

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular

Dânae Longo

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

Orientadora: Dr^a Loreta Brandão de Freitas

Co-orientador: Dr. João Renato Stehmann

Porto Alegre, 29 de Março de 2005

Instituições

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Molecular (Departamento de Genética, Instituto de Biociências) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com o Centro de Biologia Genômica e Molecular (Faculdade de Biociências) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e com o Laboratório de Taxonomia Vegetal (Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Órgãos Financiadores:

PRONEX, CNPq, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Prof^ª Loreta B. Freitas e Prof^º João Renato Stehmann, primeiramente, pela oportunidade de realizar esse trabalho, por todos os ensinamentos e, principalmente, a paciência que tiveram comigo. (Eu sei que não sou fácil. Às vezes, nem eu me agüento...)

Meu muito obrigado ao Prof^º Sandro Bonatto pelo suporte teórico nas análises dos resultados. Apesar de não ser meu orientador oficial, esse trabalho teria sido mais complicado sem a sua ajuda.

A parte ruim de terminar o Mestrado é que, a partir de agora, eu vou deixar de ter a convivência diária com o pessoal do Laboratório de Evolução Molecular. Foram cinco anos da minha vida compartilhados com pessoas que, para mim, há muito deixaram de ser um grupo de trabalho e passaram a representar um grupo de grandes amigos, quase uma família. E como uma grande família, houve também aqueles episódios ruins, mas que não foram tão sérios a ponto de abalar as relações que estão estruturadas em laços muito fortes. Vocês todos moram no meu coração. Eu não queria citar nomes, mas preciso agradecer especialmente à Patrícia Koehler dos Santos, Valéria Cunha Muschner, Aline Pedroso Lorenz-Lemke, Jaqueline Battilana e Laci Krupahtz, as mais “antigas” do laboratório. Eu devo muito a vocês, gurias. Obrigada por tudo.

A Nicolás Oliveira Mega, meu colega e melhor amigo na época da graduação, eu agradeço o apoio durante a época conturbada que foi o fim do Bacharelado e o primeiro ano do Mestrado.

A Glauco Schüssler, um grande cientista além de ótimo companheiro, muito obrigada pela ajuda agora na reta final do Mestrado. Apesar de não discutirmos muito profundamente sobre o meu trabalho, o teu incentivo me deu ânimo para terminar as coisas da melhor maneira possível.

Por fim, dedico essa dissertação às famílias Longo e Piccoli, que desde 1998, lá de Flores da Cunha, se preocupam comigo e torcem pelo meu sucesso. Imagina o que minhas avós diriam se elas soubessem que eu ficava no Departamento de Genética, completamente sozinha no Campus do Vale, até às dez da noite? (*Má che pericolo, Madonna Mia...*)

Em especial, aos meus pais, eu agradeço pelo amor, carinho e segurança que eles me proporcionaram nos momentos de maior dúvida e confusão. Eu me orgulho de carregar os seus genes. Espero, algum dia, poder representar para os meus filhos aquilo que vocês representam para mim.

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	
Caracterização dos organismos de estudo	8
O gênero <i>Petunia</i> Juss.	8
Radiação adaptativa no gênero <i>Petunia</i> s.s.	10
Caracterização taxonômica da espécie <i>Petunia integrifolia</i> (Hook.) Schinz & Thell	11
Taxonomia do complexo <i>Petunia integrifolia</i>	12
A biologia em nível molecular	15
Marcadores moleculares e os estudos evolutivos	16
Filogeografia	18
Filogenias intraespecíficas inferidas por <i>networks</i>	19
Objetivos	20
Materiais e Métodos	
Definição do grupo amostral e obtenção das amostras	21
Extração de DNA	22
Reações de amplificação	23
Regiões marcadoras para seqüenciamento	26
Quantificação dos fragmentos de DNA amplificados	28
Purificação enzimática dos produtos de PCR	29
Precipitação com PEG	29
Seqüenciamento	29
Purificação com etanol/acetato de amônio	30
Análise das seqüências de DNA	30
Inferindo as relações evolutivas na amostra	31
Divisão da amostra para análises populacionais	32
Análises intrapopulacionais	32
Correlação entre distância genética e distância geográfica	33
Análises interpopulacionais	34

Resultados	
Características das seqüências	36
Relações evolutivas na amostra	37
Análises intrapopulacionais	40
Correlação entre distância genética e distância geográfica	44
Análises interpopulacionais	47
Discussão	
Sítios heterozigotos em ITS – falha na evolução em concerto?	51
Evolução diferente dos marcadores – inserção/deleção e substituição	52
Relações evolutivas entre os indivíduos da amostra evidenciam três grupos de haplótipos que representam linhagens evolutivas distintas	53
Análises populacionais	54
Padrões de diversidade intrapopulacional	54
Padrões de diversidade interpopulacional	55
Relação entre geografia e genética	56
Conclusões e Perspectivas	
Aspectos filogeográficos	58
Região ITS não detecta estrutura filogeográfica	58
Análises moleculares evidenciam linhagens evolutivas distintas	58
Como explicar o isolamento entre linhagens continental e costeira?	59
Linhagens costeira e continental representam <i>taxa</i> em especiação incipiente?	60
Genética e conservação	61
Aspectos taxonômicos	61
Resolvendo o complexo <i>integrifolia</i>	62
Linhagens distintas, <i>taxa</i> distintos	63
Nova proposta taxonômica para o complexo <i>Petunia integrifolia</i>	64
Referências Bibliográficas	66
Anexos	80

Resumo

Os chamados 'complexos de espécies' são definidos como grupos de organismos que compartilham características morfológicas muito semelhantes. Os complexos de espécies representam um problema para os sistemas de classificação baseados apenas em caracteres morfológicos, uma vez que os critérios para delimitação de espécies são subjetivos e, por isso, variam de acordo com cada taxonomista. O complexo *integrifolia*, que reúne diversos *taxa* com características florais muito semelhantes à espécie *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell, é um exemplo dessa problemática taxonômica. A determinação de espécies dentro desse complexo, baseada apenas em caracteres morfométricos, é até hoje ainda muito controversa. Nesse trabalho, os espaçadores internos transcritos do DNA nuclear ribossomal (ITS1 e ITS2) e dois espaçadores intergênicos (*trnS-trnG* e *psbA-trnH*) do DNA plastidial (cpDNA) foram sequenciados em 69 indivíduos pertencentes a cinco entidades taxonômicas do complexo *integrifolia* na tentativa de entender sua história evolutiva e melhor contribuir para a correta delimitação das espécies. Análises populacionais e filogeográficas dos três marcadores do cpDNA mostraram que apenas a entidade taxonômica descrita como *Petunia interior* pode ser considerada uma espécie distinta de *Petunia integrifolia*. As outras quatro entidades taxonômicas estão divididas em duas linhagens genéticas independentes e alopátricas, que surgiram mais ou menos na mesma época após um evento de diminuição populacional seguido de rápida expansão. Uma dessas linhagens está localizada na planície costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, enquanto a outra linhagem se distribui na porção continental do RS ao oeste da Lagoa dos Patos. Análises morfométricas mais detalhadas mostram que essas duas linhagens genéticas podem ser distinguidas taxonomicamente e, portanto, são definidas como duas subespécies de *Petunia integrifolia*. Há indícios de que um processo de especiação por adaptação a dois ambientes distintos (alta salinidade na planície costeira e baixa salinidade na porção continental) esteja envolvido na divergência dessas duas linhagens. No entanto, para confirmar essa hipótese, são necessários estudos adicionais.

Palavras chave: *Petunia*; especiação; estruturação populacional; filogeografia; taxonomia.

Abstract

“Species complex” are usually defined as group of species that are morphologically very similar and consequently are very difficult to distinguish. Species complexes, therefore, represent a serious problem to the classification systems based only in morphological characters, the criteria used to delimit species being subjective. The integrifolia complex, that congregates taxa with floral characteristics very similar to *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell, it is an example of this taxonomic challenge. The determination of the species inside of this complex, based only in morphometric characters, it is still very controversial. In this work, the internal transcribed spacers of the ribosomal nuclear DNA (ITS1 and ITS2) and two intergenic spacers (trnS-trnG and psbA-trnH) of the plastidial DNA (cpDNA) had been sequenced in 69 individuals pertaining to five taxonomic entities of the integrifolia complex, in the attempt to understand its evolutionary history and contribute to the better delimitation of the species. Populational and phylogeographic analyses of the three markers and of cpDNA had shown that only the taxonomic entity described as *Petunia interior* can be considered a distinct species of *Petunia integrifolia*. The four other taxonomic entities are divided in two independent and allopatric lineages, that diversified almost simultaneously after an event of population bottleneck followed by a fast expansion. One of these lineages is located in the coastal plain of the Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, while to other lineage it’s distributed in the continental region of the Rio Grande do Sul to the west of the Lagoa dos Patos. Detailed morphometric analyses shown that these two lineages can be taxonomically distinguished and therefore, they may be considered as two subspecies of *Petunia integrifolia*. Some findings suggest that a process of adaptation to these two distinct environments (high salinity in the coastal plain and low salinity in the continental region) may be involved in the divergence of the two lineages. Additional studies are required to test this hypothesis.

Key words: *Petunia*; speciation; populacional structure; phylogeography; taxonomy.

Introdução

Caracterização dos organismos de estudo

O gênero *Petunia* Juss.

A família Solanaceae L. compreende 2930 espécies distribuídas em 147 gêneros (Judd e cols., 1999). Essencialmente, esta família de plantas é composta por espécies que podem ser tanto ervas, arbustos, árvores como trepadeiras ou epífitas, caracterizadas por flores geralmente actinomorfas com cinco estames, cinco sépalas e cinco pétalas concrecidas. A junção das pétalas confere à corola diferentes formatos: tubulares, cônicos, de sino, trombeta ou prato. Muitos membros dessa família são venenosos devido à presença de alcalóides. Algumas espécies são fontes de drogas farmacêuticas ou narcóticas, por exemplo: *Nicotiana* (tabaco), *Atropa* (beladona) e *Datura* (estramônio). Espécies de importância alimentar estão incluídas nos gêneros *Solanum* (tomate, batata, etc.) e *Capsicum* (pimentas). A família Solanaceae inclui também diversas espécies de interesse ornamental em gêneros como *Browallia*, *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Datura*, *Salpiglossis*, *Solandra* e *Petunia* (Judd e cols., 1999).

Petunia sensu lato (s.l.) é o gênero da tribo Nicotianeae G. Don melhor representado no Brasil, com 34 espécies onde a maioria ocorre na região sul nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A denominação “petúnia” é derivada de “petum, betum”, nome indígena do tabaco (*Nicotiana tabacum*) que é muito semelhante a *Petunia nyctaginiflora* (= *P. axillaris*), uma das primeiras espécies descritas para o gênero (Stehmann, 1999).

As petúnias são conhecidas popularmente devido à espécie *Petunia x hybrida*¹ ("petúnia de jardim" - figura 1A), um híbrido artificial obtido no início do século XIX a partir do cruzamento entre as espécies *P. integrifolia* (Hook) Schinz & Tell e *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. A identidade das espécies parentais da petúnia de jardim, no entanto, foi esclarecida somente em 1982 e 1983, após uma série de cruzamentos interespecíficos conduzidos por Wijsman e colaboradores. Juntamente com análises cariotípicas e isoenzimáticas, esses autores mostraram que o gênero *Petunia* era, na verdade, constituído por dois grupos de espécies distintos: um com $2n = 14$ e outro com $2n = 18$ cromossomos.

¹ O "x" na nomenclatura indica uma espécie híbrida.

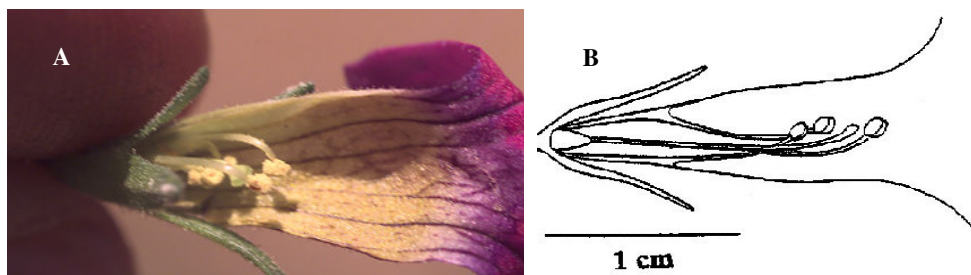


Figura 1 - Detalhe da estrutura floral de *Petunia*; A) Corte da flor de *P.x hybrida*, mostrando os cinco estames heterodínamos; B) Esquema da flor de *P. integrifolia* em corte, mostrando a junção dos estames à corola.

O grupo de espécies com $2n = 14$, no qual está incluída *Petunia x hybrida*, foi mantido como gênero *Petunia sensu stricto* Jussieu (s.s) (Wijnands e Boss, 1986; Brummitt, 1989). As outras espécies ($2n = 18$) foram agrupadas no gênero *Calibrachoa* La Llave & Lexarza (Wijsman, 1990; Stehmann e Semir, 1997). A denominação *Petunia sensu lato* (s.l.) refere-se, portanto, ao grupo formado pelos gêneros *Petunia* s.s e *Calibrachoa*. A posição taxonômica de *Petunia* s.l. Jussieu está esquematizada na Figura 2.

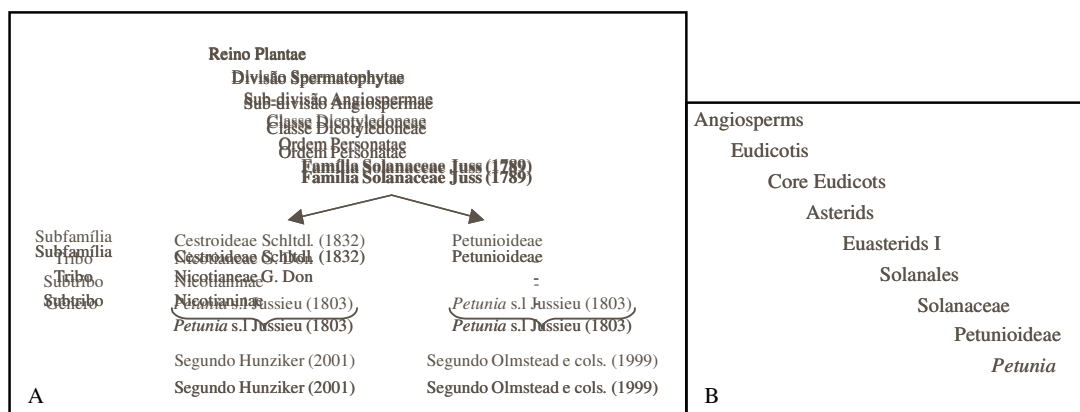


Figura 2 - Esquemática da classificação do gênero *Petunia*. A) Segundo Olmstead e cols. (1999), baseado em análises de DNA cloroplasmático, e segundo Hunziker (2001), baseado em caracteres morfológicos e análises cromossômicas; B) Segundo APG (“Angiosperm Phylogeny Group”, 2003), a partir de uma compilação de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares, morfológicos e bioquímicos.

A sistemática do gênero *Petunia* Juss. foi revisada por Stehmann (1999). Baseando-se em características morfológicas, anatômicas e cromossômicas, o autor reconheceu 11 espécies, endêmicas da América do Sul, restritas à região entre os paralelos 22° e 39°S, que enquadra dois centros de diversidade (Figura 3). De modo geral, estas espécies são plantas subarborescentes ou

herbáceas, com raízes axiais, de caule verde ou purpúreo-escuro, com denso indumento composto de tricomas simples de ápice glanduloso, que secretam substâncias viscosas aderentes, açúcares esterificados e alcalóides envolvidos em estratégias de defesa contra insetos (Johnson, 1975; Chortyk e cols. 1997). Dependendo do autor, as espécies são classificadas como anuais ou perenes de vida curta (Child e Lester, 1991; Ando e Hashimoto, 1993; Stehmann, 1999). As folhas são sésseis ou sub-sésseis, variando de um a 19 cm. As flores são vistosas, com cálice profundamente fendido, corola actino ou zigomorfa, com prefloração imbricada, de coloração predominantemente púrpura ou magenta e, mais raramente, vermelha ou branca. O androceu tem cinco estames heterodínamos e adnatos ao tubo da corola, sendo um par maior, outro par mediano e um estame menor (Figura 1B). O fruto é uma cápsula septífraga, com sementes pequenas e abundantes, de dispersão anemocórica. A síndrome da melitofilia² é encontrada na maioria das espécies (Stehmann, 1999).

Radiação adaptativa no gênero *Petunia* s.s

A grande quantidade de variedades de petúnias ornamentais obtidas por cruzamentos artificiais desde o início do século XVIII é um indicativo da fraca barreira genética existente entre as espécies de *Petunia* s.s. (Prain e cols, 1918).

A baixa incidência de hibridação natural (apesar de exceções relatadas por A.P. Lorenz-Lemke, comunicação pessoal) sugere a existência de mecanismos eficientes de prevenção ao fluxo gênico interespecífico. Mecanismos de isolamento reprodutivo estabelecidos por adaptação a diferentes polinizadores parecem ser particularmente importantes na manutenção da integridade genética entre as espécies de *Petunia* (Stehmann, 1999). As diferentes síndromes florais, aliadas à paradoxal baixa diferenciação genética das espécies (Kulcheski e cols., no prelo), indicam a ocorrência de especiação por radiação adaptativa na evolução do gênero *Petunia*.

Radiação adaptativa é definida como a evolução divergente de numerosas linhagens em um curto espaço de tempo. A radiação adaptativa acontece quando a evolução dessas linhagens divergentes envolve adaptação a diferentes modos de vida (Futuyma, 1998). No caso do gênero *Petunia*, portanto, as diferentes linhagens (espécies) evoluíram por adaptação a diferentes polinizadores. Um exemplo clássico de radiação adaptativa em vegetais são os gêneros que compõem a flora Hawaiana (Baldwin e Robichaux, 1995). Assim como *Petunia*, esses gêneros exibem grande diferenciação morfológica a despeito de baixa diferenciação genética interespecífica.

² Síndrome: conjunto de características (formato e cor da corola, posição dos estames, perfume, etc.) que tornam a flor propícia à polinização por um determinado vetor. Flores melitófilas são aquelas polinizadas por abelhas.

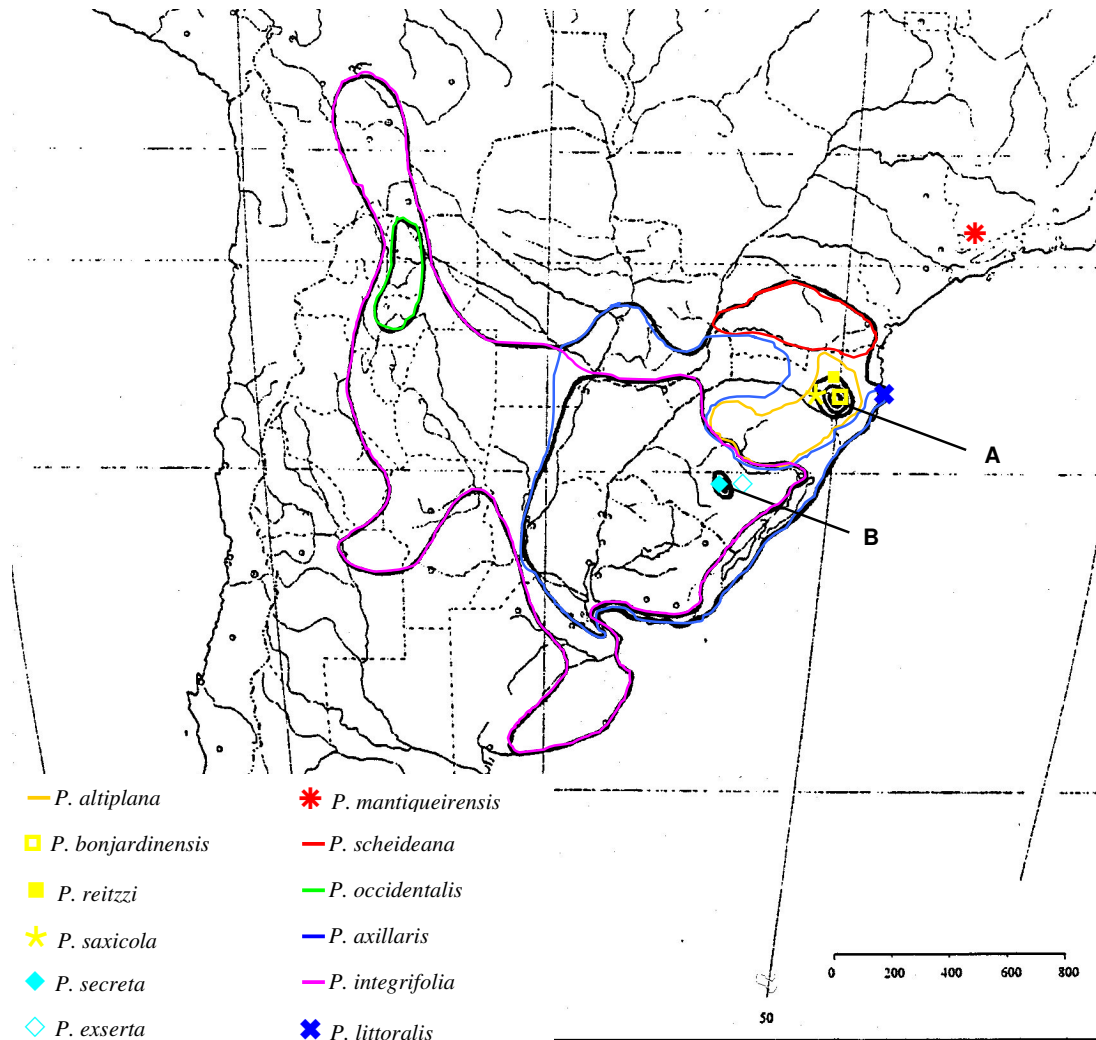


Figura 3 - Centros de diversidade do gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae), cada um representado por quatro espécies, segundo Stehmann (1999): A) Campos de altitude associados à floresta ombrófila mista, na borda oriental do planalto catarinense (1000-1820 m): são encontradas *P. altiplana*, *P. bonjardinensis*, *P. reitzii* e *P. saxicola*. B) Serra do Sudeste gaúcha, região de afloramentos rochosos areníticos: ocorrem *P. axillaris*, *P. integrifolia*, *P. exserta* e *P. secreta*. As linhas delimitam áreas de distribuição enquanto os símbolos indicam ocorrência mais restrita. *Petunia littoralis* foi incluída nessa figura, mas Stehmann (1999) a considera sinônimo de *P. integrifolia* (ver adiante).

Caracterização taxonômica da espécie *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell

Esta espécie apresenta grande variação nos caracteres vegetativos e no hábito. Podem ser eretas, ascendentes, decumbentes ou procumbentes, (Figura 4), atingindo 50 cm de altura. As folhas têm 12-70 x 15-30 mm, lâmina elíptica a ovada, geralmente pilosa. As inflorescências apresentam ramos mais comumente dicotômicos. O cálice varia entre 5-20 mm de comprimento,

sendo profundamente fendido. A corola de 20-44 mm comprimento é zigomorfa, infundibuliforme, com tubo piloso, lobos largo-obovados, obtusos ou arredondados, sendo o ápice obtuso ou agudo, de cor magenta ou púrpura. Os estames são inclusos, adnatos à base da corola entre 2 e 7 mm, com filetes heterodínamos. O estilete tem 10-18 mm de comprimento, é levemente curvado e dilatado em direção ao ápice. A forma do pólen também apresenta ampla variação, sendo que em *P. integrifolia* podem ser encontradas todas as formas registradas para o gênero. A área de ocorrência da espécie está indicada na Figura 3. *Petunia integrifolia* habita os mais variados tipos de ambientes campestres, afloramentos rochosos e locais perturbados pela ação antrópica. A espécie floresce durante todo o ano e frutifica de agosto a junho sendo, ainda, melitófila, auto-incompatível e xenógama. O polinizador efetivo em populações do estado do Rio Grande do Sul (Figura 5F) é a abelha *Callonychium petuniae*, Andrenidae (Silva, 1994).

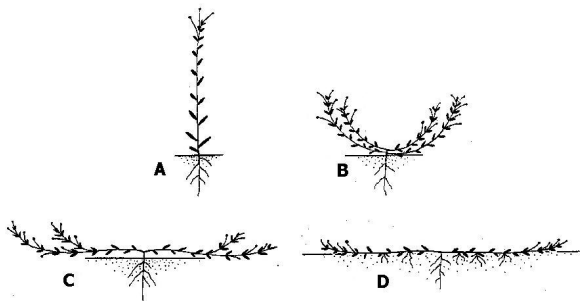


Figura 4 - Representação esquemática dos hábitos da espécie *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Tell: A) ereto; B) ascendente; C) procumbente; D) decumbente. (modificado de Stehman, 1999)

Taxonomia do complexo *Petunia integrifolia*

Um complexo de espécies é o conjunto de organismos com características morfológicas muito semelhantes. Uma vez que o critério para delimitação de espécies taxonômicas (*taxa*) é a presença de caracteres morfológicos diagnósticos e descontínuos, a circunscrição de espécies estáveis dentro de tais complexos é difícil. Isso porque, muitas vezes, os critérios diagnósticos variam de autor para autor e revisões posteriores, baseadas em novos caracteres ecológicos e morfológicos até então ignorados, tendem a contradizer as classificações anteriores. Um exemplo disso é o conjunto de *taxa* que forma o chamado complexo *Petunia integrifolia* (referido de agora em diante simplesmente como complexo integrifolia).

Stehmann (1999) incluiu no complexo integrifolia os integrantes do gênero *Petunia* Juss. que compartilham as características florais da espécie *Petunia integrifolia*, a saber: corola infundibuliforme, magenta ou purpúrea, filetes adnatos à base da corola a 2-5 mm, estigma localizado entre as anteras dos pares de estames maior e mediano e pólen violáceo. Na Figura 5 são

apresentadas fotografias de alguns dos integrantes desse complexo e na Figura 6 estão as mudanças de classificação dos diversos *taxa* ao longo das décadas.

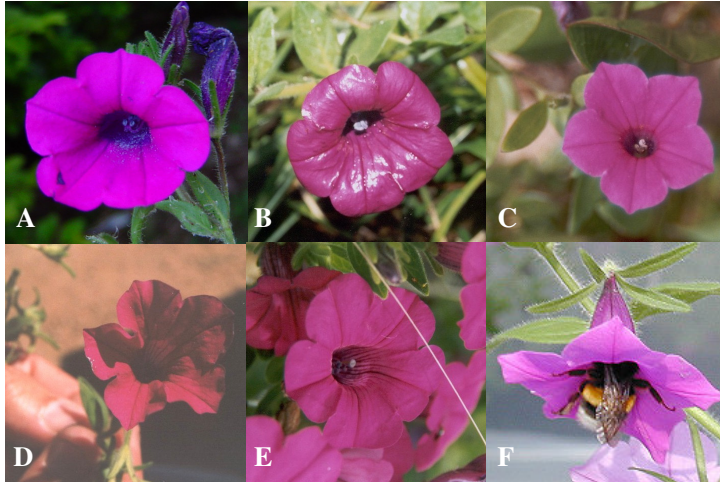


Figura 5 – Algumas espécies e subespécies integrantes do complexo *integrifolia*. A) *Petunia interior*; B) *P. riograndensis*; C) *P. littoralis*; D) *P. integrifolia* subsp. *depauperata*; E) *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*; F) *P. integrifolia* e seu polinizador efetivo *Callonychium petuniae*.

As populações de *Petunia* encontradas na ilha de Florianópolis foram descritas por Smith e Downs (1966) como uma espécie distinta, *Petunia littoralis* (Figuras 3 e 5C), devido ao formato linear das folhas e aos ramos glabros. Wijsman (1982), por sua vez, reconheceu *P. integrifolia* como uma espécie biológica única formada por três subespécies geográficas: *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia* (Figura 5E) associada ao Pampa gaúcho e argentino, *P. integrifolia* subsp. *inflata* no Paraguai, nordeste da Argentina e oeste da região Sul do Brasil, e *P. integrifolia* subsp. *occidentalis* isolada na região norte da Argentina e sul da Bolívia.

Posteriormente, outros três *taxa* relacionados a *P. integrifolia* foram elevados à categoria de espécie: Ando e Hashimoto (1996) denominaram as populações que apresentavam anteras com tecas diferenciadas e ramificações tricotômicas de *Petunia interior* (Figura 5A); e, em 1998, estes mesmos autores, baseados nas diferenças de tamanho da flor, dos estames e formato do tubo da corola descreveram *Petunia riograndensis* (Figura 5B) nas savanas do planalto sul-riograndense e *P. bajeensis* na região dos campos pampeanos. Segundo Ando e Hashimoto (1996 e 1998), as características diagnósticas dessas três espécies não apresentam sobreposição na natureza, o que justificaria sua separação em espécies distintas.

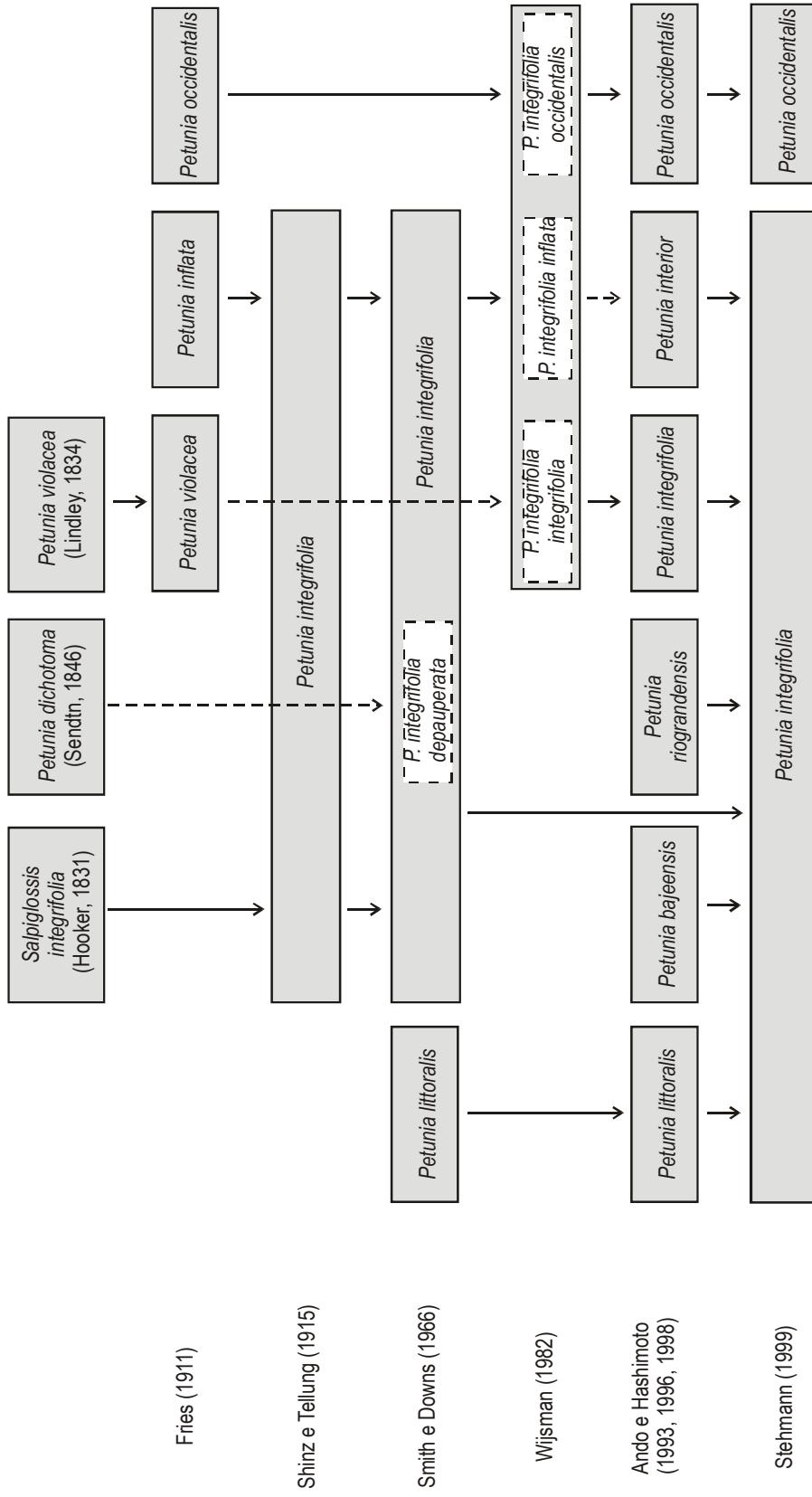


Figura 6 – Mudanças na delimitação taxonômica e nomenclatura dos *taxa* pertencentes ao complexo *Petunia integrifolia* de acordo com diversos autores. As caixas cinza representam *taxa* específicos. As caixas brancas representam *taxa* infraespecíficos.

Stehmann (1999), por outro lado, argumenta que a espécie *Petunia integrifolia* encontra-se naturalmente subestruturada em populações parcialmente isoladas. Devido ao isolamento, algumas populações marginais poderiam se diferenciar vegetativamente das outras, mas não o suficiente para constituir espécies taxonômicas diferentes. Este seria o caso dos *taxa* descritos acima. Portanto, no critério de Stehmann (1999), as entidades descritas como *Petunia littoralis*, *P. riograndensis*, *P. bajeensis* e *P. interior* deveriam ser consideradas, no máximo, como *taxa* infraespecíficos de *Petunia integrifolia*. *Petunia occidentalis*, que apresenta uma distribuição mais disjunta e caracteres diagnósticos mais consistentes seria uma exceção, constituindo uma espécie independente.

Levando em consideração toda a controvérsia que concerne à classificação do complexo *integrifolia*, no presente trabalho as entidades taxonômicas pertencentes a esse complexo não serão tratadas como espécies ou subespécies, mas como “grupos morfológicos” (ver equivalência e maiores detalhes nos Materiais e Métodos). As características morfológicas diagnósticas desses grupos são apresentadas no Anexo.

A biologia em nível molecular

Os primeiros estudos da biologia evolutiva de Lamarck (1809), Darwin (1859) e Haeckel (1866) fizeram inferências sobre a origem e a relação entre os organismos fundamentados basicamente pela comparação de caracteres morfológicos. Em muitos casos, esses estudos permitiram estabelecer relações entre as espécies, deduzindo aspectos de sua origem e evolução.

Com o desenvolvimento científico e tecnológico ao longo dos anos, muitas metodologias de análise foram surgindo e permitiram acessar informações sobre os organismos que não eram percebidas diretamente. A partir dos anos de 1960, o estabelecimento de métodos matemáticos e algoritmos, auxiliados pelo avanço computacional, permitiram realizar análises reunindo um grande número de dados complexos. Dentre esses dados, os aspectos celulares relacionados com a estrutura das moléculas tornaram-se uma grande fonte de informações. Essa nova linha de estudo, conhecida como biologia molecular, permitiu que dúvidas antigas sobre a evolução dos organismos pudessem ser esclarecidas (Matioli, 2001).

Para a Biologia de Populações e para a Genética, o desenvolvimento de técnicas como a PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Mullis e cols, 1986) e o seqüenciamento (Sanger e cols, 1977), e sua utilização como ferramentas na análise de marcadores moleculares, permitiram que informações primárias sobre a constituição dos organismos, em nível de DNA, pudessem ser observadas.

Segundo Leicht e Bennet (1997), a caracterização dos organismos a partir de marcadores moleculares apresenta certas vantagens sobre outros marcadores (como aqueles baseados em caracteres bioquímicos e morfológicos), na medida em que eles são independentes da expressão gênica. Os marcadores moleculares são, então, insensíveis às influências do ambiente e do *background* genético e são estáveis ao longo do desenvolvimento. Esses marcadores refletem características herdáveis dos organismos e podem apresentar múltiplos estados (alelos) para cada caráter (*locus*). Como os alelos podem se diferenciar entre os indivíduos, o estabelecimento de conexões entre essas variações permite determinar a estrutura genética de populações naturais ou domesticadas e, também, reconstruir a história filogenética de grupos de organismos (Nei e Kumar, 2000).

Marcadores moleculares e os estudos evolutivos

Numerosos avanços no estudo da biologia evolutiva foram possibilitados nas últimas duas décadas depois do aprimoramento da tecnologia de seqüenciamento automático do DNA genômico. Desde então, informações provenientes do DNA organelar vêm sendo especialmente utilizadas em uma variedade de estudos evolutivos. As organelas – mitocôndrias e cloroplastos – apresentam herança uniparental, pouca ou nenhuma recombinação e taxas de evolução diferentes daquelas observadas para o DNA nuclear. Em plantas, informações do DNA plastidial (cpDNA) tornaram-se ferramentas padrão para estudos filogenéticos (Clegg e cols., 1994; Gielly e cols., 1996) e um número cada vez maior de trabalhos na área da sistemática taxonômica vêm utilizando dados moleculares como auxiliares na resolução de problemas de classificação baseadas apenas em dados morfológicos (Araújo, 2001; Angiosperm Phylogeny Group, 2003; Muschner e cols., 2003).

Para estudos filogenéticos em níveis taxonômicos abaixo da categoria de gênero, as regiões não codificadoras do cpDNA (íntrons e espaçadores intergênicos) são as mais utilizadas, pois sofrem pouca ou nenhuma pressão seletiva. Assim, essas regiões estão mais livres para variar, fornecendo informações filogenéticas suficientes para reconstruir eventos evolutivos relativamente recentes (Small e cols., 1998). Dentre as regiões não codificadoras do cpDNA, o espaçador intergênico cloroplasmático *psbA-trnH* foi caracterizado por Aldrich e cols. (1988) como uma região plástica evolutivamente. Juntamente com outros marcadores, a região *psbA-trnH* já foi usada para acessar as relações filogenéticas entre espécies do gênero *Paeonia* (Sang e cols., 1997) e entre gêneros da ordem Laurales (Renner, 1999). Outro espaçador intergênico de cloroplasto, *trnS-trnG*, parece apresentar variação intraespecífica suficiente para permitir estudos de estrutura populacional e fluxo gênico em espécies de angiospermas (Hamilton, 1999).

Devido à condição altamente conservada do genoma plastidial, regiões de cpDNA são pouco utilizadas para estudos evolutivos em nível populacional (van Ham e cols., 1994), pois geralmente estas seqüências não evoluem rápido o suficiente para revelar polimorfismos intraespecíficos (Wolfe, 1987). Contudo, o seqüenciamento das regiões *psbA-trnH* e *trnS-trnG* do cpDNA, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou uma boa variação inter e intraespecífica nos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* (Contini e cols., 2003; Kulcheski e cols., 2003; Kulcheski e cols., no prelo; Longo e cols., 2003; Lorenz e cols., 2003).

As regiões do genoma nuclear são ferramentas mais adequadas para os estudos evolutivos que requerem dados de variação molecular em nível intraespecífico e populacional em plantas, pois apresentam taxas evolutivas cerca de três a seis vezes maiores que as do cpDNA (Small e cols., 1998). Além disso, diversos trabalhos (p/ ex.: Molvray e cols, 1999; Fishbein e Soltis, 2004; Koontz e cols., 2004; Oh e Potter, 2005) vêm combinando dados nucleares aos dados de cpDNA, na tentativa de aumentar a confiabilidade das relações evolutivas inferidas, pois, uma vez que os dois genomas apresentam mecanismos evolutivos diferentes, a história que é contada apenas por um deles pode ser incompleta, como revisado em Schaal e cols. (1998) e Nordborg e Innan (2002). A incongruência entre resultados obtidos a partir de regiões do genoma nuclear e plastidial pode indicar a ocorrência de eventos de hibridação e introgressão, que passariam despercebidos caso os estudos fossem conduzidos com apenas um tipo de marcador (Yoo e cols., 2002). Além disso, nos estudos de genética de populações, o sistema diferenciado de herança dos genomas nuclear (biparental) e plastidial (uniparental) acaba determinando padrões de diversidade genética intra e interpopulacional bastante divergentes (Petit e cols., 1993a).

Uma das regiões mais usadas para estudos evolutivos, dentre as regiões nucleares disponíveis para a análise, tem sido a região correspondente aos espaçadores internos transcritos do DNA nuclear ribossomal (nrDNA), ITS1 e ITS2, que separam os genes 18S, 5,8S e 26S, codificadores das subunidades ribossomais (Figura 7). Transcritos juntamente com as regiões codificadoras, os espaçadores ITS são eliminados durante o processamento do RNA. Em organismos superiores, o DNA ribossomal encontra-se agrupado em arranjos de centenas a milhares de repetições. O mecanismo chamado “evolução em concerto” atua sobre as repetições presentes em um genoma de maneira a homogeneizá-las em apenas uma seqüência definida, o que facilita a utilização da região ITS em estudos que envolvem seqüenciamento. No caso da formação de plantas híbridas, as seqüências de ITS, originadas dos diferentes genomas parentais, preferencialmente, passam por evolução em concerto em vez de continuar a evoluir independentemente, sendo homogeneizadas. Tem sido sugerido que o mecanismo para a homogeneização interlocos seja a permuta desigual ou a conversão gênica (Baldwin e cols., 1995). Como observado por Aguilar e cols. (1999), a homogeneização das seqüências de ITS em híbridos

artificiais em *Armeria* pode ocorrer rapidamente, em apenas duas gerações, removendo um dos tipos de rDNA parental do genoma do híbrido.

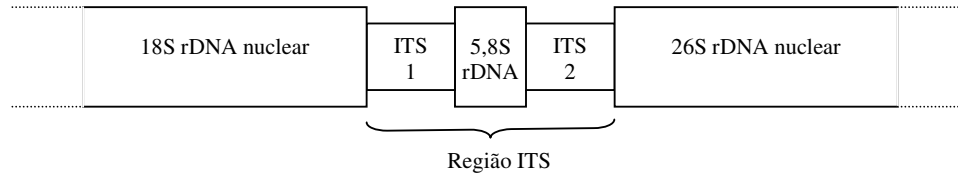


Figura 7 - Organização da região ITS. (adaptado de Baldwin e cols., 1995).

Entre 244 trabalhos revisados por Álvarez e Wendel (2003), os estudos filogenéticos utilizando a análise da região ITS foram os mais frequentes aparecendo, também, como auxiliar nos estudos de sistemática molecular. Neste último aspecto, a análise dos ITS serviu, inclusive, para elucidar relações evolutivas dentro de complexos de espécies (Rauscher, 2002; Rauscher e cols., 2002; Goel e cols., 2002). O estudo combinado da região ITS com marcadores de cpDNA e caracteres morfológicos aumenta ainda mais a consistência das relações evolutivas inferidas (Álvarez e cols., 2001).

Filogeografia

Como já foi mencionado anteriormente, o estudo da variação encontrada nas seqüências de DNA possibilitou grandes avanços nas áreas da Filogenia e Sistemática Filogenética. Nos estudos em nível intraespecífico, o uso de seqüências de DNA para inferir processos evolutivos envolvendo populações foi estimulado após o estabelecimento do conceito de Filogeografia por Avise e cols. (1987).

Os estudos filogeográficos traçam inferências sobre a história da divergência entre populações examinando as relações genealógicas dos genes dentro de um contexto geográfico (filogenias intraespecíficas). As abordagens filogeográficas oferecem um meio de determinar quais processos atuais e históricos influenciaram a variação genética atualmente observada nas populações (Avise, 2000).

Os estudos moleculares em nível populacional, no entanto, ainda permanecem muito menos comuns que estudos similares em animais. Tal fato deve-se, primeiramente, à dificuldade de

encontrar marcadores com nível apropriado de polimorfismo intraespecífico (Schaal e cols. 1998). A construção de filogenias intraespecíficas para grupos de plantas tem aumentado nos últimos oito anos, quando começaram a ser identificadas seqüências nucleares (Strand e cols., 1997; Olsen e Schaal, 1999; Gaskin e Schaal, 2002) e plastidiais (Maskas e Cruzan, 2000) que exibem variação adequada. Desde então, a abordagem filogeográfica vem permitindo entender detalhadamente os processos populacionais e históricos que governam a evolução das plantas, especialmente as de interesse econômico e ecológico (Schaal e cols., 2003).

Filogenias intraespecíficas inferidas por *networks*

As relações evolutivas acima e abaixo do nível de espécie são diferentes em sua natureza. As relações entre os genes amostrados de indivíduos pertencentes a diferentes espécies (filogenia, propriamente dita) são hierárquicas. Isso porque esses genes são produto de fissão populacional seguida por longo tempo de isolamento reprodutivo, durante o qual novas mutações combinadas à divergência de populações levam à fixação de diferentes alelos e, finalmente, a conjuntos gênicos não sobrepostos.

As propriedades das relações entre genes amostrados em uma espécie não são hierárquicas, uma vez que resultam de reprodução sexual, de menor número de mutações recentes e, freqüentemente, de recombinação (Templeton e cols., 1992; Crandall e cols., 1994). Por causa dessas propriedades, métodos filogenéticos como os *networks* são mais adequados para inferir relações em nível populacional (Posada e Crandall, 2001). As árvores de haplótipos³, chamadas de *networks*, ao contrário das árvores bifurcadas usadas para filogenias interespecíficas tradicionais, incorporam as predições da teoria da genética de populações (Watterson, 1985; Hudson, 1990; Crandall e Templeton, 1993) permitindo, assim, a observação e análise de polimorfismos ancestrais na amostra, além de multifurcações e reticulações entre os haplótipos analisados.

As árvores de haplótipos têm sido freqüentemente usadas, por exemplo, para obter informações sobre o estabelecimento e rotas de migração pós-glaciais de importantes espécies arbóreas européias (Taberlet e cols., 1998; Lumaret e cols, 2002; Petit e cols., 2002b). Outros estudos documentaram a origem de plantas cultivadas (Olsen e Schaal, 1999), examinaram a colonização e diversificação de espécies de plantas na Ásia (Huang e cols., 2001; Ge e cols., 2002) e investigaram a origem de plantas invasoras que ameaçam a biodiversidade nos Estados Unidos e outras regiões do mundo (Schaal e cols., 2003).

³ Haplótipos são alelos de um mesmo *locus* que se diferenciam por uma ou mais mutações.

Objetivos

O objetivo geral desse trabalho é caracterizar a variabilidade molecular nos diferentes grupos morfológicos pertencentes ao complexo de espécies *Petunia integrifolia* encontrados no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, usando como marcadores os espaçadores intergênicos plastidiais *psbA-trnH* e *trnS-trnG* e os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear ITS1 e ITS2.

Objetivos específicos:

- caracterizar e comparar o nível de variabilidade genética obtido com os diferentes marcadores moleculares;
- contribuir para o conhecimento das relações evolutivas e filogeográficas dos integrantes do complexo *integrifolia*;
- comparar os grupos morfológicos entre si através de parâmetros populacionais, inferindo o nível de diferenciação genética entre eles;
- contribuir para a circunscrição taxonômica dos integrantes do complexo *integrifolia*.

Materiais e Métodos

Definição do grupo amostral e obtenção das amostras

O material analisado foi obtido diretamente através de coletas na natureza, em diferentes regiões dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 8). As informações sobre os locais de coleta são apresentadas na Tabela 1. Ao todo, foram analisadas amostras provenientes de 50 populações, pertencentes aos cinco grupos morfológicos⁴ definidos para *Petunia integrifolia*. Os testes piloto de seqüenciamento para dez marcadores moleculares de genoma nuclear e plastidial revelaram pouco ou nenhum polimorfismo intrapopulacional. Desta forma, para cada população foram escolhidas, aleatoriamente, uma ou duas amostras para a análise, totalizando 69 indivíduos, conforme descrito abaixo:

- 20 populações do grupo *integrifolia* (26 indivíduos analisados). Este grupo corresponde à *Petunia integrifolia* subsp *integrifolia* segundo a definição de Wijsman (1982);
- 20 populações do grupo *depauperata* (21 indivíduos analisados). Os indivíduos deste grupo correspondem à *Petunia integrifolia* subsp *depauperata* segundo a definição de Smith e Downs (1966);
- sete populações do grupo *riograndensis* (8 indivíduos analisados). Estes correspondem à *Petunia riograndensis* descrita por Ando e Hashimoto (1998);
- duas populações do grupo *interior* (7 indivíduos analisados), correspondentes à *Petunia interior* descrita por Ando e Hashimoto (1996);
- uma população do grupo *littoralis* (7 indivíduos analisados), incluídos em *Petunia littoralis* descrita por Smith e Downs (1996).

⁴ ver Introdução e Figura 6 para maiores esclarecimentos sobre os grupos morfológicos.

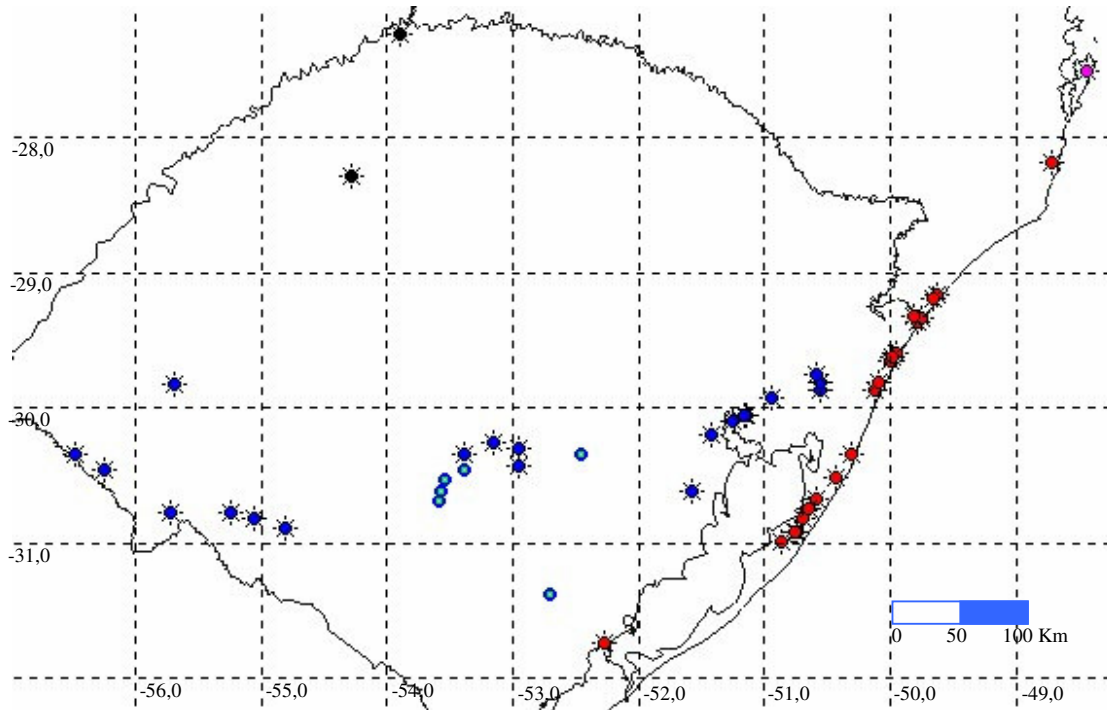


Figura 8: Mapa simplificado dos estados do RS e SC com a localização das populações onde foram obtidas as amostras analisadas neste estudo. Os diferentes símbolos indicam os grupos morfológicos descritos na literatura: (★) grupo integrifolia; (★) grupo riograndensis; (★) grupo depauperata; (★) grupo littoralis; (★) grupo interior.

Extração de DNA

Para cada indivíduo amostrado, foram coletadas algumas folhas jovens, imediatamente acondicionadas em sílica gel para secagem. De cada população foi confeccionada, pelo menos, uma exsiccata, depositada no Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Minas Gerais, como testemunha. As folhas desidratadas em sílica foram pulverizadas com nitrogênio líquido e a extração de DNA total do material foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por Roy e cols. (1992) adaptada para amostras de *Petunia*:

- 20 mg de material pulverizado;
- Adição de 600µl de tampão de extração (100mM TRIS-HCl; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoetanol; 2% PVP 40), 60µl de β-mercaptoetanol e 6µl de Proteinase K (10mg/ml);
- Incubação a 65°C por 30 minutos;
- Emulsão com 600µl de fenol-clorofórmio (1:1);

- Centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm;
- Recolhimento da fase aquosa e estimativa do volume;
- Precipitação do DNA com um volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio;
- Armazenamento por 24 horas em freezer - 20 °C;
- Centrifugação por 20 minutos a 14000 rpm e descarte do sobrenadante;
- Lavagem do *pellet* com 200 µl de etanol 70% e secagem à temperatura ambiente por 20 minutos;
- Eluição do *pellet* em 200 µl de água ultra-pura estéril e 2 µl de RNase (10mg/ml).

Os produtos de extração foram testados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). A qualidade do DNA extraído foi avaliada e sua concentração estimada por comparação com marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Reações de amplificação

O DNA das amostras foi amplificado pela técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Mullis e cols., 1986), em termociclador automático MJ Res. Inc., utilizando *primers* e protocolos específicos, descritos na literatura, para cada um dos marcadores utilizados.

Tabela 1: Principais informações sobre as amostras analisadas: local de coleta, número de indivíduos por populações, código dos indivíduos analisados, classificação dos indivíduos de acordo com o grupo morfológico e de acordo com os resultados obtidos na análise de *networks* (ver também Figura 10) e tipos de haplótipos obtidos com os três diferentes marcadores.

Localidade, Município e data de Coleta	Coordenada geográfica	n	Códigos	Amostra analisada	Grupos morfológicos	Grupos formados no <i>network</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnS-trnG</i>	combinado	ITS
Capané, Cachoeira do Sul/RS - 08/10/02	-30 17' 05" -53 07' 58"	6	int01 - 06	int004			AH01	SG01	C01	H01 e H02
Caçapava do Sul/RS - 08/10/02	-30 22' 06" -53 21' 46"	3	int07-09	int007			AH01	SG01	C01	H03 e H04
Morro Grande, Cachoeira do Sul/RS - 11/10/02	-30 19' 11" -52 55' 34"	5	int015 - 020	int017			AH02	SG01	C05	H10 e H11
Piquiri, Cachoeira do Sul/RS - 11/10/02	-30 27' 11" -52 56' 08"	3	int021 - 023	int022 int023		continental	AH04 AH05	SG03	C06 C07	H12 e H13 H08 e H12
Guatiba/RS - 12/11/02	-30 13' 09" -51 24' 15"	15	int048 - 062	int050 int062			AH09	SG03	C12	H21
Dom Pedrito/RS - 13/11/02	-30 55' 06" -54 47' 24"	1	int063	int063			AH10	SG03	C13 C14	H18 e H21 H22 e H10
Santana do Livramento/RS - 13/11/02	-30 50' 27" -55 02' 16"	1	int064	int064			AH11	SG03	C15	H10 e H23
Santana do Livramento/RS - 13/11/02	-30 47' 33" -55 12' 39"	10	int065 - 072 e 101-102	int070 int072			AH12 AH01	SG08 SG03	C16 C17	H09 e H21 H24 e H25
Quaraí/RS - 13/11/02	-30 47' 27" -55 42' 04"	5	int075 - 079	int075 int078	integrifolia		AH13	SG03	C18	- H03 e H26
Banhado Julie, Quaraí/RS - 13/11/02	-30 29' 03" -56 13' 15"	6	int080 - 085	int083		continental	AH09	SG03	C12	H23 e H27
Uruguaiana/RS - 14/11/02	-30 21' 27" -56 27' 23"	1	int086	int086			AH01	SG03	C17	H23 e H28
Alegrete/RS - 14/11/02	-29 50' 36" -55 39' 45"	11	int087 - 097	int090 int093			AH09 AH04	SG09	C19 C20	H13 e H29 -
Barra do Ribeiro/RS - 27/09/03	-30 38' 23" -51 33' 24"	7	int132 - 138	int136			AH09	SG03	C12	H21 e H38
Porto Alegre/RS - 18/10/02	-30 04' 27" -51 07' 04"	7	int034 - 040	int037 int040			AH06	SG03	C09	H08 e H16 H17 e H18
Porto Alegre/RS - 18/10/02	-30 04' 13" -51 08' 31"	5	int041 - 045	int043			AH07	SG06	C10	H08 e H19
Morro do Osso, Porto Alegre/RS - 20/10/02	-30 07' 20" -51 14' 05"	2	int046 - 047	int046			AH08	SG03	C11	H18 e H20
Gravatá/RS - 08/10/03	-29 56' 34" -50 55' 37"	14	int145 - 158	int147			AH18	SG03	C26	H40 e H41
Sto Antônio da Patrulha/RS - 08/10/03	-29 52' 58" -50 32' 06"	5	int159 - 163	int162	integrifolia		AH19	SG03	C27	H41
Sto Antônio da Patrulha/RS - 08/10/03	-29 50' 05" -50 32' 27"	3	int164 - 166	int165			AH19	SG03	C27	H08 e H42
Sto Antônio da Patrulha/RS - 08/10/03	-29 46' 09" -50 34' 24"	7	int167 - 173	int170		costeiro	AH19	SG03	C27	H04 e H08
Imbituba/SC - 11/11/02	-28 12' 07" -48 41' 26"	6	int104 - 109	int106			AH15	SG11	C22	H32
Sombrio/SC - 11/11/02	-29 11' 06" -49 36' 49"	10	int110 - 119	int116			AH15	SG11	C22	H33 e H34
Sombrio/SC - 11/11/02	-29 12' 39" -49 38' 09"	6	int120 - 125	int122			AH15	SG11	C22	-
Lagoa Jacaré, Torres/RS - 11/11/02	-29 20' 43" -49 47' 17"	2	int126 - 127	int126 int127	depauperata		AH16	SG11	C23	H35
Camping Itapeva, Torres/RS - 11/11/02	-29 22' 53" -49 45' 57"	2	int128 - 129	int129			AH17	SG11	C24	H36 e H37

Tabela 1 – (continuação)

Pedra de Furnas, Torres/RS - 11/11/02	-29 21' 32" -49 44' 09"	2	int130 - 131	int130					AH15	SG11	C22	H19 e H35
Vila Assunção II, Pelotas/RS - 24/01/04	-31 45' 58" -52 15' 13"	1	int177	int177					AH17	SG12	C28	H33 e H37
Praia de Bacupari, Mostardas/RS - 31/01/04	-30 32' 36" -50 24' 46"	1	int180	int180					AH15	SG13	C29	H39 e H43
Solidão, Mostardas/RS - 31/01/04	-30 42' 09" -50 33' 41"	1	int184	int184					AH20	SG13	C30	H21
Praia de Cacimbas, Mostardas/RS - 31/01/04	-30 45' 53" -50 37' 35"	1	int185	int185					AH17	SG13	C31	H22 e H44
Povos, Mostardas/RS - 31/01/04	-30 50' 36" -50 40' 54"	1	int186	int186					AH21	SG13	C32	H10 e H45
Balneário São Simão, Mostardas/RS - 31/01/04	-30 56' 05" -50 44' 34"	1	int187	int187					AH07	SG13	C33	H46 e H47
Balneário São Simão, Mostardas/RS - 31/01/04	-30 56' 52" -50 43' 33"	1	int188	int188					AH15	SG13	C29	H48 e H49
Mostardas/RS - 31/01/04	-31 01' 08" -50 50' 28"	1	int190	int190					AH22	SG13	C34	H50 e H51
Balneário Mariluz/RS - 01/02/04	-29 53' 18" -50 05' 47"	1	int191	int191					AH19	SG03	C27	H49 e H52
Balneário Atlântida/RS - 01/02/04	-29 49' 42" -50 03' 59"	1	int192	int192					AH23	SG03	C35	H34 e H35
Capão da Canoas/RS - 01/02/04	-29 40' 41" -49 58' 30"	1	int194	int194					AH23	SG03	C35	H04 e H53
Arroio Teixeira/RS - 01/02/04	-29 38' 29" -49 57' 50"	1	int195	int195					AH17	SG11	C24	H16 e H35
Novo Curumim/RS - 01/02/04	-29 36' 45" -49 56' 04"	1	int196	int196					AH23	SG03	C35	H54 e H55
Quintão/RS - 17/02/03	-30 21' 32" -50 17' 35"	1	lito31	lito31					AH15	SG13	C29	H64 e H65
Caçapava do Sul/RS - 08/10/02	-30 29' 00" -53 22' 04"	3	int008 - 009	int008					AH02	SG02	C02	H01 e H05
Pedra Segredo, Caçapava do Sul/RS - 08/10/02	-30 33' 13" -53 31' 13"	1	int010	int010					AH03	SG03	C03	H06 e H07
Caçapava do Sul/RS - 09/10/02	-30 38' 27" -53 33' 14"	4	int011 - 014	int013					AH01	SG04	C04	H03 e H08
Pantano Grande/SR - 11/10/02	-30 22' 09" -52 25' 47"	6	int024 - 029	int024					-	-	-	H09 e H10
Pedra Segredo, Caçapava do Sul/RS - 08/10/02	-30 33' 13" -53 31' 07"	1	int100	int100					AH04	SG05	C08	H14 e H15
Floridia, Canguçu/RS - 24/02/03	-31 24' 00" -52 40' 59"	1	int103	int103					AH14	SG10	C21	H04 e H30
Estrada entre Caçapava e Minas do Camaquã/RS; coletado em 05/10/03	-30 42' 13" -53 33' 24"	1	int144	int144					AH02	SG03	C25	H31
Parque Nacional do Turvo/RS - novembro/03	-27 15' 00" -53 52' 00"	2	int197 - 198	int197					AH24	SG14	C36	H01 e H39
				int198								H56 e H57
				int199								H56
				int200								H04 e H66
				int201					AH25	SG15	C37	H67
				int202								H67
				int203					AH26	SG03	C38	-
				lito01								-
				lito14								H58
				lito26					AH07	SG11	C39	H58 e H60
				lito29								H61 e H63
				lito11								H32 e H58
				lito25								H58 e H59
				lito30								H61 e H62
				n = 69					26	15	39	H32
												67
Praia de Mocambique, Rio Vermelho, Florianópolis/SC - 06/12/02	-30 04' 13" -51 08' 31"	30	lito01 - 30	lito01								
Total 50 populações amostradas												

Regiões marcadoras para seqüenciamento

As condições para a amplificação dos espaçadores intergênicos *psbA-trnH* e *trnS-trnG*, do DNA plastidial (cpDNA) e da região dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS), bem como o tamanho esperado dos fragmentos amplificados, estão descritos nos Quadros 1, 2 e 3 respectivamente. Essas três regiões foram escolhidas por apresentarem maior polimorfismo entre os 10 marcadores testados previamente.

Quadro 1 - Condições de amplificação e seqüência dos *primers* usados nas reações de PCR e seqüenciamento do marcador *psbA – trnH* (Sang e cols., 1997).

<u>Reação</u>	
Tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl)	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	2 mM
<i>Primer 1 (psbA F)</i>	0,2 µM
<i>Primer 2 (trnH R)</i>	0,2 µM
Taq polimerase (Invitrogen)	1 U
DNA	50 ng
<u>Condições de amplificação</u>	
	94°C por 3 min para desnaturação inicial
30 ciclos	{ 94°C por 45 s para desnaturação
	{ 58°C por 1 min para anelamento
	{ 72°C por 1 min e 30 s para alongamento
	{ 72°C por 10 min para extensão final
<u>Seqüências dos <i>primers</i> para PCR e seqüenciamento</u>	
<i>Primer 1 (psbA F)</i>	5' GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C 3'
<i>Primer 2 (trnH R)</i>	5' CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC 3'
Tamanho esperado do fragmento: entre 372 e 404 pb de acordo com Sang e cols. (1997) para espécies do gênero <i>Paeonia</i> .	

Quadro 2 - Condições de amplificação e seqüência dos *primers* usados nas reações de PCR e seqüenciamento do marcador *trnS-trnG* (Hamilton, 1999).

<u>Reação</u>	
Tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl)	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	2 mM
<i>Primer 1 (trnS GCU)</i>	0,4 µM
<i>Primer 2 (trnG UCC)</i>	0,4 µM
Taq polimerase (Invitrogen)	1 U
DNA	50 ng
<u>Condições de amplificação</u>	
	96°C por 5 min para desnaturação inicial
40 ciclos	96°C por 45 s para desnaturação
	52°C por 1 min para anelamento
	72°C por 1 min para alongamento
	72°C por 5 min para extensão final
<u>Seqüências dos <i>primers</i> para PCR e seqüenciamento</u>	
<i>Primer 1 (trnS GCU)</i>	5' GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC 3'
<i>Primer 2 (trnG UCC)</i>	5' GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C 3'
Tamanho esperado: 844 pb para seqüências de <i>Nicotiana tabacum</i> . (GenBank Acc. Z00044 e S54304)	

Quadro 3 - Condições de amplificação e seqüência dos *primers* usados nas reações de PCR e seqüenciamento da região ITS (White e cols., 1990).

<u>Reação</u>	
Tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl)	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	1,5 mM
<i>Primer 75</i>	0,2 µM
<i>Primer 92</i>	0,2 µM
Taq polimerase (Invitrogen)	1 U
DNA	50 ng
<u>Condições de amplificação</u>	
	94°C por 3 min para desnaturação inicial
40 ciclos	94°C por 45 s para desnaturação
	58°C por 1 min para anelamento
	72°C por 1 min e 30 s para alongamento
	72°C por 10 min para extensão final
<u>Seqüências dos <i>primers</i> para PCR</u>	
<i>Primer 75</i>	5' TAT GCT TAA ACT CAG CGG G 3'
<i>Primer 92</i>	5' AAG GTT TCC GTA GGT GAA C 3'
<u>Seqüências dos <i>primers</i> para seqüenciamento</u>	
<i>Primer 74</i>	5' GCT ACG TTC TTC ATC GAT 3'
<i>Primer ITS3</i>	5' ATC GAT GAA GAA CGT ACG 3'
Tamanho esperado: 629 pb para seqüência de <i>Petunia axillaris</i> (GenBank Acc. AJ300213).	

Os produtos de amplificação por PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz UV para a checagem da amplificação.

Quantificação dos fragmentos de DNA amplificados

Os produtos de PCR foram quantificados com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen), utilizando 4 µl da amostra (produto de PCR) + 1 µl de corante

bromofenol blue com glicerol (BFB) e 4 µl do marcador + 1 µl de BFB. As amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz UV. Para a quantificação do DNA dos produtos de PCR, as bandas das amostras foram comparadas às do marcador de peso molecular, estimando-se sua concentração.

Purificação enzimática dos produtos de PCR

Os produtos de PCR que apresentaram concentrações inferiores a 10 ng/µl foram purificados utilizando o *kit* enzimático ExoSAP-IT (Amersham Biosciences), composto por uma unidade de exonuclease I e uma unidade de fosfatase alcalina, que degradam *primers* e dNTPs não incorporados durante as reações de PCR. A reação enzimática ocorreu a 37 °C, enquanto que a inativação a 80 °C.

Precipitação com PEG

Os produtos de PCR que apresentaram concentrações superiores a 10 ng/µl foram purificados por precipitação dos *primers* e dNTPs não incorporados utilizando Polietilenoglicol (PEG) segundo o protocolo de Dunn and Blattner (1986):

- Adição de igual volume de PEG 20% (p/v) ao produto de PCR e homogeneização;
- Incubação a 37 °C por 30 min;
- Centrifugação a 14000 rpm por 20 min;
- Descarte cuidadoso do sobrenadante;
- Adição de 125 µl de EtOH 80% gelado. Incubação por 1 min e centrifugação por 2 min;
- Descarte do sobrenadante;
- Repetição dos 6º e 7º passos com etanol absoluto;
- Evaporação do EtOH residual a 70 °C por 10 min;
- Ressuspensão do produto de PCR em 15 µl de H₂O ultra-pura estéril e incubação à temperatura ambiente por 12 horas.

Seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA amplificado por PCR foi realizado em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), seguindo os protocolos que acompanham

o aparelho e o *DYEnamicTMET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente. As condições da reação de seqüenciamento são detalhadas no Quadro 4 . As reações foram preparadas diretamente nas placas destinadas ao seqüenciador.

Quadro 4 - Condições das reações de seqüenciamento.

<u>Reação</u>		<u>Condições de amplificação</u>
DYEnamic TM ET terminator sequencing premix	4 µl	35 ciclos { 95 °C por 20 seg 50 °C por 15 seg 60 °C por 1 min
Produto de PCR purificado	40 ng	
Primer	5 µM	
Água estéril	Para completar 10 µl	

Purificação com etanol/acetato de amônio

Antes do seqüenciamento propriamente dito, as amostras foram purificadas para retirar reagentes não incorporados, de acordo com o protocolo abaixo. As amostras foram purificadas diretamente nas placas destinadas ao seqüenciador.

- Adição de 1 µl de acetato de amônio 7,5 M pH e 30 µl de etanol absoluto (temperatura ambiente) em cada produto de reação de seqüenciamento;
- Fechamento da placa com adesivo apropriado e mistura por 30 inversões;
- Centrifugação da placa por 45 min, 1780 RCF e 20°C;
- Descarte do sobrenadante, por inversão brusca da placa;
- *Spin* a 500 RCF com a placa invertida e apoiada em papel toalha;
- Adição de 100 µl de etanol 70% (temperatura ambiente) ao *pellet*;
- *Spin* a 1780 RCF e descarte do sobrenadante, por inversão brusca da placa;
- *Spin* a 750 RCF com a placa invertida e apoiada em papel toalha;
- Adição de 10 µl de *Loading Solution* e fechamento da placa com adesivo apropriado;
- Ressuspensão em *vortex* por 5 min;
- *Spin* a 1780 RCF e encaminhamento ao seqüenciador.

Análise das seqüências de DNA

As seqüências foram alinhadas com o programa Clustal X 1.81 (Thompson e cols., 2001) e corrigidas manualmente com auxílio do programa GeneDoc (Nicholas e Nicholas, 1997). As informações sobre o número de sítios variáveis, sítios conservados e composição nucleotídica

foram obtidas pelo programa MEGA2 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Kumar e cols., 2001). Uma vez que o sequenciamento do marcador ITS revelou sítios heterozigotos, para esse marcador foram estimados haplótipos⁵ pelo programa PHASE 1.0 (Stephens e cols., 2001).

Inferindo as relações evolutivas na amostra

A grande quantidade de sítios heterozigotos, proporcional aos sítios de substituição, e a baixa frequência de amostras homozigotas para o marcador ITS (como pode ser observado nos Resultados), fizeram com que somente os haplótipos referentes aos marcadores de cpDNA fossem utilizados na inferência das relações evolutivas entre os indivíduos amostrados.

As seqüências dos marcadores plastidiais foram agrupadas no programa MEGA2 usando a metodologia *neighbor-joining* (NJ; Saitou e Nei, 1987) baseada na distância-p (Kimura, 1980), com a opção *complete deletion*. Além disso, no programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford, 2002), foi realizada uma análise de máxima parsimônia (MP) por busca heurística com *tree bisection-reconnection* (TBR) *branch swapping*, com o uso da opção MULPARS e 1000 replicações de adição randômica, considerando sítios de inserção/deleção (indels) como quinto estado. Os sítios indels com extensão maior que um par de bases foram considerados como eventos únicos (indels simplificados), sendo substituída a totalidade da extensão do indel por apenas um evento de inserção/deleção, correspondente à primeira base (Schneider, 2003).

Para ambas as análises, NJ e MP, as árvores filogenéticas resultantes foram submetidas à análise de consistência de agrupamentos filéticos por re-amostragem (*bootstraps*), usando 1000 replicações (Hedges, 1992).

Métodos disponíveis para análises filogenéticas interespecíficas, como NJ e MP, assumem uma série de pressupostos que podem ser violados nas análises em nível populacional. O principal pressuposto assumido por estes métodos, por exemplo, é a ausência de haplótipos ancestrais, os quais frequentemente estão presentes em estudos intraespecíficos. Os métodos de *network* são mais adequados que os métodos filogenéticos para inferir relações evolutivas intraespecíficas, uma vez que incorporam predições da teoria da genética de populações (Hudson, 1990). A análise de *network* para os haplótipos amostrados foi realizada no programa *NETWORK* 3.1.1.1 (disponível no site <http://www.fluxus-engineering.com>) através do método de *median joining* (Bandelt e cols., 1999), usando os sítios indels simplificados. Além disso, os sítios que apresentaram mais que duas

⁵ O termo haplótipo é usado para designar um alelo ou um conjunto de alelos que estão presentes em um genoma haplóide ou estão ligados em um único cromossomo nuclear. Devido ao grande número de sítios heterozigotos revelados na região ITS e o desconhecimento da fase haplóide destas seqüências, o termo mais indicado a ser usado para designá-las seria 'tipos de seqüências'. No entanto, a exemplo de diversos trabalhos encontrados na literatura, será mantido o termo haplótipo também nesta situação.

mutações recorrentes foram eliminados da análise, pois sítios com múltiplas mutações representam homoplasias⁶, que podem confundir os padrões de divergência intraespecíficas (Lloyd, 2003).

Divisão da amostra para análises populacionais

Quatro conjuntos de dados foram criados para as análises populacionais realizadas:

- 1°) A amostra como um todo: n=69 indivíduos;
- 2°) Toda amostra, exceto os indivíduos pertencentes ao grupo interior: n=62;
- 3°) Comparação dos cinco grupos morfológicos (Tabela 1 e Figura 8):
 - grupo *integrifolia* (n=26);
 - grupo *riograndensis* (n=8);
 - grupo *depauperata* (n=21);
 - grupo *littoralis* (n=7);
 - grupo interior (n=7),
- 4°) De acordo com os três clados formados na análise de *network* (Tabela 1 e Figura 10):
 - grupo interior (n=7);
 - grupo continental (n=22);
 - grupo costeiro (n=33).

Três indivíduos não fizeram parte desta última análise, devido à posição que ocuparam no *network*.

Para as análises de diferenciação interpopulacional nos 3° e 4° casos, os diferentes grupos foram definidos artificialmente como populações. Da mesma forma que nas análises de *network*, para as análises intrapopulacionais, interpopulacionais e de correlação entre distância genética e distância geográfica, os sítios indels foram simplificados e considerados como quinto estado.

Análises intrapopulacionais

A diversidade nucleotídica e haplotípica (Nei, 1987), bem como os testes de neutralidade *D* de Tajima (Tajima, 1989) e *F_s* de Fu (Fu, 1997) foram calculados pelo pacote Arlequin (Schneider e cols., 2000). Esses testes de neutralidade, originalmente descritos para detectar seleção em nível molecular, atualmente são muito usados para inferir eventos como expansão populacional e efeito de gargalo de garrafa (*bootleneck*), que também podem causar desvios no modelo neutro de

⁶ Homoplasia: caráter compartilhado por dois *taxa*, que não foi herdado de um ancestral comum (Wiley e cols, 1991).

população estacionária no qual eles são baseados (Tajima, 1996). Nestes casos, a significância dos coeficientes de neutralidade é testada pela geração de amostras aleatórias sob a hipótese de neutralidade seletiva e equilíbrio populacional, usando um algoritmo de simulação de coalescência (Hudson, 1990). Nas análises realizadas no presente estudo foram usadas 1000 permutações.

A *mismatch distribution*, que é a distribuição gráfica do número de diferenças observadas entre todos os haplótipos tomados par a par, foi calculada pelo pacote Arlequin, juntamente com os parâmetros de expansão demográfica tau (τ), teta inicial (θ_0) e teta final (θ_1). Essa distribuição é usualmente multimodal em amostras obtidas de populações em equilíbrio demográfico, sendo geralmente unimodal em populações que passaram por uma expansão demográfica recente (Rogers e Harpending, 1992). Os parâmetros de expansão populacional são definidos por Li (1977) como:

$$\theta_0 = 2\mu N_0, \theta_1 = 2\mu N_1 \text{ e } \tau = 2\mu t$$

Onde: μ = taxa de mutação para o haplótipo;

N_0 e N_1 = tamanho populacional antes e depois da expansão, respectivamente;

t = tempo transcorrido entre N_0 e N_1 .

Assim, a comparação dos valores dos parâmetros θ fornece uma estimativa da diferença entre os tamanhos populacionais antes e depois da expansão, enquanto τ indica o número de gerações transcorridas no processo de expansão. Para verificar se os parâmetros e a distribuição calculados estão adequados ao modelo de expansão populacional súbita (hipótese nula), os dados foram testados por um método de *bootstrap* paramétrico (Schneider e Excoffier, 1999), com 1000 replicações.

Devido às dúvidas em relação aos haplótipos gerados para as seqüências de ITS, nas análises do nDNA foi utilizada a opção *unknown gametic phase* no pacote Arlequin. Por causa dessa limitação, os índices de neutralidade, a distribuição *mismatch*, os parâmetros de expansão geográfica, o teste de Mantel e a autocorrelação geográfica não puderam ser calculados para esta região.

Correlação entre distância genética e distância geográfica

Os padrões de distribuição espacial da diversidade de DNA na amostra foram investigados por dois métodos.

O teste de Mantel, que avalia a correlação entre duas matrizes de distância, no caso, distância genética e distância geográfica entre os indivíduos amostrados, foi realizado no pacote Arlequin. A matriz de distância genética foi obtida também pelo pacote Arlequin, utilizando o método de médias das diferenças. A matriz de distância geográfica foi construída manualmente e com o auxílio do programa *GPS Trackmaker* ver. 12.3 (<http://www.gpstm.com/>), que fornece a

distância geográfica entre dois pontos assinalados no plano cartográfico. O teste de significância da correlação entre as duas matrizes foi feito através de um processo de permutação aleatória de linhas e colunas (Smouse e cols., 1986). Mil *rounds* de permutação foram usados para gerar a distribuição nula do coeficiente de correlação.

O segundo método calcula um índice de autocorrelação espacial (AIDA) para diferentes classes de distância geográfica. O conjunto resultante dos coeficientes de autocorrelação, visualizado em forma de um gráfico chamado *correlograma*, indica a aleatoriedade da distribuição espacial dos haplótipos. Ou seja, determina se existe correlação entre a distância genética e a distância geográfica (Bertorelle e Barbujani, 1995). As análises de autocorrelação foram realizadas no programa AIDA_IND (http://web.unife.it/progetti/genetica/Giorgio/giorgio_soft.html) As classes de distância geográfica foram definidas pela opção '*equal size*' de modo a igualar o número de comparações entre classes de distância. A significância dos índices de autocorrelação é calculada por um procedimento de permutação aleatória, similar ao utilizado para o teste de Mantel, onde os haplótipos são re-distribuídos aleatoriamente entre as diferentes localidades de coleta. A cada *round* de permutação, os valores de correlação são recalculados e, ao final do processo, é obtida uma distribuição empírica sob a hipótese nula de distribuição aleatória de haplótipos. Os intervalos de confiança para os índices de autocorrelação foram calculados por 1000 replicações dentro de cada uma das classes geográficas.

Análises interpopulacionais

As comparações de distância genética interpopulacionais e AMOVA (Análise de variância molecular), descritas a seguir, foram realizadas no pacote Arlequin.

A metodologia de AMOVA avalia a estrutura genética da amostra através de uma análise de variância que usa tanto informações do conteúdo alélico dos haplótipos quanto suas frequências populacionais. A significância dos resultados é testada através de um procedimento não-paramétrico onde os diferentes haplótipos são permutados aleatoriamente entre as populações. Depois de cada *round* de permutação, todas as estatísticas são recalculadas para obter sua distribuição nula (Excoffier e cols., 1992). A matriz de distância genética entre os haplótipos foi calculada pelo método de diferenças médias e foram usadas 1000 permutações nesta análise.

Como medida de diferenciação interpopulacional, o índice F_{ST} foi calculado para as populações definidas anteriormente, em comparações par a par. Segundo Reynolds e cols. (1983) e Slatkin (1995), o índice F_{ST} pode ser usado como medida de distância genética se for aplicada uma ligeira transformação de forma a linearizar essa distância em relação ao tempo de divergência entre as populações. Além da utilização deste procedimento no cálculo deste índice no presente estudo,

foram combinados os dados de frequência haplotípica com os dados de distância genética entre os haplótipos como sugerido por Hudson e cols. (1992). A matriz de distância genética foi calculada pelo método de média das diferenças. Para o teste estatístico de significância, a distribuição nula dos valores do F_{ST} , sob a hipótese de ausência de diferenciação entre populações, foi obtida permutando aleatoriamente os haplótipos entre as populações (1000 permutações). O valor P do teste refere-se à proporção de permutações que levou a um valor de F_{ST} maior ou igual ao observado.

Resultados

Os resultados obtidos para os dois genomas (DNA nuclear e cloroplasmático) serão apresentados separadamente. Os resultados provenientes da análise dos marcadores plastidiais serão considerados de forma combinada. As seqüências de cada um dos haplótipos das três regiões estudadas (discriminados na Tabela 1) foram submetidas ao GenBank e estão aguardando atribuição do código do acesso.

Características das seqüências

- DNA nuclear - Região ITS

O comprimento total da região seqüenciada, compreendendo ITS1, ITS2 e o gene 5,8S (ver Figura 7), para os 63 indivíduos analisados, foi de 582 pares de base (pb). Dos 39 sítios variáveis existentes, 29 (74,3%) corresponderam a sítios heterozigotos, dois sítios indels simples e seis sítios de substituição. Um número expressivo de sítios heterozigotos presentes na região ITS também pode ser encontrado tanto em outras espécies de *Petunia* (Kulcheski e cols., no prelo) quanto em seqüências de diversas espécies de solanáceas (GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Devido à presença de sítios heterozigotos, foi necessário utilizar o programa PHASE para inferir os haplótipos para a região ITS. Para o total de 63 indivíduos analisados foram estimados 67 haplótipos. As características gerais de seqüência desses haplótipos são apresentadas na Tabela 2. Dos 63 indivíduos seqüenciados para a região ITS, apenas 11 apresentaram um único haplótipo, ou seja, foram homozigotos para a seqüência total desse marcador (Tabela 1).

- DNA plastidial – Espaçadores intergênicos

As características gerais dos 65 haplótipos obtidos pelo seqüenciamento dos espaçadores intergênicos do cpDNA, analisados individualmente e de forma combinada, são apresentadas na Tabela 2. Conforme mencionado nos Materiais e Métodos, os marcadores plastidiais apresentaram um grande número de sítios correspondentes a indels: 45 em *psbA-trnH* e 17 em *trnS-trnG*. No entanto, a maioria dos sítios indels esteve agrupada *in tandem*. Provavelmente cada um destes conjuntos de sítios indels representam eventos evolutivos únicos, onde a seqüência de DNA foi inserida ou deletada de uma só vez. Assim, os sítios de indels múltiplos foram submetidos ao procedimento de simplificação descrito nos Materiais e Métodos. Na Tabela 2 são apresentados apenas os eventos de indels simplificados. Como os sítios indels em ITS foram todos simples, não

houve necessidade de aplicar tal procedimento de simplificação usado para os marcadores plastidiais.

Tabela 2: Características dos haplótipos obtidos para os marcadores plastidiais analisados, individualmente e de forma combinada, e para a região ITS.

	n	Nº sítios analisados	Nº sítios conservados	% sítios variáveis	Nº substituições	Transições/transversões	Nº de eventos indels	Composição nucleotídica (%)			
								T	C	A	G
<i>psbA-trnH</i>	65	438	414	5,48	12	4/8	12*	41,7	12,3	30,9	15,1
<i>trnG-trnS</i>	65	652	635	6,8	13	8/5	4*	35,7	17	33,7	13,6
cpDNA combinados	65	1090	1049	3,76	25	12/13	16*	38,1	15,1	32,6	14,2
ITS	67	582	543	6,7	37	27/10	2	21,6	30	20,1	28,3

* nº de eventos indels resultantes do procedimento de simplificação descrito nos Materiais e Métodos.

Comparando os haplótipos inferidos para ITS com o resultado da análise combinada dos marcadores plastidiais, observa-se que a proporção de sítios variáveis da primeira região é quase o dobro da proporção obtida para as regiões analisadas do cpDNA. Além disso, as regiões plastidiais apresentaram um número muito maior de eventos indels (16 eventos contra apenas dois na região ITS). Isto sugere que a região ITS em *Petunia* possa estar evoluído principalmente por eventos de substituição, enquanto que os espaçadores intergênicos plastidiais analisados estariam mais sujeitos a eventos de inserção/deleção.

Relações evolutivas na amostra

A ocorrência de baixo número de indivíduos homozigotos para o marcador ITS, aliado ao grande número de sítios heterozigotos, atrapalha enormemente a estimativa dos haplótipos e consequentemente diminui a confiança nos 67 haplótipos estimados pelo programa PHASE. Por isso, apenas os haplótipos obtidos pelo seqüenciamento das regiões espaçadoras plastidiais foram utilizados para estudar as relações evolutivas entre os indivíduos amostrados.

- DNA plastidial – Espaçadores intergênicos combinados

O dendrograma resultante da análise de NJ para os marcadores combinados de cpDNA é apresentado na Figura 9A. Para facilitar a visualização, os indivíduos foram representados na figura pelo código correspondente ao seu haplótipo (Tabela 1). De modo geral, a análise de MP repetiu o

mesmo padrão de agrupamentos visto no NJ e a árvore consenso resultante apresentou baixo suporte estatístico para os clados (dados não apresentados).

Como pode ser visto na Figura 9A, três clados principais podem ser destacados no agrupamento das amostras analisadas:

- O clado 1, mais basal, é constituído exclusivamente por haplótipos dos indivíduos pertencentes ao grupo morfológico interior;
- O clado 2 reúne haplótipos presentes somente em indivíduos pertencentes aos grupos morfológicos *integrifolia* e *riograndensis*;
- O clado 3 (grupo irmão do 2) agrupa haplótipos apresentados por indivíduos pertencentes aos grupos morfológicos *integrifolia*, *depauperata* e *littoralis*.

Além disso, dentro do clado 3, é possível observar uma subdivisão que reflete a distribuição geográfica dos indivíduos (Figura 9B). Neste clado, o subgrupo mais basal corresponde às amostras coletadas na região de Porto Alegre, Santo Antônio da Patrulha e litoral norte do Rio Grande do Sul; os outros dois correspondem, respectivamente, às amostras coletadas no litoral sul do RS e às amostras coletadas no litoral de SC até Florianópolis.

O *network* que demonstra o relacionamento entre os haplótipos plastidiais é representado na Figura 10. Nele pode ser observado o mesmo padrão de divisão em três clados principais obtidos nas análises filogenéticas descritas acima. O primeiro clado, denominado de interior, é o mais divergente. Corresponde aos haplótipos do grupo morfológico interior, separados do restante da amostra assim como observado na análise de NJ (1º clado do NJ);

- O segundo clado, chamado de costeiro, que inclui os haplótipos correspondentes ao clado 3 da análise por NJ;
- O terceiro clado, designado continental, corresponde ao clado 2 observado por NJ e inclui o restante das amostras, com exceção dos três haplótipos centrais que se ligam ao vetor médio (C03, C16 e C21 da Tabela M1, assinalados com * na árvore de NJ, inseridos no clado 2). O vetor médio presente no diagrama do *network* corresponde a um haplótipo intermediário não amostrado.

Os clados continental e costeiro evidenciados na análise do *network* representam duas linhagens genéticas distintas, ao que parece separadas pelo lago Guaíba. Como os indivíduos pertencentes a cada clado ocupam áreas geográficas separadas, os termos “clado continental” e “clado costeiro” serão utilizados algumas vezes para designar também as áreas geográficas ocupadas por essas linhagens.

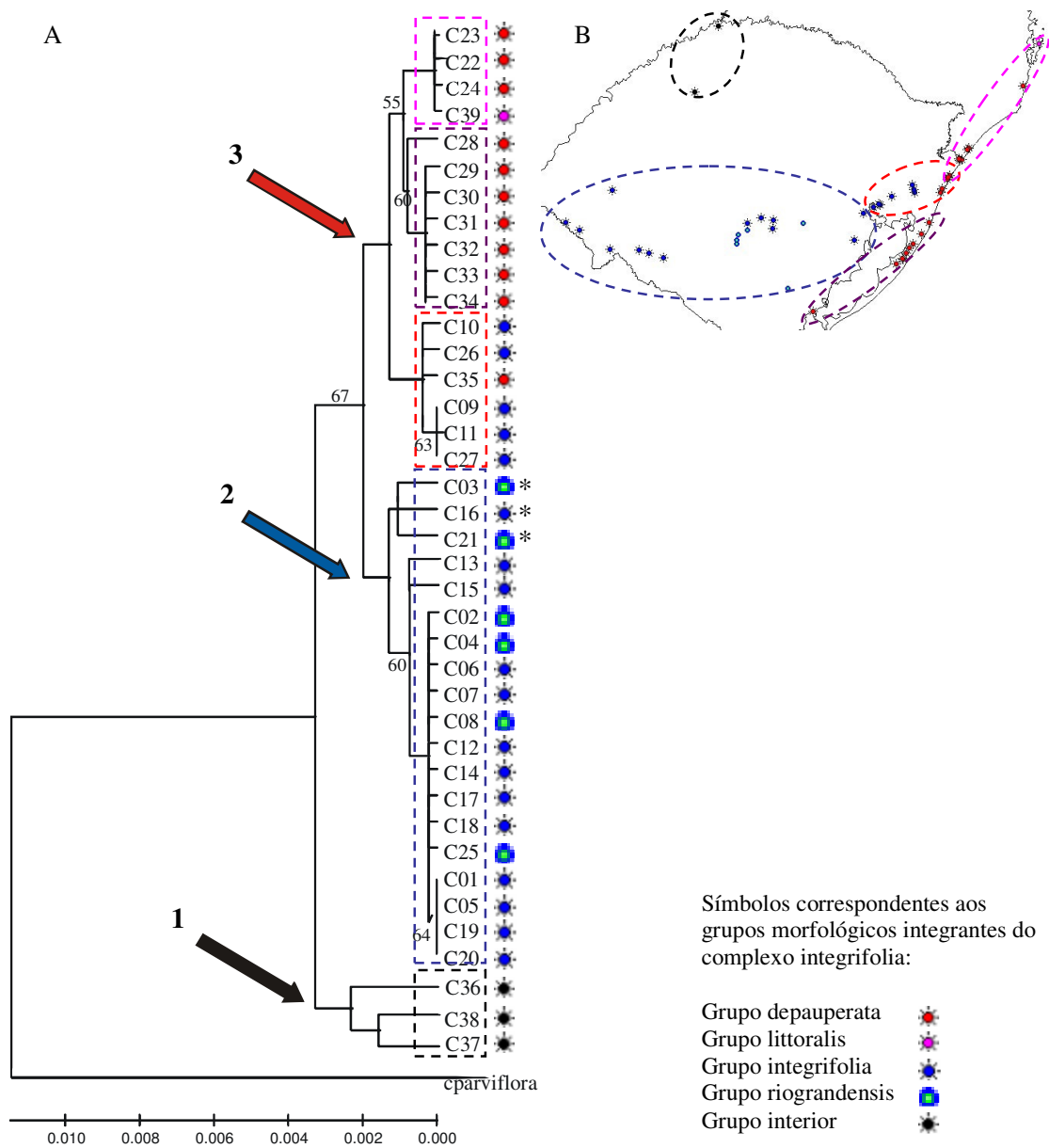


Figura 9: (A) Dendrograma (árvore linearizada) resultante da análise de NJ com os dados combinados dos marcadores plastidiais. Os indivíduos estão representados pelo número do haplótipo correspondente (Tabela 1). Os valores de *bootstrap* maiores que 50 são indicados acima dos ramos. Os grupos morfológicos que caracterizam os indivíduos estão assinalados por símbolos coloridos; as setas indicam os clados correspondentes aos três grupos formados no *network* (Figura 10): 1 = clado interior, 2 = clado continental; 3 = clado costeiro. Os haplótipos centrais do *network* são indicados com *. As linhas coloridas tracejadas circundando os haplótipos correspondem aos subgrupos geográficos assinalados no mapa de distribuição das amostras (B).

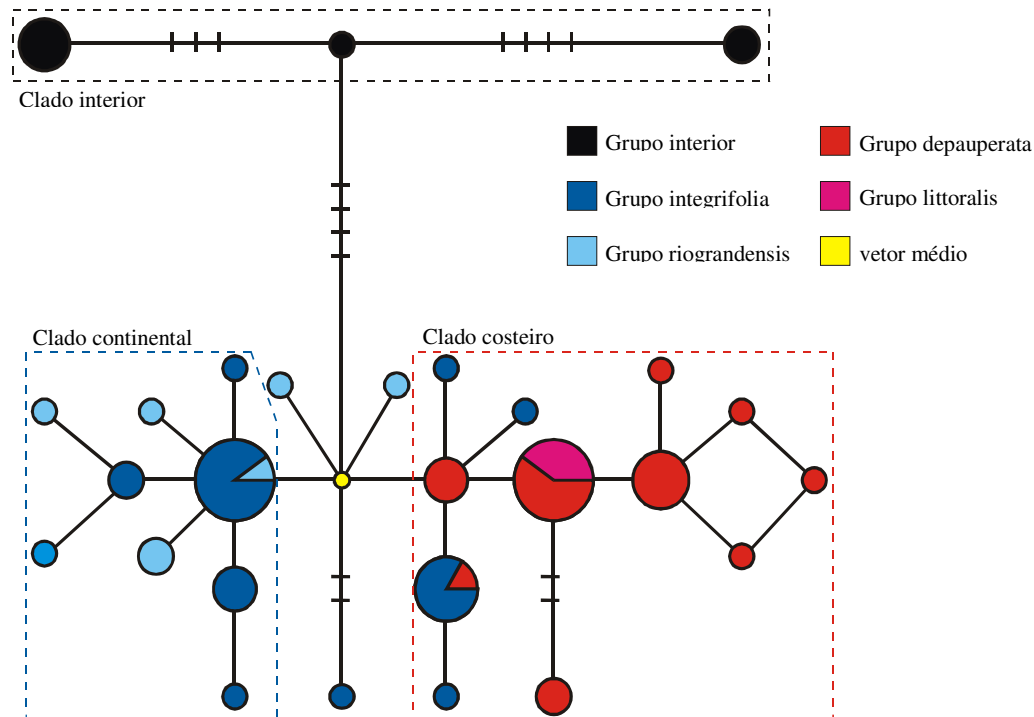


Figura 10: *Network* obtido com os dados combinados dos marcadores plastidiais. O tamanho dos círculos que representam os haplótipos é proporcional à frequência; os eventos adicionais de mutação são indicados por linhas transversais. As cores representam os diferentes grupos morfológicos descritos na literatura. As linhas pontilhadas separam os três clados principais que correspondem às setas coloridas na árvore de NJ (detalhes no texto).

Ao contrário dos clados interior, continental e costeiro, os grupos morfológicos integrifolia, riograndensis, depauperata e littoralis, não parecem bons indicativos de linhagens evolutivas, uma vez que os haplótipos correspondentes a esses grupos encontram-se misturados ao longo do *network* e na árvore NJ (Figuras 9 e 10). Em outras palavras, os caracteres morfológicos que são usados para separar os grupos morfológicos no complexo integrifolia, dentro de uma visão taxonômica – com exceção do grupo interior – não estão associados aos caracteres moleculares que separam os indivíduos em linhagens evolutivas distintas.

Análises intrapopulacionais

- DNA nuclear - Região ITS

Conforme descrito nos Materiais e Métodos, alguns parâmetros de diversidade populacional puderam ser calculados com os resultados obtidos para o marcador nuclear ITS,

usando a fase gamética desconhecida. Cada uma das divisões apresentadas na Tabela 3 foi considerada como sendo uma população.

De modo geral, os valores numéricos para cada um dos índices calculados foram praticamente os mesmos, independente da divisão por grupos morfológicos ou clados evidenciadas no *network* e na árvore obtida por NJ. A variação da região ITS, portanto, está igualmente distribuída entre as diferentes categorias morfológicas e linhagens evolutivas analisadas. Os altos valores para diversidade haplotípica, que variaram de 0,9333 até 1, indicaram que quase todas as seqüências individuais encontradas dentro de cada uma das divisões são diferentes. Os baixos índices de diversidade nucleotídica, no entanto, revelaram que as seqüências diferenciaram-se muito pouco umas das outras, em média cerca de nove nucleotídeos.

Tabela 3: Índices de diversidade nucleotídica e haplotípica intrapopulacionais inferidos na análise da região ITS. Valores de desvio padrão entre parênteses.

	Grupos morfológicos				Clados do <i>network</i>			n total s/ interior ⁴	n total
	integrifolia	riograndensis	depauperata	littoralis	interior	continental	costeiro		
n amostral	24	8	19	7	5	20	34	58	63
k ¹	8,5648 (4,0284)	9,1166 (4,4287)	8,8378 (4,1668)	4,9999 (2,5857)	7,6000 (3,8756)	8,4043 (3,9727)	9,1777 (4,2729)	8,9309 (4,1449)	9,0188 (4,1804)
π^2	0,0164 (0,0085)	0,0171 (0,0093)	0,0161 (0,0084)	0,0100 (0,0058)	0,0134 (0,0077)	0,0161 (0,0084)	0,0168 (0,0086)	0,0166 (0,0085)	0,0165 (0,0085)
Hd ³	0,9982 (0,0047)	1,000 (0,0221)	0,9986 (0,0065)	0,9560 (0,0447)	0,9333 (0,0620)	0,9987 (0,0060)	0,9974 (0,0032)	0,9990 (0,0014)	0,9987 (0,0012)

¹número médio de diferenças nucleotídicas entre todos os pares de haplótipos na amostra; ²diversidade nucleotídica;

³diversidade haplotípica; ⁴amostra total excluindo indivíduos pertencentes ao grupo morfológico interior.

- DNA plastidial – Espaçadores intergênicos combinados

Os valores de diversidade nucleotídica, diversidade haplotípica e os coeficientes de neutralidade são apresentados na Tabela 4. Refletindo o maior nível de conservação dos marcadores cpDNA, os índices de diversidade nucleotídica foram cerca de três vezes menores que os índices obtidos para a região ITS. O grupo *littoralis* foi monomórfico para esses marcadores, sendo observado um único haplótipo entre os quatro indivíduos analisados. O índice *D* de Tajima não desviou da neutralidade em nenhuma das divisões analisadas ($P > 0,05$). No entanto, o índice *F_s* de Fu, mais indicado para evidenciar desvios do modelo nulo de população estacionária com alelos infinitos, foi significativo para todas as divisões ($P < 0,01$, na maioria dos casos). Assim, parece que a evolução dos marcadores de cpDNA indica a ocorrência de um evento de diminuição

populacional (efeito gargalo de garrafa) seguido de rápida expansão. Esse evento parece ter atingido igualmente todos os grupos analisados, de forma geral.

Tabela 4: Índices de diversidade nucleotídica, diversidade haplotípica e índices de neutralidade intrapopulacionais inferidos na análise combinada das regiões espaçadoras plastidiais. Valores de desvio padrão entre parênteses.

	Grupos morfológicos				Clados do <i>network</i>		n total s/ interior ⁵	n total	
	integrifolia	riograndensis	depauperata	littoralis	interior	continental			costeiro
n amostral	26	7	21	4	7	22	33	58	65
h ¹	18	6	12	1	3	17	17	36	39
k ²	4,2154 (2,1619)	4,000 (2,6024)	2,5905 (1,6127)	0	4,4762 (2,8712)	2,7879 (1,7089)	2,9659 (1,7700)	4,5959 (2,5394)	5,8394 (2,8278)
π ³	0,0039 (0,0023)	0,0038 (0,0025)	0,0024 (0,0015)	0	0,0041 (0,0026)	0,0026 (0,0016)	0,0028 (0,0016)	0,0043 (0,0024)	0,0054 (0,0029)
Hd ⁴	0,969 (0,018)	0,952 (0,096)	0,966 (0,031)	0	0,667 (0,160)	0,978 (0,019)	0,949 (0,017)	0,979 (0,007)	0,980 (0,006)
D Tajima	-0,5470 ^{NS}	-0,9982 ^{NS}	-0,5348 ^{NS}	-	1,161 ^{NS}	-0,773 ^{NS}	-0,459 ^{NS}	-1,098 ^{NS}	-1,068 ^{NS}
F _s Fu	-25,808**	-3,5811*	-26,6137**	-	-3,286**	-26,487**	-26,32**	-25,69**	-25,31**

¹número de haplótipos obtidos para os marcadores combinados de cpDNA; ²número médio de diferenças nucleotídicas entre todos os pares de haplótipos na amostra; ³diversidade nucleotídica; ⁴diversidade haplotípica; ⁵amostra total excluindo indivíduos pertencentes ao grupo morfológico interior; ^{NS}Não significante; *significante ($P<0,05$); **significante ($P<0,01$).

As análises da distribuição *mismatch* confirmam a hipótese de expansão populacional evidenciada pelos índices F_s de Fu. O gráfico obtido para toda a amostra (Figura 11A) apresentou um padrão bimodal. Quando os indivíduos do grupo morfológico interior foram removidos da análise, a distribuição tornou-se unimodal (Figura 11B) refletindo claramente um padrão de diminuição populacional, seguido de expansão rápida. Esse resultado indica que o grupo morfológico interior é geneticamente muito divergente do resto dos indivíduos que compõem o complexo integrifolia.

As análises de *mismatch* para os haplótipos dos clados continental e costeiro, em separado, mostraram o mesmo padrão de expansão populacional em ambos (Figura 11C e D). A média de diferenças nucleotídicas entre os indivíduos, aliada ao valor semelhante de τ , é indicativa de que os dois eventos de expansão populacional ocorreram independentemente e mais ou menos na mesma época (Tabela 5). A grande diferença entre os parâmetros θ_0 e θ_1 e a ausência de sobreposição nos intervalos de confiança indicam expansão populacional grande, tanto para o clado continental quanto para o clado costeiro.

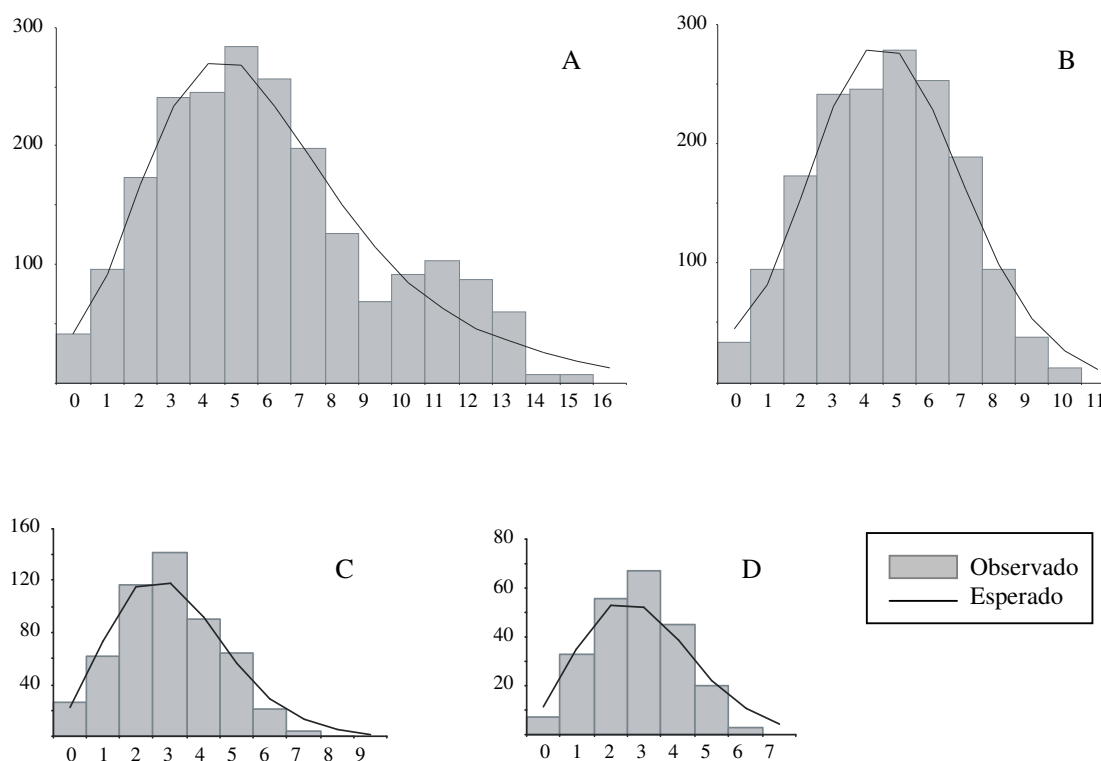


Figura 11: Distribuição *mismatch* analisando os marcadores combinados de cpDNA de toda a amostra (A); toda a amostra excluindo o grupo interior (B); e os grupos costeiro (C) e continental (D) formados na análise de *network* (ver Figura 10). O eixo horizontal (x) representa o número de sítios diferentes entre pares de indivíduos comparados. As barras representam o número de pares amostrados que apresentaram x diferenças. A linha sólida indica a distribuição *mismatch* esperada de acordo com o modelo de expansão populacional súbita.

Tabela 5: Parâmetros de expansão demográfica associados à análise da distribuição *mismatch* obtidas com os dados dos marcadores de cloroplasto combinados; intervalos de confiança (para $\alpha=0,05$) estão entre parênteses.

	Toda amostra	Toda amostra menos grupo interior	Clados do <i>network</i>	
			continental	costeiro
nº médio de diferenças (k)	5,839 (3,629 - 10,085)	4,596 (3,287 - 6,269)	2,788 (2,000 - 4,074)	2,966 (2,299 - 3,991)
nº de sítios polimórficos	41 (59 - 93)	32 (46 - 78)	13 (21- 42)	14 (36 - 61)
tau (τ)	3,392 (1,563 - 10,410)	4,996 (2,562 - 6,648)	2,980 (1,273 - 4,138)	3,129 (1,487 - 3,950)
teta inicial (θ_0)	2,916 (0,000 - 9,310)	0,036 (0,000 - 2,192)	0,000 (0,000 - 2,062)	0,000 (0,000 - 1,653)
teta final (θ_1)	89,609 (18,49 - 6940,8)	47,192 (16,78 - 6862,2)	6732,5 (37,62 - 9632,5)	4682,5 (39,9- 10206,25)

Correlação entre distância genética e distância geográfica

O teste de Mantel indicou correlação entre as distâncias genética e geográfica apenas na análise da amostra como um todo, excluindo ou não os indivíduos do grupo interior (Tabela 6). Os valores dos coeficientes de regressão e determinação, no entanto, foram baixos, indicando que a distância genética está correlacionada com a distância geográfica, mas ao mesmo tempo a primeira não é completamente determinada pela última. Isto ficou mais claramente demonstrado pela falta de correlação quando a amostra foi dividida nos clados costeiro e continental. Nesse caso, a variabilidade genética dentro de cada um deles parece não estar organizada de acordo com o modelo de isolamento por distância. Levando em conta essas observações, pode-se sugerir que o coeficiente de correlação de toda a amostra é significativo devido, principalmente, à comparação entre os indivíduos pertencentes aos dois grupos homogêneos correspondentes aos clados continental e costeiro, que são diferentes um do outro e estão separados geograficamente.

Tabela 6: Coeficientes do teste de Mantel que avalia a correlação entre a distância genética (Y) e distância geográfica (X) dos indivíduos amostrados.

	Toda amostra	Toda amostra menos grupo interior	Clados do <i>network</i>	
			continental	costeiro
Coeficiente de regressão (bY)	0.000686	0.000038	-0.000015	0.000007
Coeficiente de correlação (rY)	0.408867**	0.355440**	-0.152781 ^{NS}	0.062036 ^{NS}
Determinação de Y por X	0.167172	0.126338	0.023342	0.003848

^{NS} Não significante; **significante ($P < 0,01$).

A análise de autocorrelação espacial complementou as análises de Mantel e permitiu uma visão mais detalhada da distância genética entre os indivíduos dentro de diferentes categorias de distância geográfica. Os correlogramas (Figuras 12 e 13), de modo geral, indicaram uma tendência clinal para os dados, onde os indivíduos mais próximos geograficamente são também mais semelhantes geneticamente. A ocorrência de uma clina perfeita estaria associada ao modelo de isolamento por distância. No entanto, os resultados aqui apresentados mostraram uma ‘quebra’ no padrão clinal, provavelmente devido à existência de estruturação populacional. Ou seja, indivíduos geograficamente próximos podem pertencer a populações diferentes e podem, portanto, ser geneticamente distantes.

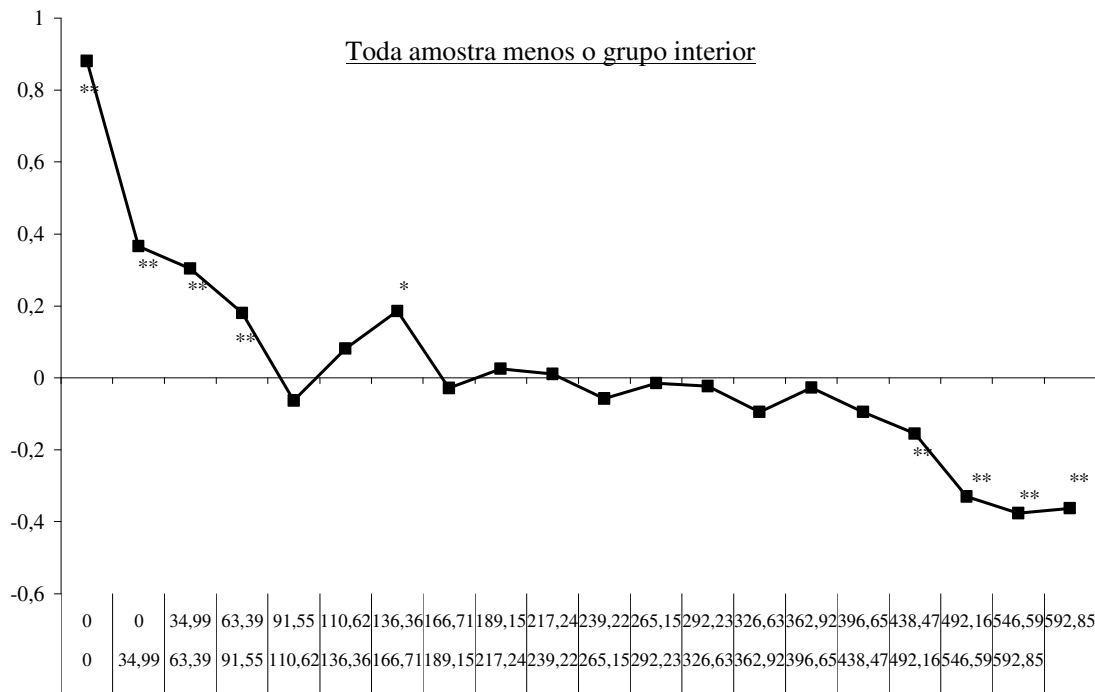
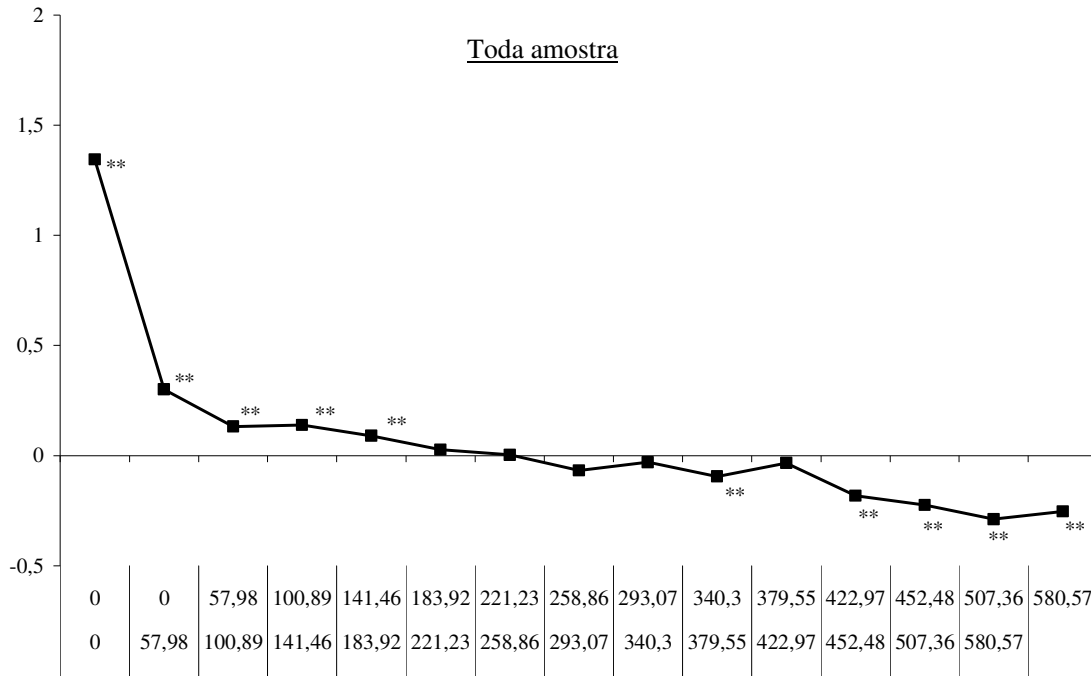


Figura 12: Correlogramas dos dados combinados de cpDNA de toda amostra analisada (acima) e toda amostra excluindo o grupo interior (abaixo). O eixo vertical (Y) corresponde ao valor do coeficiente de autocorrelação calculado para cada uma das 20 classes de distância geográfica; eixo horizontal (X) medidas em quilômetros. A primeira classe (0 km) inclui comparações entre haplótipos pertencentes a uma mesma população. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

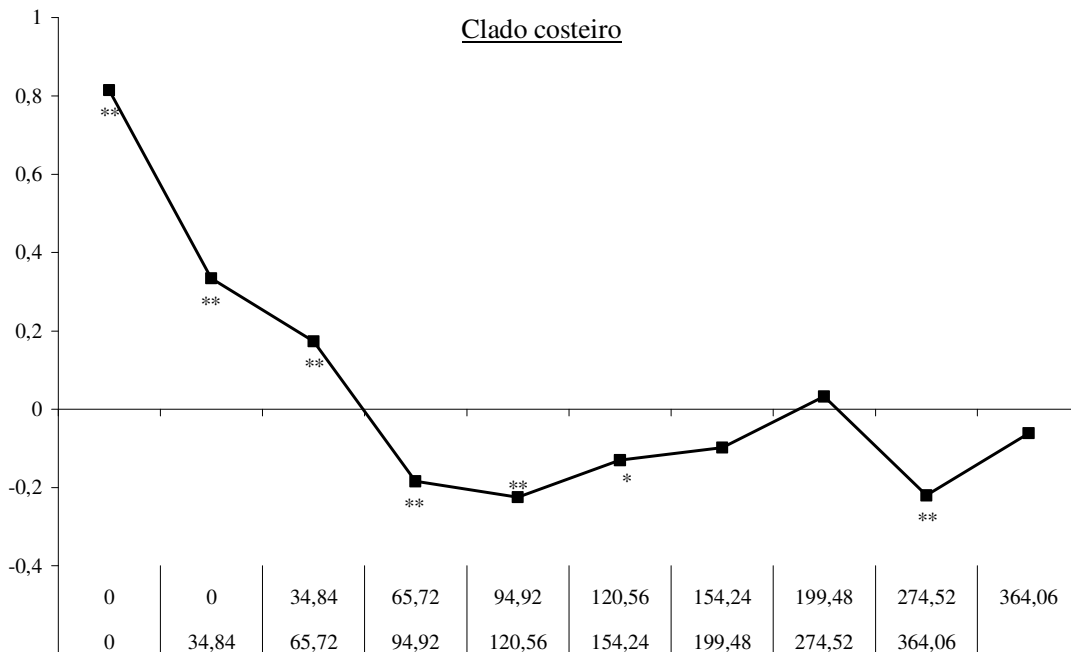
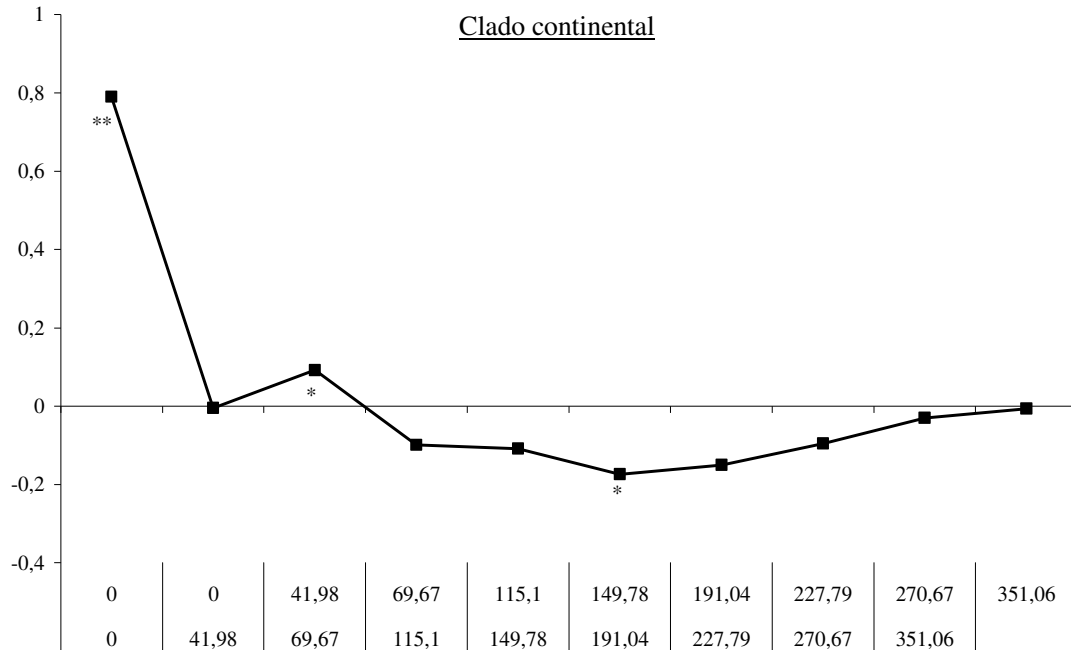


Figura 13: Correlogramas dos dados combinados de cpDNA dos grupos continental (acima) e costeiro (abaixo) formados na análise de *network*. O eixo vertical (Y) corresponde ao valor do coeficiente de autocorrelação calculado para cada uma das 10 classes de distância geográfica eixo horizontal (X) medidas em quilômetros. A primeira classe (0 km) inclui comparações entre haplótipos pertencentes a uma mesma população. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Assim como aconteceu com os resultados obtidos pelo teste de Mantel, o padrão clinal ficou mais evidente quando toda a amostra foi considerada (Figura 12) que quando a amostra foi dividida nos clados continental e costeiro (Figura 13). Para o clado costeiro, existe um padrão clinal até aproximadamente 120 km, enquanto que no clado continental não existe evidência de clina. A variabilidade genética observada, portanto, só pode ser atribuída a um modelo de isolamento por distância entre os indivíduos mais próximos no clado costeiro.

Análises interpopulacionais

Os cinco diferentes grupos morfológicos descritos para o complexo *integrifolia* e as três linhagens evolutivas evidenciadas na *network* foram considerados como populações com o objetivo de investigar os padrões de distribuição da variabilidade genética obtida com o estudo da região ITS e dos marcadores combinados de cpDNA.

- DNA nuclear - Região ITS

Os resultados da AMOVA para a região ITS diferenciaram fracamente os grupos morfológicos e os clados do *network* entre si, uma vez que a variação genética intrapopulacional (87,87% e 92,31% para cada comparação, respectivamente) foi maior que a interpopulacional (Tabela 7). As comparações par a par de F_{ST} de nível estatístico significativo (Tabela 8 e Figura 14) indicaram que o grupo morfológico *littoralis* é o mais diferenciado dos demais, apresentando mais ou menos o mesmo nível de isolamento em relação a cada um dos outros grupos (*integrifolia*, *depauperata* e *riograndensis*). O grupo interior, por sua vez, distanciou-se mais do grupo *littoralis* que do grupo *integrifolia*. Por fim, os grupos *integrifolia* e *depauperata* pareceram ser os menos divergentes entre si.

A diferenciação dos clados do *network* para a região ITS (Tabela 8 e Figura 14), de modo geral, foi menor que a dos grupos morfológicos. Os clados continental e costeiro pareceram ser menos divergentes entre si que quando comparados com o clado interior pelos índices F_{ST} .

Tabela 7: Resultados da AMOVA para a região ITS.

	Grupos morfológicos (5 populações ¹)			Clados do <i>network</i> (3 populações ²)		
	Entre populações	Dentro das populações	Total	Entre populações	Dentro das populações	Total
graus de liberdade	4	121	125	2	115	117
soma do desvio quadrado	68,321	495,377	563.697	31,879	497,773	529.652
quadrado médio esperado	0,5654**	4,0940	4.65942	0,3606**	4,3285	4.68902
% de variação	12,13	87,87	100	7,69	92,31	100
índice F_{ST}		0,1213			0,0767	

¹ grupos integrifolia, riograndensis, depauperata, littoralis e interior; ² grupos continental, costeiro e interior; **P (valor aleatório \geq valor observado) < 0,01

Tabela 8: Comparações interpopulacionais baseadas em dados da região ITS. As populações comparadas correspondem aos cinco grupos morfológicos do complexo integrifolia e aos três grupos evidenciados nas análises de *network*. A proporção de diferenças nucleotídicas médias entre as populações é mostrada acima da diagonal; abaixo da diagonal estão os índices F_{ST} .

	Grupos morfológicos					Clados do <i>network</i>			
	integrifolia	depauperata	riograndensis	interior	littoralis	continental	costeiro	interior	
integrifolia	-	9.19846	8.94792	9.72917	8.86607	cont	-	9.12132	9.64000
depauperata	0.06207*	-	9.38816	9.25263	9.13158	cost	0.04820*	-	9.64412
riograndensis	0.00233	0.04276	-	9.13750	9.36607	inter	0.16284*	0.13008*	-
interior	0.16031*	0.11185	0.06918	-	10.4571				
littoralis	0.22499*	0.24344*	0.25623*	0.43610*	-				

* valores de $P < 0,05$.

- DNA plastidial – Espaçadores intergênicos combinados

Os índices gerais de estruturação populacional F_{ST} calculado pela AMOVA nos grupos morfológicos e clados do *network* (Tabela 9) foram cerca de quatro e seis vezes maiores, respectivamente, que os índices F_{ST} calculados com os dados de ITS (Tabela 7). Isso indica que, apesar dos marcadores de cpDNA serem mais conservados que a região ITS (comparando as Tabelas 3 e 4), a variação encontrada neste último está distribuída de forma mais uniforme entre os grupos morfológicos e os clados do *network*. Esse padrão pode ser explicado pelo maior tamanho populacional efetivo (N_e) do genoma nuclear em comparação ao genoma cloroplasmático, conforme detalhado na Discussão.

Tabela 9: Resultados da AMOVA para os marcadores combinados de cpDNA.

	Grupos morfológicos (5 populações ¹)			Clados do <i>network</i> (3 populações ²)		
	Entre populações	Dentro das populações	Total	Entre populações	Dentro das populações	Total
graus de liberdade	4	60	64	2	59	61
soma do desvio quadrado	82.826	104.038	186.864	87.603	90.156	177.759
quadrado médio esperado	1.64759**	1.73396	3.38155	2.35910	1.52807	3.88717
% de variação	48.72	51.28	100	60.69	39.31	100
índice F_{ST}		0,4872			0,6069	

¹ grupos integrifolia, riograndensis, depauperata, littoralis e interior; ² grupos continental, costeiro e interior; ***P* (valor aleatório \geq valor observado) < 0,01

Comparando a variação molecular entre populações, vê-se que esta foi maior (60,69% na Tabela 9) entre os clados do *network* que quando a mesma comparação foi feita usando seqüências de ITS (7,69%, na Tabela 7). Quando divididos em grupos morfológicos, os maiores valores de F_{ST} (Tabela 10) foram observados nas comparações envolvendo o grupo interior. Os grupos integrifolia e riograndensis pareceram não apresentar diferenciação genética significativa. O menor valor de F_{ST} foi obtido para o grupo depauperata quando comparado com o grupo littoralis. Esses resultados são compatíveis com a árvore de NJ (Figura 9) e com o *network* (Figura 10): o grupo morfológico interior, o mais diferenciado de todos, é o único que corresponde a um grupo monofilético, enquanto os quatro outros grupos morfológicos estão dispersos dentro dos outros dois clados.

Tabela 10: Comparações interpopulacionais baseadas em dados combinados dos marcadores de cpDNA. As populações comparadas correspondem aos cinco grupos morfológicos do complexo integrifolia e aos três grupos evidenciados nas análises de *network*. A proporção de diferenças nucleotídicas médias entre as populações é mostrada acima da diagonal; abaixo da diagonal, estão os índices F_{ST} .

	Grupos morfológicos					Clados do <i>network</i>			
	integrifolia	depauperata	riograndensis	interior	littoralis	continental	costeiro	interior	
integrifolia	-	5.59348	4.41766	10.89011	5.46154	cont	-	6.15713	10.84416
depauperata	0.38457*	-	5.61224	11.17007	2.28571	cost	0.53105*	-	11.15584
riograndensis	0.06637	0.44988*	-	10.42857	5.57143	inter	0.69762*	0.70126*	-
interior	0.60589*	0.71869*	0.59344*	-	11.42857				
littoralis	0.43450*	0.24143*	0.55520*	0.74940*	-				

* valores de $P < 0,05$.

Na comparação dos clados do *network*, para os dados da região ITS, o clado interior é o mais divergente, enquanto os clados costeiro e continental são muito próximos (Figura 14). Contudo, os três clados apresentaram-se igualmente divergentes entre si quando os resultados de cpDNA foram considerados

Os resultados das análises de NJ, *network*, distribuição *mismatch* e F_{ST} , de modo geral, indicaram que o chamado complexo integrifolia é composto por três linhagens evolutivas: clados continental, costeiro e grupo interior, sendo esse último o mais distinto dos três segundo os dados moleculares.

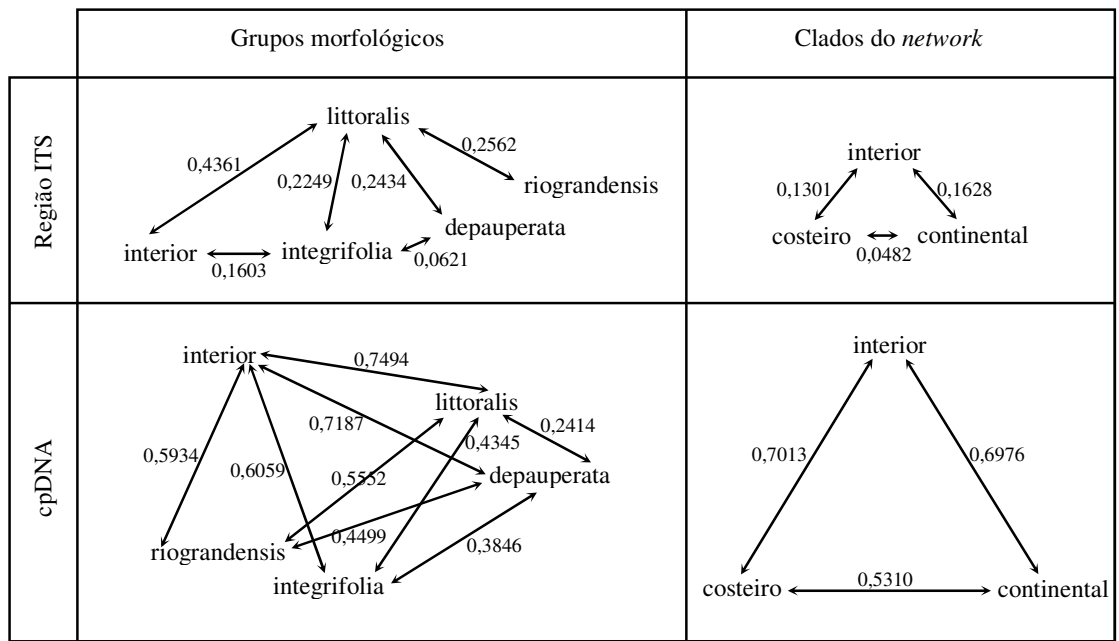


Figura 14: Esquema indicando os valores dos índices F_{ST} calculados para os dados da região ITS e dos marcadores combinados de cpDNA em comparações interpopulacionais. Apenas os valores significativos são apresentados. O comprimento das setas é proporcional aos valores de F_{ST} obtidos.

Discussão

Sítios heterozigotos em ITS – falha da evolução em concerto?

A evolução em concerto é a homogeneização de seqüências entre diferentes cópias da mesma família gênica ou seqüências dispersas ao longo do genoma através de permuta desigual ou processo de conversão gênica (Elder e Turner, 1995). Embora existam de centenas até milhares de repetições da região ITS do DNA nuclear ribossomal (nrDNA) no genoma das plantas, essas seqüências passam, teoricamente, por um forte processo de evolução em concerto que elimina a variação existente entre as várias cópias. Essa homogeneização é de grande valia para os estudos de reconstrução filogenética (Baldwin e cols., 1995), sendo as análises da região ITS muito usadas em estudos de sistemática de plantas (Álvarez e Wendel, 2003). No entanto, polimorfismos de base em sítio único (chamados nesse trabalho de sítios heterozigotos) já foram relatados ocorrendo em diversas espécies (Bohs e Olmstead, 2001; Okuyama e cols, 2005) acusando a persistência de diferentes alelos não homogeneizados para a região ITS. No gênero *Mitella* de Saxifragaceae (Okuyama e cols, 2005), a manutenção de alelos de ITS não homogeneizados em genomas individuais é atribuída à lentidão dos mecanismos de evolução em concerto, uma vez que eventos recorrentes de hibridação natural acabam misturando alelos entre diferentes espécies do gênero. O gênero *Paeonia* (Paeoniaceae) também exhibe *taxa* híbridos com seqüências parentais de ITS não homogeneizadas (Sang e cols. 1995). A manutenção das seqüências parentais em *taxa* híbridos, segundo Sang e cols. (1995), poderia ser atribuída à reprodução vegetativa. No entanto, a ausência de recombinação sexual não parece estar associada à deficiência dos mecanismos de evolução em concerto, uma vez que resultados similares foram obtidos para outras espécies híbridas que não apresentavam reprodução vegetativa (Kim e Jansen, 1994; O'Kane e cols., 1996). Outra sugestão para explicar o atraso ou ausência de mecanismos de evolução em concerto seria a presença de *loci* do nrDNA em cromossomos não homólogos (Campbell e cols., 1997).

O gênero *Nicotiana* (Solanaceae), assim como *Mitella* e *Paeonia*, exhibe um grande nível de hibridação natural seguido de especiação (Goodspeed, 1954). No entanto, ao contrário desses dois gêneros, as espécies do gênero *Nicotiana* analisadas por Chase e cols. (2003) apresentaram genomas individuais portando apenas um alelo para a região ITS. A homogeneização dos alelos em espécies híbridas de *Nicotiana* é atribuída a um mecanismo rápido de conversão gênica (Lim e cols., 2000), visto também em *Armeria* (Aguilar e cols., 1999), mas que parece não atuar nas espécies analisadas nos outros estudos descritos acima.

Como se pode perceber pelos trabalhos encontrados na literatura, ainda não foram reconhecidos todos ou quais são os caracteres biológicos que determinam os padrões evolutivos da

região ITS nas diferentes espécies de plantas estudadas. No caso dos integrantes do complexo *Petunia integrifolia* e outras espécies de *Petunia* já analisadas por nosso grupo de pesquisa, a presença de sítios heterozigotos na região ITS de genomas individuais indica uma deficiência nos mecanismos de evolução em concerto no gênero como um todo. No entanto, devido à raridade de hibridação natural entre espécies de *Petunia* (Stehmann, 1999), a falta de informações sobre mecanismos de reprodução vegetativa e posição cromossômica dos *loci* de nrDNA no gênero, fica difícil determinar as prováveis causas da falta de homogeneização da região ITS sem a condução de outros experimentos.

Evolução diferente dos marcadores – inserção/deleção e substituição

As baixas taxas de mutação associadas ao genoma plastidial (cpDNA) geralmente dificultam a obtenção de polimorfismos necessários aos estudos populacionais e filogeográficos (Provan e cols., 2001). Por outro lado, as regiões intergênicas de cpDNA podem apresentar polimorfismos adequados aos estudos em nível intraespecífico, mas esses resultados variam muito de acordo com a espécie e a região estudada (Schaal e cols., 1998). Neste trabalho, os espaçadores intergênicos *psbA-trnH* e *trnS-trnG* mostraram-se mais conservados que a região ITS do nrDNA nos *taxa* integrantes do complexo *integrifolia*. A maior parte da variação encontrada nos marcadores de cpDNA foi composta por eventos de inserção/deleção, o que confirma as observações iniciais de Palmer (1985) e Aldrich e cols. (1988).

Apesar de apresentarem um certo nível de restrição funcional (Mai e Coleman, 1997), as regiões ITS1 e ITS2 do nrDNA podem evoluir relativamente rápido (Small e cols., 1998; Cronn e cols., 2002), tanto por eventos de substituição nucleotídica quanto por acúmulo de sítios indels. Em muitos estudos, o excesso de variação dificulta o alinhamento de seqüências em análises filogenéticas envolvendo níveis taxonômicos mais profundos (Kim e Jansen, 1996; Ashworth, 2000), o que não é o caso do complexo *integrifolia*, uma vez que este reúne *taxa* de divergência mais recente (ver Conclusões). Os resultados aqui apresentados indicaram que a região ITS evoluiu principalmente por eventos de substituição nucleotídica nas amostras analisadas. Por causa dessas características, aliadas ao bom nível de variabilidade observado, a região ITS mostrou ser um marcador adequado para estudos populacionais e filogeográficos no complexo *integrifolia*. No entanto, o grande número de sítios heterozigotos presentes nas seqüências impossibilitou a inferência adequada dos haplótipos, sem a condução de experimentos adicionais, necessários à determinação da fase haplóide correta. Assim, a comparação entre os padrões de variação obtidos com cpDNA e nrDNA só puderam ser realizadas nas análises que não exigiam a determinação da fase gamética.

Relações evolutivas entre os indivíduos da amostra evidenciam três grupos de haplótipos que representam linhagens evolutivas distintas

A análise combinada dos marcadores de cpDNA revelou os mesmos padrões de relacionamento entre os integrantes do complexo integrifolia nos três métodos utilizados (NJ, MP e *network*). O baixo valor de suporte estatístico (valor de *bootstrap*) para os ramos das árvores de NJ e MP (dados não mostrados) não indicaram inconsistência dos resultados, uma vez que esses métodos não são os mais adequados para análises intraespecíficas (ver Introdução). O baixo suporte dos ramos foi consequência direta da alta similaridade genética entre as unidades comparadas (indivíduos da mesma espécie ou de *taxa* muito próximos). A congruência entre os métodos filogenéticos clássicos (NJ e MP) e a análise *network* (mais indicada para esse tipo de dados), por si só, já garante a consistência evolutiva das três linhagens genéticas denominadas nos Resultados de clados interior, costeiro e continental.

Os clados continental e costeiro, conforme mostrado na Figura 9, ocupam áreas geográficas distintas (são alopátricos). Esse mesmo padrão de linhagens genéticas alopátricas foi observado em outros estudos onde foi possível associar cada linhagem genética com caracteres morfológicos e/ou ecológicos distintos (Byrne e cols., 2003; Rambau e cols., 2003). Em alguns casos, inclusive, foi possível explicar a estruturação geográfica de linhagens genéticas por eventos históricos de isolamento, como nos diversos estudos de recolonização pós-glacial de espécies vegetais europeias (Hewitt, 1999; Petit e cols., 2002a). Um estudo envolvendo oito espécies de carvalhos na Europa (Dumolin-Lapegue, 1997) mostrou o mesmo padrão de linhagens genéticas distintas compostas por haplótipos exclusivos exibido pelo complexo integrifolia. Naquele caso, cada uma das linhagens em carvalho foi associada a um dos diversos refúgios de vegetação encontrados nas penínsulas da Ibéria, Itália e Balcãs, a partir dos quais essas espécies se expandiram no final da última glaciação, recolonizando o continente europeu durante os últimos 13 mil anos. No caso do complexo integrifolia, devido aos eventos de retração e expansão marítima que moldaram a planície costeira do RS, como consequência de alterações climáticas holocênicas (Villwock e Tomazelli, 1995), é possível que o mesmo sistema de isolamento em refúgios tenha separado, em algum momento no passado, os haplótipos ancestrais originais das duas linhagens genéticas distintas a que chamamos aqui de continental e costeira.

Avise (2000) reuniu diversos estudos filogeográficos baseados em linhagens genéticas do mtDNA de espécies animais. Pela revisão dos resultados encontrados nesses trabalhos, o autor dividiu os padrões filogeográficos observados em sete categorias distintas. Os clados costeiro e continental, segundo a chave classificatória de Avise (2000), se enquadram na categoria III

referente a linhagens genéticas alopátricas e pouco divergentes (árvore de haplótipos “rasa”⁷). Nessa categoria filogenética, o fluxo gênico entre as populações geograficamente separadas é baixo o suficiente em relação ao tamanho populacional para que a ação da deriva promova a diferenciação genética entre elas. Um exemplo desse padrão também pode ser encontrado em *Peromyscus polionotus*, uma espécie de roedor confinada às planícies costeiras do sudeste dos Estados Unidos. Os diferentes haplótipos de mtDNA encontrados para esses indivíduos são altamente relacionados e geograficamente estruturados, correspondendo a populações isoladas (Avice e Lansman, 1983), assim como no caso do complexo integrifolia. A exemplo do exposto por Avice (2000), esse tipo de padrão filogeográfico indicaria origem e divergência recente dos clados costeiro e continental a partir de um conjunto gênico ancestral. Uma vez que esses dois grupos não compartilham haplótipos, e se a origem de ambos foi recente, podemos inferir que eles se encontram isolados, sem fluxo gênico de cpDNA, desde o momento em que se estabeleceram até os dias atuais (Schaal e cols, 1998).

A história do clado interior, por outro lado, parece ser diferenciada dentro do complexo integrifolia. Este clado é o mais divergente dos três e é o único que pode ser relacionado a uma entidade taxonômica distinta, correspondendo ao grupo morfológico interior, descrito como *Petunia interior* por Ando e Hashimoto (1996). Análises adicionais realizadas por F. R. Kulcheski (comunicação pessoal) mostraram que os clados continental e costeiro se diferenciam mais geneticamente do clado interior que de outras espécies do gênero que não fazem parte do complexo integrifolia. Tal separação deve ser, portanto, mais antiga que a divergência entre os clados continental e costeiro. Esse tempo de separação, provavelmente, permitiu o acúmulo de mutações necessárias para a distinção morfológica do clado interior.

Análises populacionais

Padrões de diversidade intrapopulacional

De acordo com os padrões descritos por Rogers e Harpending (1992) e Rogers (1997), a análise de distribuição *mismatch* no complexo integrifolia evidencia a ocorrência de uma diminuição populacional drástica (baixos valores de θ_0) seguida de um crescimento populacional exponencial (altos valores de θ_1). O desvio de um modelo de tamanho populacional estacionário é evidenciado também pelos valores significativos do índice de neutralidade F_s de Fu. O padrão bimodal observado no complexo integrifolia como um todo também é encontrado por Printzen e cols. (2003) na análise do líquen *Cavernularia hultenii*. Conforme sugerido por Avice (2000),

⁷ No original (Avice, 2000), a categoria III é definida como: *shallow gene tree, lineages allopatric*.

padrões bimodais encontrados na distribuição *mismatch* são indicativos de populações que já estão separadas por um longo período de tempo dentro da espécie analisada. Tão logo os indivíduos correspondentes ao grupo morfológico interior foram removidos da análise, a distribuição tornou-se unimodal. Isso indica que o grupo morfológico interior representa uma linhagem evolutiva distinta do restante do complexo integrifolia. Como as análises filogeográficas (ver acima) e as análises de variação genética interpopulacional (ver adiante) mostraram uma grande diferenciação genética desse grupo em relação aos demais, é provável que sua separação do restante do complexo integrifolia tenha se dado anteriormente ao evento de expansão populacional que originou as linhagens costeira e continental.

Quando as linhagens continental e costeira, por sua vez, foram analisadas separadamente, verificamos que elas também apresentam um padrão de expansão populacional muito similar, tanto na época da expansão, evidenciado pelo valor τ , quanto pela intensidade do *bottleneck* e da expansão, evidenciado pelos valores similares de θ_0 e θ_1 . Como o índice θ_0 fornece uma estimativa do número de haplótipos ancestrais presente na população fundadora, e esse número variou em torno de 0, é provável que cada um dos clados tenha sido fundado por um haplótipo ancestral, como pode ser evidenciado pelo *network*.

Padrões de diversidade interpopulacional

Conforme o teste de AMOVA e as comparações par-a-par entre as populações, o nível de diferenciação genética interpopulacional no complexo integrifolia (F_{ST}) foi maior para os polimorfismos de cpDNA que para os de nrDNA. Os valores de F_{ST} para o marcador ITS (0,1213 para os cinco grupos morfológicos definidos como populações e 0,0767 para os clados do *network* definidos como populações) são convencionalmente interpretados como indicativos de alto fluxo gênico. Já os valores obtidos para os marcadores plastidiais (0,4872 para os cinco grupos morfológicos definidos como populações e 0,6069 para os clados do *network* definidos como populações), por outro lado, indicaram baixo fluxo gênico e alta estruturação populacional (Avice, 2000).

Conforme já evidenciado em estudos anteriores (Petit e cols., 1993 a,b; Zanetto e Kremer, 1995; Schaal e Olsen, 2000), tal contraste entre o nível de estruturação para marcadores uniparentais e biparentais vem sendo mostrado quase como regra. Em uma análise comparativa de 183 espécies de plantas, Petit e col. (2004) demonstram que o índice médio de subdivisão genética encontrado em genomas de herança materna ($\cong 0,637$) é quase 3,5 vezes maior que o índice relativo aos genomas de herança biparental ($\cong 0,184$) em angiospermas. Dois fatores principais contribuem

para o aumento da estrutura genética para marcadores de cpDNA (Ennos, 1994; McCauley, 1995; El Mousadik e Petit, 1996):

- 1) O tamanho efetivo populacional (N_e) para um marcador de origem nuclear é duas vezes maior que para um marcador de herança uniparental e haplóide em espécies vegetais monóicas. O efeito da deriva genética, portanto, é duas vezes mais pronunciado para genomas haplóides que para diplóides, o que leva à fixação mais acelerada de alelos distintos em populações diferentes;
- 2) O fluxo gênico efetivo é limitado às sementes para os genomas herdados maternalmente, como é o caso do cpDNA em espécies do gênero *Petunia*. Como a dispersão de sementes geralmente é mais restrita que a de pólen, o fluxo de novas mutações surgidas em populações isoladas é mais lento.

Além do maior N_e , Buckler e cols. (1997) mostram que fatores como recombinação intramolecular associada com mecanismos de evolução em conserto também podem apagar o sinal filogeográfico no relacionamento dos haplótipos da região ITS.

Independente da discussão sobre a influência do tipo de herança genômica no nível de estruturação populacional, os maiores índices de diferenciação genética, tanto para nrDNA quanto para cpDNA, foram observados entre os três grupos que correspondem aos três clados do *network*. Ibrahim e cols (1996) mostraram que a distribuição geográfica da diversidade genética de muitas espécies vegetais européias reflete padrões históricos de isolamento populacional. Dessa forma, as maiores distâncias genéticas dentro dessas espécies são sempre observadas entre as regiões identificadas como refúgios glaciais. Como as linhagens genéticas correspondentes aos clados continental e costeiro também estão associadas a regiões geográficas separadas, é provável que as duas áreas tenham abrigado dois centros de origem distintos para essas linhagens.

Relação entre geografia e genética

O teste de Mantel indica uma relação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética do cpDNA entre os indivíduos. Essa relação foi fraca, no entanto, indicando que muito pouco da variação genética observada pode ser considerada como consequência direta da distância geográfica.

A existência de um fraco padrão clinal na análise do complexo *integrifolia*, evidenciado pelas análises de autocorrelação espacial do cpDNA, poderia ser a responsável pela significância encontrada no teste de Mantel. Kitamoto e cols. (2004), em um estudo genético de populações de

da erva clonal *Primula sieboldii*, não encontraram uma relação significativa entre a variação genética e a distância geográfica no teste de Mantel. Como a espécie analisada por eles apresentava uma forte estruturação populacional, suspeitamos que o modelo de isolamento genético por distância tenha sido “quebrado” no complexo integrifolia, provavelmente, devido à existência de estruturação populacional no cpDNA.

Conforme mostrado na Figura 9, as três linhagens evolutivas independentes (ou clados) evidenciadas no cpDNA estão separadas geograficamente. O clado interior, inclusive, é o mais distante dos outros dois, tanto geográfica quanto geneticamente. Dessa forma, uma vez que o teste de Mantel no complexo integrifolia foi significativo, supomos que os indivíduos mais diferenciados são também os mais distantes, não por causa do modelo de isolamento por distância, mas porque eles pertencem a linhagens genéticas distintas que estão separadas geograficamente.

Conclusões e Perspectivas

Aspectos filogeográficos

Região ITS não detecta estrutura filogeográfica

A análise da região ITS revelou menor nível de estruturação genética (diferenciação genética interpopulacional indicada pelos valores de F_{ST}) que os marcadores de cpDNA. Esse padrão é repetido em diversos outros estudos. A diferenciação entre os clados costeiro e continental em ITS foi também muito menos acentuada que a diferenciação observada com os marcadores de cpDNA, o que pode ser explicado pela diferença de tamanho efetivo populacional (N_e) dos genomas nuclear e plastidial. Uma vez que o efeito da deriva genética aleatória é menor no genoma nuclear, provavelmente não houve tempo suficiente para que fossem eliminados haplótipos ancestrais de ITS desde a origem das linhagens costeiras e continentais. Os marcadores de cpDNA, por outro lado, indicaram monofilia recíproca para as linhagens continental e costeira satisfazendo os critérios propostos por Avise (2000).

Devido à ausência de estruturação genética, aliada à grande quantidade de sítios heterozigotos, concluímos que o marcador ITS não é adequado para estudos filogeográficos no complexo integrifolia e no restante do gênero *Petunia*, diferentemente do que já foi proposto por diversos grupos, inclusive o nosso em estudos com espécies de *Passiflora* L. (p/ex., Lorenz-Lemke e cols., 2005).

Análises moleculares evidenciam linhagens evolutivas distintas

O conjunto dos dados obtidos com as análises de *network*, distribuição *mismatch* e índices de neutralidade no complexo integrifolia permite supor que um evento passado de diminuição populacional seguido de rápida expansão levou à re-colonização recente de duas áreas distintas, mais ou menos ao mesmo tempo: uma delas correspondendo à planície costeira do RS e SC e a outra correspondente à porção continental do estado do RS. Cada uma dessas áreas desenvolveu, na época da expansão, duas linhagens genéticas distintas de cpDNA. O conjunto gênico atual de cpDNA presente em cada uma das linhagens correspondem aos clados continental e costeiro do *network*, mostrados na Figura 10.

O clado denominado interior, por outro lado, parece ter se separado do restante do complexo integrifolia antes do evento de expansão populacional que originou os clados continental e costeiro. Os indivíduos que integram essa linhagem evolutiva correspondem ao grupo

morfológico interior. Segundo T. Ando e G. Hashimoto (comunicação pessoal), o grupo interior é o único integrante do complexo integrifolia que pode ser reconhecido indubitavelmente por caracteres morfológicos diagnósticos e, portanto, pode ser considerado uma espécie taxonômica distinta.

Como explicar o isolamento entre as linhagens continental e costeira?

Conforme exposto anteriormente, um evento de diminuição populacional provavelmente levou à permanência de haplótipos de cpDNA diferentes em duas áreas geográficas distintas, correspondendo aos clados costeiro e continental. As populações residentes nessas áreas após a expansão, aparentemente, mantiveram-se isoladas umas das outras em relação ao fluxo de cpDNA.

Como o genoma cloroplasmático é herdado maternalmente em *Petunia*, ele se movimenta exclusivamente através da dispersão de sementes que, por sua vez, são muito pequenas e leves nesse gênero, podendo ser espalhadas facilmente pelo vento a longas distâncias (Stehmann, 1999). O lago Guaíba, a única barreira em potencial posicionada na região de contato entre os clados continental e costeiro, teoricamente, não deveria representar uma barreira para o fluxo do genoma de cloroplasto entre essas populações. Pensamos em duas hipóteses para tentar explicar a falta de sobreposição geográfica e genética desses clados:

1) Sabemos que a planície costeira atual do RS começou a ser formada há 120 mil anos atrás, no final do Pleistoceno. Com o resfriamento progressivo do planeta, começou uma lenta e constante regressão marítima, culminando com o máximo regressivo em 17.500 anos atrás, no início do Holoceno. Nesta época, o nível do oceano na planície costeira do RS encontrava-se 130 m abaixo do nível atual (Villwock e Tomazelli, 1995). Suspeitamos que o evento de expansão populacional que levou à colonização da planície costeira do RS pela linhagem costeira do cpDNA pode ter acontecido, portanto, entre 120 mil e 17.500 anos atrás⁸. O estabelecimento das populações de *Petunia* nessa região, portanto, pode ser considerado bastante recente em termos geológicos. A falta de evidências sobre o fluxo de sementes (cpDNA) entre os grupos costeiro e continental pode ser devido ao estabelecimento muito recente das populações, que ainda não permitiu detectar haplótipos invasores devido à baixa frequência nas áreas invadidas e não a uma barreira física efetiva.

Essa primeira hipótese poderia ser testada por um aumento do esforço amostral na região de contato entre as duas linhagens de haplótipos para tentar detectar e quantificar o fluxo gênico

⁸ O cálculo da taxa evolutiva dos marcadores de cpDNA utilizados poderia auxiliar a resolver essa questão. Mas, infelizmente, isso não foi possível devido à falta de um ponto de calibração adequado para o gênero *Petunia*.

entre as duas áreas. Para isso, seria interessante também aumentar o tamanho amostral intrapopulacional em todas as regiões e a condução de estudos adicionais, posteriores a este.

2) Análises estatísticas preliminares (dados não mostrados) indicaram que as diferentes variantes morfológicas do complexo *integrifolia* estão associadas, significativamente, aos diferentes níveis de salinidade do solo. A existência de caracteres morfológicos típicos de ambientes salinos e não salinos poderia indicar a presença de ecotipos⁹ diferenciados. Caso os indivíduos pertencentes às linhagens continental e costeira sejam também ecologicamente diferenciados, poderiam existir genótipos adaptados à baixa e à alta salinidade, respectivamente, e com dificuldades de se estabelecerem fora de seu ambiente de origem.

Linhagens costeira e continental representam *taxa* em especiação incipiente?

Segundo Schaal e cols. (2003), a divisão de uma simples linhagem em duas separadas é talvez o mais interessante e crítico estágio de divergência genética, uma vez que em alguns casos este é o prelúdio da especiação. Conforme exposto na segunda hipótese apresentada acima, como cada uma das linhagens costeira e continental está aparentemente associada a ambientes distintos, poderíamos especular sobre um processo incipiente de especiação ecológica. No entanto, o teste para essa hipótese é mais complicado, necessitando de um planejamento muito cuidadoso, só possível após o desenvolvimento do presente trabalho.

Os estudos para detectar variação ambiental adaptativa são relativamente complicados devido a grande quantidade de fatores que podem estar influenciando a seleção dos diferentes padrões morfológicos e genéticos observados (Linhart e Grant, 1996). Segundo Endler (1986), um estudo que objetive demonstrar ação de seleção natural deveria:

- a) identificar quais caracteres, com base de transmissão genética, estão sujeitos à seleção e quais os fatores ambientais que possivelmente poderiam estar atuando;
- b) demonstrar que a seleção afeta diretamente um caráter. Para isso, sua frequência ou distribuição pode variar entre a geração parental e seus descendentes, ou entre classes de idade ou história de vida;
- c) dentre os fatores ambientais suspeitos, confirmar quais são realmente fatores seletivos.

O estudo de adaptações ambientais populacionais é central para o entendimento dos processos evolutivos que atuam na formação das espécies. Gregor (1930) foi o primeiro a demonstrar diferenciação genética entre ecotipos costeiros e continentais da espécie *Plantago*

⁹ Termo que designa a variante genotípica de uma espécie associada adaptativamente a determinado ambiente (Hufford e Mazer, 2003).

maritima como resposta adaptativa a diferentes condições ambientais. O trabalho de Gregor é um exemplo de estudo clássico, onde a base genética dos caracteres diagnósticos dos ecotipos é confirmada indiretamente pela observação de frequências fenotípicas na prole de cruzamentos dirigidos, em condições ambientais controladas, como visto também em Clausen e cols. (1940). Assim, por muitos anos, os estudos para detectar seleção natural descreveram as adaptações a partir de uma perspectiva morfológica. No entanto, devido ao enorme progresso da biologia molecular nos últimos anos, hoje em dia existem muitos métodos para elucidar processos de adaptação diretamente em nível molecular, como demonstram Taylor e cols. (1995), Nordborg e Innan (2002), Schlötterer (2002). Esses métodos consistem no estudo da evolução de seqüências de DNA codificadoras e reguladoras, principalmente em espécies animais. Para modelos vegetais, a compreensão do papel de genes envolvidos em rotas bioquímicas celulares aumentou após o seqüenciamento de genomas completos, como *Arabidopsis thaliana* (Chory e cols., 2000). Kuittinen e cols. (2002) apresentam uma série de regiões gênicas propícias ao estudo de adaptações vegetais em situações naturais, as quais podem ser aplicadas, futuramente, na análise dos clados costeiro e continental de *Petunia integrifolia*.

Genética e conservação

A distinção entre as duas hipóteses sobre as causas do isolamento genético e geográfico dos clados costeiro e continental apresentadas anteriormente não é simples. No entanto, um estudo mais aprofundado sobre as causas desse isolamento seria de interesse para conservação, como detalhado a seguir.

Se a primeira hipótese de divergência recente for verdadeira e se realmente não existe uma barreira efetiva de isolamento entre as linhagens costeira e continental, esperamos que o fluxo gênico venha a restabelecer-se naturalmente e, a longo prazo, recupere a variabilidade que foi “dividida” pelo processo de gargalo de garrafa e efeito fundador evidenciados por nossos resultados. Nesse caso, planos futuros de conservação deveriam considerar a preservação das áreas naturais de contato entre as duas formas, para que um corredor genético entre elas pudesse ser mantido aberto e, assim, evitar o efeito de depressão endogâmica (*inbreeding depression*) (Hufford e Mazer, 2003). Além disso, poderiam ser feitos estudos semelhantes com outras espécies nativas para verificar se os mesmos padrões de separação de linhagens são encontrados. A repetição em outras espécies aumentaria a importância da conservação das áreas naturais de Porto Alegre e região metropolitana para manutenção do fluxo gênico.

Por outro lado, se fosse detectado que as duas linhagens de cpDNA representam também dois *taxa* em processo de especiação ecológica (hipótese 2), podemos esperar que a divergência

entre os dois aumente ao longo do tempo. Assim, deveria ser evitada a introdução de genótipos de ambientes distintos, de modo a minimizar os efeitos de depressão exogâmica (*outbreeding depression*) nas populações naturais, que é a diminuição do valor adaptativo das populações naturais pela introdução de genótipos adaptados a outras condições ambientais (Hufford e Mazer, 2003). Além disso, a planície costeira do RS e a região da Ilha de Santa Catarina, onde o clado costeiro se desenvolve, estão sujeitas a grande exploração imobiliária. Se o clado costeiro corresponder a uma espécie incipiente, esta já está ameaçada de extinção.

Aspectos taxonômicos

Resolvendo o complexo *integrifolia*

Conforme exposto na Introdução, os complexos de espécies como o complexo *integrifolia* representam um agrupamento de *taxa* com características muito semelhantes. Os caracteres diagnósticos para a divisão desses complexos em *taxa* distintos variam dependendo do critério particular de cada taxonomista. Essa subjetividade leva a classificações divergentes, sendo que as discussões taxonômicas podem atravessar décadas (como ilustrado pela Figura 6), sem que um consenso seja alcançado.

A exemplo de diversos trabalhos da literatura (Giebler e cols., 1999; Bruschi e cols., 2000; Coleman, 2000; Shaw, 2000; entre outros), dados moleculares foram utilizados como auxiliares na tentativa de estabilização da classificação taxonômica do complexo *integrifolia*. A análise desses dados sob uma perspectiva filogeográfica (como em Pierpaoli e cols., 1999; Jeewon e cols, 2003; Marcussen, 2003; Shaffer e cols, 2004) pôde elucidar melhor as relações evolutivas entre os *taxa* abordados nesse trabalho, o que torna a delimitação taxonômica do complexo *integrifolia* mais adequada, segundo os princípios da sistemática filogenética (de Queiroz e Gauthier, 1992).

Independente da grande discussão existente sobre os métodos mais adequados para delimitar espécies – revisados em Benton (2000) e Sites e Marshall (2003) – Coleman (2000) ressalta que, na problemática envolvendo complexos de espécies, as entidades precisam ser genética e morfológicamente discretas para serem consideradas unidades taxonômicas distintas. Por outro lado, os botânicos taxonomistas reconhecem que muitas das variações morfológicas significativas para diferenciação de espécies podem ser atribuídas a um número relativamente pequeno de genes (Gottlieb, 1984; Bradshaw e cols, 1995; Bradley e cols, 1997). Na maioria dos casos, como a divergência morfológica não está relacionada com o grau de diferenciação genética entre as linhagens, a determinação da coesão genética de um grupo baseada apenas em caracteres taxonômicos pode ser equivocada (Schaal e cols., 1998; Borba e cols., 2002). Assim, de acordo

com os nossos resultados, concluímos que os grupos morfológicos *integrifolia*, *depauperata*, *littoralis* e *riograndensis* são diferenciados por caracteres morfológicos (Tabela em anexo) que não têm significado evolutivo, pois não refletem a história evolutiva das entidades. Dessa forma, concordamos com Stehmann (1999) quando ele considera as espécies *P. littoralis* (Smith e Downs, 1966) e *P. riograndensis* (Ando e Hashimoto, 1998) como sinônimos de *P. integrifolia*.

Linhagens distintas, taxa distintos

Os dados moleculares nesse trabalho identificaram três linhagens evolutivas distintas dentro do complexo *integrifolia*. Dessas linhagens, apenas uma delas coincide com um dos grupos morfológicos descritos na literatura. As outras duas não podem ser distintas por caracteres morfológicos já descritos, pois envolvem diferentes grupos morfológicos, conforme explicado abaixo:

- grupo interior: é correspondente ao clado 1 do NJ (Figura 9A) e ao clado interior do *network* (Figura 10). Esse grupo morfológico corresponde à espécie taxonômica *Petunia interior* (Ando e Hashimoto, 1996). As características morfológicas diagnósticas dessa espécie estão descritas no Anexo. Essa é a linhagem molecularmente mais divergente de todas; análises de outras espécies de *Petunia* (F. R. Kulcheski, comunicação pessoal) indicam que *Petunia interior* é mais divergente do resto do complexo *integrifolia* que espécies morfológicamente muito distintas, como *P. axilaris* e *P. exserta*.
- linhagem continental: está representada no clado 2 do NJ (Figura 9A) e no clado continental do *network* (Figura 10). Essa linhagem reúne o grupo morfológico *riograndensis* e as amostras do grupo morfológico *integrifolia* que foram coletadas a oeste do Lago Guaíba e Lagoa dos Patos.
- linhagem costeira: está agrupada no clado 3 do NJ (Figura 9A) e no clado costeiro do *network* (Figura 10). Reúne os grupos morfológicos *depauperata*, *littoralis* e as amostras do grupo *integrifolia* coletadas a leste do Lago Guaíba e Lagoa dos Patos.

Os cladogramas continental e costeiro, apesar de representarem linhagens genéticas separadas, provavelmente são muito jovens evolutivamente e, por isso, não apresentaram caracteres tão evidentes para separação em entidades distintas nas revisões taxonômicas de *Petunia* feitas até então. No entanto, J.R. Stehmann (comunicação pessoal), em uma análise morfológica mais aprofundada comparando essas duas entidades, inclusive os indivíduos aqui analisados, encontrou caracteres que podem ser usados para diferenciar taxonomicamente os cladogramas continental e costeiro

(Quadro 5). As amostras coletadas nos morros graníticos de Porto Alegre e arredores, entretanto, apesar de pertencerem ao clado costeiro nas análises moleculares, apresentam características morfológicas intermediárias entre as populações costeiras e do interior do RS. Um maior número de amostras deve ser analisado para confirmar essa suposta posição intermediária.

Quadro 5: Características morfológicas típicas das populações pertencentes aos cladoss costeiro e continental evidenciados nas análises moleculares:

Linhagens genéticas		Clado interior	Clado continental	Clado costeiro
Localização das populações		Interiores do centro-sul do RS	Morros graníticos dos Arredores de Porto Alegre	Litoral e Lagoa dos Patos
Caracteres Morfológicos	Hábito	Decumbente, com ramos geralmente menores que 80 cm de comprimento	Decumbente, com ramos geralmente menores que 80 cm de comprimento	Procumbente, com ramos muito alongados, podendo atingir 1-2 m de comprimento
	Folhas	Elípticas ou obovadas, 13-21 mm comprimento, 4-15 mm largura	Elípticas ou obovadas, 16-27 mm comprimento, 6-13,4mm largura	Estreito-elípticas, elípticas ou obovadas, 20-27 mm comprimento, 5,2-7,3 mm largura.
	Cálice	10,7-12,6 mm	8,5-13,2 mm	7,8-9,1 mm
	Corola	28,2-32,8 mm	26-27 mm	24-25 mm
	Cápsula	Subglobosa	Subglobosa	Elipsóide

Ao contrário de *Petunia interior*, que é molecular e morfológicamente bastante divergente e, portanto, deve constituir uma espécie distinta, os cladoss costeiro e continental são pouco divergentes e, por isso, devem ser considerados apenas com raças geográficas ou, no máximo, como subespécies dentro de *Petunia integrifolia*, conforme exposto abaixo.

Nova proposta taxonômica para o complexo *Petunia integrifolia*

Baseado nos resultados obtidos com os marcadores moleculares nesse trabalho, aliado a análises morfométricas adicionais (J.R. Stehmann, comunicação pessoal) apresentamos agora uma nova proposta de classificação taxonômica para os integrantes do complexo *Petunia integrifolia*.

1) *Petunia interior*

Taxa descritos (sob o gênero *Petunia*):

- *Petunia violacea* Lindley, 1833.
- *Petunia inflata* R. E. Fries, 1911.
- *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. subsp. *inflata* (R.E.Fr.) Wijsman, 1982.
- *Petunia interior* T. Ando & G. Hashim., 1996.

Os dados genéticos sugerem que o este último *taxon* seja considerado uma espécie distinta do restante do complexo *Petunia integrifolia*. Morfologicamente pode ser distinguido pelo hábito ereto ou ascendente, pelas flores menores e pedicelo inflexo, distribuindo-se do Norte e Nordeste do Rio Grande do Sul, Oeste de SC e Paraná, Misiones Argentinas até o Paraguai. Essa espécie é encontrada junto às lavouras da região das Missões e pode ter tido uma introdução recente no Rio Grande do Sul (por volta da década de 1970).

2) *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*

Taxa descritos:

- *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. subsp. *integrifolia*, 1915.
- *Petunia riograndensis* T. Ando & Hashim., 1998.

As análises genéticas sugerem que as populações do continente do Rio Grande do Sul ao Oeste da Lagoa dos Patos constituam um único grupo taxonômico, que deve corresponder nomenclaturalmente à subespécie típica (*Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*). Morfologicamente corresponde a plantas decumbentes.

3) *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*

Taxa descritos:

- *Petunia dichotoma* Sendtn., 1846.
- *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. var. *depauperata* (R. E. Fr.) L. B. Sm. & Downs, 1966.
- *Petunia littoralis* L. B. Sm. & Downs, 1966.

As análises genéticas sugerem que as populações da planície costeira do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e as populações dos morros graníticos de Porto Alegre e arredores constituam um único grupo. Morfologicamente, entretanto, este grupo reúne populações bastante divergentes, com as populações da região de Porto Alegre e arredores com hábito decumbente, folhas mais largas e flores maiores (cálice e corola, embora geralmente menores que as de *P. integrifolia* da região continental sul-riograndense). As populações litorâneas que vivem sobre solo arenoso possuem o hábito procumbente, folhas mais estreitas e flores menores. Morfologicamente, as populações que crescem na restinga poderiam ser reconhecidas como uma unidade taxonômica infraespecífica, *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. var. *depauperata* (R. E. Fr.) L. B. Sm. & Downs, 1966. Sugere-se, pois, que seja elevada ao nível subespecífico. As populações de Porto Alegre e arredores, contudo, assemelham-se mais àquelas das linhagens continentais sul-riograndenses nos caracteres morfológicos.

Referências Bibliográficas

- Aguilar JF, Rossello JA and Feliner GN (1999) Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae) Mol Ecol 8:1341-1346.
- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E and Christopherson L (1988) The role of insertions/deletions on the evolution of the intergenic region between psbA and trnH in the chloroplast genome. Curr Genet 14: 137-146.
- Álvarez I and Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol Phyl Evol 29: 417-434.
- Álvarez IF, Aguilar JF, Panero JL and Feliner GN (2001) A phylogenetic analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecionae) based on morphological, nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (*trnL-F*) evidence. Mol Phylogenet Evol 20, 41-64.
- Ando T and Hashimoto G (1993) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Brazil. Bot J Linnean Soc 111: 265-280.
- Ando T and Hashimoto G (1996) A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. Brittonia 48: 217-223.
- Ando T and Hashimoto G (1998) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Rio Grande do Sul, Brazil. Brittonia 50(4):483-492.
- Angiosperm Phylogeny Group (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot J Linnean Soc 141: 399-436.
- Araújo, AC (2001) Revisão de *Rhynchospora* Vahl sect. *Pluriflorae* Kük. (Cyperaceae). Dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ashworth VETM (2000) Phylogenetic relationship in Phoradendreae (Viscaceae) inferred from three regions of the nuclear ribosomal cistron. I. Major lineages and paraphyly of *Phoradendron*. Syst Bot. 25, 349-370.
- Avice JC (2000) Phylogeography, The history and Formation of Species. Harvard University Press, London. 447p.
- Avice JC and Lansman RA (1983) Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: Nei M and Koehn RK (eds) Evolution of Genes and Proteins. Sinauer, Sunderland, pp. 147-164.

- Awise JC, Arnold J, Ball Jr RM, Bermingham E, Lamb T, Niegel JE, Reeb CA and Saunders NC (1987) Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Baldwin GG and Robichaux RH (1995) Historical biogeography and ecology of the Hawaiian silversword alliance (Asteraceae). In Wagner WL and Funk VL (eds), *Hawaiian Biogeography: Evolution on a Hot Spot Archipelago*. Smithsonian Institution Press, Washington DC. pp. 259-287.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter MJ, Wojciechowski MF, Campbell CS and Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard* 82: 247-277.
- Bandelt H-J, Forster P and Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Benton MJ (2000) Stem, nodes, crown clades, and rank-free lists: is Linnaeus dead? *Biol Rev* 75: 633-648.
- Bertorelle G and Barbujani G (1995) Analysis of DNA diversity by spatial autocorrelation. *Genetics* 140: 811-819.
- Bohs L and Olmstead RG (2001) A reassessment of *Normania* and *Triguera* (Solanaceae). *Plant Syst Evol* 228: 33-48.
- Borba EL, Shepherd GJ, Van Den Berg C and Semir J (2002) Floral and Vegetative Morphometrics of Five *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species: Correlation with Taxonomy, Phylogeny, Genetic Variability and Pollination Systems. *Ann Bot* 90: 219-230.
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E (1997) Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275: 80-82.
- Bradshaw HD, Wilbert SM, Otto KG, Schemske DW (1995) Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature* 376: 762-765.
- Brummitt RK (1989) Report of the Committee for Spermatophyta: 36. *Taxon* 38: 301.
- Bruschi P, Vendramin GG, Bussotti F and Grossoni P (2000) Morphological and Molecular Differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *Ann Bot* 85: 325-333.
- Buckler ESI, Ippolito A and Holtsford TP (1997) The evolution of plant ribosomal DNA: divergent paralogues, pseudogenes and phylogenetic implications. *Am J Bot* 84: 1.

- Byrne M, Macdonald B and Brand J (2003) Phylogeography and divergence in the chloroplast genome of Western Australian Sandalwood (*Santalum spicatum*). *Heredity* 91: 380-395.
- Campbell CS, Wojciechowski MF, Baldwin BG, Alice LA and Donoghue MJ (1997) Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol Biol Evol* 14: 81-90.
- Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson JJ, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V and Parokonny AS (2003) Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann Bot* 92: 107-127.
- Child A and Lester RN (1991) Life form and branching within the Solanaceae. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M and Estrada N (eds) *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Kew: Royal Botanic Gardens/ The Linnean Society of London, London, pp 151-159.
- Chortyk OT, Kays SJ and Teng Q (1997) Characterization of insecticidal sugar esters of *Petunia*. *J Agricult Food Chem* 45: 270-275.
- Chory J, Ecker JR, Briggs *et al.* (2000) Functional genomics and the virtual plant. A blueprint for understanding how plants are built and how to improve them. *Plant Physiology* 123: 423-425.
- Clausen J, Keck DD and Hiesey WM (1940) Experimental studies on the nature of species. I. Effect of varied environments on western North American plants. *Carnegie Institution of Washington Publication* 520: 1-452.
- Clegg MT, Gaut GH, Learn GH Jr, Morton BR (1994) Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *PNAS* 91: 6795-6801.
- Coleman M (2000) Application of RAPDs to the critical taxonomy of the English endemic elm *Ulmus plotii* Druce. *Bot J Linn Soc* 133: 241-262.
- Contini V, Lorenz AP, Kulcheski FR, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e Freitas LB (2003) Filogenia molecular no gênero *Calibrachoa* (Solanaceae). *Anais do 49º Congresso Nacional de Genética* (disponível em CD-ROM), Águas de Lindóia, Brasil.
- Crandall KA and Templeton AR (1993) Empirical tests os some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.
- Crandall KA, Templeton AR and Sing CF (1994) Intraspecific phylogenetics: problems and solutions. In: Scotland RW, Siebert DJ and Williams DM, eds. *Systematics Association Special Volume*. Clarendon Press, Oxford, 273-297.

- Cronn RC, Small RL, Haselkorn T and Wendel JF (2002) Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. *Am J Bot* 89: 707-725.
- Darwin C. (1959) *The origin of species*. New York: Random House, 689p. (reimpressão de 1993)
- De Queiroz K and Gauthier J (1992) Phylogenetic Taxonomy. *Annu Rev Ecol Syst* 23:449-80.
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, Corre VL and Petit RJ (1997) Phylogeographic Structure of White Oaks Throughout the European Continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Dunn IS and Blattner FR (1986) Sharoons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res* 15: 2677-2698.
- Elder Jr JF and Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 70: 297-320.
- El Mousadik A and Petit RJ (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol Ecol* 5: 547-555.
- Endler JA (1986) *Natural Selection in the Wild*. Princeton NJ: Princeton Univ. Press. 336p.
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant population. *Heredity* 72:250-259.
- Excoffier L, Smouse P and Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fishbein M and Soltis DE (2004) Further Resolution of the Rapid Radiation of Saxifragales (Angiosperms, Eudicots) Supported by Mixed-Model Bayesian Analysis. *Syst Bot* 29: 883-891.
- Fries RE (1911) Die Arten der Gattung *Petunia*. *Kongl. Svenska Vetenskapsakad. Handl.*, 46: 1-72.
- Fu Y X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Futuyma DJ (1998) *Evolutionary Biology* (3rded). Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts. 763p.
- Gaskin JF and Schaal BA (2002) Hybrid *Tamarix* widespread in USA invasion and undetected in Asian range. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 11256-11259.
- Ge XJ, Chiang YC, Chou CH and Chiang TY (2002) Nested clade analysis of *Dunnina cinensis* (Rubiaceae), a monotypic genus from China based on organelle DNA sequences. *Conserv Genet* 3: 351-362.

- Giebler S, Mader E and Schwenk K (1999) Morphological evolution and genetic differentiation in *Daphnia* species complexes. *J Evol Biol* 12: 710-723.
- Gielly L, Yong-Ming Y, Küpfer P and Taberlet P (1996) Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: Chloroplast trnL (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Mol Phylogenet Evol* 5: 460-466.
- Goel S, Raina SN and Ogihara Y (2002) Molecular Evolution and Phylogenetic Implications of Internal Transcribed Spacer Sequences of Nuclear Ribosomal DNA in the *Phaseolus-Vigna* Complex. *Mol Phylogenet Evol* 22: 1-19.
- Goodspeed TH (1954) The genus *Nicotiana*. *Chronica Botanica* 16: 1-536.
- Gottlieb LD (1984) Genetics and morphological evolution in plants. *Am Nat* 123: 681-709.
- Gregor JW (1930) Experiments on the genetics of wild populations part I. *Plantago maritima*. *L J Genet* 22: 15-25.
- Haeckel E. (1866) *Generelle morphologie der organismen: allgemeine grundzüge der organischen formen-wissenschaft mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte descendenz-theorie*. Georg Rieme, Berlin.
- Hamilton MB (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intra-specific variation. *Mol Ecol* 8: 513-525.
- Hedges SB (1992) The number of replications needed for accurate estimation of bootstrapping P value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol* 9: 366-369.
- Hewitt, GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* 68: 87-112.
- Hooker WJ (1831) *Salpiglossis integrifolia*. Entire-leaved *Salpiglossis*. *Bot Mag* 58: 3113.
- Huang S, Chiang YC, Schaal BA, Chou CH and Chiang TY (2001) Organelle DNA phylogeography of *Cycas lailungensis*, a relict species in Taiwan. *Mol Ecol* 10: 2669-2681.
- Hudson RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf Surv Evol Biol* 7: 1-44.
- Hudson RR, Slatkin M and Maddison WP (1992) Estimation of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583-589.
- Hufford KM and Mazer SJ (2003) Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecol Evol* 18(3): 147-155.
- Hunziker AT (2001) *The Genera of Solanaceae*. A.R.G. Gantner Verlag K.G.

- Ibrahim KM, Nichols RA and Hewitt GM (1996) Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* 77, 282-291.
- Jeewon R, Liew ECY, Simpson JA, Hodgkiss IJ and Hyde KD (2003) Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. *Mol Phylogenet Evol* 27: 372-383.
- Johnson HB (1975) Plant pubescence: an ecological perspective. *Bot Rev* 41: 233-258.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA and Stevens PF (1999) *Plant Systematics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 464 pp.
- Kim KJ and Jansen RK (1996) Phylogenetic implications of *rbcL* and ITS sequence variation in the Berberidaceae. *Syst Bot* 21: 381-396.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- Kitamoto N, Honjo M, Ueno S, Takenaka A, Tsumura Y, Washitani I and Ohsawa R (2004) Spatial genetic structure among and within populations of *Primula sieboldii* growing beside separate streams. *Mol Ecol* 14: 149-157.
- Koontz JA, Soltis PS, and Soltis DE (2004) Using Phylogeny Reconstruction to Test Hypotheses of Hybrid Origin in *Delphinium* Section *Diedropetala* (Ranunculaceae). *Syst Bot* 29: 345-357.
- Kuittinen H, Aguadé M, Charlesworth D, Haan ADE, Lauga B, Mitchell-Olds T, Oikarinenn S, Ramos-Onsins S, Stranger B, Van Tienderen P and Savolainen O (2002) Primers for 22 candidate genes for ecological adaptations in Brassicaceae. *Mol Ecol Notes* 2: 258-262.
- Kulcheski FR, Lorenz AP, Muschner VC, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto S, Freitas LB (2003) Análise filogenética do gênero *Petunia* Juss. s.s. (Solanaceae). Anais do 49° Congresso Nacional de Genética (disponível em CD-ROM), Águas de Lindóia, Brasil.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e Loreta B. Freitas. *Genética (Artigo Aceito Para Publicação)*.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB and Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Ver2.1. Arizona State University, Tempe. (distributed by the authors in www.megasoftware.com)
- Lamarck JB (1809) *Philosophie Zoologique*. Paris, Dentier.
- Leicht IJ and Bennet MD (1997) Poliploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci* 2(12): 470-476.

- Li WH (1977) Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a finite population. *Genetics* 85: 331-337.
- Lim TY, Kovarik A, Matyásek R, Bezdek M, Lichtenstein CP and Leitch AR (2000) Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma* 109: 161-172.
- Lindley J (1834) *Petunia violacea*. Purple *Petunia*. *Bot Reg* 19: Tab. 1626.1834.
- Linhart YB and Grant MC (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 237-277.
- Lloyd BD (2003) The demographic history of the New Zealand short-tailed bat *Mystacina tuberculata* inferred from modified control region sequences. *Mol Ecol* 12: 1895-1911.
- Longo D, Lorenz AP, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e Freitas LB (2003) Dados moleculares auxiliam na resolução do complexo integrifolia. Anais do 49º Congresso Nacional de Genética (disponível em CD-ROM), Águas de Lindóia, Brasil.
- Lorenz AP, Stehmann JR, Muschner VC, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB (2003) Caracterização genética de espécies de *Petunia* endêmicas da Serra do Sudeste, RS. Anais do 49º Congresso Nacional de Genética (disponível em CD-ROM), Águas de Lindóia, Brasil.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM and Freitas LB (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloaceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Ann Bot (in press)*
- Lumaret RC, Mir C, Michaud H and Raynal V (2002) Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Mol Ecol* 11: 2327-2336.
- Mai JC and Coleman AW (1997) The Internal Transcribed Spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *J Mol Evol* 44: 258-271.
- Marcussen T (2003) Evolution, phylogeography, and taxonomy within the *Viola alba* complex (Violaceae). *Plant Syst Evol* 237: 51-74.
- Maskas SD and Cruzan MB (2000) Patterns of intraspecific diversification in the *Piriqueta caroliniana* complex in southeastern North America and the Bahamas. *Evolution* 54: 815-827.
- Matioli SR (2001). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora LTDA, São Paulo. 202p.
- McCauley DE (1995) The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends Ecol Evol* 10: 198-202.

- Molvray M, Kores PJ and Chase MW (1999) Phylogenetic relationship within *Korthalsella* (Viscaceae) based on nuclear ITS and plastid *trnL-F* sequence data. *Am J Bot* 86:249-260.
- Mullis K, Falcona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chiez TT, Salzano FM and Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae) *Am J Bot* 90(8): 1229-1238.
- Nicholas KB and Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. Program available in the internet (www.psc.edu/biomed/genedoc).
- Nei, M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M and Kumar, S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nordborg M and Innan H (2002) Molecular population genetics. *Curr Opin Plant Biol* 5: 69-73.
- Oh SH and Potter D (2005) Molecular Phylogenetic Systematics and Biogeography of Tribe Neillieae (Rosaceae) using DNA sequences of cpDNA, rDNA, and LEAFY1. *Am J Bot* 92: 179-192.
- O'Kane SL, Schaal BA, Al-Shebaz IA (1996) The origins of *Arabidopsis suecica* (Brassicaceae) as indicated by nuclear rDNA sequences. *Syst Bot* 21:559-566.
- Olmstead RG, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L and Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee M, Symon DE, Lester RN and Jessop JP (eds) *Solanaceae IV: Advances in biology and utilization*. Kew: Royal Botanic Gardens/The Linnean Society of London, London, pp 111-137.
- Olsen KM and Schaal BA (1999) Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *PNAS* 96: 5586-5591.
- Okuyama Y, Fujii N, Wakabayashi M, Kawakita A, Ito M, Watanabe M, Murakami N and Kato M (2005) Nonuniform Concerted Evolution and Chloroplast Capture: Heterogeneity of Observed Introgression Patterns in Three Molecular Data Partition Phylogenies of Asian *Mitella* (Saxifragaceae). *Mol Biol Evol* 22: 285-296.
- Palmer JD (1985) Comparative Organization of Chloroplast Genomes. *Annu Rev Genet*, 19: 325-354.

- Petit RJ, Kremer A and Wagner DB (1993a) Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity* 71:630-641.
- Petit RJ, Kremer A and Wagner DB (1993b) Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor Appl Genet* 87: 122-128.
- Petit RJ, Brewer S, Bordaes S, Burg K, Cheddadi R, Coart E *et al* (2002a) Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Ecol Manag* 156: 49-74.
- Petit RJ, Csakl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, Cottrell J *et al* (2002b) Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Ecol Manag* 156: 5-26
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D and Vendramin GG (2004) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol Ecol* 2004, 13p.
- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V and Randi E (1999) Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Ecol* 8: 1805-1817.
- Posada D and Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 16: 37-45.
- Prain e cols. (1918) *Petunia integrifolia*. *Bot Mag* 4: 8749.
- Printzen C, Ekman S and Tonsberg T. (2003) Phylogeography of *Cavernularia hultenii*: evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Mol Ecol* 12: 1473-1486.
- Provan J, Powell W and Hollingsworth M (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 16: 142-147.
- Rambau RV, Robinson TJ and Stanyon R. (2003) Molecular genetics of *Rhabdomys pumilio* subspecies boundaries: mtDNA phylogeography and karyotypic analysis by fluorescence in situ hybridization. *Mol Phylogenet Evol* 28: 564-575.
- Rauscher JT (2002) Molecular phylogenetics of *Espletia* complex (Asteraceae): evidence from nrDNA ITS sequences on the closest relatives of Andean adaptive radiation. *Am J Bot* 89: 1074-1084.

- Rauscher JT, Doyle JJ and Brown HD (2002) Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex. *Mol Ecol*, 11: 2691-2702.
- Renner SS (1999) Circumscription and phylogeny of the Laurales: Evidence from molecular and morphological data. *Am J Bot* 86: 1301-1315.
- Reynolds J, Weir BS and Cockerham CC (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.
- Rogers AR and Harpending (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.
- Rogers AR (1997) Population structure and modern human origins. In: Donnelly P, Tavaré S (eds) *Progress in population genetics and human evolution*. Springer, New York, 55-79.
- Roy A, Frascaria N, Mackay J and Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor Appl Genet* 85: 173-180.
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sang, T, Crawford DJ and Stuessy TF (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6813-6817.
- Sang T, Crawford DJ and Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84: 1120-1136.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sendtner O (1846) Solanaceae et Cestrinae. In: Martius, C.F.P von (ed.) 1965-1967. *Flora Brasiliensis: enumeratio plantarum*. Reimpressão. Weinheim: J. Cramer. v10: 1-338.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT and Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7: 465-474.
- Schaal BA and Olsen KM (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7024-7029.
- Schaal BA, Gaskin JF and Caicedo AL (2003) Phylogeography, Haplotype Trees, and Invasive Plant Species. *Journal of Heredity* 91: 197-201.

- Schinz NY and Thellung A (1915) *Petunia integrifolia*. Vierteljahrsschr. Naturf. Ges. Zürich 60: 361.
- Schlötterer C (2002) Towards a molecular characterization of adaptation in local populations. Curr Opin Genet Dev 12: 683-687.
- Schneider H (2003) Métodos de Análise Filogenética: um Guia Prático (2ªed). Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto 114p.
- Schneider S and Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Applications to human mitochondrial DNA. Genetics 152: 1079-1089.
- Schneider S, Roessli D and Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2000: A software for population genetics and data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shaffer HB, Fellers GM, Voss SR, Oliver JC and Pauly GB (2004) Species boundaries, phylogeography and conservation genetics of the red-legged frog (*Rana aurora/draytonii*) complex. Mol Ecol 13: 2667-2677.
- Shaw AJ (2000) Molecular phylogeography and cryptic speciation in the mosses, *Mielichhoferia elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae) Mol Ecol 9: 595-608.
- Silva OS (1994) Importância da *Callonychium petuniae* Cere & Wittmann, 1990 (Insecta, Hymenoptera, Andrenidae) e outras abelhas no sucesso reprodutivo de *Petunia integrifolia* (Hooker) Schinz et Thellung (Solanaceae). Tese de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Sites Jr JW and Marshall JC (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. Trends Ecol Evol 18: 462-470.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139: 457-462.
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T and Wendel JF (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. Am J Bot 85: 1301-1315.
- Smith LB and Downs R (1966) Solanáceas. Flora Ilustrada Catarinense (fasc. SOLA): 1-321.
- Smouse PE, Long JC and Sokal RR (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. Syst Zool 35: 627-632.

- 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. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Stehmann JR and Semir J (1997) A New Species and New Combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon* 7: 417-419.
- Stephens M, Smith NJ and Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68, 978-989.
- Strand AE, Leebens-Mack J and Milligan BG (1997) Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. *Mol Ecol* 6:113-118.
- Swofford DL (2002) PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG and Cosso JF (1998) Comparative phylogeography and post-glacial colonization routes in Europe *Mol Ecol* 7: 453-464.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tajima F (1996) The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* 143: 1457-1465.
- Taylor MFJ, Shen Y and Kreitman ME (1995) A population genetic test of selection at molecular level. *Science* 270: 1497-1499.
- Templeton AR, Crandall KA and Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (2001) ClustalX. Program available in the internet (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx>).
- Van Ham RCHJ, Hart H, Mes THM and Sandbrink, JM (1994) Molecular evolution of noncoding regions of the chloroplast genome in the Crassulaceae and related species. *Curr Genet* 25: 558-566.
- Villwock JA e Tomazelli LJ (1995) Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1-45.
- Watterson GA (1985) The genetic divergence of two populations. *Theor Popul Biol* 27: 298-317.

- White TJ, Burns T, Lee S and Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J and White T (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academy Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wijnands DO and Boss JJ (1986) Proposal to conserve 7436 *Petunia* with *P. nyctaginiflora* as Typ. Cons. (Solanaceae). *Taxon* 35: 748-749.
- Wijsman HJW (1982) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Botanica Neerlandica* 31: 447-490.
- Wijsman HJW (1983) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* II. Experimental data: crosses between different taxa. *Acta Botanica Neerlandica* 32: 97-107.
- Wijsman HJW (1990) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae). *Acta Botanica Neerlandica* 39: 101-102.
- Wiley EO, Brooks DR, Siegel-Causey D and Funk VA (1991) *The Compleat Cladist: a Primer of Phylogenetic Procedures*. Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence.
- Wolfe KH, Li W-H, Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *PNAS* 84: 9054-5058.
- Yoo KO, Lowry PP and Wen J (2002) Discordance of chloroplast and Nuclear ribosomal DNA data in *Osmorhiza* (Apiaceae) *Am J Bot* 89: 966-971.
- Zanetto A and Kremer A (1995) Geographic structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. 1. Monolocus patterns of variation. *Heredity* 75: 506-517.

ANEXOS

Anexos – Tabela mostrando os caracteres morfológicos usados para a delimitação taxonômica dos diferentes *taxa* que compõem o complexo *integrifolia*.

Espécie	<i>P. integrifolia</i>	<i>P. riograndensis</i>	<i>P. interior</i>	<i>P. integrifolia inflata</i>	<i>P. integrifolia depauperata</i>	<i>P. littoralis</i>
Hábito	Decumbente	Prostrada, geralmente alongada em zig-zag, até 10-20 cm de altura	Eréta, com ramos secundários ascendentes até prostrados; 3-ramificado junto ao primeiro nó floral	Eréta ou ascendente	Procumbente, com caule longo, não ramificado, assimetricamente dicotômico junto aos nós florais	Procumbente, caule longo, radiado, até 80 cm comprimento
Folha	?	Linear-oblonga a elíptica, raramente obovade, (15)20-45(60) x 8-20 (32) mm	Oblonga até linear (ocasionalmente elíptica), (24)30-43(52) x (6)10-19(32) mm, subglabra a esparsa-pilosa (exceto nas margens e nervuras)	Rombóide-espatalata, 20-60 x 10-10 mm	Linear-oblanceolada, elíptica ou espatalada	Estreito-lanceolada, obtusa, base longo atenuada, até 35 mm comprimento X 10 mm largura, subcarnea
Cálice	Profundamente lobado > 10 mm	Profundamente lobado, >10 mm	Profundamente lobado, < 10 mm	Profundamente lobada	Medianamente lobado, < 10 mm comprimento	Profundamente lobado, < 10 mm comprimento
Corola	Infundibuliforme, 30-33 mm	Infundibuliforme, (32) 35-55 mm, curtamente lobada, lobos depresso-orbiculares, agudos a mucronados no ápice	Infundibuliforme, (18)20-25(28) cm	Ventricoso-infundibuliforme, cerca de 25 mm, lobos arredondado-triangulares	Infundibuliforme, 18-20 mm	Infundibuliforme, lobos deltoides, 25 mm comprimento
Cor da corola	Púrpura	Cor do tubo e dos lobos púrpura-avermelhada, a superfície interna raramente apresentando faixas ou reticulação no lado superior	Púrpura-pálida com faixas púrpura-escura e reticulação no lado superior	?	Púrpura	Púrpura (Roxa)
Filete – comprimento.	?	16-21(24) mm	13-15 mm	8-13 mm	?	?
Filete – adnação	X=7,25 (6-8 mm)	Cerca de 10 mm	Cerca de 5 mm	3-4 mm	?	?
Anteras (filetes maiores)	Coniventes, lobos planos	Coniventes, lobos planos	Coniventes, lobos canaliculados	Conivente, lobos achatados	?	?
Estigma	?	Obcônico até truncado	Obcônico ou truncado	Clavado-discóideo	?	Capitado
Fruto – pedúnculo	Deflexo	Deflexo	Forte ou fracamente deflexo, 8-20(37) mm	Inflexo ou pouco patente	Deflexo	Deflexo
Cápsula	5-6 mm	Ovoide a globoso, 5-8(9) mm	Ovoide, (3)5-6(7) mm	Ovoide, 5-7 mm	?	Elipsóide 5 mm comprimento

Anexo – (continuação)

Espécie	<i>P. integrifolia</i>	<i>P. riograndensis</i>	<i>P. interior</i>	<i>P. integrifolia inflata</i>	<i>P. integrifolia depauperata</i>	<i>P. littoralis</i>
Sementes	?	0,6-0,8 mm	0,5-0,7 mm	0,5 mm	?	?
Distribuição Geográfica	?	RS (centro e leste Planalto Sul-Riograndense em altitudes de 250-500 m	Interior de SC e RS	Paraguai, Argentina (Misiones)	Região costeira de SC e RS	SC, Florianópolis

? – característica não avaliada.