram amostrados 220 indivíduos pertencentes a 13 populações ao longo da distribuição da espécie no RS. O material coletado teve o DNA extraído a partir de folhas jovens usando CTAB. Foram analisadas as seqüências dos espaçadores intergênicos plastidiais *trnH-psbA*, e *trnS-trnG*. Análises filogeográficas e populacionais foram

realizadas com a finalidade de avaliar a diversidade e padrões evolutivos de *C. heterophylla*.

O alinhamento das seqüências de *trnH-psbA* e *trnS-trnG* apresentou 1280 pb com 26 sítios polimórficos, variabilidade relativamente alta se considerarmos a recente história evolutiva do grupo. Na *network* gerada foi observada uma estruturação geográfica consistente onde 65,24% da variação detectada corresponderam à variação entre populações ( $\Phi_{ST} = 0,65238$ ). Esta característica foi reforçada pela significativa correlação, entre as distâncias genética e geográfica, observada através dos testes de Mantel e Autocorrelação Espacial. A análise de possíveis barreiras ao fluxo gênico na área de estudo, realizada através do programa SAMOVA, indicou a existência de até duas barreiras formando três grupos de populações. Não foram encontradas evidências de expansão demográfica recente para o conjunto completo de dados: a análise da distribuição *mismatch* apresentou uma curva bimodal e os índices *D* de Tajima e *F<sub>s</sub>* de Fu não apresentaram valores estatisticamente significativos. Entretanto, quando os mesmos parâmetros foram calculados para os agrupamentos formados pelo programa SAMOVA isoladamente, dois deles (1 e 2) parecem ter passado por um período de expansão demográfica recente.

A restrita capacidade de dispersão de sementes nesta espécie e, a herança materna dos cloroplastos neste gênero, podem ser as prováveis razões para a baixa variabilidade genética intrapopulacional encontrada, visto que os marcadores utilizados são seqüências plastidiais. A alta diversidade observada entre alguns dos grupos dificilmente poderia ter surgido, em sua totalidade, já na Planície Costeira, pois essa é uma região geologicamente muito recente (~ 400.000 A.P.). Então, distintas linhagens devem ter colonizado essa região através de diferentes rotas ou em momentos diversos e não se uniram devido às barreiras biogeográficas que encontraram no ambiente. Quando se compara a localização das barreiras biogeográficas sugeridas pelo programa SAMOVA com a geologia da

Planície Costeira, percebe-se que essas barreiras coincidem com paleocanais mapeados através de dados sísmicos por diversos autores.

Durante as coletas, muitas vezes não foi possível encontrar *C. heterophylla* em regiões onde sua ocorrência era esperada. Pelo fato da Planície Costeira do RS ser cada vez mais alvo da ação humana e de *C. heterophylla* demonstrar ser muito exigente quanto a mudanças ambientais, essa espécie pode ser indicada como altamente ameaçada.

Um resultado inesperado foi a descoberta da existência de populações de *C. heterophylla* fora da Planície Costeira em coleta realizada por nosso grupo na região da Campanha Sul-rio-grandense, em um ambiente muito semelhante àquele normalmente encontrado na Planície Costeira. Este fato conduz à necessidade de averiguarmos a existência de outras populações no interior do continente no RS. Fica como perspectiva para o pleno conhecimento da evolução, origem e real distribuição de *C. heterophylla*, investigar as redes hidrográficas localizadas no interior do Estado.

## ABSTRACT

The South American genus *Calibrachoa* (Solanaceae) likely arrived at the Brazilian southeast region through an andean-pampean migratory route. *Calibrachoa* species do not have a long distance seed dispersal system or any strategy for vegetative propagation. *Calibrachoa heterophylla* dwell in dunes and sandy fields, mainly at the Coastal Plain of Rio Grande do Sul Brazilian state. Cyclic climatic and habitat occurrence oscillations in the Pleistocene had high influence in the distribution and evolutionary history of many biological groups. Areas that still maintain the original habitats in the Coastal Plain are rare and mostly fragmented due to anthropic actions, leading many plant and animal species to near extinction. The use of new molecular techniques and analytical methods bring important insights into likely evolutionary scenarios. Besides, findings of phylogeographic studies also brought new light into biological conservation strategies, focusing in intraspecific history and patterns of diversity.

The main objective of this work is to use plastidial molecular markers to characterize the genetic diversity of *C. heterophylla* through its distributional range, to better understand its evolution, phylogeographic patterns and taxonomy, associated with the geological history of the Coastal Plain.

We sampled 220 individuals from 13 populations through Rio Grande do Sul, from which we obtained sequences from the plastidial intergenic spacers *trnH-psbA* and *trnS-trnG*. The sequences were aligned and analyzed with several populational and phylogeographic methods.

The alignment of *trnH-psbA* plus *trnS-trnG* spacers is 1280 bp with 26 variable sites, a high value considering the likely recent evolutionary history of the specie. The

haplotype network shows a clear geographical structure, with 65.2% of the variation being among populations in the AMOVA as well as having a significantly high  $\Phi_{ST}$  (=0,65238). We also found a significant correlation between the genetic and geographical distances and significant patterns in the Spatial Autocorrelation analysis. The SAMOVA analysis found two likely barriers to gene flow separating three groups of populations. No evidence for population expansion for the species was found using a mismatch distribution analysis (that was bimodal) or by neutrality tests (all non-significant). However, when these statistics were estimated for each population-group found in SAMOVA, two of them (1 and 2) presented evidences for a relatively recent demographic expansion.

The limited seed dispersal ability of this species coupled with the maternal inheritance of the plastidial markers used may be a likely explanation for the low intrapopulational diversity found. The high divergence found between some groups could not likely be explained as having originated in the Coastal Plain, as this region of geologically very recent (~400.000 years ago). Consequently, already differentiated lineages should have colonized the region perhaps by different routes and stayed isolated due the barriers found in the area. When the location of the barriers suggested by SAMOVA is compared with the geology of the region, there are coincidence between those and the reconstructed path of ancient river channels.

During field work, at several sites where the presence of *C. heterophylla* was expected, it actually could not be found. This is likely caused by the increasing human interference in the habitat and the small tolerance of the species to habitat degradation, and suggests that this species may be in danger of extinction.

An unexpected result was the discovery of one population of *C. heterophylla* outside the Coastal Plain, in a region adjacent to it, in a place such as sandy river beach,

habitat that is very similar to its usual habitat in the Coastal Plain. Therefore, it is important to better understand the evolutionary history of this species to continue investigating these other populations outside its main area of occurrence.

## 1. INTRODUÇÃO

### **1.1. Sinopse histórica do gênero *Calibrachoa* Cerv. ex La Llave & Lex.**

A família Solanaceae, pertencente à ordem Solanales, Euasterídeas I (APG II, 2003), é composta por aproximadamente 3000 espécies, distribuídas em 150 gêneros (Souza & Lorenzi, 2005), sendo a América do Sul seu maior centro de diversidade (Hunziker, 2001). No Brasil ocorrem 32 gêneros e 350 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). Essa família possui grande importância econômica para a sociedade, com diversas espécies comestíveis, ornamentais e medicinais. D'Arcy (1991) dividiu Solanaceae em três subfamílias: Solanoideae, Nolanoideae e Cestroideae. Estudos filogenéticos baseados em informações do DNA plastidial (cpDNA) mudaram significativamente a compreensão dos relacionamentos entre as subfamílias de Solanaceae e uma nova classificação foi proposta (Olmstead & Palmer, 1992; Olmstead *et al.*, 1999). A tradicional subfamília Cestroideae foi dividida em cinco subfamílias menores: Cestroideae, Petunioideae, Schizanthoideae, Nicotianoideae e Schwenckioideae. Petunioideae inclui os gêneros *Petunia* Juss. e *Calibrachoa* Cerv. ex La Llave e Lexarza, além de outros gêneros da antiga tribo Nicotianeae.

O gênero *Petunia* foi descrito por Antoine L. Jussieu em 1803 a partir de duas espécies, *P. parviflora* Juss. e *P. nyctaginiflora* Juss., hoje conhecidas como *Calibrachoa parviflora* (Juss.) D'Arcy e *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb., respectivamente (Stehmann, 1999). Outros autores, como Miers (1846) e Sendtner (1846), publicaram importantes obras que contribuíram para o conhecimento do gênero e acrescentaram diversas espécies. Em 1911, Fries publicou um trabalho reconhecendo 27 espécies para *Petunia*, sendo que nove destas nunca haviam sido descritas. Wijnsman (1983)

e Wijsman & Jong (1985) perceberam que as espécies de *Petunia* podiam ser divididas em dois grupos de acordo com o número cromossômico e algumas características morfológicas como pré-floração, hábito, forma da folha e coloração da corola. A partir dessas informações, Wijnands *et al.* (1986) separaram esses grupos em dois gêneros: *Petunia*, com  $2n=14$ , e *Calibrachoa*, com  $2n=18$ . O epíteto genérico *Calibrachoa* é uma homenagem de Cervantes ao professor de botânica mexicano Antonii de la Cal et Bracho (Stehmann, 1999). A recombinação de diversas espécies de *Petunia sensu* para *Calibrachoa* foi realizada a seguir por Wijsman (1990), que transferiu 15 espécies e Stehmann & Semir (1997) que acrescentaram mais dez (sendo uma espécie nova), ambos os trabalhos baseados nas mesmas características diferenciais utilizadas por Wijsman & Jong (1985). Atualmente, são reconhecidas 25 espécies para o gênero *Calibrachoa*, entretanto algumas espécies descritas como pertencentes ao gênero *Petunia*, apesar de possuírem características cromossômicas de *Calibrachoa*, ainda não foram recombinaadas por não terem sido analisadas após a separação dos dois gêneros (Stehmann & Semir, 2005).

Estudos mais recentes indicam que *Calibrachoa* pode ser dividido em dois subgrupos baseados na autocompatibilidade reprodutiva (Watanabe *et al.*, 1997; Tsukamoto *et al.*, 1998; Ando *et al.*, 2001; Tsukamoto *et al.*, 2002), morfologia da superfície das sementes (Watanabe *et al.*, 1999), conteúdo de DNA nuclear (Mishiba *et al.*, 2000) e análises filogenéticas (Ando *et al.*, 2005). Em todas essas análises, *C. parviflora* (Juss.) Wijsman e *C. pygmaea* (R.E.Fr.) Wijsman ficam agrupadas, enquanto as outras espécies do gênero formam um grupo à parte.

## **1.2. Caracterização do grupo de estudo**

O gênero *Calibrachoa*, com a exceção de *C. parviflora*, ocorre exclusivamente no sudeste da América do Sul, de Minas Gerais até o Uruguai, com abundância máxima nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) (Tsukamoto *et al.*, 2002). Gêneros irmãos de *Calibrachoa* e *Petunia*, como por exemplo, *Fabiana* Ruiz & Pav., habitam regiões andinas e patagônicas. Sugere-se que os gêneros *Calibrachoa* e *Petunia* teriam surgido através de uma radiação adaptativa a partir dos Andes, tendo sido conduzidos a uma evolução divergente, colonizando áreas de clima subtropical como a região pampeana e chegando posteriormente ao planalto catarinense (Stehmann, 1999).

A grande maioria das espécies possui distribuição contínua, associada a uma determinada região fisionômica e restrita a uma condição edáfica característica (Stehmann, 1999). Segundo Stehmann & Semir (2005), no Brasil ocorrem 19 espécies, divididas em dois grandes centros de diversidade: um nos Planaltos de Curitiba e Ponta Grossa (Paraná); outro nos campos de altitude da borda oriental do planalto sul-brasileiro (Santa Catarina). Segundo os mesmos autores existe ainda um terceiro, porém menor, centro de diversidade na província Pampeana, fronteira entre Brasil e Uruguai. *Calibrachoa*, assim como a maioria de seus gêneros irmãos, possui origem andina e é aceitável crer que tenha existido no passado uma rota migratória andino-pampeana que permitiu que as espécies atingissem o sudeste brasileiro (Stehmann, 1999). Esta hipótese biogeográfica é sugerida para vários outros grupos de plantas, devido à presença de espécies de gêneros típicos dos Andes na região subtropical do Brasil, especialmente em áreas mais altas e frias (Rambo, 1951; Safford, 1999).

As espécies do gênero têm hábito arbustivo, subarbustivo ou herbáceo e, em geral, possuem menos de 70 cm de altura. Três padrões de hábito já foram observados em

*Calibrachoa*: ereto, decumbente e repente. A maioria das espécies possui caule lenhoso, característica que sugere que essas sejam perenes. *C. parviflora* e *C. elegans* (Miers) Stehmann & Semir são as únicas espécies comprovadamente anuais (Stehmann, 1999). O indumento das plantas representantes do gênero pode ser pubérulo, tomentoso, piloso ou subviloso, e constituído de tricomas simples e unisseriados. Braquiblastos, pequenos ramos axilares, são encontrados principalmente no grupo de espécies com folhas lineares, como *C. ericaefolia* (R.E.Fr.) Wijsman, *C. heterophylla* (Sendtn.) Wijsman, *C. micrantha* (R.E.Fr.) Stehmann & Semir e *C. paranensis* (Dusén) Wijsman. A corola é zigomorfa infundibuliforme, com a base tubulosa amarela ou esbranquiçada, possui pré-floração conduplicada, onde as duas maiores pétalas que formarão os lobos inferiores se dobram sobre as três restantes. Os cinco estames estão arrançados em três alturas diferentes e o pólen é amarelo, diferindo da maior parte das espécies de *Petunia*. A maioria das espécies de *Calibrachoa* possui características morfológicas associadas à melitofilia, as exceções são *C. serrulata* (L.B. Sm. & Downs) Stehmann & Semir e *C. sendtneriana* (R.E.Fr.) Stehmann & Semir que são ornitófilas e *C. parviflora* que é autógama e não necessita de dispersores de pólen (Stehmann, 1999).

As espécies do gênero são preferencialmente encontradas em afloramentos rochosos, bordas de floresta, campos arenosos ou pedregosos. Nenhuma estratégia de multiplicação vegetativa foi observada e as espécies de *Calibrachoa* não possuem mecanismos de dispersão de sementes a longas distâncias, seus frutos são deiscentes e as sementes (Figura 1) liberadas diretamente no solo, próximas à planta-mãe (Stehmann, 1999).



**Figura 1** – Foto ilustrando o fruto e sementes de *Calibrachoa heterophylla*.

### **1.3. Utilização e potencial ornamental**

O cultivo de *Petunia* para utilização como planta ornamental foi registrado pela primeira vez por volta de 1830, através de sucessivos cruzamentos interespecíficos. Hoje já existem cultivares de petúnia com praticamente todas as colorações de flor comumente encontradas na horticultura (Murakami *et al.*, 2004). Cultivares comerciais de *Calibrachoa* foram inicialmente desenvolvidas no Japão, em 1994, e posteriormente na Europa, em 1996 (Rice, 1997). Desde então, diversos cruzamentos têm sido feitos e uma grande escala de cores de corola já foi gerada. A hibridação entre espécies do gênero não é difícil e, aparentemente, não existem mecanismos de isolamento reprodutivo pós-polinização ou pós-zigóticos entre a maioria das espécies dentro de cada um destes gêneros (Watanabe *et al.*, 1997; Stehmann, 1999). Possíveis híbridos interespecíficos já foram identificados em seu ambiente natural: *C. linoides* (Sendtn.) Wijsman x *C. sellowiana* (Sendtn.) Wijsman (Stehmann *et al.*, 1996); *C. linoides* x *C. excellens* (R.E.Fr.) Wijsman (Fregonezi *et al.*, 2007) e *C. sellowiana* x *C. serrulata* (J.N. Fregonezi, comunicação pessoal). Mais recentemente, foi desenvolvido o primeiro híbrido entre os dois gêneros (*Calibrachoa* x *Petunia*), denominado *Petchoa* Boker & Shaw que é estéril (Shaw, 2007).

#### **1.4. *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman**

A espécie alvo deste trabalho foi descrita por Sendtner (1846) como *Petunia heterophylla* que, posteriormente, foi recombinação para o gênero *Calibrachoa* por Wijsman (1990). Sua distribuição tem sido descrita para toda a Planície Costeira do RS, em áreas de Formações Pioneiras com influência marinha, lacunar ou lacustre. Seu registro mais setentrional foi feito em Imbituba (SC), enquanto o limite meridional é o norte do litoral uruguaio, embora não tenham sido observadas, recentemente, plantas desta espécie nos extremos de sua distribuição (P. Speranza, comunicação pessoal para ocorrência no litoral uruguaio). Esta espécie habita dunas e campos arenosos, além de ambientes alterados, como beiras de estradas e lavouras abandonadas. As plantas se caracterizam como subarbustos, com base lenhosa, e muitos ramos inicialmente eretos, logo decumbentes; suas folhas são pequenas e há presença de braquiblastos axilares (Figura 2). As folhas são sésseis, com lâmina geralmente linear, densamente pubérulo-glandulosas em ambas as faces. Nos ramos mais velhos, as folhas caem e apenas o conjunto de pequenas folhas dos braquiblastos persiste (Figura 3A). A presença destes dois tipos de folhas deu origem ao epíteto específico. A perda das folhas maiores e a persistência nos braquiblastos podem ser interpretadas como uma estratégia da planta para a economia de água, já que essa espécie sofre grande estresse hídrico por habitar solos arenosos (Stehmann, 1999). As flores são de cor magenta ou purpúrea, com fauce amarelada, circundada por um anel purpúreo-escuro (Figura 3B). A morfologia floral está associada à melitofilia e os polinizadores mais frequentes são abelhas solitárias. É uma espécie caracteristicamente psamófila, facilmente reconhecida pela coloração esbranquiçada ou acinzentada, conferida pelos grãos de areia aderidos ao seu indumento, nos seus ramos jovens, folhas e cálice (Stehmann, 1999) (Figura 3B). De acordo com observações em campo, essa espécie possui

uma considerável plasticidade fenotípica representada por diferentes padrões quanto ao hábito, forma e tamanho das folhas ao longo da sua distribuição geográfica.



**Figura 2** – Indivíduo de *Calibrachoa heterophylla* fotografado no Horto Florestal da Aracruz, Barra do Ribeiro/RS: hábito subarborescente.



**Figura 3** – *Calibrachoa heterophylla*.  
**A)** Ramos com predominância de folhas dos braquiblastos.  
**B)** Flor em detalhe e areia aderida ao indumento.

### **1.5. A Planície Costeira do Rio Grande do Sul**

O termo Província Costeira é amplamente utilizado para designar um grupo de elementos geológicos característico da margem continental brasileira na atualidade. Durante o Cenozóico, a erosão dos terrenos elevados situados a oeste gerou fácies sedimentares que se acumularam ao longo da Província Costeira do RS. Em consequência desse processo, a Província Costeira do RS pode ser dividida em dois compartimentos geomorfológicos: o das “terras altas” e o das “terras baixas” (Villwock & Tomazelli, 1995). O Compartimento das “terras altas” agrupa o Planalto Sul-rio-grandense, a Depressão Central e o Planalto das Araucárias; enquanto que o das “terras baixas” é formado pela Planície Costeira e pela plataforma continental adjacente (Weschenfelder, 2005).

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul constitui a mais ampla planície litorânea do Brasil, cobrindo cerca de 33.000 km<sup>2</sup> (Tomazelli & Villwock, 2000). A atual praia oceânica da Planície Costeira é extensa e contínua lateralmente, localizada em uma região costeira aberta, dominada pela ação das ondas. As feições morfológicas da praia se

caracterizam pela relativa homogeneidade e continuidade lateral, em contraste com a marcante modificação antrópica, causada ao campo de dunas frontais, e à planície arenosa adjacente (Weschenfelder, 2005).

A Laguna dos Patos é um dos componentes mais marcantes na fisiografia do Estado. A Laguna é a bacia de captação da rede de drenagem da Bacia Fluvial do Sudeste do RS e do Nordeste da República do Uruguai. A extensão total de sua superfície de captação alcança 180.000 km<sup>2</sup> e as águas captadas desembocam diretamente no Oceano Atlântico, através do Canal de Rio Grande, localizado no extremo sul da laguna (Weschenfelder *et al.*, 2005). Toda essa região pode ser vista como uma área altamente dinâmica do ponto de vista geográfico.

Os eventos de transgressão-regressão do nível do mar que originaram a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, entre o Pleistoceno e o Holoceno, geraram quatro extensos sistemas deposicionais do tipo laguna-barreira, paralelos à linha de costa (três pleistocênicos e um holocênico). Cada um desses sistemas é caracterizado por uma barreira arenosa e, atrás destes em direção ao continente, existem extensos depósitos lagunares costeiros (Lima & Buchmann, 2005; Tomazelli & Villwock, 2005). A formação destes sistemas foi relacionada com a alternância cíclica de períodos frios e quentes ocorridos durante o Pleistoceno e Holoceno, os estágios glaciais e interglaciais. Durante estes períodos havia a fusão (estágios interglaciais) ou crescimento (estágios glaciais) das regiões polares e, conseqüentemente, subida (transgressão) ou descida (regressão) do nível do mar (Villwock & Tomazelli 1995). Há cerca de 500 mil anos Antes do Presente (ka A.P.), o nível do mar na região do RS estava 70 m abaixo do nível atual e a linha da costa recuada mais de 100 km. Há 400 ka A.P. ocorreu uma grande transgressão marinha e, no RS, o mar invadiu toda região de Porto Alegre, ficando somente os morros emersos.

Assim, formou-se a primeira barreira da Planície Costeira. O mar regrediu e, cerca de 75 ka depois, houve outra transgressão, dessa vez a área ocupada pelo mar foi consideravelmente menor que a anterior, formando a segunda barreira da Planície Costeira. Novamente o mar recuou e, há 120 ka A.P., ocorreu uma nova transgressão que resultou na formação da terceira barreira da Planície Costeira e das restingas que delimitaram a Laguna dos Patos. A formação de uma barreira arenosa holocênica (quarta barreira), surgida há aproximadamente 5 ka A.P. e integrante de um sistema complexo de múltiplas barreiras que reúne ainda a Laguna dos Patos e a Lagoa Mirim, foi o episódio final consequente das variações do nível do mar que afetaram este setor costeiro (Figura 4). Após esse último evento, formou-se uma restinga arenosa entre o planalto e o mar que promoveu a ligação da Planície Costeira do RS com litoral do norte do País, permitindo a migração da flora e fauna atuais e interrompeu o curso dos rios. A partir de então, toda a drenagem continental que anteriormente atingia a quebra da plataforma continental ficou retida no interior deste sistema lagunar (Weschenfelder *et al.*, 2005). As desembocaduras dos estuários e os canais fluviais foram soterrados pelas areias transgressivas. Desta forma, o registro dos canais soterrados representa evidências da drenagem pleistocênica sobre a antiga PC na atual plataforma continental (Abreu & Calliari, 2005). Paleocanais detectados na linha de costa atual podem representar o antigo curso de alguns dos principais rios do Estado como o Jacuí, o Camaquã e o Jaguarão, que fragmentavam a costa, desaguardo diretamente no Oceano Atlântico, como sugerem Corrêa (1996) e Weschenfelder (2005) (Figura 5).

Na Tabela 1 são apresentados, resumidamente, acontecimentos da Era Cenozóica, relevantes para o entendimento deste trabalho.

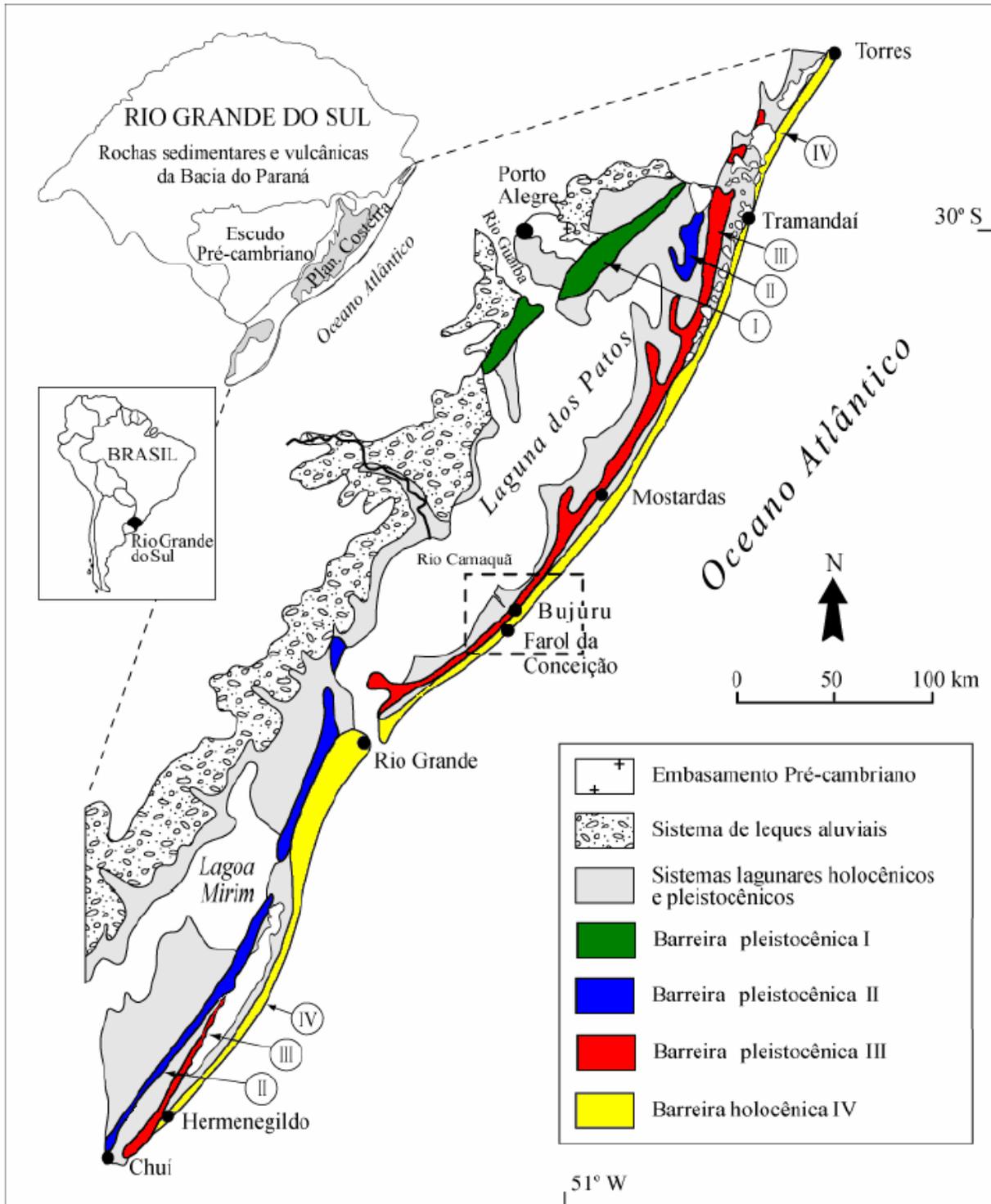
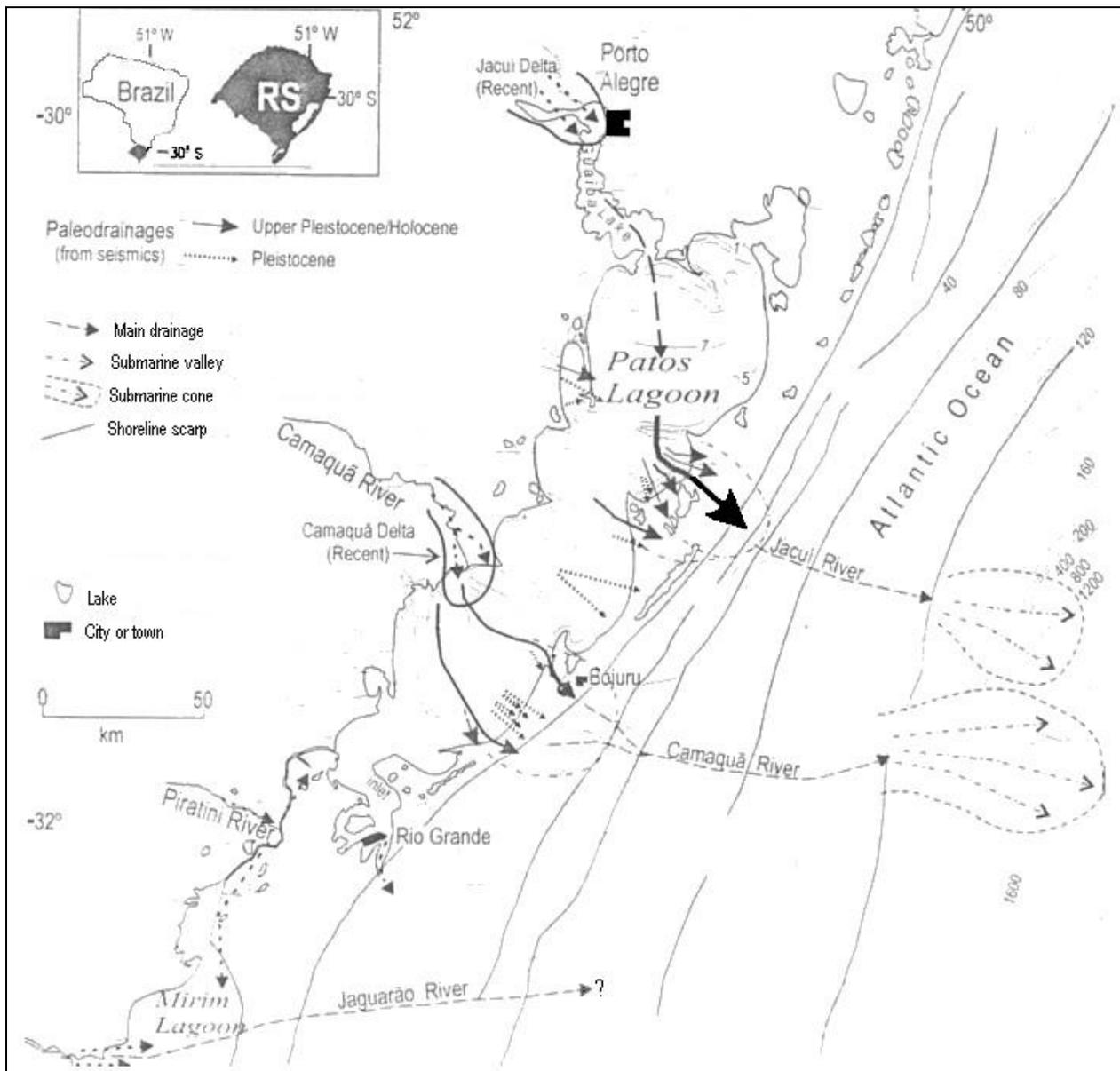


Figura 4 - Cenário paleogeográfico da Planície Costeira do RS (modificado de Tomazelli *et al.*, 2000).



**Figura 5** - Rede de paleocanais mapeados através de dados sísmicos segundo Weschenfelder (2005).

**Tabela 1** - Escala geológica da Era Cenozóica e resumo dos acontecimentos recentes na Planície Costeira.

<b>Era</b>	<b>Período</b>	<b>Época</b>		<b>ka A.P</b>	<b>Acontecimentos</b>
Cenozóico	Neogeno	Holoceno		Atual a 11,5	Formação 4ª barreira da PC -5 ka
		Pleistoceno	Superior	11,5 a 126	Formação 3ª barreira da PC -120 ka
	Médio		126 a 781	Formação 2ª barreira da PC -325 ka	
	Inferior		781 a 1806	Formação 1ª barreira da PC - 400 ka	
	Paleogeno	Plioceno		1806 a 5332	Ultima glaciação- 500 ka
		Mioceno		5332 a 23300	
	Paleogeno	Oligoceno		23300 a 33900	
		Eoceno		33900 a 55800	Surgimento de grande parte das angiospermas atuais (Romero, 1993).
		Paleoceno		55800 a 65500	

ka= Mil anos

A.P.: Antes do Presente

PC: Planície Costeira

Essas oscilações paleoclimáticas periódicas alteraram fortemente a disponibilidade de habitats e produziram grande impacto na distribuição e história evolutiva de muitos grupos biológicos (Knowles, 2001). A Planície Costeira do RS possui exuberante vegetação hidrófila e halófila em ambientes de muita instabilidade, que tornam as comunidades vegetais altamente mutáveis (Werneck & Lorscheister, 2001). O revestimento vegetacional dessa região, muitas vezes referido como vegetação pioneira, é composto, na realidade, de um imenso mosaico de comunidades florísticas e estruturalmente distintas, que depende mais do solo que do clima (Dorneles & Waechter, 2004). Cordazzo & Seeliger (1988) consideram que o extremo sul do Brasil e o Uruguai representam o centro de uma zona biogeográfica subtropical, transição entre as regiões temperada e tropical. As espécies vegetais formadoras destas comunidades apresentam características que as habilitam a colonizar solos pobres, arenosos, encharcados ou com certa salinidade, em ambientes com ventos constantes (Porto & Dillenburg, 1986). O solo contém quantidades de sal prejudicial à maior parte dos vegetais, portanto desenvolvem-se nele somente espécies capazes de suportar essa adversidade (Rambo, 1954). Na zona das dunas móveis prevalecem as gramíneas, nos intervalos mais calmos e úmidos surgem espécies rasteiras de verbenáceas, leguminosas e compostas. Os arbustos por sua vez, só aparecem na zona das dunas fixas (Rambo, 1954).

Hasenack & Ferraro (1989) definiram o clima da região como sendo do tipo subtropical úmido, sem estação seca e com verão quente. Segundo os mesmos autores, a temperatura média anual é em torno de 20° C, com amplitude térmica anual de  $\pm 9,4^{\circ}$  C; a umidade relativa do ar varia de 80 a 86%, sendo mais elevada no inverno; a taxa de precipitação pluviométrica é elevada e com grande regularidade ao longo do ano, excedendo a taxa anual de evaporação, não caracterizando período de seca.

A paisagem da Planície Costeira tem sofrido modificações constantes devido à urbanização, criação de gado, plantio e procedimentos da drenagem associados ao cultivo de arroz (Freitas, 1995). O aumento progressivo da utilização da terra para atividades agrárias afeta drasticamente o ambiente e coloca em risco diversas espécies animais e vegetais como é o caso do roedor *Ctenomys minutus*, cuja distribuição está sendo fragmentada e restringida a áreas cada vez menores (Marinho & Freitas, 2006). A maior parte da urbanização nas praias do RS está localizada no Litoral Norte. Como existe uma tendência de que essa urbanização aumente ainda mais, migrando no futuro próximo para áreas pouco desenvolvidas, é importante caracterizar zonas prioritárias para preservação nessa região. Dentre as áreas de preservação criadas ou já implantadas sobre a Planície Costeira destacam-se: o Parque Nacional da Lagoa do Peixe, que possui uma área de 344 km<sup>2</sup>, abrangendo porções litorâneas dos municípios de Mostardas e Tavares (RS) (Dorneles & Waechter, 2004); a Estação Ecológica do Taim, administrada pelo IBAMA, possui uma área de 1.113,17 km<sup>2</sup>, situa-se na estreita faixa de terra entre o oceano Atlântico e a Lagoa Mirim (IBAMA, 2004); o Parque Estadual de Itapeva, localizado em Torres (RS), possui 10 km<sup>2</sup>; e o Parque Estadual de Itapuã com área de 55,66 km<sup>2</sup>, localizado em Viamão (RS) (SEMA, 2002).

### **1.6. Especiação e fluxo gênico**

A definição de um conceito de espécie para plantas tem sido um grande desafio para os botânicos. Essa dificuldade se deve a características como a hibridação interespecífica e o fato da variação fenotípica que, em alguns grupos, não varia prontamente em categorias discretas (Rieseberg & Willis, 2007).

As barreiras reprodutivas que isolam as espécies de plantas podem ser: (1) pré-polinização, que limita a transferência de pólen de uma espécie para estigmas de outras espécies através de isolamento ecogeográfico, mecânico ou temporal; (2) pós-polinização e pré-zigóticas, onde ocorre a vantagem no desenvolvimento do pólen específico ou falha na germinação do pólen não específico; (3) pós-zigóticas, através da inviabilidade, esterilidade ou redução do sucesso reprodutivo do híbrido nas gerações subseqüentes (Rieseberg & Willis, 2007). Na maioria dos casos, essas barreiras atuam juntas gerando efeito acumulativo que aumenta o isolamento das espécies. O isolamento ecogeográfico é tido como a mais importante barreira reprodutiva entre espécies vegetais. Esta hipótese tem sido confirmada por estudos que mostram que espécies próximas ou subespécies possuem diferentes preferências de habitat (Rieseberg & Willis, 2007). Quando há contato secundário entre espécies isoladas somente por barreiras ecogeográficas, a formação do híbrido é provável e, como consequência disso, a utilização do conceito biológico de espécie torna-se inadequada. No conceito filogenético, quando comparados com outros grupos, os indivíduos de uma mesma espécie são mais relacionados entre si e suas moléculas de DNA mostram um ancestral comum mais recente (Avise, 2000). Filogenias construídas com a utilização de seqüências de DNA podem melhor esclarecer os processos envolvidos na evolução e a utilização de várias seqüências do genoma descreve de forma mais adequada estes processos (Templeton *et al.*, 2000).

A especiação pode acontecer por alopatria, quando uma barreira física ou a própria distância reduzem o fluxo gênico entre as populações. Esta barreira pode aparecer por mudanças geológicas e geomorfológicas (rios, cadeias de montanhas, deriva continental, formação de desertos, etc.) ou por eventos de dispersão (deslocamento de populações para locais distantes, dispersão provocada pelo vento, correntes marinhas, etc.) As populações

isoladas se diferenciam através de mutações e alteram suas frequências alélicas por deriva ou seleção natural, até que ocorra isolamento reprodutivo. Se os alelos favorecidos pela seleção são diferentes em duas populações adjacentes, estabelece-se uma clina de frequências alélicas. Se existe uma seleção suficientemente forte sobre *loci* relacionados ao isolamento reprodutivo, as populações podem se diferenciar em espécies isoladas reprodutivamente.

Especiação por vicariância ocorre quando duas populações são separadas pelo surgimento de uma barreira extrínseca, enquanto a especiação peripátrica ocorre quando há formação de uma subpopulação periférica por dispersão a partir da população original e, após várias gerações, ocorre o isolamento reprodutivo. Essa segunda possibilidade é comum em eventos de colonização de ilhas a partir do continente. Em locais onde populações distintas geneticamente se inter cruzam são formadas zonas híbridas. Estudos com marcadores genéticos podem esclarecer estes processos: (1) zonas híbridas compostas por indivíduos geneticamente divergentes (similares aos parentais) são interpretadas como locais de contato secundário entre as populações que se diferenciaram em alopatria; (2) zonas híbridas formadas por indivíduos geneticamente intermediários entre os parentais (variação clinal) são consideradas áreas de diferenciação *in situ*, ou seja, originadas pela divergência primária de populações parapátricas (Avice, 2000).

Na especiação simpátrica, uma barreira biológica que impede o cruzamento se origina dentro dos limites de uma população, sem o isolamento espacial das espécies incipientes (Futuyma, 2002). Para isso, são propostos os modelos graduais e instantâneos, sendo os modelos instantâneos mais aceitos: hibridação seguida de poliploidia (alopoliploidia); modificação do sistema reprodutivo de auto-incompatível para autocompatível; modificações cromossômicas estruturais, que levam à interesterilidade; e

mutações em genes de grande efeito nas estruturas reprodutivas (Judd *et al.*, 1999). Eventos de especiação simpátrica são comumente vistos em plantas, especialmente devido a eventos de poliploidização, amplamente tolerados neste grupo.

O padrão da variação genética pode refletir o modo de especiação e o tempo de divergência de prováveis espécies irmãs. Estes dados devem ser correlacionados com fatores históricos e contemporâneos, como a distribuição geográfica, ecologia reprodutiva e o modo de dispersão. O modo de dispersão tem influência direta na diversificação de uma espécie, pois é o principal mecanismo responsável pelo fluxo gênico dentro e entre as populações, além de determinar a sua distribuição. Quanto maior a área de distribuição de uma espécie, mais elevada tende a ser a heterogeneidade genética entre suas populações, isso por causa das diferentes pressões seletivas que essas populações sofrem ou por causa dos níveis limitados de fluxo gênico entre elas (Takayama *et al.*, 2006). Se a heterogeneidade genética entre populações se torna grande o bastante, estas populações podem eventualmente especiar. Por outro lado, o fluxo gênico é um dos processos mais importantes na manutenção da unidade de uma espécie (Barton & Hewitt, 1989). Geralmente, os efeitos do fluxo gênico são tão grandes que um imigrante por geração é suficiente para impedir uma forte diferenciação entre populações (Ellstrand & Elam 1993).

### **1.7. Filogeografia e conservação**

A filogeografia é o campo de estudo relativo aos princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies fortemente relacionadas. O tempo e o espaço estão ligados e são considerados os eixos da filogeografia (Avice, 2000). A disponibilidade de utilização e avanço das técnicas moleculares, além do enriquecimento das análises filogenéticas intra-

específicas, tem possibilitado de maneira eficaz a interpretação de possíveis cenários evolutivos, como o tempo e o padrão de divergência entre as populações de uma mesma espécie ou de espécies relacionadas. Espécies de origem muito recente ou que apresentam dispersão e fluxo gênico a longas distâncias podem não apresentar diferenciação geográfica, não havendo coerência entre o relacionamento genético e a distribuição das populações analisadas. Já espécies que apresentam linhagens genéticas distintas e formam grupos monofiléticos, na maioria das vezes, estiveram isoladas geograficamente e consequentemente tiveram seu fluxo gênico interrompido por certo período (Avice, 2000). Dependendo da capacidade de dispersão do grupo que está sendo estudado, essas barreiras podem ser rios, desertos, montanhas, entre outras.

A perda e a fragmentação do habitat favorecem o isolamento e a redução das populações a níveis que favorecem o endocruzamento, à perda de variabilidade genética e do potencial evolutivo (Frankham *et al.* 1999). Em casos extremos, o aumento de homozigotos na população pode levar à expressão de alelos deletérios e, o efeito dessas mudanças, pode resultar na extinção local da espécie (Leijts *et al.* 1999).

Diversos métodos de estimativa da biodiversidade têm sido propostos para a identificação de áreas prioritárias para a conservação. Recentemente, o conhecimento da biologia evolutiva dos organismos passou a ser valorizado neste contexto. Dessa forma, muitos planos de conservação têm como objetivo a manutenção da variabilidade genética, tendo em vista os processos evolutivos (Mace & Purvis, 2008). A filogeografia é uma das ferramentas que pode ser utilizada com muito sucesso neste tipo de avaliação. Os dados filogeográficos permitem estabelecer uma estratégia que prioriza a conservação de grupos, que incluam representantes da maior parte da história evolutiva das espécies, identificando populações com maior variabilidade genética (Vázquez & Gittleman, 1998). Regiões ricas

em endemismos devem ser bastante valorizadas devido à grande vulnerabilidade destas espécies que, além de apresentarem uma distribuição geográfica restrita, muitas vezes necessitam nichos ecológicos específicos (Primack & Rodrigues, 2001).

A maioria dos organismos possui uma distribuição disjunta, característica da espécie ou determinada pela descontinuidade do habitat. A frequência de alelos pode apresentar uma estrutura espacial diferente, em função dos efeitos do fluxo gênico, das diferentes pressões seletivas entre populações isoladas, da deriva genética e do sistema de cruzamento (Wright, 1943). Em espécies com distribuição espacial contínua, o endocruzamento é restrito a pequenas distâncias, limitado pelo alcance da dispersão. Isto é especialmente relevante em plantas, onde as sementes representam a principal forma de dispersão, a qual, na maioria dos casos, é limitada a distâncias curtas (Cain *et al.*, 2000). A ausência de fluxo gênico permite que essas populações possam se diferenciar com o passar do tempo (Wright, 1943).

Hoje em dia, grande parte das paisagens originais foi reduzida a fragmentos de habitats remanescentes, cercados por áreas desfavoráveis. Neste processo, grandes populações foram reduzidas ou subdivididas, possivelmente levando ao isolamento. A fragmentação do habitat pode levar à redução da variabilidade genética. Na Planície Costeira do RS, áreas que conservam a fisionomia natural estão cada vez mais raras e fragmentadas, devido à urbanização e atividades agronômicas, fazendo com que muitas espécies vegetais e animais estejam cada vez mais ameaçadas.

Cientistas reconhecem que estudos evolutivos são componentes chave para o manejo e conservação ambiental, entretanto, esse pensamento raramente tem sido colocado em prática. Muitos planos de manejo e conservação do meio ambiente têm sido feitos sem informações imprescindíveis devido à falta de comunicação entre evolucionistas e os

responsáveis pela determinação das áreas que serão preservadas, ou ainda pela urgência com que essas decisões têm que ser tomadas. Para reduzir os obstáculos e integrar os conhecimentos dos processos evolutivos nos planos de conservação e manejo, é preciso estabelecer um vínculo direto entre cientistas e formadores de opinião, além disso, os responsáveis pelas decisões devem atuar junto com esses cientistas do início ao fim do trabalho (Mace & Purvis, 2008).

### **1.8. Marcadores moleculares**

A utilização de marcadores moleculares tem demonstrado ser grande aliada nos estudos que envolvem questões taxonômicas e evolutivas. Os métodos de análise taxonômica mais utilizados atualmente são os morfológicos e moleculares, ambos apresentando vantagens e desvantagens próprias. Os dados moleculares são criticados, porque é possível que representem somente a evolução do marcador e, não necessariamente, das espécies (Pedersen & Seberg, 1998). Entretanto uma grande vantagem dos marcadores moleculares é que a análise do DNA pode acessar indiretamente informações sobre a morfologia, além de que, em alguns casos, pode apresentar muito mais caracteres informativos que a análise da morfologia. Abordagens genéticas e morfológicas se complementam e reforçam a avaliação taxonômica, pois, dessa forma, geram-se mais caracteres para a análise, além destes não estarem diretamente relacionados.

O seqüenciamento de DNA tem sido uma das técnicas mais utilizadas em estudos filogeográficos, pois permite a avaliação de diversos níveis taxonômicos em muitas escalas geográficas (Avice, 2000).

A amplificação de seqüências do DNA mitocondrial (mtDNA) pode ser muito útil para elucidar questões filogeográficas entre espécies animais (Zink *et al.*, 2006), entretanto

essas seqüências são muito pouco informativas quando o grupo de estudo em questão é uma espécie vegetal (Duminil & Petit, 2002; Dombrovska & Qiu, 2004). Outro marcador molecular bastante utilizado em estudos populacionais, inclusive de plantas, são os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal nuclear (nrDNA), mas que no gênero *Calibrachoa* não possui variabilidade intra-específica suficientemente informativa (J.N. Fregonezi, comunicação pessoal).

Seqüências do DNA plastidial (cpDNA) são atualmente as mais utilizadas em trabalhos que inferem padrões evolutivos de plantas, podendo ser comparadas apenas ao seqüenciamento da região ITS (Shaw *et al.*, 2005). Enquanto genes do cpDNA como *rbcL*, *ndhF*, *atpB* e *matK* passaram a ser cada vez mais utilizados na filogenia de plantas, paralelamente, regiões não-codificadoras começaram a ser muito utilizadas em estudos de níveis taxonômicos mais baixos como infra-genéricos e intra-específicos (Hwang *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2005). O seqüenciamento de regiões do cpDNA é muito eficiente para interpretar a dinâmica espaço/tempo dos organismos estudados, devido à taxa de evolução apropriada das seqüências (Palmer *et al.*, 1988). Entre as regiões do cpDNA que estão sendo utilizadas em estudos filogeográficos de plantas, podem-se destacar os espaçadores intergênicos plastidiais *psbB-psbH*, *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. Essas regiões apresentam um grande potencial de variação para estudos populacionais e evolutivos (Okaura & Harada, 2002; Pelsler *et al.*, 2003; Dobes *et al.*, 2004), para investigações sobre a origem de espécies híbridas (Iwata *et al.*, 2000) e para identificar eventos de hibridação recente (Olsen, 2002; Olsen & Schaal, 1999; Bleeker, 2003).

Um dos primeiros estudos com o espaçador intergênico *trnH-psbA* foi realizado por Aldrich *et al.* (1988) que mostrou que essa região é rica em eventos de inserção/deleção (*indels*) e que sua variabilidade está intimamente relacionada com a classificação

taxonômica das espécies. Sang *et al.* (1997) mostraram que essa região é altamente eficiente para inferir a taxonomia de espécies, possuindo maior variabilidade genética quando comparada com o gene *matK* e o espaçador *trnL-trnF*, dois dos marcadores plastidiais mais utilizados até então. A utilidade do *trnH-psbA* foi também demonstrada por Hamilton (1999) que utilizou essas seqüências para um estudo intra-específico com espécies do gênero *Corythophora* (Lecythidaceae). Mais recentemente, estudos têm mostrado que apesar do espaçador *trnH-psbA* possuir um grande percentual de sítios variáveis (Azuma *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2003), ele é usualmente analisado junto com outras regiões por ser comparativamente mais curto, podendo não gerar caracteres informativos em número suficiente para a construção de filogenias bem resolvidas.

Hamilton (1999) desenvolveu *primers* para a amplificação do espaçador entre os genes *trnS* e *trnG* (*trnS-trnG*) com a finalidade de estudar a dinâmica populacional entre três espécies tropicais do gênero *Corythophora* (Lecythidaceae). Estudos subseqüentes têm demonstrado que essa região também é altamente variável em outras famílias. Olson (2002) publicou que as seqüências do espaçador *trnS-trnG* são tão polimórficas que tornam o alinhamento bastante difícil na comparação de gêneros das famílias Caricaceae e Moringaceae. Xu *et al.* (2000) mostraram que esse espaçador é o mais informativo de nove regiões não-codificadoras do cpDNA na análise de dois subgêneros de *Glycine* altamente relacionados. Trabalhos realizados recentemente demonstraram que o espaçador *trnS-trnG* possui mais sítios informativos que as seqüências dos marcadores *rpL16*, íntron do *trnL*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL* e *atpB-rbcL* na tribo Sinningieae (Gesneriaceae) (Perret *et al.*, 2003); *psbB-psbH*, *atpB-rbcL*, *trnL-trnF*, e *rpS12-rpL20* em *Corythophora* (Lecythidaceae) (Hamilton *et al.*, 2003); *trnH-psbA*, *atpB-rbcL* e *matK* em famílias de Myrtales (Schönenberger & Conti, 2003)

O espaçador intergênico *psbB-psbH*, cujos *primers* para amplificação e seqüenciamento foram desenvolvidos por Hamilton (1999), possui em média 527 pares de bases (pb), variando entre 250 e 604 pb, e contém aproximadamente 230 pb na porção codificadora, região relativamente invariável entre diferentes linhagens. Xu *et al.* (2000) afirmaram que esse marcador, quando comparado com os espaçadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, é menos informativo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar, através de marcadores moleculares, a variabilidade genética da espécie *Calibrachoa heterophylla* ao longo de toda sua distribuição, fornecendo dados sobre sua evolução, taxonomia e filogeografia.

### 2.2. Objetivos específicos:

a) Avaliar a variabilidade de seqüências espaçadoras plastidiais intergênicas *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *psbB-psbH* de *C. heterophylla*.

b) Analisar a dinâmica populacional ao longo de toda a distribuição da espécie.

c) Correlacionar padrões de estruturação genética das espécies com a geografia da área de estudo;

d) Demonstrar através de dados genéticos a importância da conservação de ambientes naturais na Planície Costeira.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coletas

O material analisado foi obtido através de coletas em campo. Foram analisados indivíduos de *C. heterophylla* coletados em diferentes populações ao longo de toda a Planície Costeira do RS (Tabela 2). Excetuando-se o litoral catarinense e uruguaio, toda a distribuição conhecida de *C. heterophylla* foi percorrida. Nessa região, 12 populações foram encontradas, sendo que três delas não possuíam nem ao menos cinco indivíduos. Curiosamente, foi encontrada uma pequena população no município de São Francisco de Assis, à margem de um arroio no interior do Estado (Pop3). Com isso, pela primeira vez, *C. heterophylla* foi comprovadamente relatada fora da Planície Costeira. É importante destacar que os rios dessa região possuem margens bastante arenosas, ambiente muito semelhante aos terrenos arenosos da Planície Costeira.

As coordenadas geográficas dos locais de coleta foram obtidas através do sistema de posicionamento global (GPS). Para as análises genéticas foram coletadas folhas jovens de forma a não danificar os indivíduos amostrados. Estas folhas foram acondicionadas em sílica gel para secagem e posterior extração de DNA. As exsiccatas confeccionadas foram depositadas no Herbário BHCB, do Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, e determinadas pelo taxonomista Dr. João Renato Stehmann, especialista no grupo.

**Tabela 2** - Informações de coleta.

<b>População</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>Origem</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
Pop1	01	Arambaré/RS	30° 55' 09"S	51° 29' 46"W
Pop2	23	Estrada Interpraias, Torres/RS	29° 25' 56"S	49° 47' 53"W
Pop3	04	São Francisco de Assis/RS	29° 34' 59"S	55° 06' 03"W
Pop4	03	Entre Bacopari e Solidão, Mostardas/RS	30° 56' 15"S	50° 44' 21"W
Pop5	13	Balneário Mostardense, Mostardas/RS	31° 06' 33"S	50° 54' 04"W
Pop6	26	Proximidades da Lagoa das Flores, Rio Grande/RS	32° 31' 26"S	52° 32' 48"W
Pop7	24	Margem da Lagoa dos Barros, Santo Antônio da Patrulha/RS	29° 53' 34"S	50° 25' 46"W
Pop8	33	Próximo a Bojuru, São José do Norte/RS	31° 40' 00"S	51° 25' 33"W
Pop9	16	Próximo a Bojuru, São José do Norte/RS	31° 40' 04"S	51° 25' 27"W
Pop10	02	Entre Praia do Mar Grosso e a sede de São José do Norte/RS	32° 02' 47"S	52° 00' 36"W
Pop11	19	Beira da Lagoa Mangueira, próximo a Curral Alto, Santa Vitória do Palmar/RS	32° 59' 15"S	52° 43' 56"W
Pop12	26	Ilha do Barba Negra, Barra do Ribeiro/RS	30° 28' 31"S	51° 08' 46"W
Pop13	30	Horto Florestal da Aracruz, Barra do Ribeiro/RS	30° 25' 13"S	51° 13' 30"W
<b>Total:</b>	<b>13 Populações</b>	<b>220 Indivíduos analisados</b>		

### **3.2. Extração do DNA**

As folhas do material coletado, após secas em sílica gel, foram pulverizadas com nitrogênio líquido em gral e o DNA extraído pela técnica de Roy *et al.* (1992) modificada, como será descrito a seguir:

- 20 mg de material pulverizado;
- Adição de 600 µl de tampão de extração (100 mM TRIS-HCl; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoetanol; 2% PVP 40), 60 µl de β-mercaptoetanol e 6 µl de Proteinase K (10mg/ml);
- Incubação a 65°C por 30 minutos;
- Emulsão com 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1);
- Centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm;
- Recolhimento da fase aquosa e estimativa do seu volume;
- Precipitação do DNA com um volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio;
- Armazenamento por 24 horas em freezer-18°C;
- Centrifugação por 20 minutos e descarte do sobrenadante;
- Lavagem do “pellet” com 200 µl de etanol 70% e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos;
- Eluição do “pellet” em 200 µl de água ultra-pura, estéril, e 2 µl de RNase (10 mg/ml).

Os produtos de extração foram testados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado GelRed<sup>TM</sup> e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Para a quantificação, os produtos foram comparados com um DNA padrão ( $\lambda$  DNA, Invitrogen).

### **3.3. Amplificação e seqüenciamento**

Os marcadores moleculares utilizados foram os espaçadores intergênicos *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. As condições de amplificação, bem como as seqüências dos *primers* e a literatura consultada estão nas Tabelas 3 e 4. As seqüências do espaçador plastidial *psbB-psbH* também foram obtidas, porém a análise desse marcador foi descontinuada logo após os primeiros seqüenciamentos (representando 11 das 13 populações estudadas), quando foi possível perceber que ele não apresenta nenhum sítio variável entre as amostras das diferentes populações. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol (PEG) segundo o protocolo de Dunn & Blattner (1986).

**Tabela3** - Protocolo para amplificação e seqüências dos *primers* do espaçador *trnH-psbA*.

---

<u>Reação</u>	
Tampão	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
<i>Primer psbA F</i>	0,2 µM
<i>Primer trnH R</i>	0,2 µM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng

---

<u>Condições de amplificação</u>		
	94°C por 5 min	
30 ciclos	{	94°C por 45 s
		58°C por 1 min
		72°C por 45 s
		72°C por 5 min

---

<u>Seqüências dos <i>primers</i> (Sang <i>et al.</i>, 1997)</u>	
<i>Primer psbA F</i>	5' GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C 3'
<i>Primer trnH R</i>	5' CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC 3'

---

**Tabela 4** - Protocolo para amplificação e seqüências dos *primers* do espaçador *trnS-trnG*.

---

<u>Reação</u>	
Tampão	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
<i>Primer trnS</i>	0,2 µM
<i>Primer trnG</i>	0,2 µM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng

---

<u>Condições de amplificação</u>		
	94°C por 5 min	
25 ciclos	{	94°C por 1 min
		54°C por 1 min
		72°C por 45 seg
		72°C por 5 min

---

<u>Seqüências dos <i>primers</i> (Hamilton, 1999)</u>	
<i>Primer trnS</i> (GCU)	5' GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC 3'
<i>Primer trnG</i> (UCC)	5' GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C 3'

---

O seqüenciamento do DNA foi realizado em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences – GE Health Care), seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamic<sup>TM</sup>ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente. As condições da reação de seqüenciamento estão descritas na Tabela 5. Antes do seqüenciamento, cada amostra foi purificada diretamente nas placas do seqüenciador, como segue:

- Adição de 1 µl de acetato de amônia 7,5 M pH e 30 µl de etanol absoluto (temperatura ambiente);
- Mistura por 30 inversões;
- Centrifugação da placa por 45 min, a 1780 RCF a 20 °C;
- Descarte do sobrenadante por inversão;
- *Spin* a 500 RCF com a placa invertida e apoiada em papel toalha;
- Adição de 100 µl de etanol 70% (temperatura ambiente);
- *Spin* a 1780 RCF;
- Descarte do sobrenadante;
- *Spin* a 750 RCF com a placa invertida;
- Adição de 10 µl de *Loading Solution* e fechamento da placa com adesivo;
- Ressuspensão em vórtex por 5 min;
- *Spin* a 1780 RCF;
- Encaminhamento ao seqüenciador.

**Tabela 5** - Condições das reações de PCR para seqüenciamento.

Componentes da reação	Volume	Condições de amplificação
<i>DYEnamic™ ET terminator sequencing premix</i>	4 µl	35 ciclos: <span style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</span> <span style="display: inline-block; vertical-align: middle;">           95° C por 20 s            50° C por 15 s            60° C por 1 min         </span>
Produto de PCR purificado	40 ng	
<i>Primer</i>	5 µM	
Água estéril	Completar 10 µl	

### 3.4. Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas no programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997) e, quando necessário, corrigidas manualmente após verificação dos cromatogramas, como o auxílio do programa Chromas 2.33 ([www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)).

Estatísticas básicas como diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica (Hd) foram calculadas no programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Os índices de neutralidade  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1996), foram calculados pelo programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) com a finalidade de avaliar a dinâmica das populações. Para verificar a existência de uma possível expansão populacional recente, foi realizada a análise da *pairwise mismatch distribution* (Rogers & Harpending, 1992) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de *bootstrap* (programa Arlequin 3.11).

Os haplótipos foram gerados através do programa DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). As relações evolutivas entre as seqüências foram inferidas pelo método de *median-joining network* ( $\epsilon=0$ ; Bandelt *et al.*, 1999) realizadas pelo programa Network 4.5 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). Ainda no programa Arlequin 3.11, foi estimada a diferenciação genética entre as populações através da análise de variância molecular

(AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) no intervalo de confiança de 95 % após 1000 permutações, onde foi calculado o índice  $\Phi_{ST}$ .

Para identificar a ocorrência de possíveis barreiras ao fluxo gênico entre as populações estudadas foi utilizado o programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002) onde também foram calculados os índices de fixação correspondentes.

A correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, para testar a hipótese de isolamento por distância, foi realizada no programa *Alleles In Space* (AIS) 1.0 (Miller, 2005) através da realização do Teste de Mantel (Mantel, 1967) e do teste de Autocorrelação Espacial.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização das seqüências obtidas

O seqüenciamento dos marcadores plastidiais gerou um alinhamento com 1280 pares de bases (pb) para os 220 indivíduos analisados. Destes, 487 pb corresponderam à amplificação do espaçador intergênico *trnH-psbA* (de 1 a 487) e 793 pb (de 488 a 1280) do espaçador *trnS-trnG*.

As análises foram conduzidas com as seqüências dos dois espaçadores combinadas e o conteúdo de GC (guaninas e citosinas) apresentado foi de 30,7 %. Foram identificados 26 polimorfismos no alinhamento concatenado (12 na porção correspondente ao *trnH-psbA* e 14 no *trnS-trnG*), sendo uma duplicação e 25 substituições, das quais oito foram transições e 17 transversões. A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) verificada foi de  $0,003724 \pm 0,002022$ , enquanto a diversidade haplotípica (Hd) de  $0,822 \pm 0,00024$  entre os 22 haplótipos identificados pelo programa DnaSP. Quando os marcadores foram analisados separadamente, os valores de  $\pi$  e Hd foram, respectivamente,  $0,00376 \pm 0,00413$  e  $0,770 \pm 0,017$  para *trnH-psbA* e  $0,00334 \pm 0,00275$  e  $0,718 \pm 0,019$  para *trnS-trnG*.

As principais características das seqüências analisadas, incluindo os valores calculados para cada população, estão expostas na Tabela 6. Os haplótipos, suas respectivas freqüências e as populações nas quais foram encontrados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 6** - Principais características das seqüências analisadas.

<b>População</b>	<b>N° de indivíduos</b>	<b>N° de sítios polimórficos</b>	<b>N° de haplótipos</b>	<b>Diversidade nucleotídica</b>	<b>Diversidade haplotípica</b>
Pop1	01	-	1	-	-
Pop2	23	1	2	0,00007 (± 0,00007)	0,08696 (± 0,00606)
Pop3	04	0	1	0	0
Pop4	03	0	1	0	0
Pop5	13	1	2	0,00012 (± 0,00011)	0,15385 (± 0,01590)
Pop6	26	2	3	0,00050 (± 0,00040)	0,57846 (± 0,00320)
Pop7	24	2	3	0,00029 (± 0,00023)	0,30072 (± 0,01255)
Pop8	33	4	4	0,00031 (± 0,00019)	0,32386 (± 0,00969)
Pop9	16	0	1	0	0
Pop10	02	0	1	0	0
Pop11	19	7	4	0,00071 (± 0,00030)	0,45029 (± 0,01644)
Pop12	26	7	2	0,00239 (± 0,00099)	0,50769 (± 0,00162)
Pop13	30	7	3	0,00078 (± 0,00031)	0,24598 (± 0,00956)
<b>Total</b>	<b>220</b>	<b>26</b>	<b>22</b>	<b>0,00372</b> <b>(± 0,00202)</b>	<b>0,82200</b> <b>(± 0,01600)</b>

Valores entre parênteses: desvio padrão

**Tabela 7** - Haplótipos amostrados nas populações analisadas.

Haplótipos	Posição Nucleotídica																N° observado	Populações amostradas							
	<i>trnH-psbA</i>								<i>trnS-trnG</i>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16									
H1	T	G	C	A	C	A	G	T	C	T	T	A	T	G	G	A	G	A	G	A	G	C	C	01	Pop1
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	T	.	42	Pop2; 7
H3	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	G	.	.	.	T	.	01	Pop2
H4	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	04	Pop3
H5	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	03	Pop4
H6	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	71	Pop5; 6; 8; 9; 10
H7	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	01	Pop5
H8	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	02	Pop6
H9	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	10	Pop6
H10	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	A	C	.	.	.	.	.	T	.	03	Pop7
H11	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	C	.	.	T	.	.	T	.	01	Pop7
H12	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	T	.	01	Pop8
H13	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	T	.	.	.	.	T	.	04	Pop8
H14	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	01	Pop8
H15	.	A	.	.	.	.	.	.	G	A	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	14	Pop11
H16	A	A	.	.	.	.	G	A	.	G	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	03	Pop11
H17	.	A	.	.	.	.	G	A	.	G	.	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	T	.	01	Pop11
H18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	01	Pop11
H19	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	G	15	Pop12
H20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	T	.	37	Pop12; 13
H21	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	T	.	01	Pop13
H22	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	03	Pop13

## **4.2. Estrutura populacional**

O relacionamento entre as seqüências foi inferido pelo método de *median-joining* ( $\epsilon=0$ , Bandelt *et al.*, 1999) no programa Network 4.5. Para facilitar a compreensão, os códigos H1, H2,... Hn, representados na *network* (rede de haplótipos) (Figura 6), são correspondentes aos códigos da Tabela 6.

Através da confecção da *network* foi possível verificar uma tendência de estruturação geográfica, separando geneticamente os indivíduos das diferentes populações. Dentre as características da rede de haplótipos que mais chamaram a atenção, pode-se destacar o relacionamento entre as populações localizadas entre Mostardas e São José do Norte (Pop5; 6; 8; 9 e 10). Nessas populações foi encontrado um haplótipo central bastante freqüente fortemente relacionado a outros menos freqüentes encontrados em algumas das mesmas populações (H6, n=71, presente em 78,89% das amostras destas populações e, em 32,27% da amostragem total).

A população localizada no extremo sul da amostragem (Santa Vitória do Palmar, Pop11), foi a que se mostrou mais distante geneticamente das demais. Seus quatro haplótipos ficaram agrupados e a menor distância evolutiva entre eles e um haplótipo de outra população é de três sítios polimórficos. Além disso, a Pop11 está separada por no mínimo seis sítios polimórficos da população mais próxima geograficamente (Pop6, aproximadamente 54 km) indicando uma possível barreira ao fluxo gênico entre elas.

As populações Pop12 e Pop13, de Barra do Ribeiro (Ilha do Barba Negra e Horto Florestal da Aracruz, respectivamente) foram as únicas que apresentaram haplótipos não relacionados diretamente no mesmo ramo da *network*, ou seja, ocorrência de haplótipos intermediários amostrados em outras populações. Essa característica influenciou diretamente a elevação dos índices de diversidade nucleotídica e haplotípica nessas

populações (Tabela 5). Um dos haplótipos da Pop12 (Ilha do Barba Negra) é exclusivo dessa população.

A população Pop3, de São Francisco de Assis, coletada em uma região nunca antes citada como de ocorrência para a espécie, onde apenas quatro indivíduos foram encontrados, apresentou um único e exclusivo haplótipo (H4).

Foram também verificados na rede de haplótipos dois vetores médios, indicando a existência de haplótipos extintos ou não amostrados.

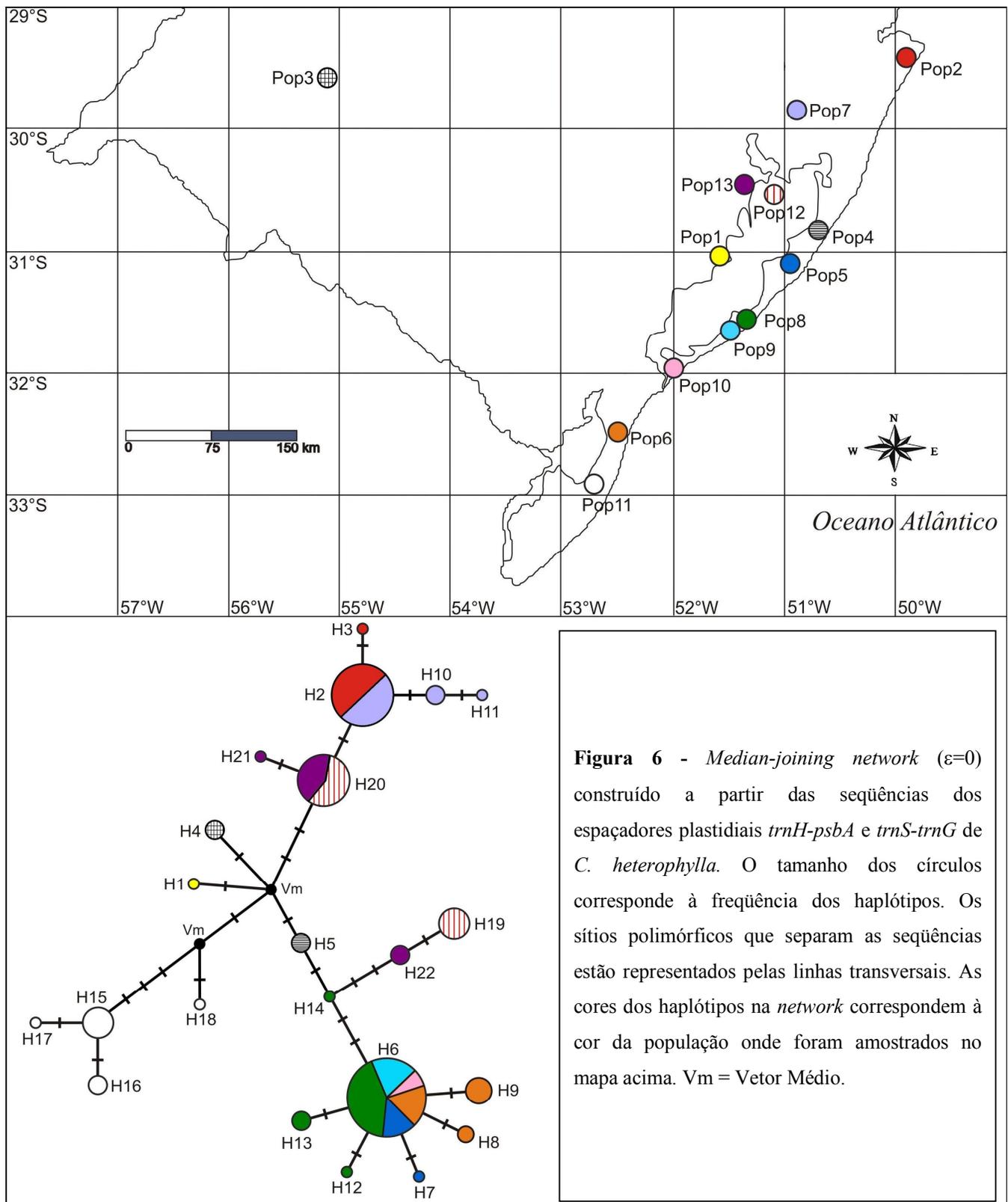
O grau de estruturação genética das populações pôde ser verificado através da Análise da Variância Molecular (AMOVA) e do cálculo do índice de fixação  $\Phi_{ST}$ . Para estes testes a população Pop1, por possuir apenas um indivíduo amostrado, não foi incluída na análise. Observou-se que 65,24 % da variação encontrada entre as seqüências correspondem à variação entre as populações, enquanto 34,76% da variação é relativa à variação intrapopulacional. O valor de  $\Phi_{ST}$  foi de 0,65238 em um intervalo de confiança de 95 % após 1000 permutações (Tabela 8).

Quando a AMOVA é calculada sem a presença das populações Pop12 e Pop13 (únicas que apresentaram haplótipos não relacionados diretamente no mesmo ramo da *network*) o percentual de variação entre as populações se eleva para 88,42 % com  $\Phi_{ST}$  de 0,88415.

Na Tabela 9 pode-se observar que entre boa parte das populações os índices de fixação alélica das populações comparados par a par são significativamente diferentes.

O teste de Mantel teve como resultado a correlação moderada e significativa entre as distâncias genéticas e geográficas para as populações de *C. heterophylla* [Coeficiente de Correlação ( $r$ ) = 0,4463;  $P < 0,001$ ] (Figura 7). Esse resultado também foi verificado através do teste de Autocorrelação Espacial, onde é possível perceber um aumento contínuo da

distância genética conforme aumenta o distanciamento geográfico entre as populações. Este padrão indica a existência de isolamento por distância (Figura 8). A distância genética média estimada foi de 0,8289; observando-se um aumento significativo desta ( $P < 0,05$ ) a partir da distância de 150 quilômetros entre as populações.



**Tabela 8** - AMOVA entre as populações amostradas de *C. heterophylla*.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes da variância</b>	<b>Percentual de variação</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Entre populações</b>	11	57,750	0,28754	65,24	<0,001
<b>Dentro das populações</b>	207	31,716	0,15322	34,76	<0,001
<b>Total</b>	218	89,466	0,44076		
<b><math>\Phi_{ST}</math> : 0,65238</b>					

**Tabela 9** - Resultado do teste de  $\Phi_{ST}$  par a par das populações amostradas.

	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	Pop9	Pop10	Pop11	Pop12	Pop13
Pop2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pop3	+		+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Pop4	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pop5	+	+	+		+	+	-	+	-	+	+	+
Pop6	+	+	+	+		+	+	+	-	+	+	+
Pop7	-	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Pop8	+	+	+	-	+	+		-	-	+	+	+
Pop9	+	+	+	-	+	+	-		-	+	+	+
Pop10	+	-	+	-	-	+	-	-		+	+	+
Pop11	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Pop12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Pop13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Sinal positivo = valor significativo para  $P < 0,05$ ; Sinal negativo, valor não significativo.

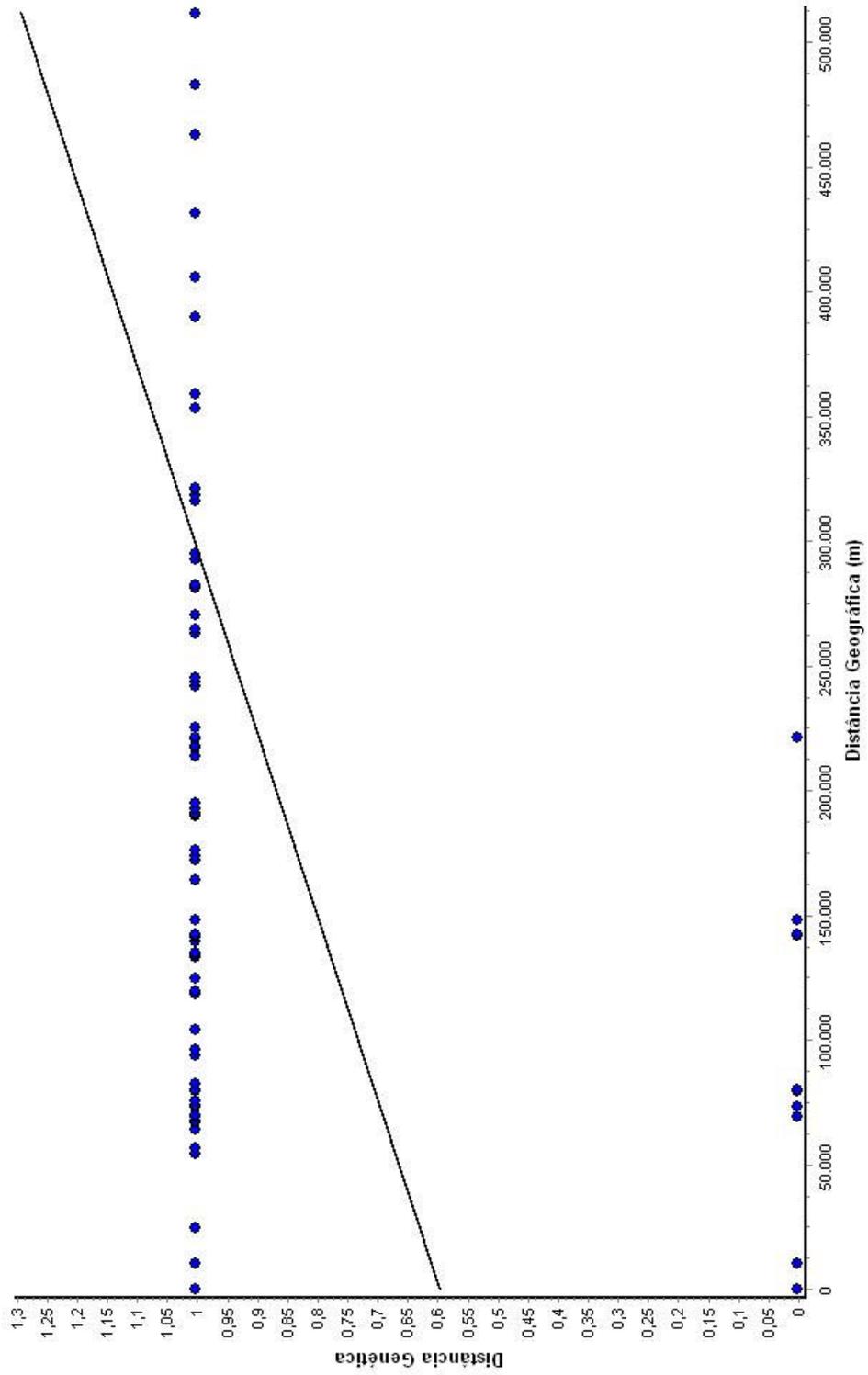
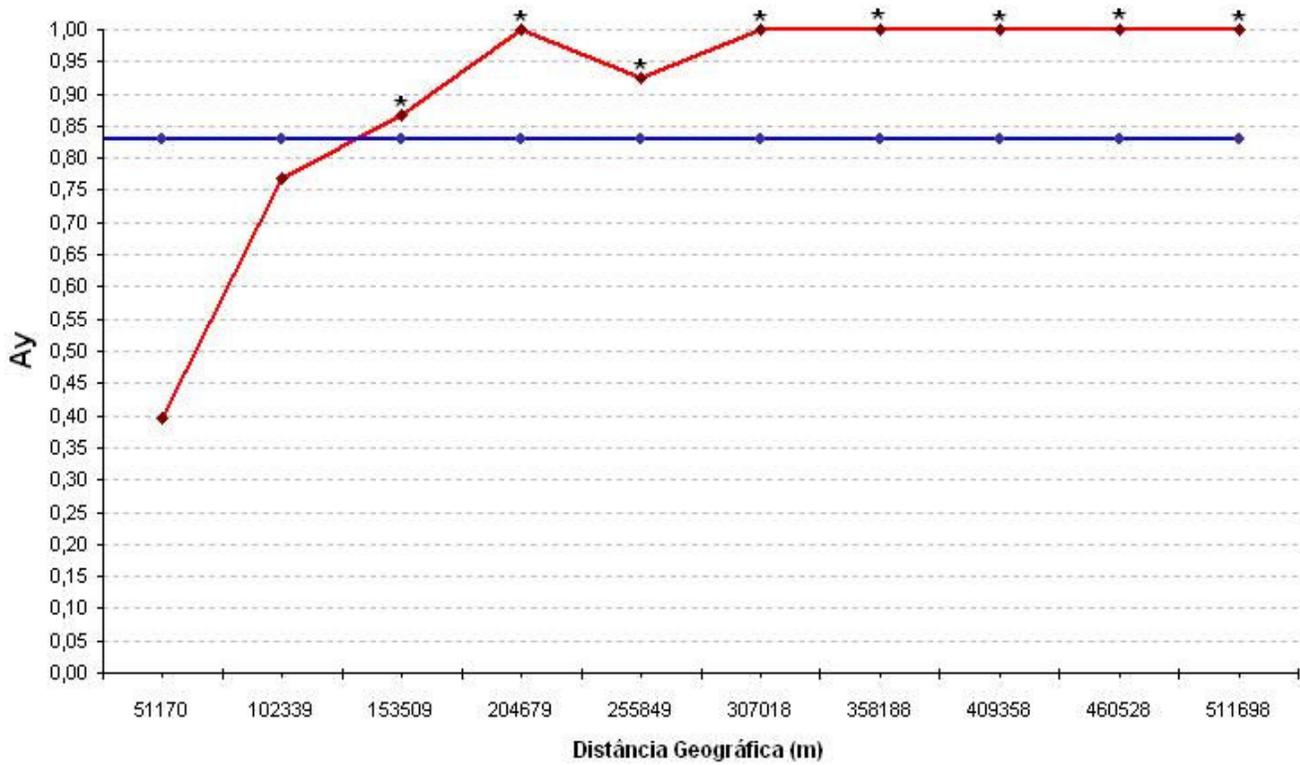


Figura 7 - Teste de Mantel.  $r = 0,4463$  para  $P < 0,001$ .



**Figura 8** – Análise da Autocorrelação Espacial para *C. heterophylla*. Ay= média da distância genética entre pares de indivíduos. A linha paralela ao eixo “x” (azul) indica o valor médio de Ay para o conjunto de dados (= 0,8289). Asterisco (\*) = estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

### **4.3. Detecção de barreiras biogeográficas**

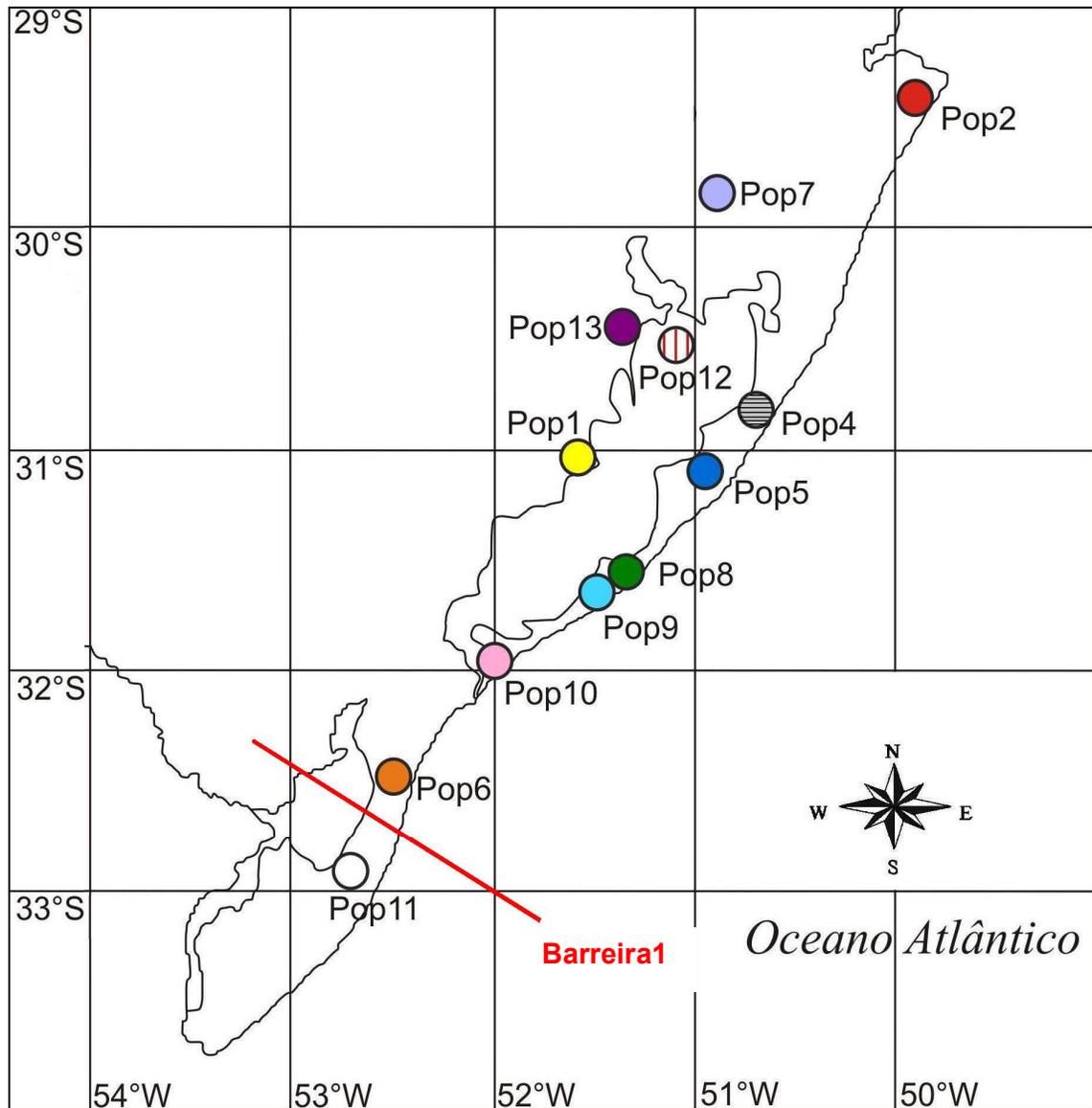
A fim de detectar possíveis barreiras biogeográficas que impeçam o fluxo gênico entre as populações amostradas, foram feitas análises no programa SAMOVA 1.0. Esse programa agrupa as populações de acordo com sua similaridade genética e localização geográfica. As populações Pop1 e Pop3 não foram incluídas nas análises utilizando o programa SAMOVA. A primeira por apresentar somente um indivíduo amostrado e a outra por não estar no contexto biogeográfico da Planície Costeira e pela possível existência de populações intermediárias, entre esta e as demais populações estudadas, que não foram incluídas neste trabalho. Primeiramente, foi testada a hipótese da existência de uma barreira biogeográfica, que separou a população Pop11 das demais, sugerindo uma barreira (Barreira1) entre esses grupos (Figura 9). Como já havia sido visto anteriormente na *network*, a população Pop11 está presente em um ramo separado dos demais e é geneticamente bem distante da população mais próxima geograficamente (Pop6). A AMOVA comparando esses dois agrupamentos resultou em  $F_{CT}$  de 0,47248. Dentre a variação observada, 47,25% correspondem à variação entre os grupos (Pop11 e demais populações); 42,40% entre as populações dentro dos grupos e 10,35% dentro das populações ( $P < 0,001$ ; Tabela 10).

A seguir, foi testada a hipótese de duas barreiras biogeográficas. Como resultado, se obteve a formação de três agrupamentos: a população Pop11, novamente isolada (Barreira1, Grupo1); as populações Pop5, 6, 8, 9 e 10 formando outro grupo (Grupo2); e um terceiro agrupamento, isolado do Grupo2 pela Barreira2 e, formado pelas populações Pop2, 4, 7, 12 e 13 (Grupo3) (Figura 10). A variação entre os grupos foi de 73,16%; entre as populações dentro dos grupos foi de 14,32% e dentro das populações foi de 12,52%. Nesse caso, o índice  $F_{CT}$  calculado foi de 0,73158, para ( $P < 0,001$ , Tabela 11). Análises que

consideravam a existência de três ou mais barreiras biogeográficas resultaram em valores de  $F_{CT}$  semelhantes ao observado para duas barreiras. Esta tendência é esperada devido à relação dependente dos valores dos índices de fixação:  $(1 - \Phi_{ST}) = (1 - F_{SC}) (1 - F_{CT})$ . O índice  $\Phi_{ST}$  parece insensível ao aumento do número de barreiras, entretanto a variação entre as populações dentro dos grupos ( $F_{SC}$ ) diminui (já que o número de populações presentes em cada grupo é reduzido) e conseqüentemente a diversidade entre os grupos ( $F_{CT}$ ) aumenta (Dupanloup *et al.*, 2002). Desta forma, além do alto valor de  $F_{CT}$ , a existência de duas barreiras foi considerada a mais provável por apresentar uma maior coerência com o contexto geológico da região e com o relacionamento entre os haplótipos pertencentes aos diferentes grupos.

**Tabela 10** - AMOVA para a hipótese de uma barreira biogeográfica.

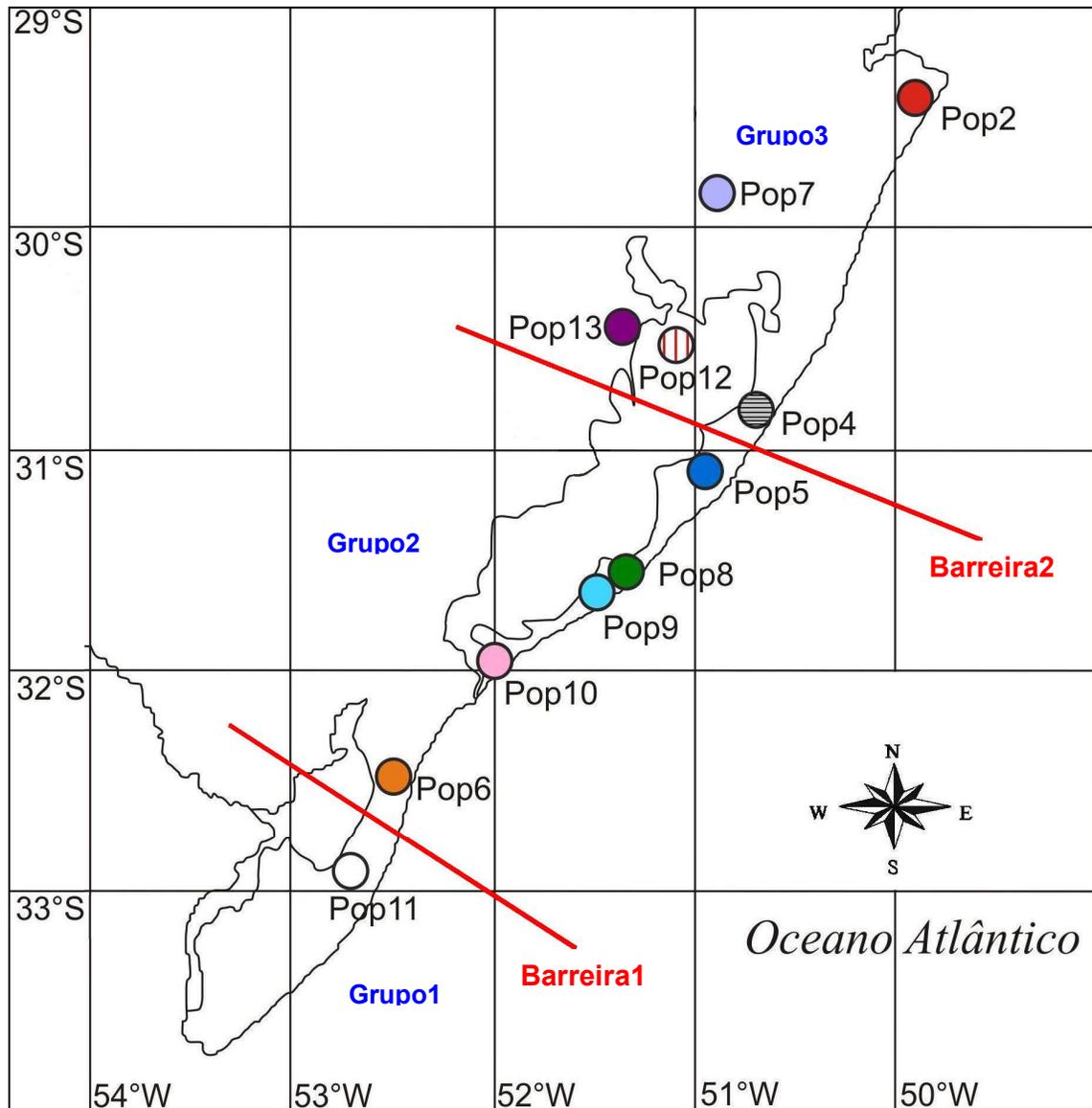
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual de variação	Valor de P
Entre grupos	2	105,930	2,02240	47,25%	<0,001
Entre populações dentro dos grupos	9	314,437	1,81463	42,40%	<0,001
Dentro das populações	207	90,396	0,44312	10,35%	<0,001
<b>Total</b>	<b>218</b>	<b>510,763</b>	<b>4,28014</b>		
<b><math>F_{CT}</math> : 0,47248</b>					



**Figura 9** - Localização da barreira biogeográfica inferida pelo programa SAMOVA 1.0 para a hipótese de existência de apenas dois grupos.

Tabela 11 - AMOVA para a hipótese de duas barreiras biogeográficas.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes da variância</b>	<b>Percentual de variação</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Entre grupos</b>	2	342,722	2.5883	73,16	<0,001
<b>Entre populações dentro dos grupos</b>	8	77,645	0.50668	14,32	<0,001
<b>Dentro das populações</b>	204	90,396	0.44312	12,52	<0,001
<b>Total</b>	214	510,763	3.53810		
<b><math>F_{Cr}</math> : 0,73158</b>					



**Figura 10** - Localização das barreiras biogeográficas inferidas pelo programa SAMOVA 1.0 para a hipótese da existência de três grupos.

#### **4.4. Dinâmica populacional**

Os testes de neutralidade utilizados para o conjunto completo de dados apresentaram como resultados valores não significativos. Os valores obtidos para os índices calculados são relacionados logo abaixo:

→  $D$  de Tajima: 0,04962;  $P > 0,10$

→  $F_s$  de Fu: -1,450;  $P > 0,10$

Os resultados destes testes estatísticos não apresentaram desvio significativo da expectativa neutra das mutações indicando que essas populações se encontram em equilíbrio quando consideradas haplótipos do cpDNA.

Esses índices de neutralidade também foram calculados para os três grupos de populações gerados através da análise de barreiras biogeográficas inferidas pelo programa SAMOVA, com o objetivo de verificar se o padrão observado na amostragem como um todo se confirma nesses grupos (Tabela 11). Para o Grupo1, o teste estatístico  $D$  de Tajima apresentou resultado negativo e significativo para  $P < 0,05$ , entretanto o índice  $F_s$  de Fu não foi significativo. A análise do Grupo2 resultou em índices  $F_s$  de Fu e  $D$  de Tajima negativos e significativos para  $P < 0,05$ . O Grupo3 não apresentou resultados significativos para nenhum dos índices de neutralidade calculados (Tabela 12). A significância dos testes de neutralidade para os grupos 1 e 2, sugere que, ao contrário do que é visto na análise geral das populações, esses agrupamentos estão em expansão demográfica, sobretudo o Grupo2, que além de apresentar resultados significantes para os dois testes, é composto por cinco diferentes populações tornando o resultado mais confiável.

**Tabela 12** - Índices de neutralidade calculados para os grupos de populações estudadas.

<b>Grupos</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>D de Tajima</b>	<b>F<sub>s</sub> de Fu</b>
Grupo1 (Pop11)	19	-1,81758*	-0,274
Grupo2 (Pop5, 6, 8, 9 e 10)	90	-1,66095*	-4,669*
Grupo3 (Pop2, 4, 7,12 e 13)	106	0,37464	0,676
<b>Total</b>	<b>215</b>	0,04962	-1,450

\*P &lt; 0,05

Corroborando os resultados não significativos dos testes de neutralidade para a amostra como um todo, a análise da *mismatch distribution* não apresentou sinal de expansão demográfica recente no intervalo de confiança de 95% com 1000 replicações de *bootstrap* (P < 0,05) Observando o gráfico da *mismatch distribution*, verificamos a presença de duas modas quanto ao número de diferenças entre os haplótipos, uma entre zero e um e outra em sete sítios polimórficos, e não um padrão unimodal como é esperado quando um evento de expansão ocorreu recentemente (Figura 11).

Quando a *mismatch distribution* é testada para os três grupos formados através do programa SAMOVA, é possível detectar sinal de expansão demográfica para os grupos 1 e 2 (P > 0,05; ou seja, não difere dos valores simulados para a hipótese de expansão recente), concordando com a significância evidenciada em alguns dos índices de neutralidade (Figuras 12, 13, e 14).

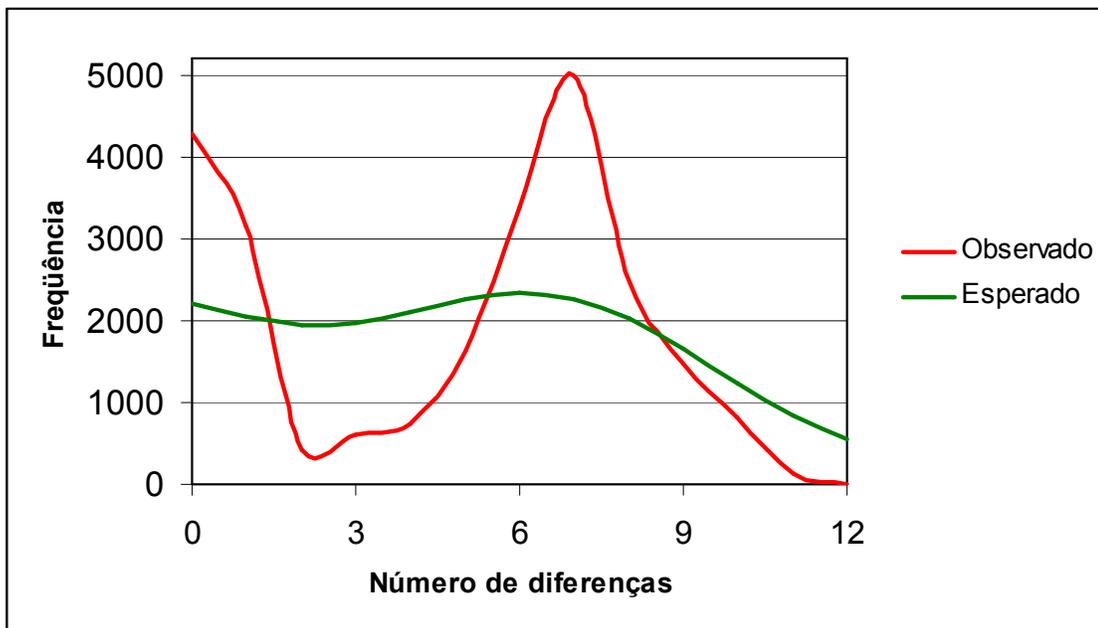


Figura 11 - *Mismatch distribution* para o conjunto completo de dados.

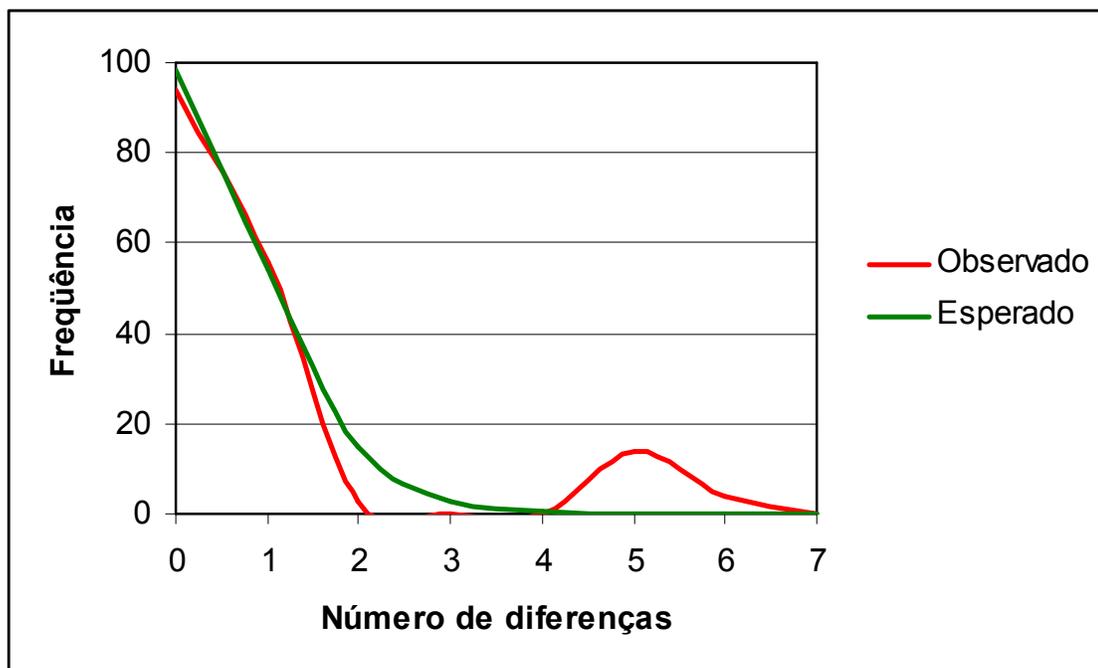


Figura 12 - *Mismatch distribution* para as amostras do Grupo 1.

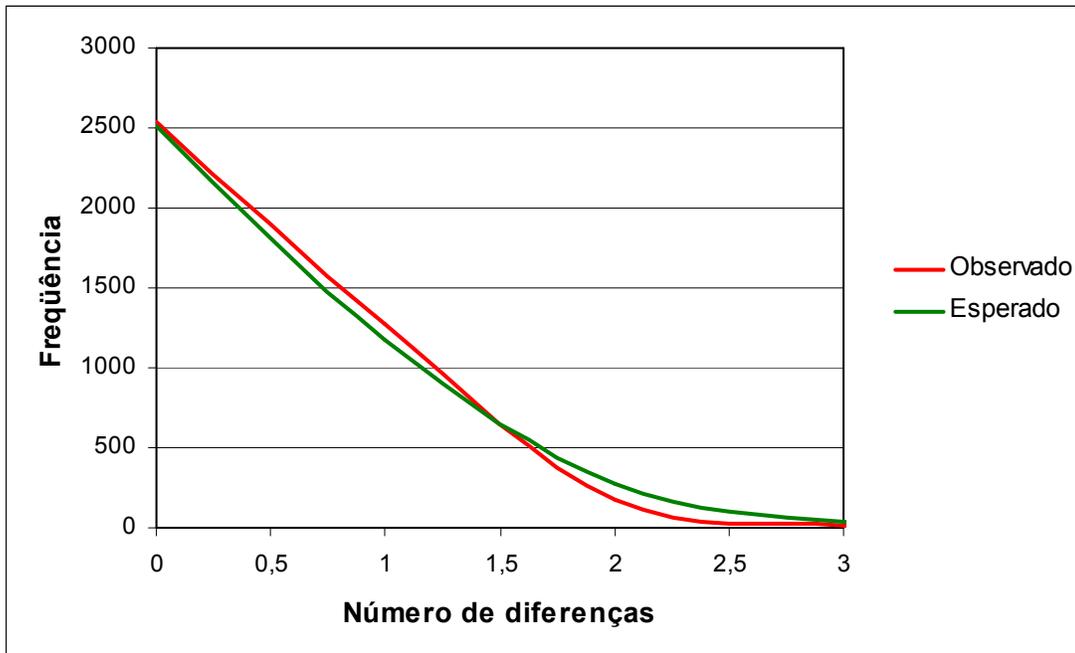


Figura 13 - *Mismatch distribution* para as amostras do Grupo2.

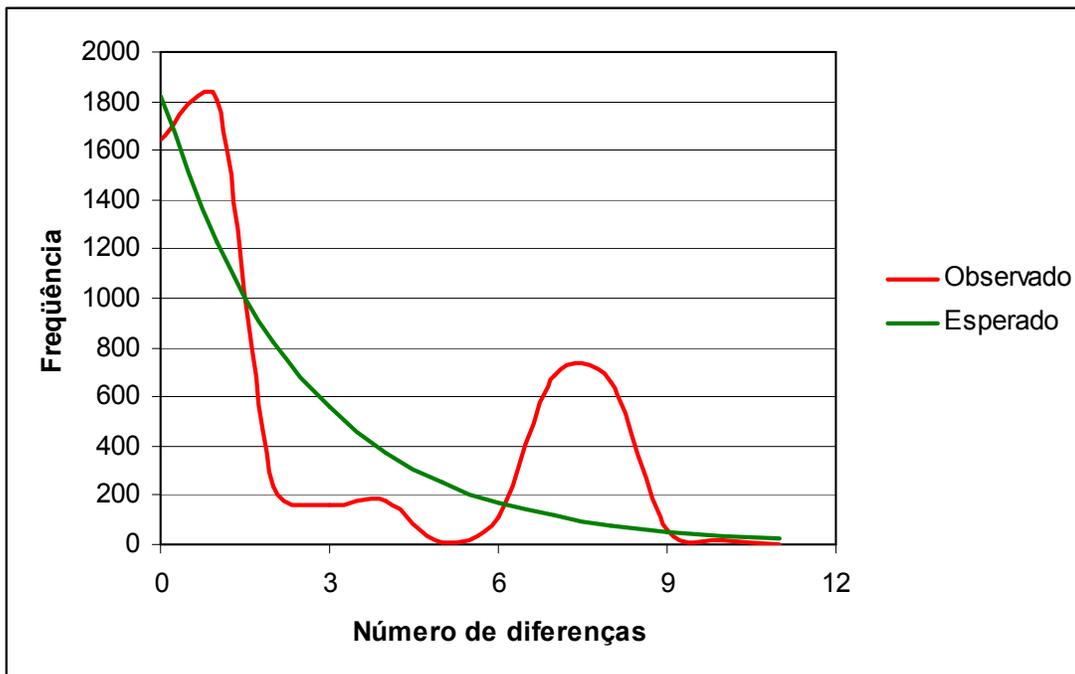


Figura 14 - *Mismatch distribution* para as amostras do Grupo3.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. A diversidade dos marcadores utilizados

Levando-se em consideração a recente história evolutiva de toda a subfamília Petunioideae, os índices  $\pi$  e Hd obtidos para *C. heterophylla* podem ser considerados de médios até altos para os marcadores utilizados. Fregonezi *et al.* (2007) observaram valores de  $\pi$  e Hd para *C. excellens* e *C. linooides* semelhantes aos verificados neste trabalho, porém é importante ressaltar que essas espécies possuem distribuição muito mais ampla que *C. heterophylla*. Ramos *et al.* (2007) também observaram valores de diversidade semelhantes para *P. integrifolia* subsp. *depauperata* ( R.E.Fr. ) L.B.Sm. & Downs, espécie com distribuição muito semelhante a *C. heterophylla*. *P. exserta* Stehmann (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006) e *C. elegans* (Togni *et al.*, 2007) apresentaram índices de diversidade mais baixos em relação aos que observamos, resultado esperado pelo fato dessas espécies possuírem caráter micro-endêmico.

Entretanto quando os valores de diversidade desses marcadores são verificados para espécies de outras famílias como, por exemplo: *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) (Štorchová & Olson, 2004); *Eryngium alpinum* (Apiaceae) (Naciri & Gaudeul, 2007) e *Asplenium hookerianum* (Aspleniaceae) (Shepherd *et al.*, 2007), valores consideravelmente mais altos podem ser observados, característica explicada por se tratarem de grupos com história evolutiva mais antiga que as Petunioideae.

## **5.2. Geologia da Planície Costeira vs filogeografia de *C. heterophylla***

Através dos testes que comparam o relacionamento entre os haplótipos e a distribuição geográfica das amostras foi possível detectar que as populações de *C. heterophylla* analisadas estão altamente estruturadas geneticamente. Baixos níveis de fluxo gênico foram evidenciados pela AMOVA, ao demonstrar que a maior parte da diversidade genética observada está presente entre as populações, resultado também observado por Fregonezi *et al.* (2007) para *C. excellens* e *C. linoides* e por Ramos *et al.* (2007) para *P. integrifolia* subsp. *depauperata*. O padrão de isolamento pela distância foi confirmado pelo teste de Mantel que apresentou uma correlação significativa entre distância genética e a distância geográfica e pelo teste de Autocorrelação Espacial o qual indicou que a partir de 150 km, a distância genética entre as populações é significativamente maior que a média ( $P < 0,05$ ). Essa alta estruturação não é surpreendente quando pensamos na biologia da espécie e no tipo de marcador molecular utilizado. Como os marcadores foram seqüências espaçadoras de genes plastidiais e os cloroplastos são predominantemente ou exclusivamente herdados de forma uniparental (no caso de espécies de *Petunia*, os cloroplastos têm herança materna, Derepas & Dulieu, 1992), a ausência de mecanismos de dispersão das sementes nas espécies de *Calibrachoa* inviabiliza o fluxo gênico plastidial entre populações relativamente distantes.

A ocorrência de vetores médios na *network* indica a presença de haplótipos extintos ou não amostrados. Caso não tenham sido amostrados, esses haplótipos provavelmente encontram-se fora da Planície Costeira do RS, visto que essa região foi amplamente investigada, tendo sido percorrida integralmente. Com a descoberta de que essa espécie pode ocorrer no interior do continente é possível que os haplótipos não amostrados existam nessa região ou, ainda, na costa catarinense e uruguaia.

Possivelmente a Planície Costeira do RS foi colonizada a partir de distintas ondas migratórias em diferentes períodos da história, rotas e/ou, ainda, a partir de diferentes refúgios. Essa hipótese pode muito bem explicar o padrão estruturado de pelo menos três grupos de populações. A alta diversidade encontrada entre alguns grupos dificilmente teria surgido, em sua totalidade, já na Planície Costeira, pois essa é uma região geologicamente muito recente. Então, diferentes linhagens devem ter colonizado essa região através de diferentes rotas ou em momentos diversos, e não se uniram devido às barreiras biogeográficas que encontraram nesse ambiente.

A presença de haplótipos geneticamente distantes dentro das populações da Ilha do Barba Negra e do Horto Florestal da Aracruz pode ser explicada por possível contato secundário entre linhagens de diferentes origens. Um dos haplótipos encontrado Ilha do Barba Negra apresenta polimorfismo em relação ao haplótipo mais próximo encontrado no Horto da Aracruz. Outro haplótipo foi encontrado nessas duas populações. A partir desses dados, é mais parcimonioso pensar que essas populações um dia estiveram em contato e que o polimorfismo encontrado surgiu após o isolamento da ilha por deriva genética. De acordo com a história geológica da Planície Costeira isso deve ter acontecido já no Holoceno.

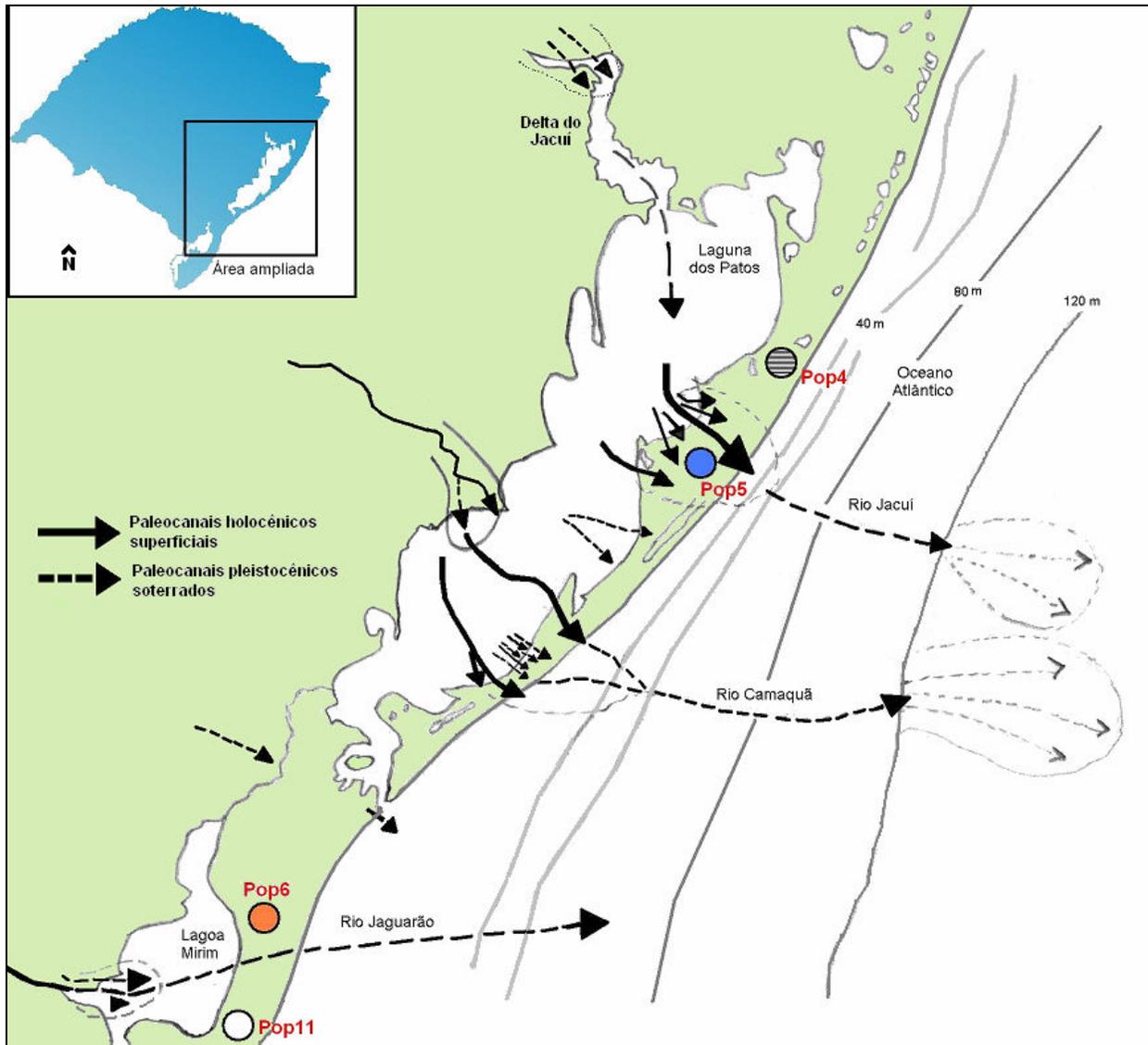
Quando se compara a localização das barreiras biogeográficas sugeridas pelo programa SAMOVA com a geologia da Planície Costeira, percebe-se que essas barreiras coincidem com paleocanais mapeados através de dados sísmicos por diversos autores como Corrêa (1996) e Weschenfelder (2005) como pode ser visto na Figura 5.

A Barreira1 inferida no extremo sul do RS, entre as populações Pop6 e Pop11, coincide com a localização sugerida para o antigo curso do Rio Jaguarão durante o Pleistoceno (Figura 15). Após a última transgressão marinha, já no Holoceno, formou-se a

Lagoa Mirim e, a partir de então, o Rio Jaguarão passou a desaguar nesta lagoa. Entretanto a Lagoa Mirim continuou diretamente ligada ao oceano até mais recentemente (Corrêa, 1996). Concordando com isso, Ayup-Zouain *et al.* (2003) observaram na região do banhado do Taim, através de análise digital de imagens de satélite, uma feição morfológica que seria a ligação entre a Lagoa e o mar. O banhado do Taim ainda hoje é influenciado pela presença constante de água ao longo da história, apresentando solo alagadiço. Solos alagados não são adequados para o desenvolvimento de *C. heterophylla* que, preferencialmente, habita campos arenosos (Stehmann, 1999). Através dessas informações, podemos supor que a barreira ao fluxo gênico entre as populações de *C. heterophylla* persista desde o Pleistoceno Médio até os dias de hoje.

A localização da Barreira<sup>2</sup> se sobrepõe à região onde foi detectada a presença de paleocanais correspondentes, durante o Pleistoceno, ao curso do Rio Jacuí (Corrêa, 1996; Weschenfelder, 2005) (Figura 15). Após a formação da restinga que delimitou a Laguna dos Patos, o Rio Jacuí passou a desaguar na região hoje chamada de Delta do Jacuí (Corrêa, 1996). Entretanto, através de análises de sedimentos e datação por radiocarbono, ficou provado que esses paleocanais continuaram atuantes na drenagem da laguna até o mar até o Holoceno e, portanto, isolando os locais onde atualmente foram coletadas as populações Pop4 e Pop5 (Weschenfelder, 2005).

Siqueira *et al.* (2006) confirmaram a hipótese de rios como barreiras ao fluxo gênico para os peixes *Acanthurus bahianus* e *A. coeruleus* no Rio Amazonas. No Brasil, trabalhos confirmando essa hipótese através de dados genéticos para espécies vegetais ainda não foram publicados (Silva, 2008).



**Figura 15** - Rede de paleocanais detectados na Planície Costeira e seu possível papel no fluxo gênico entre as populações de *C. heterophylla*. Modificado de Weschenfelder (2005).

### **5.3. Expansão ou estabilidade populacional**

Através do cálculo dos índices de neutralidade e da *mismatch distribution* não foi possível detectar eventos recentes de expansão demográfica quando foi considerada a distribuição total da espécie. Esse resultado pode ter sido influenciado pelo fato de que o conjunto geral de dados possui amostras pertencentes a diferentes linhagens. A presença dessas diferentes linhagens pode encobrir resultados significativos. A presença de duas modas no gráfico da *mismatch distribution* pode indicar dois eventos de expansão: um deles tendo dado origem às diferentes linhagens (moda em sete diferenças) e outro bem mais recente (moda entre zero e uma diferenças).

A existência de uma expansão populacional recente pode ser evidenciada quando a análise é feita separando as populações em grupos demográficos de acordo com as barreiras detectadas na Planície Costeira. Um evento de expansão recente fica claro quando verificamos os resultados dessas análises no Grupo2: índices de neutralidade negativos e significativos ( $F_s$  de Fu e  $D$  de Tajima para  $P < 0, 05$ ), *mismatch distribution* com padrão unimodal e o padrão de relacionamento “*star-like*” entre os haplótipos destas populações (se considerarmos somente os haplótipos H6, H7, H8, H9, H12, H13 e H14 na *network* da Figura 6). Através desses resultados, é possível sugerir que esse grupo sofreu expansão recentemente, pois este padrão é freqüentemente observado em populações que passaram por uma expansão demográfica recente (Hartl & Clark, 1997).

Para o Grupo1, embora tenha sido observada significância do índice de neutralidade  $D$  de Tajima e padrão unimodal significativo na *mismatch distribution*, não é seguro afirmar que tenha se expandido recentemente, já que este grupo é representado por apenas uma população com 19 indivíduos amostrados. Para o Grupo3, as análises referentes à dinâmica

populacional indicaram que ele está em equilíbrio, não tendo passado por eventos de expansão recentemente.

Fregonezi *et al.* (2007) não identificaram eventos de expansão populacional recente para *C. excellens* e *C. linoides*, assim como Togni *et al.* (2007) estudando populações de *C. elegans*, espécie endêmica dos campos de altitude de Minas Gerais. Entretanto esse evento foi identificado para *P. integrifolia* subsp. *depauperata* (Longo, 2005; Ramos *et al.*, 2007), espécie do gênero irmão que possui distribuição muito semelhante a *C. heterophylla*.

#### **5.4. Conservação do ambiente**

A Planície Costeira do RS é cada vez mais alvo da ação humana, seja pela construção civil, atividades agrárias ou extrativismo. Essas ações tornam as espécies que habitam a região altamente vulneráveis. Dentre eles, *C. heterophylla* pode ser indicada como altamente ameaçada, pois sua distribuição é quase que exclusivamente nessa região, além de ser muito exigente quanto a mudanças ambientais principalmente relacionadas ao solo. Durante as coletas, muitas vezes não foi possível encontrar esta espécie em regiões onde, por características ambientais gerais, sua ocorrência era esperada (boa parte do lado oeste da Laguna dos Patos e a Praia de Fora no Parque Estadual de Itapuã, por exemplo). Em outras regiões, foram encontradas apenas populações muito pequenas. O Litoral Norte do RS é a região do Estado mais afetada pelas ações humanas, tendo sido encontrada nesse local apenas uma população, justamente na área de proteção ambiental do Parque Estadual de Itapeva.

Os dados filogeográficos semelhantes aos obtidos nesse trabalho permitem estabelecer estratégias que priorizem a conservação de grupos com representantes da maior

parte da história evolutiva das espécies, levando em consideração populações com maior variabilidade genética, que é a matéria-prima para a sobrevivência das espécies.

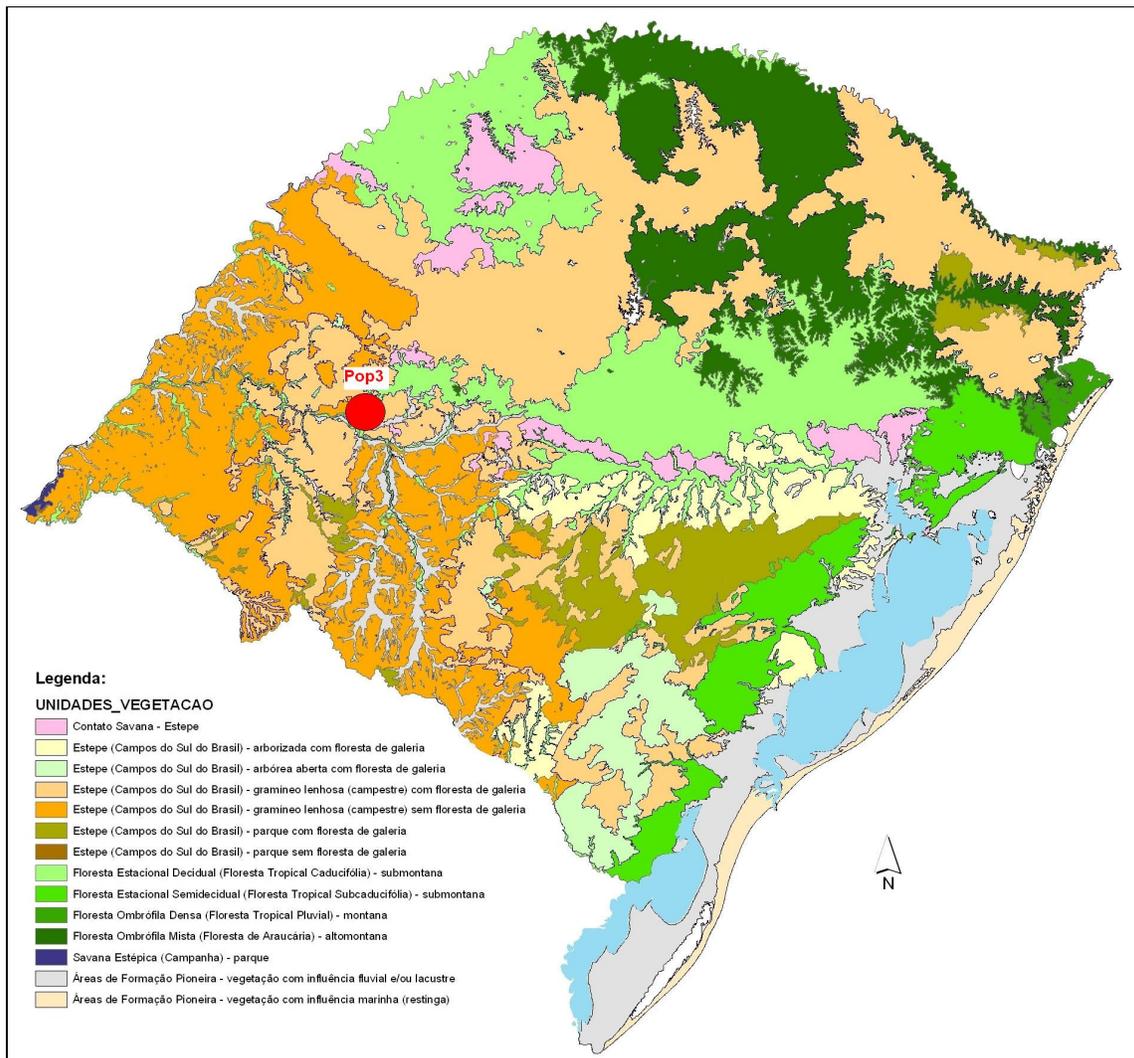
Os pontos de coleta onde foram identificadas as maiores e mais vigorosas populações de *C. heterophylla* foram o Horto da Aracruz e a Ilha do Barba Negra. O primeiro possui apenas resquícios da vegetação original, devido à monocultura de eucaliptos ali existente. Já o segundo, apesar de não ser área protegida por nenhum parque, é um local bem preservado por ser utilizado apenas como ponto de parada para alguns pescadores da região. Como nossos dados indicaram, a ilha além de possuir uma numerosa e vigorosa população, apresenta altos valores de diversidade nucleotídica e haplotípica, provavelmente devidos à presença de diferentes linhagens. Por se tratar de uma ilha, possivelmente vários outros organismos vegetais e animais podem apresentar padrão bastante semelhante ao verificado neste trabalho quanto à diversidade genética. Pela proximidade, uma possibilidade interessante para preservar essas espécies seria incorporar essa ilha ao Parque Estadual de Itapuã.

Outra população que chamou bastante a atenção em relação à preservação foi a população de Santa Vitória do Palmar (Pop11). Esta, além de apresentar níveis altos de diversidade genética, apresentou haplótipos exclusivos que, provavelmente, tiveram origem distinta dos demais encontrados em todas as outras populações estudadas. Esse local, apesar de estar muito próximo à Estação Ecológica do Taim, não possui nenhum tipo de proteção ambiental. Como a barreira que separou essa população das demais demonstra bastante consistência, é provável que populações de outras espécies também possuam características semelhantes nesse local.

### **5.5. Distribuição da espécie**

A descoberta da existência de populações de *C. heterophylla* fora da Planície Costeira chama a atenção à necessidade da investigação de novas populações no interior do continente no RS. O local onde foi coletada a população Pop3, São Francisco de Assis, tem sua classificação quanto à vegetação como “Área de Formação Pioneira” pelo IBGE. Não por acaso, a mesma classificação dada à vegetação que cerca a Laguna dos Patos e a Lagoa Mirim (Figura 16). De fato, a fisionomia da região onde essa população foi coletada é muito semelhante à encontrada na Planície Costeira: terrenos bastante arenosos, com a presença de espécies típicas de restinga litorânea. Segundo o IBGE (1992), as “Áreas de Formações Pioneiras” são caracterizadas como a vegetação situada na Planície Costeira e ao longo da rede hidrográfica da Depressão Central e da Campanha. Nestas áreas, encontram-se espécies, de herbáceas a arbóreas, com ocorrência de variadas formas biológicas, adaptadas às diferentes condições edáficas aí reinantes. As formações vegetais encontradas são de influência marinha (restinga), fluvial (comunidades aluviais) e flúvio-marinha (manguezal e campos salinos).

Como a origem de *Calibrachoa* é andina e esse gênero chegou ao RS migrando no sentido oeste-leste, torna-se fundamental para o melhor entendimento dos processos evolutivos que envolvem essa espécie, a obtenção de mais amostras coletadas no interior do continente. Fica como perspectiva para o pleno conhecimento da evolução, origem e real distribuição de *C. heterophylla*, investigar as redes hidrográficas localizadas na Depressão Central e na Campanha Sul-rio-grandense a partir do mapeamento vegetacional feito pelo IBGE (1992).



**Figura 16** - Unidades de vegetação do RS segundo o IBGE (1992). Ponto vermelho: indicação do local de coleta da população Pop3.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu JGN & Calliari LJ (2005) Paleocanais na plataforma continental interna do Rio Grande do Sul: evidências de uma drenagem fluvial pretérita. *Rev Bras Geof* 23: 123-132.
- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E & Christopherson L (1988) The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Curr Genet* 14: 137–146.
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watanabe H, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E & Kitching IJ (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88: 403–413.
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E & Basualdo I (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96: 289–297.
- APG II – Angiosperm Phylogeny Group (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc* 141: 399–436.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, London, 447 pp.
- Ayup-Zouain RN, Ferreira HP, Barboza EG & Tomazelli LJ (2003) Evidência morfológica de um paleocanal holocênico da Laguna Mirim nas adjacências do banhado Taim. *Anais IX ABEQUA* p. 82. Recife - PE.
- Azuma H, García-Franco JG, Rico-Gray V & Thien. LB (2001) Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical and temperate disjunctions. *Am J Bot* 88: 2275–2285.
- Bandelt H-J, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Barton NH & Hewitt GM (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* 341: 497–503.

- Bleeker W (2003) Hybridization and *Rorippa austriaca* (Brassicaceae) invasion in Germany. *Mol Ecol* 12: 1831-1841.
- Cain ML, Milligan BG & Strand AE (2000) Long-distance seed dispersal in plant populations. *Am J Bot* 87: 1217-1227.
- Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L & Ando T (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (Solanaceae) based on the sequence of the *Hfl* gene. *J Plant Res* 120: 385-397.
- Cordazzo CV & Seeliger U (1988) Guia ilustrado da vegetação costeira do extremo sul do Brasil. FURG, Rio Grande, 275 pp.
- Corrêa ICS (1996) Les variations du niveau de la mer durant les derniers 17.500 ans BP: l'exemple de la plate-forme continentale du Rio Grande do Sul - Brésil. *Mar Geol* 130: 163-178.
- D'Arcy WG (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. *In* Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution (Hawkes JG, Lester RN, Nee M and Estrada N, eds.), Royal Botanic Garden Kew and Linnean Society of London, London, p.75-135.
- Derepas A & Dulieu H (1992) Inheritance of the capacity to transfer plastids by pollen parent in *Petunia hybrida* Hort. *J Hered* 83: 6-10.
- Dobes CH, Mitchell-Olds T & Koch MA (2004) Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabis drummondii*, *A. x divaricarpa*, and *A. holboellii* (Brassicaceae). *Mol Ecol* 13: 349-370.
- Dombrowska O & Qiu Y-L (2004) Distribution of introns in the mitochondrial gene *nad1* in land plants: phylogenetic and molecular evolutionary implications. *Mol Phylogenet Evol* 32: 246-263.
- Dorneles LPP & Waechter JL (2004) Estrutura do componente arbóreo da floresta arenosa de restinga do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul. *Hoehnea* 31: 61-71.
- Duminil J, Pemonge M-H & Petit RJ (2002) A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Mol Ecol Notes* 2: 428-430.

- Dunn IS & Blattner FR (1986) SharoNS 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res* 15: 2677-2698.
- Dupanloup I, Schneider S & Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11: 2571-81.
- Ellstrand NC & Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217-242.
- Excoffier LGL & S. Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
- Excoffier LGL, Smouse PE & Quattro M (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Frankham R, Lees K, Montgomery ME, England PR, Lowe E & Briscoe DA (1999) Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Anim Conserv* 2: 255-260.
- Fregonezi JN, Lorenz-lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2007) Relações filogeográficas e dinâmica populacional em *Calibrachoa excellens* e *Calibrachoa linooides* (Solanaceae). In: CD-ROM do 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia - SP.
- Freitas TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in Southern Brazil (Rodentia–Octodontidae). *Stud Neotrop Fauna Environ* 30: 53–59.
- Fries RE (1911) Die Arten der Gattung *Petunia*. *Kunl. Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 46: 1-72.
- Fu YX (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* 143: 557–570.
- Hamilton MB (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraespecific variation. *Mol Ecol* 8: 513-525.

- Hamilton MB, Braverman JM & Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertions/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Mol Biol Evol* 20: 1710-1721.
- Hartl DL & Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates. Sunderland Massachusetts 542 pp.
- Hasenack H & Ferraro LW (1989) Considerações sobre o clima da região de Tramandaí, RS. *Pesquisas* 22: 53-70.
- Hunziker AT (2001) *The genera of Solanaceae*. ARG Gantner et Verlag KG, Königstein, Germany. 272 pp.
- Hwang SH, Lin TP, Ma CS, Lin, CL, Chung JD & Yang JC (2003) Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Mol Ecol* 12: 2689-2695.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2004) Unidade: Estação Ecológica do Taim. (meio eletrônico: <http://www.ibama.gov.br/siucweb/mostraUc.php?seqUc=64>).
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1992) *Manual Técnico da Vegetação Brasileira*. Rio de Janeiro - RJ 92 pp.
- Iwata H, Kato T & Ohno S (2000) Triparental origin of Damask roses. *Gene* 259: 53-59.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA & Stevens PF (1999) *Plant Systematics. A phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland 464 pp.
- Knowles LL (2001) Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Mol Ecol* 10: 691-701.
- Kuhner MK (2006) Lamarc 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22: 768 - 770.
- Leijs R, van Apeldoorn RC & Bijlsma R (1999) Low genetic differentiation in north-west European populations of the locally endangered root vole, *Microtus oeconomus*. *Biol Cons* 87: 39-48.

- Lima LG & Buchmann FSC (2005) Novo afloramento fossilífero (Pleistoceno/Holoceno) no sul da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. In: X ABEQUA Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, 2005, Guarapari. Boletim de resumos, v. 1.
- Longo D (2005) Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação de Mestrado.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15: 4487-4497.
- Mace GM & Purvis A (2008) Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Mol Ecol* 17: 9-19.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Marinho JR & de Freitas TRO (2006) Population structure of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Ctenomyidae) on the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Theriol* 51: 53-59.
- Miers J (1846) Contributions to the Botany of South America. *London J Bot* 5: 144-190.
- Miller M (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J Hered* 96: 722-724.
- Mishiba KI, Ando T, Mii M, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G & Marchesi E (2000) Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 85: 665-673.
- Murakami Y, Fukui Y, Watanabe H, Kokobun H, Toya Y & Ando T (2004) Floral coloration and pigmentation in *Calibrachoa* cultivars. *J Horticult Sci Biotechnol* 79: 47-53.
- Naciri Y & Gaudeul M (2007) Phylogeography of the endangered *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae) in the European Alps. *Mol Ecol* 16 (13): 2721-2733.
- Nicholas KB & Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. Programa disponível no sítio: [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc).

- Okaura T & Harada K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88: 322-329.
- Olmstead RG & Palmer JD (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Ann Miss Bot Garden* 79: 346–360.
- Olmstead RG, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L & Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. pp. 111–137 in *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization* edited by Nee M, Symon DE, Lester RN & Jessop JP. Royal Botanical Garden, Kew, UK.
- Olsen KM (2002) Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Mol Ecol* 11: 901-911.
- Olsen KM & Schaal BA (1999) Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5586-5591.
- Olson ME (2002) Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int J Plant Sci* 163: 51–65.
- Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, Chase MW & Manhart JR (1988) Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 75: 1180–1206.
- Pedersen G & Seberg O (1998) Molecules vs morphology. *In* A. Karp et al. (ed.) *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman and Hall, London. p 359–365.
- Pelser PB, Gravendeel B & van der Meijden R (2003) Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobaea* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. *Mol Phylogen Evol* 29: 613-628.
- Perret, M, Chautems A, Spichiger R, Kite G & Savolainen V (2003) Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analysis of six plastid DNA regions and nuclear *ncpGS*. *Am J Bot* 90: 445–460.
- Porto ML & Dillenburg LR (1986) Fisionomia e composição florística de uma mata de restinga da Estação Ecológica do Taim, Brasil. *Ci e Cult* 38: 1288-1236.

- Primack RB & Rodrigues E (2001) *Biologia da Conservação*. Editora Vida, Londrina, 328 pp.
- Rambo B (1951) O elemento andino no pinhal riograndense. *Sellowia* 3: 7-39.
- Rambo B (1954) História da flora do litoral riograndense. *Sellowia* 6: 113-172.
- Ramos AMC, Lorenz-Lemke AP, Zamberlan PM, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2007) História paleogeográfica da Planície Costeira do RS: uma abordagem filogeográfica através de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*. In: CD-ROM do 53º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia - SP.
- Rice G (1997) Petunias: a garden paradigm. *The Garden* 122: 30-393.
- Rieseberg LH & Willis JH (2007) Plant speciation. *Science* 317: 910-4.
- Rogers AR & Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.
- Romero EJ (1993) South American paleofloras. In P Goldblatt (Ed). *Biological Relationships between Africa and South America*. Yale University Press, New Haven and London, p 62-85.
- Roy A, Frascaria N, MacKay J & Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor Appl Genet* 85: 173-180.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X & Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Safford HD (1999) Brazilian Paramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *J Biogeogr* 26: 693-712.
- Sang T, Crawford DJ & Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84: 1120-1136.
- Schönenberger J & Conti E (2003) Molecular phylogeny and floral evolution of the Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae, and Alzateaceae (Myrtales). *Am J Bot* 90: 293-309.

- SEMA – Secretaria Estadual do Meio Ambiente (2002) Unidades de Conservação. (meio eletrônico: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/bio.htm>).
- Sendtner O (1846) Solanaceae. In Flora Brasiliensis (CFP von Martius, ed.). F Fleischer, Lipsiae. Vol 10.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE & Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92: 142-166.
- Shaw JMH (2007) A new hybrid genus for *Calibrachoa* × *Petunia* (Solanaceae). *Hanburyana* 2: 50–51.
- Shepherd LD, Perrie LR & Brownsey PJ (2007) Fire and ice: volcanic and glacial impacts on the phylogeography of the New Zealand forest fern *Asplenium hookerianum*. *Mol Ecol* 16 (21): 4536-4549.
- Silva FB (2008) Filogeografia Comparada e História Evolutiva da Planície Costeira Sul e Sudeste do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.
- Siqueira GW, Pereira SFP & Aprile FM (2006) Determinação dos elementos-traço (Zn, Co, e Ni) em sedimentos da Plataforma Continental Amazônica sob influência da descarga do rio Amazonas. *Acta Amazônica* 36: 321-326.
- Souza VC & Lorenzi H (2005) Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, p 141-142.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Tese de doutorado.
- Stehmann & Semir (1997) A new species and new combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon* 7: 417-419.

- Stehmann JR & Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical south America. In: Festschrift for William G.Darcy: The Legacy of a Taxonomist. R. C. Keating, V. C. Hollowell & T. B. Croat (eds.). Missouri Botanical Garden Press, Syst Bot Monogr 104.
- Stehmann JR, Semir J, Dutilh JHA & Forni-Martins RE (1996) Solanaceae. IOPB chromosome data. Newsletter of the International Organization of Plant Biosystematists, v. 26/27, p 24-24.
- Štorchová H & Olson MS (2004) Comparison between mitochondrial and chloroplast DNA variation in the native range of *Silene vulgaris*. Mol Ecol 13 (10): 2909-2919.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.
- Takayama K, Kajita T, Murata J & Tateishi Y (2006) Phylogeography and genetic structure of *Hibiscus tiliaceus* — speciation of a pantropical plant with sea-drifted seeds Mol Ecol 15: 2871–2881.
- Templeton AR, Maskas SD & Cruzan MB (2000) Gene trees: A powerful tool for exploring the evolutionary biology of species and speciation. Plant Species Biol 15: 211-222.
- Togni PD, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2007) Filogeografia de *Calibrachoa elegans* (Solanaceae), uma espécie endêmica dos campos de altitude de Minas Gerais. In: CD-ROM do 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia – SP.
- Tomazelli LJ & Villwock JA (2000) O Cenozóico no Rio Grande do Sul: Geologia da Planície Costeira. In: Holz M & De Ros LF (eds.). Geologia do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, IG/UFRGS, p 375-406.
- Tomazelli LJ & Villwock JA (2005) Mapeamento geológico de planícies costeiras: o exemplo da costa do Rio Grande do Sul. Gravel 3: 109-115.
- Tomazelli LJ, Dillenburg SR & Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain, southern Brazil. Rev Bras Geoc 30: 474-476.

- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, Hashimoto G, Marchesi E & Kao T (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phytotax Geobot* 49: 115-133.
- Tsukamoto T, Ando T, Waranabe H, Kokubun H, Hashimoto G, Sakazaki U, Suárez E, Marchesi E, Oyama K & Kao T (2002) Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). *J Plant Res* 115: 185-193.
- Vázquez DP & Gittleman JL (1998) Biodiversity conservation: Does phylogeny matter? *Curr Biol* 8: R379-R381.
- Villwock JA & Tomazelli LJ (1995) Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1-45.
- Watanabe H, Ando T, Iida S, Buto K, Tsukamoto T, Kokubun H, Hashimoto G & Marchesi E (1997) Cross-compatibility of *Petunia pubescens* and *P. pygmaea* with native taxa of *Petunia*. *Japan Soc Hort Sci* 66: 607-612.
- Watanabe H, Ando T, Nishino E, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G & Marchesi E (1999) three groups of species in *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) inferred from the intact seed morphology. *Am J Bot* 86: 302-305.
- Werneck PB & Lorscheitter ML (2001) Paleoambientes dos últimos milênios na zona da mata do Faxinal, Torres, Rio Grande do Sul, Brasil, através de um estudo de sucessão vegetal. *Boletim de Resumos, Mudanças Globais e o Quaternário, VIII Congresso da ABEQUA, Imbé-RS*: 405-406.
- Weschenfelder J (2005) Processos sedimentares e variação do nível do mar na região costeira do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.
- Weschenfelder J, Corrêa ICS & Aliotta S (2005) Elementos arquiteturais do substrato da Lagoa dos Patos revelados por sísmica de alta resolução. *Pesq Geoc* 32: 57-67.
- Wijnands DO, Boss JJ, Wijsman HJW, Schneider F, Brickell CD & Zimmer K (1986). Proposal to conserve 7436 *Petunia* with *P. nyctaginiflora* as *typ. cons.* *Taxon* 35: 748–749.

- Wijsman HJW (1990) On the interrelationship of certain species of *Petunia* VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae). Acta Bot Neerl 39: 101-102.
- Wijsman HJW (1983) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. II. Experimental data: crosses between different taxa. Acta Bot Neerl 32: 97–107.
- Wijsman HJW & Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. 5. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. Acta Bot Neerl 34: 337-349.
- Wright S (1943) Isolation by distance. Genetics 28: 114-138.
- Xu DH, Sakai AJ, Kanazawa M, Shimamoto A & Shimamoto Y (2000) Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. Theor Appl Genet 101: 724–732.
- Zink RM, Drovetski SV & Rohwer S (2006) Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. Mol Phylogenet Evol 40: 679-686.