

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Genética

**História Evolutiva de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata***

**Aline Ramos**

Orientadora: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Co-orientadora: Dra. Aline P. Lorenz-Lemke

Trabalho apresentado como requisito para  
obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências  
Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

**Porto Alegre, junho de 2008**

UFRGS - BIBLIOTECA  
INST. BIOCÊNCIAS



*“E é este descanso estético do espírito entre o oceano e as serras continentais que se revela a última razão da beleza natural: o litoral rio-grandense é uma paisagem profundamente harmônica, a mais harmônica de quantas existem no Rio Grande do Sul.” (Rambo, 1954)*

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

A parte experimental deste estudo foi realizada nas instalações do Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS. As seqüências dos marcadores foram obtidas no Centro de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências, PUCRS.

Para a realização deste projeto contamos com o apoio financeiro das seguintes Instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Programa Especial em Taxonomia – PROTAX (MCT/CNPq/CAPES)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX (CNPq/FAPERGS)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS)
- Fundação Biodiversitas/Conservation International/Programa de espécies ameaçadas.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho encerra os meus cinco anos de graduação e muitas pessoas contribuíram para que eu chegasse até aqui. Não sei se vou conseguir lembrar o nome de todas, mas para algumas não posso deixar de agradecer especialmente:

À minha orientadora Dra. Loreta Brandão de Freitas, por me apresentar ao maravilhoso mundo da Filogeografia, por todos os ensinamentos, pelos momentos fundamentais de incentivo e por acreditar na minha capacidade desde o início.

À Dra. Aline Lorenz-Lemke pela paciência e por todo o ensinamento, em campo, no laboratório, e com todos os malditos arquivos de programas (*inputs e outputs*), fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Jef por todo amor, atenção, carinho, paciência e companheirismo. Não sei como te agradecer por me fazer tão feliz, te amo muito!

Ao Geraldo Mäder pelas dicas, referências, conselhos e risadas também essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Nelson, pela paciência e por tudo que eu aprendi durante o estágio supervisionado (ainda que a matemática tenha me enlouquecido).

À Paki, pelos ouvidos amigos, por acrescentar o termo “caótico” (que define muitas situações) ao meu vocabulário e pelos momentos de descontração.

À Pri, pelos conselhos e pela inspiração de paciência nos últimos tempos.

Aos colegas do Laboratório de Evolução Molecular que muitas vezes contribuíram de alguma forma com este trabalho: Carol, Clênio, Raquel e Tielli.

À minha família (incluindo o Luppy) por me agüentar tão estressada nos últimos meses e por me apoiar em todos os sentidos, sempre (amo vocês).

Às divas (Marcela, Mari, Esther, Karyne e Fê), por serem tão festeiras, amigas e companheiras durante estes quatro anos e meio. Vocês são as melhores amigas que eu poderia querer!!!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade e instituições e Fontes Financiadoras.

## Resumo

O gênero *Petunia* Juss (Solanaceae) é endêmico da América do Sul e tem grande importância econômica devido ao seu uso ornamental. A espécie *P. integrifolia* apresenta uma das maiores distribuições do gênero, estando presente em diferentes regiões. As populações naturais apresentam grande variação nos caracteres florais, vegetativos e no habitat e, por isso, provocam muitas divergências taxonômicas a respeito de sua classificação. Análises genéticas realizadas anteriormente verificaram que a espécie *Petunia integrifolia* está dividida em dois taxa infra-específicos: *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia* e *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*, sendo esta característica de ambientes de alta salinidade. Populações de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* estão distribuídas ao longo de toda a Planície Costeira do Rio Grande do Sul e litoral catarinense. Os objetivos deste trabalho foram: estabelecer relações evolutivas e filogeográficas em *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*; determinar o grau de variabilidade genética e a dinâmica populacional desta linhagem ao longo de toda a distribuição. Para tanto, o DNA de 190 indivíduos, distribuídos em 56 localidades, foi amplificado por PCR, utilizando *primers* específicos para os espaçadores intergênicos plastidiais *trnS-trnG* e *trnH-psbA*. Os produtos de PCR foram seqüenciados automaticamente e as seqüências alinhadas no programa *GeneDoc*. Os haplótipos foram determinados com o programa *DnaSP* e suas relações filogenéticas inferidas pelo programa *Network*. Para avaliar a possibilidade de expansão populacional foram realizados testes de neutralidade utilizando o programa *Arlequin*. A fim de detectar grupos geograficamente homogêneos, que se diferenciam geneticamente uns dos outros, foram feitas análises no programa SAMOVA. Foram encontrados 16 haplótipos e a *network* não apresentou uma estruturação geográfica gradual no relacionamento entre eles, mas uma estruturação em três grupos geográficos distintos: Centro, Sul e Norte, que também foram recuperados pela análise com o programa SAMOVA. Os resultados obtidos sugerem que a colonização da Planície Costeira se deu por eventos subseqüentes de ocupação, influenciados pelas oscilações marinhas ocorridas durante o Pleistoceno e o Holoceno. Este cenário de instabilidade ocasionou ondas de extinção com subseqüente expansão e recolonização destas populações na Planície Costeira, de forma que o padrão genético observado atualmente para esta linhagem é resultado destes eventos.

## Abstract

The genus *Petunia* Juss (Solanaceae) is endemic in South America and has great economic importance because of its ornamental use. The specie *P. integrifolia* presents one of the largest distributions of genus and it is present in different regions. The natural populations show wide variation in floral and vegetative characters, and habitat, and because of this there are many differences concerning their taxonomic classification. Analysis carried out genetic previously found that the species *Petunia integrifolia* is divided into two *taxa* infraespecific: *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia* e *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*. The last one is characteristic of environments of high salinity and distributed throughout the Coastal Plain of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The aims of this study were: to establish evolutionary and phylogeographic relationships of *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*; to determine the genetic variability and population dynamics throughout of the lineage distribution. The DNA of 190 individuals distributed in 56 localities was amplified by PCR using specific primers from the plastidial intergenic spacers *trnS-trnG* e *trnH-psbA*. PCR products were sequenced in automatic sequencer, and the sequences aligned in *GeneDoc* program. The haplotypes were determined by *DnaSP* program and their phylogenetic relationships inferred by *Network*. To evaluate the possibility of population expanding, neutrality tests were performed using the *Arlequin* package. In order to detect geographically homogeneous groups that are differentiated from each other genetically, analyses were made in the SAMOVA program. It found 16 haplotypes and the network did not present a geographic structure gradually in the relationship between the haplotypes, but was structured in three distinct geographic groups: Central, South and North, which also were referred by SAMOVA. Through the results we can infer that the colonization of the Coastal Plain was given by subsequent events of occupation, influenced by fluctuations marine during the Pleistocene and Holocene. This instable scenario produced recurrent extinction and recolonization by these populations in the Coastal Plain, so that the genetic pattern seen today for this lineage is a result of these events.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
1.1. O gênero <i>Petunia</i> Juss.....	08
1.2. <i>Petunia integrifolia</i> subsp. <i>depauperata</i> .....	09
1.3. A Planície Costeira do Rio Grande do Sul.....	13
1.4. Diversificação genética e estrutura populacional.....	16
1.5. Filogeografia e conservação.....	17
1.6. Marcadores moleculares.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Coletas.....	23
3.2. Extração do DNA.....	26
3.3. Reações de amplificação e seqüenciamento.....	27
3.4. Precipitação com PEG.....	28
3.5. Seqüenciamento.....	29
3.6. Análise das seqüências.....	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Caracterização das seqüências .....	32
4.2. Relações evolutivas na amostra.....	35
4.3. Detecção de grupos geográficos.....	40
4.4. Dinâmica populacional.....	44
5. DISCUSSÃO.....	48
5.1. Diversidade dos marcadores utilizados.....	48
5.2. Filogeografia e dinâmica populacional de <i>P. integrifolia</i> subsp. <i>depauperata</i> .....	49
5.3. Conservação.....	51
5.4. Perspectivas.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## 1. Introdução

### 1.1 O Gênero *Petunia* Juss.

O gênero *Petunia* (Solanaceae) foi originalmente estabelecido por Jussieu em 1803 com a descrição de duas espécies: *Petunia nyctaginiflora* (= *P. axillaris*) e *Petunia parviflora* (= *Calibrachoa parviflora*) (Stehmann, 1999). Porém, estudos morfológicos e cromossômicos realizados por Wijsman (1982) e Wijsman & Jong (1985) mostraram que o gênero *Petunia* era, na verdade, constituído por dois grupos de espécies distintas: um grupo com  $2n = 14$  e outro  $2n = 18$ . A designação *Petunia* foi mantida para as espécies com  $2n = 14$  e as espécies  $2n = 18$  receberam o nome de *Calibrachoa* La Llave & Lex. (Wijsman, 1990).

*Petunia* Juss. é um gênero subtropical, endêmico da América do Sul, que apresenta, segundo Stehmann (1999) onze espécies, a maioria delas encontradas no Sul e Sudeste do Brasil. Conhecidas popularmente pelas petúnias-de-jardim, este grupo de espécies tem uma longa história de cruzamentos artificiais. No início do século XIX, um híbrido artificial (*Petunia x hybrida*) foi obtido através do cruzamento das espécies *P. integrifolia* (Hook) Schinz & Tell e *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb.

Fertilizações manuais interespecíficas em laboratório produzem híbridos com variado grau de fertilidade, comprovando que não há barreiras genéticas a este tipo de cruzamento (Watanabe *et al.*, 1996). As espécies de *Petunia* se reproduzem sexuadamente e florescem geralmente num mesmo período, não havendo isolamento sazonal entre elas. Os mecanismos de isolamento dentro deste gênero são predominantemente geográficos (diferentes habitats) e reprodutivos (radiação adaptativa de síndromes florais). Estes últimos parecem ser particularmente importantes para a manutenção da integridade genética destas espécies (Stehmann, 1999).

As espécies de *Petunia* apresentam diferentes síndromes florais (conjuntos de características que tornam a flor propícia à polinização por determinado vetor), sendo a

melitofilia (polinização por abelhas) a mais comum, presente em oito espécies do gênero. A maioria das espécies melitófilas de *Petunia* são auto-incompatíveis e, assim, dependentes da polinização realizada por abelhas especializadas para a sua reprodução, em um provável processo de co-evolução (Wittmann *et al.*, 1989; Silva, 1994).

De modo geral, as espécies deste gênero são ervas eretas, decumbentes ou procumbentes, com raízes axiais. O caule é cilíndrico e herbáceo e quando jovens são esverdeados. As folhas são sésseis ou subsésseis, podendo variar de um a 19 centímetros. As flores são vistosas, com cálice fendido até próximo à base; a corola possui prefloração imbricada, podendo ser actinomorfa ou zigomorfa, de coloração predominantemente púrpura ou, mais raramente, vermelha ou branca. Apresentam cinco estames, com anteras amarelas ou azul-violáceas. O fruto é uma cápsula septígrafa com sementes pequenas e numerosas. Não há um sistema de dispersão a longas distâncias, de forma que, geralmente, as sementes ficam próximas à planta mãe. Normalmente são plantas anuais, de vida curta e hermafroditas (Stehmann, 1999).

As espécies de *Petunia* são predominantemente heliófilas (necessitam de alta intensidade luminosa) e podem ser encontradas nos mais variados tipos de solo. Podem habitar campos, afloramentos rochosos e capoeiras da zona ecotonal entre o campo e a mata (Stehmann, 1999).

### **1.2 *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata***

A espécie *P. integrifolia* apresenta uma das maiores distribuições do gênero, estando presente na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. Populações localizadas em diferentes regiões apresentam grande variação nos caracteres florais, vegetativos e no habitat e, por isso, existem muitas divergências taxonômicas a respeito de sua classificação. Indivíduos encontrados ao longo da costa dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina têm sido

identificados com diferentes nomenclaturas. Exemplares com o pedúnculo floral comprido (mais de 15 milímetros) foram descritos em 1846 como *P. dichotoma* Sendtner e aqueles que possuíam o pedúnculo floral menor foram descritos em 1911 *P. violacea* subsp. *depauperata* Fries (Stehmann, 1999). As populações da ilha de Florianópolis (Santa Catarina) foram reconhecidas por Smith & Downs (1966) como uma espécie distinta, sendo chamadas de *Petunia littoralis*.

Wijisman (1982) reconheceu *P. integrifolia* como sendo uma espécie única, formada por três subespécies: *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, associada à região do Pampa, *P. integrifolia* subsp. *occidentalis*, isolada na região norte da Argentina e sul da Bolívia, e *P. integrifolia* subsp. *inflata* no Paraguai, nordeste da Argentina e oeste da região sul do Brasil.

Posteriormente, outros três *taxa* relacionados à *P. integrifolia* foram elevados à categoria de espécie: Ando & Hashimoto (1996) denominaram as populações que apresentavam anteras com tecas diferenciadas e ramificações tricotômicas de *Petunia interior*; e, em 1998, estes mesmos autores, baseados nas diferenças de tamanho da flor, dos estames e formato do tubo da corola descreveram *Petunia riograndensis* e *Petunia bajeensis* no planalto sul-riograndense.

Stehmann (1999), em uma revisão taxonômica do gênero, argumentou que a espécie *P. integrifolia* encontra-se naturalmente estruturada em populações parcialmente isoladas. Este isolamento seria o responsável pelas diferenças florais e vegetativas nas populações marginais, ocasionando um gradiente morfológico e induzindo a proposição de *taxa* pontuais. Para este autor, todas as espécies e subespécies do complexo descritas anteriormente deveriam ser sinonimizadas em *Petunia integrifolia*, podendo, eventualmente, serem aceitos alguns *taxa* infra-específicos.

Longo (2005) analisou seis morfologias de *P. integrifolia* através de dados moleculares, verificando a existência de três linhagens evolutivas. A primeira linhagem

correspondeu à espécie *P. interior*; a segunda à *Petunia riograndensis* e indivíduos com morfologia correspondente à *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*, coletados a oeste do Lago Guaíba e da Lagoa dos Patos; e a terceira linhagem reuniu os grupos morfológicos correspondentes a *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*, *P. littoralis* e indivíduos com morfologia correspondente a *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*, coletados a leste do Lago Guaíba e da Lagoa dos Patos. Um estudo posterior realizado pelo nosso grupo de trabalho verificou que a espécie *P. bajeensis* (Ando & Hashimoto, 1998) constitui uma linhagem única e independente (Kriedt *et al.*, 2007).

Desta forma, populações que habitam a Planície Costeira do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e os morros graníticos de Porto Alegre pertencem a uma única linhagem genética, provavelmente muito jovem evolutivamente, diferente das demais. Devido ao provável curto tempo de separação entre as linhagens evolutivas encontradas por Longo (2005), os indivíduos pertencentes a cada uma delas não apresentam caracteres morfológicos suficientes para constituírem uma unidade taxonômica que possa ser considerada como uma espécie distinta. Em seu trabalho, Longo (2005) sugeriu, ainda, que estas populações fossem consideradas uma unidade taxonômica infra-específica, passando a ser chamada de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*.

As populações de *P. integrifolia* subsp. *depauperata* vivem sobre solos arenosos e possuem hábito procumbente, folhas estreitas, flores de coloração purpúrea e pequenas se comparadas a outras do grupo *integrifolia* (Figura 1). As flores são adaptadas para melitofilia (Figura 2) e o polinizador efetivo em populações do estado do Rio Grande do Sul é a abelha *Callonychium petuniae*, Andrenidae (Silva, 1994). A distribuição geográfica desta linhagem vai desde a Ilha de Santa Catarina (Florianópolis, SC) até a Barra do Chuí (RS).



**Figura 1:** Foto de indivíduo de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*, na qual se observa o hábito (procumbente) das plantas, bem como o substrato arenoso típico de ocorrência desta linhagem. (Fotografia: Aline M.C. Ramos)



**Figura 2:** Detalhe da flor de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*, onde se observa o formato do tubo da corola e a localização dos estames e estigma (inclusos) adaptados à melitofilia, com uma abelha em seu interior. (Fotografia: Josiane Cerveira)

### 1.3 A Planície Costeira do Rio Grande do Sul

O termo Província Costeira foi proposto por Villwock (1972) para designar um grupo de elementos geológicos característico da margem continental brasileira. Assim, a Província Costeira do Rio Grande do Sul é composta por dois grandes elementos geológicos (Villwock, 1984): o embasamento (Escudo sul-rio-grandense e Uruguaio) e a Bacia de Pelotas (espessa pilha sedimentar ancorada sobre as rochas do embasamento) delimitada ao norte pelo alto de Florianópolis e ao sul pelo alto de Polônio situado em território Uruguaio (Weschenfelder, 2005).

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul (PC) representa a parte superficial da Província Costeira do RS e é uma das planícies mais amplas e extensas do mundo, contendo cerca de 33.000 quilômetros quadrados de área plana e aproximadamente 600 quilômetros de extensão alongada na direção sudoeste-nordeste (Weschenfelder, 2005).

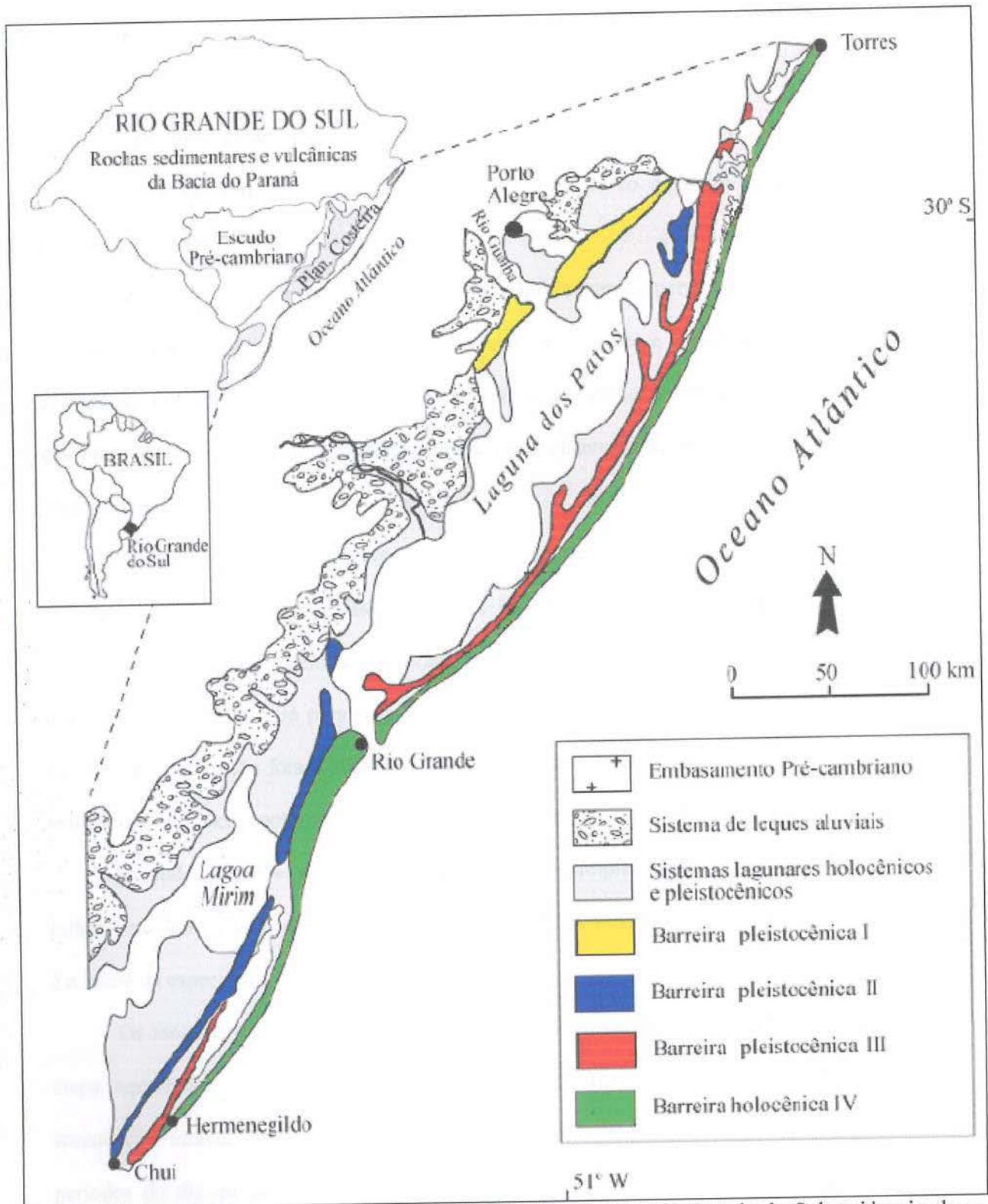
A costa do Rio Grande do Sul é formada por praias arenosas, retilíneas e predominantemente dominada por ondas. Apenas quatro irregularidades interrompem esta costa: O rio Mampituba, a desembocadura da Laguna de Tramandaí, a desembocadura da Laguna dos Patos e o Arroio Chuí (Calliari *et al.*, 2005).

As construções morfológica e sedimentológica da PC foram controladas, de forma fundamental, por uma sucessão de eventos transgressivos e regressivos do mar (Villwock *et al.*, 1987). Estes eventos são decorrentes de alternâncias cíclicas de períodos frios e quentes, que produziram os estágios glaciais e interglaciais durante o Pleistoceno e o Holoceno. Nestes períodos, havia fusão (estágios interglaciais) ou crescimento (estágios glaciais) das calotas de gelo e, conseqüente, subida (transgressão) ou descida (regressão) do nível do mar. Todas estas modificações ocasionaram a formação de quatro sistemas deposicionais transgressivos-regressivos do tipo laguna-barreira (Figura 3). Cada barreira se originou no limite atingido por uma transgressão e foi preservada devido à regressão da linha da costa (Villwock &

Tomazelli, 1995). Estas barreiras representam uma estrutura formada pelo acúmulo de areia que se estende longitudinalmente em relação à linha de costa (Dillenburg, 2005).

Há cerca de 500 mil anos antes do presente (ka A.P.), o nível do Oceano Atlântico Sul estava 70 metros abaixo do nível encontrado hoje e a linha de costa estava recuada 100 quilômetros para leste da atual. O primeiro evento transgressivo-regressivo pleistocênico originou o Sistema Laguna-Barreira I. Há cerca de 400 ka A.P. as temperaturas no planeta estavam em elevação, ocorrendo degelo nas regiões polares e montanhosas, o que fez o mar invadir toda a região de Porto Alegre, restando apenas as terras altas emersas, configurando-se como ilhas, eventualmente ligadas ao continente por restingas arenosas. O mar recuou e um segundo evento transgressivo-regressivo pleistocênico, ocorrido há cerca de 325 ka A.P., ocasionou a formação do Sistema Laguna-Barreira II. Novamente o nível do mar subiu, invadindo uma área consideravelmente menor que a anterior. Há cerca de 120 ka A.P., ocorreu uma nova transgressão marinha que originou o Sistema Laguna-Barreira III. Barreiras e restingas foram formadas permitindo o fechamento da Laguna dos Patos e da Lagoa Mirim. O Guaíba transformou-se em lago, perdendo seu contato com o mar. O Sistema Laguna-Barreira IV foi desenvolvido no Holoceno, há cerca de 5 ka A.P., em um último evento transgressivo-regressivo. Após este evento, uma restinga arenosa situada na região de Torres, ligou a PC com o litoral norte do País. Este caminho permitiu a migração mais recente da flora e fauna. A praia oceânica atual do RS faz parte desta barreira holocênica (Villwock & Tomazelli 1995; Menegat *et al.*, 1998; Weschenfelder, 2005).

Atualmente a PC está sujeita a impactos relacionados à introdução de plantas exóticas, o desenvolvimento de culturas agrícolas e pastagens, a contaminação por agrotóxicos e a intensa urbanização, causando a destruição das dunas costeiras (Oliveira *et al.*, 2005).



**Figura 3:** Mapa com o contexto geológico da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, evidenciando os quatro Sistemas Depositionais Laguna-Barreira (em cores) formados durante o Pleistoceno e Holoceno (modificado de Tomazelli *et al.*, 2000).

#### 1.4 Diversificação genética e estrutura populacional

A estrutura genética das populações e o estabelecimento de linhagens evolutivas independentes são fortemente influenciados pelo fluxo gênico dentro e entre populações (Schaal *et al.*, 1998).

Espécies de origem muito recente ou que apresentam dispersão a longas distâncias podem não apresentar coerência entre o relacionamento genético e a distribuição geográfica. Já espécies que apresentam linhagens genéticas distintas (grupos monofiléticos), na maioria das vezes, estiveram isoladas geograficamente e, conseqüentemente, tiveram seu fluxo gênico interrompido por certo período (Avice, 2000).

O tipo de polinização e a forma de dispersão das sementes podem afetar diretamente a estruturação genética das espécies de plantas. Em populações norte-americanas de *Pinus rigida* (espécie polinizada pelo vento) foram encontrados índices muito baixos de estruturação (Guries & Ledig, 1982). Já para populações de *Vouacapoua americana* (Fabaceae), os altos índices de estruturação foram atribuídos ao provável forrageamento em pequenas distâncias realizado pelos insetos polinizadores (Dutech *et al.*, 2002).

Segundo Schaall *et al.* (2003), a divisão de uma simples linhagem em duas é talvez o estágio mais interessante e crítico de divergência genética, uma vez que em alguns casos esse é o início da especiação.

Os mecanismos de isolamento em plantas podem ser classificados de acordo com a etapa reprodutiva em que atuam. Mecanismos pré-zigóticos impedem o cruzamento e a fecundação através de barreiras espaciais, isolamento temporal (floração em diferentes períodos do dia ou do ano), modificações nas estruturas florais (atração de polinizadores diferentes) ou por sistemas gaméticos de incompatibilidade (impedindo que o pólen fecunde o óvulo). Mecanismos pós-zigóticos atuam em um sistema de competição gamética ou

incompatibilidade. Se há formação de híbridos, mecanismos pós-zigóticos podem causar inviabilidade do embrião, esterilidade ou redução no sucesso adaptativo (Judd *et al.*, 1999). Os mecanismos pós-zigóticos são raramente utilizados na natureza, pois, geralmente, os pré-zigóticos conseguem, sozinhos, impedir a formação de híbridos interespecíficos. Dentre os mecanismos pré-zigóticos mais comuns em plantas está o isolamento por habitat, que ocorre entre espécies intimamente relacionadas (Raven *et al.*, 2001).

### 1.5 Filogeografia e conservação

Os estudos filogeográficos buscam evidências sobre a história da divergência entre populações, examinando as relações genealógicas das seqüências dentro de um contexto geográfico e procuram desvendar os processos atuais e históricos que influenciaram a distribuição geográfica das linhagens (Avise, 2000).

Estes estudos podem servir como uma ferramenta eficiente para esclarecer dúvidas que outras abordagens não foram capazes de resolver em nível específico. Processos de radiação adaptativa e especiação rápida podem ser detectados através de análises genéticas que demonstram pequenas diferenças indetectáveis através da morfologia (Baldwin *et al.*, 1990; Monasterio & Sarmiento, 1991).

No nível populacional, fornecem interpretações para vários cenários. Archie *et al.* (2008) conseguiram decifrar como os padrões de comportamento social influenciaram a estrutura de populações de elefantes africanos, associando dados genéticos a 33 anos de observações em campo. Em um estudo com leões marinhos do Pacífico Norte foi possível identificar quatro refúgios glaciais, com diversos eventos de isolamento seguidos de expansão, ocasionados pelos períodos de mudanças climáticas (Harlin-Cognato *et al.*, 2006).

A filogeografia em plantas permite acessar informações sobre a contribuição relativa da dispersão do pólen ou das sementes na estruturação das populações, e pode discriminar entre fluxo gênico e padrões causados por polimorfismos ancestrais (Schaal *et al.*, 1998). Inferências sobre o fluxo gênico em *Senecio halleri* puderam ser feitas, concluindo que havia cruzamentos pré-glaciais entre duas populações isoladas localizadas em *nunataks* (topo de montanhas cercadas por gelo) (Bettin *et al.*, 2007). Em um estudo com samambaias, Trewick *et al.* (2002) relacionaram três níveis de ploidia de *Asplenium ceterach* com a distribuição geográfica e concluíram que poliplóides tiveram vantagem na colonização e estabelecimento em habitats ao longo de mudanças ambientais em grande escala, por apresentarem seqüências ancestrais endêmicas na costa Sul do Mediterrâneo. Fineschi *et al.* (2002), através da análise de espaçadores intergênicos plastidiais, traçaram rotas de migração de cinco espécies de carvalho branco (*Quercus*) na Itália, correlacionando as diferentes regiões geográficas estudadas.

Outro papel importante desempenhado por estudos filogeográficos é sua utilização como uma ferramenta para estratégias de conservação, com o objetivo de manter o potencial evolutivo das espécies (Newton *et al.*, 1999). A diversidade genética é reconhecida como um componente fundamental da biodiversidade (Moritz & Faith, 1998) e estudos neste sentido fornecem informações sobre respeito populações que estejam fragmentadas, isoladas ou em declínio (Haig, 1998), além de serem valiosos para identificar linhagens genéticas com histórias evolutivas únicas (Byrne, 2003). A utilidade da filogeografia para a conservação pode ser verificada em um estudo com quatro populações de *Cordylanthus palmatus* (Scrophulariaceae) na Califórnia, no qual foi verificado que populações em áreas de preservação apresentaram uma variabilidade genética baixa se comparadas com outra população menor não incluída em programas de conservação (Fleishman *et al.*, 2001). Já em um estudo com *Acacia raddiana* (Fabaceae) é sugerida a conservação separada de doze

populações devido à alta diferenciação genética entre elas, sem cruzamentos entre populações distintas pelo risco de depressão exogâmica (diminuição do valor adaptativo de populações naturais pela introdução de genótipos adaptados a outras condições ambientais) (Shrestha *et al.*, 2002).

### 1.6 Marcadores Moleculares

A partir dos inúmeros avanços das técnicas em nível molecular, nas últimas décadas, dados moleculares estão se tornando uma ferramenta fundamental como fonte de informação biológica em diversas áreas (Avice, 2004). Desde então, informações provenientes do DNA organelar vêm sendo amplamente utilizadas em diversos estudos evolutivos (Okaura & Harada, 2002; Hwang *et al.*, 2003; Jakob & Blattner, 2006). As organelas têm características peculiares como a herança uniparental, a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas, se comparadas a um genoma nuclear (Wolfe *et al.*, 1987; Olmstead & Palmer, 1994). Desta forma, o DNA organelar tem tido um papel importante em estudos populacionais (Calcagnotto, 2001).

Em plantas, um número cada vez maior de trabalhos na área de sistemática taxonômica vem utilizando regiões codificadoras do DNA plastidial (cpDNA) para esclarecer problemas de classificação baseadas em dados morfológicos (Olmstead & Palmer, 1991; Olmstead *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2005). O cpDNA é herdado matematicamente na maioria das angiospermas (Palmer *et al.*, 1988) e isto confere uma vantagem em análises que avaliam o fluxo de sementes (Palmé *et al.*, 2003).

Mais recentemente, regiões não codificadoras do cpDNA (introns e espaçadores intergênicos) têm sido utilizados para estudos de evolução intra-específica em plantas, particularmente na estimativa de estrutura populacional (Hamilton *et al.*, 2003). As regiões

não codificadoras sofrem pouca ou nenhuma pressão seletiva e assim, fornecem informações suficientes para reconstruir eventos evolutivos recentes (Small *et al.*, 1998).

A região espaçadora entre os genes *trnH* e *psbA* foi caracterizada por Aldrich *et al.* (1988), em um dos primeiros estudos sobre esta região, como sendo rica em eventos de inserção/deleção (indels) e em seqüências repetidas de AT (adenina/timina) variáveis em comprimento. Alguns trabalhos têm demonstrado a utilidade deste espaçador para estudos filogenéticos. Sang *et al.* (1997) perceberam alta variabilidade desta região quando comparada com o gene *matK* e o espaçador *trnL-trnF*, atribuindo valor filogenético para este marcador. Em um estudo com espécies do gênero *Corythophora* (Lecythidaceae), Hamilton (1999) também comprovou a utilidade deste marcador. Chase *et al.* (2007) propuseram sua utilização na criação de um “código de barras genético” para as plantas terrestres. Porém Shaw *et al.* (2005) apontaram para problemas no seu uso em estudos filogenéticos, pois apesar da alta variação, o marcador é relativamente pequeno e pode não trazer informações suficientes. Estudos intra-específicos com o espaçador *trnH-psbA*, muitas vezes em conjunto com outros espaçadores plastidiais, têm comprovado sua utilidade na resposta a diferentes questões filogeográficas (Hamilton *et al.*, 2003; Ohi *et al.*, 2003; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Bettin *et al.*, 2007).

Dentre os numerosos marcadores plastidiais utilizados e descritos na literatura (Shaw *et al.*, 2005), destaca-se também o espaçador *trnS-trnG*, que exibiu variação em nível populacional, fornecendo informações a respeito de fluxo gênico em *Corythophora alta* (Lecythidaceae) (Hamilton, 1999). Este espaçador tem apresentado variabilidade satisfatória em diversos grupos de Angiospermas, em diferentes níveis taxonômicos. Xu *et al.* (2000) mostraram que o espaçador *trnS-trnG* é mais informativo em comparação a outras nove regiões não codificadoras do cpDNA para espécies intimamente relacionadas de *Glycine* (Fabaceae). Em um trabalho com *Moringa* (Moringaceae), este espaçador também apresentou

alta variabilidade intra-específica (Olson, 2002). Hamilton (1999) desenvolveu *primers* para o espaçador intergênico entre os genes *psbB* e *psbH* (*psbB-psbH*) para estudar a dinâmica populacional dentro de espécies de *Corythophora* (Lecythidaceae), mas Xu *et al.* (2000) mostraram que esta região é menos informativa que *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *trnT-trnL* para espécies de *Glycine* (Fabaceae).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar a variabilidade genética da linhagem *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* ao longo de toda sua distribuição, utilizando marcadores uniparentais do genoma plastidial.

### **2.2 Objetivos específicos**

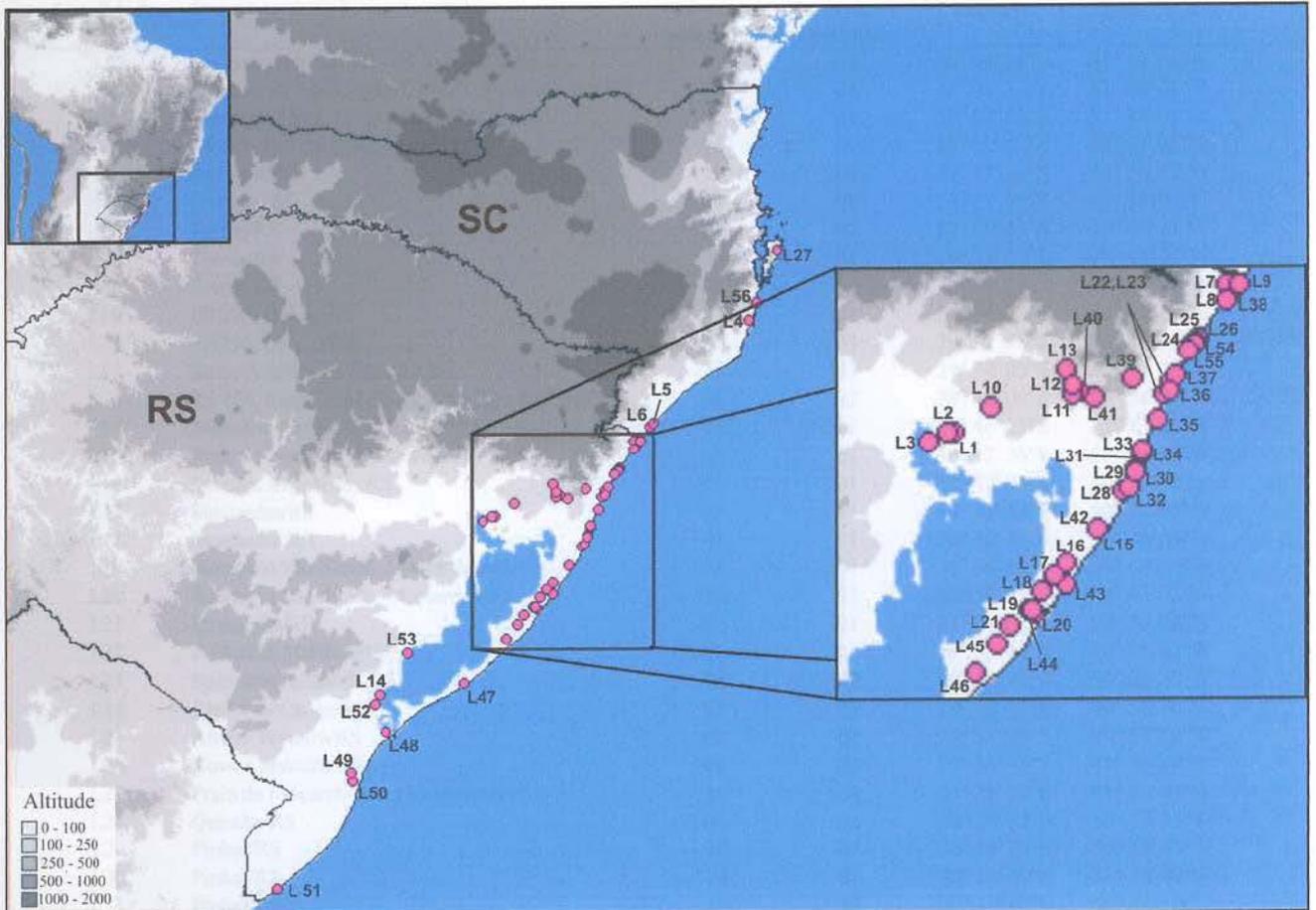
1. Avaliar a variabilidade de seqüências espaçadoras plastidiais intergênicas *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *psbB-psbH* de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*;
2. Analisar a dinâmica populacional ao longo de toda a distribuição da espécie;
3. Correlacionar padrões de estruturação genética das populações com a história de formação da área de estudo.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Coletas

O material analisado foi obtido diretamente através de coletas em todo litoral do Rio Grande do Sul e em parte do litoral de Santa Catarina. Ao todo, foram coletadas folhas jovens de 1574 indivíduos (incluindo amostras de *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*) sem danificá-los. Estas folhas foram imediatamente acondicionadas em sílica gel para secagem. De cada ponto de coleta foi confeccionada, pelo menos, uma exsicata, depositada no Herbário BHCB, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Minas Gerais. As informações de coordenadas geográficas foram obtidas através do sistema de posicionamento global (GPS). As exsicatas foram determinadas pelo taxonomista Dr. João Renato Stehmann, especialista no grupo.

Foram analisados 190 indivíduos de *P. integrifolia* subsp. *depauperata* distribuídos em 56 localidades (Figura 4). As localidades foram escolhidas de forma a cobrir toda a área de ocorrência desta linhagem. Localidades com apenas um indivíduo amostrado também foram incluídas, obtendo um maior número pontos. As informações sobre os locais de coletas são apresentadas na Tabela 1.



**Figura 4:** Mapa indicando as 56 localidades de coleta onde foram obtidos os indivíduos de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* analisados neste estudo. (Construído com pontos georreferenciados em um perfil de altitude, utilizando o programa DIVA ([www.diva-gis.org](http://www.diva-gis.org))).

L1	Monte Alegre
L2	Monte Alegre
L3	Monte Alegre
L4	Monte Alegre
L5	Monte Alegre
L6	Monte Alegre
L7	Monte Alegre
L8	Monte Alegre
L9	Monte Alegre
L10	Monte Alegre
L11	Monte Alegre
L12	Monte Alegre
L13	Monte Alegre
L14	Monte Alegre
L15	Monte Alegre
L16	Monte Alegre
L17	Monte Alegre
L18	Monte Alegre
L19	Monte Alegre
L20	Monte Alegre
L21	Monte Alegre
L22, L23	Monte Alegre
L24	Monte Alegre
L25	Monte Alegre
L26	Monte Alegre
L27	Monte Alegre
L28	Monte Alegre
L29	Monte Alegre
L30	Monte Alegre
L31	Monte Alegre
L32	Monte Alegre
L33	Monte Alegre
L34	Monte Alegre
L35	Monte Alegre
L36	Monte Alegre
L37	Monte Alegre
L38	Monte Alegre
L39	Monte Alegre
L40	Monte Alegre
L41	Monte Alegre
L42	Monte Alegre
L43	Monte Alegre
L44	Monte Alegre
L45	Monte Alegre
L46	Monte Alegre
L47	Monte Alegre
L48	Monte Alegre
L49	Monte Alegre
L50	Monte Alegre
L51	Monte Alegre
L52	Monte Alegre
L53	Monte Alegre
L54	Monte Alegre
L55	Monte Alegre
L56	Monte Alegre
Total	56

**Tabela 1:** Informações sobre os pontos de coleta

Localidade	Local de coleta	Nº de indivíduos coletados	Nº de indivíduos analisados	Latitude	Longitude
L1	Campus do Vale-UFRGS, Porto Alegre/RS	07	02	30° 04' 29"S	51° 07' 04"W
L2	Campus da Agronomia-UFRGS, Porto Alegre/RS	05	01	30° 04' 13"S	51° 08' 31"W
L3	Morro do Osso, Porto Alegre/RS	02	01	30° 07' 20"S	51° 14' 05"W
L4	BR101, Imbituba/SC	04	01	28° 12' 07"S	48° 41' 26"W
L5	Sombrio/SC	10	04	29° 11' 06"S	49° 36' 49"W
L6	Sombrio/SC	04	02	29° 12' 39"S	49° 38' 09"W
L7	Torres/RS	02	02	29° 20' 43"S	49° 47' 17"W
L8	Torres/RS	02	01	29° 22' 52"S	49° 45' 57"W
L9	Torres/RS	02	02	29° 21' 32"S	49° 44' 09"W
L10	BR290, Osório/RS	14	01	29° 56' 34"S	50° 55' 37"W
L11	BR290, Osório/RS	05	03	29° 52' 58"S	50° 32' 06"W
L12	Santo Antônio da Patrulha/RS	03	03	29° 50' 05"S	50° 32' 24"W
L13	RS 474, Santo Antônio da Patrulha - Rolante/RS	05	02	29° 46' 09"S	50° 34' 24"W
L14	Balneário Laranjal, Pelotas/RS	01	01	31° 46' 25"S	52° 13' 31"W
L15	Praia de Bacupari, Mostardas/RS	01	01	30° 32' 36"S	50° 24' 46"W
L16	Solidão, Mostardas/RS	01	01	30° 42' 09"S	50° 33' 41"W
L17	Mostardas/RS	01	01	30° 45' 53"S	50° 37' 35"W
L18	Mostardas/RS	01	01	30° 50' 36"S	50° 40' 54"W
L19	Balneário São Simão, Mostardas/RS	01	01	30° 56' 05"S	50° 44' 34"W
L20	Balneário São Simão, Mostardas/RS	01	01	30° 56' 52"S	50° 43' 33"W
L21	Mostardas/RS	01	01	31° 01' 08"S	50° 50' 28"W
L22	Balneário Mariluz/RS	01	01	29° 53' 18"S	50° 05' 47"W
L23	Balneário Atlântida/RS	02	02	29° 49' 42"S	50° 03' 60"W
L24	Capão da Canoa/RS	01	01	29° 40' 41"S	49° 58' 30"W
L25	Arroio Teixeira/RS	01	01	29° 38' 29"S	49° 57' 50"W
L26	Novo Curumim/RS	01	01	29° 36' 45"S	49° 56' 04"W
L27	Praia de Moçambique, Florianópolis/SC	30	04	27° 31' 22"S	48° 25' 01"W
L28	Quintão/RS	01	01	30° 21' 32"S	50° 17' 35"W
L29	Pinhal/RS	16	01	30° 14' 56"S	50° 13' 53"W
L30	Pinhal/RS	24	01	30° 14' 49"S	50° 13' 49"W
L31	Pinhal/RS	10	10	30° 15' 42"S	50° 14' 10"W
L32	Quintão/RS	24	02	30° 20' 27"S	50° 16' 04"W
L33	Cidreira/RS	24	02	30° 10' 27"S	50° 12' 05"W
L34	Cidreira/RS	13	01	30° 09' 14"S	50° 11' 39"W
L35	Imbé/RS	29	01	30° 00' 06"S	50° 07' 50"W
L36	Atlântida Sul/RS	04	01	29° 52' 03"S	50° 04' 07"W
L37	Xangri-lá/RS	28	01	29° 47' 30"S	50° 01' 46"W
L38	Dom Pedro de Alcântara/RS	04	04	29° 25' 55"S	49° 47' 49"W
L39	Beira da Lagoa da Pinguela, Osório/RS	75	04	29° 48' 48"S	50° 14' 34"W
L40	Osório/RS,	6	06	29° 52' 41"S	50° 30' 47"W
L41	Santo Antonio da Patrulha/RS	10	09	29° 54' 19"S	50° 25' 34"W
L42	Mostardas/RS	25	09	30° 32' 27"S	50° 25' 10"W
L43	Mostardas/RS	30	11	30° 49' 24"S	50° 33' 49"W
L44	Mostardas/RS	113	11	30° 56' 15"S	50° 44' 22"W
L45	Balneário Mostardense, Mostardas/RS	101	08	31° 06' 33"S	50° 54' 04"W
L46	Praia do Farol, Tavares/RS	28	11	31° 14' 16"S	51° 00' 34"W
L47	Balneário Mostardense, Mostardas/RS	14	09	31° 40' 00"S	51° 25' 33"W
L48	Rio Grande/RS	33	06	32° 07' 31"S	52° 10' 27"W
L49	Rio Grande/RS	26	01	32° 31' 00"S	52° 29' 58"W
L50	Rio Grande/RS, próximo ao Taim	50	03	32° 36' 17"S	52° 29' 30"W
L51	Hermenegildo, Santa Vitória do Palmar/RS	40	05	33° 38' 13"S	53° 13' 21"W
L52	Rio Grande/RS	38	07	31° 52' 01"S	52° 16' 17"W
L53	Praia do Laranjal, Pelotas/RS	23	09	31° 22' 36"S	51° 57' 11"W
L54	Curumim/RS	12	06	29° 37' 31"S	49° 56' 08"W
L55	Curumim/RS	17	05	29° 38' 35"S	49° 56' 52"W
L56	Garopaba/SC	26	02	28° 01' 17"S	48° 37' 17"W
Total		953	190		

### 3.2 Extração de DNA

As folhas desidratadas em sílica gel foram pulverizadas com nitrogênio líquido e a extração de DNA total do material foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por Roy *et al.* (1992) adaptada para amostras de *Petunia*:

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

Os produtos de extração foram testados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado GelRed™ e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Para a quantificação, os produtos foram comparados com um DNA padrão (λ DNA, Invitrogen).

### 3.3 Reações de amplificação e seqüenciamento

O DNA das amostras foi amplificado pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Mullis *et al.*, 1986), em termociclador automático. Os marcadores moleculares utilizados foram os espaçadores intergênicos plastidiais (cpDNA) *trnH-psbA* e *trnS-trnS*. Seqüências do espaçador *psbB-psbH* também foram obtidas, porém esta análise revelou baixa variabilidade ou mesmo inexistência de polimorfismos entre as amostras. As condições para a amplificação, bem como as seqüências dos *primers* estão descritas nos Quadros 1 e 2.

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

<u>Reação</u>	
Tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl)	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Primer 1 ( <i>psbA</i> F)	0,2 µM
Primer 2 ( <i>trnH</i> R)	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 seg para desnaturação
	{ 58°C por 1 min para anelamento
	{ 72°C por 45 seg para alongamento
	72°C por 10 min para extensão final
<u>Seqüências dos <i>primers</i> para PCR e seqüenciamento</u>	
Primer 1 ( <i>psbA</i> F)	5' GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C 3'
Primer 2 ( <i>trnH</i> R)	5' CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC 3'

**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 <sub>2</sub>	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>		
	94°C por 5 min para desnaturação inicial	
40 ciclos	{	94°C por 1 min para desnaturação
		52°C por 1 min para anelamento
		72°C por 45 seg para alongamento
		72°C por 10 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'	

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado GelRed™ e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.4 Precipitação com PEG

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando polietilenoglicol (PEG) 20% segundo o protocolo de Dunn & 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 H<sub>2</sub>O ultra-pura estéril e incubação à temperatura ambiente por 12 horas.

### 3.5 Seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA amplificado por PCR foi realizado em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (*Amersham Biosciences - GE Health Care*), seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamic<sup>TM</sup>ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente. As condições da reação de seqüenciamento são detalhadas no Quadro 3.

**Quadro 3:** Condições das reações de seqüenciamento.

Reação	Condições de amplificação	
<i>DYEnamic<sup>TM</sup>ET terminator sequencing premix</i>	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	Até 10 µl	

As reações foram purificadas diretamente nas placas destinadas ao seqüenciador, de acordo com o seguinte protocolo:

- ⇒ 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.

### 3.6 Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram verificadas nos cromatogramas com o auxílio do programa Chromas 2.33 (disponível no *site* [www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)) e alinhadas no programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997).

Estatísticas descritivas da variabilidade genética como diversidades nucleotídica e haplotípica (Nei, 1987), foram calculadas pelo pacote Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Para inferir eventos como expansão populacional e efeito de gargalo de garrafa foram calculados índices de neutralidade  $D$  de Tajima (Tajima, 1989),  $F_s$  de Fu (Fu, 1996) e a *pairwise mismatch distribution* (distribuição do número de diferenças observadas entre todos os haplótipos tomados par a par; Rogers & Harpending, 1992) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de *bootstrap* (programa Arlequin 3.11).

Os haplótipos foram gerados através do programa DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). A análise de *network* (rede de haplótipos) para os haplótipos amostrados foi realizada no programa Network 4.5 (disponível no *site* <http://www.fluxus-engineering.com>) através do método de *median joining* (Bandelt *et al.*, 1999). Para a geração dos haplótipos, o alinhamento das seqüências foi modificado, pois o programa utilizado considera cada posição nucleotídica alterada como um evento independente. As microinversões e as duplicações de

mais de 1 pb foram codificadas como um evento mutacional. O alinhamento não “codificado” apresentou o mesmo número e relacionamento entre os haplótipos, porém, no *network* gerado, o número de passos mutacionais foi superestimado e esta análise foi então desconsiderada.

A diferenciação genética entre as populações foi estimada através da análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) no intervalo de confiança de 95% após 1000 permutações, onde foi calculado o índice de fixação  $\Phi_{ST}$  (programa Arlequin 3.11).

Para definir grupos de populações que são geograficamente homogêneos e que se diferenciam geneticamente uns dos outros, foi utilizado o programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002) e, como subproduto desta análise, podemos inferir também possíveis barreiras ao fluxo gênico entre grupos. Foram testados os cenários para dois, três, quatro e cinco grupos e para cada teste os índices de fixação relacionados foram calculados ( $\Phi_{CT}$  = índice de variação entre os grupos,  $\Phi_{ST}$  = índice de variação intrapopulacional e  $\Phi_{SC}$  = índice de variação dentro das populações). A escolha do cenário mais provável foi feita levando-se em conta a relação entre os índices (maiores detalhes em Resultados) e a coerência com outros dados.

Os padrões de distribuição espacial da diversidade genética foram avaliados através da realização do Teste de Mantel (Mantel, 1967) e do teste de Autocorrelação Espacial. Ambos os testes foram conduzidos com 1000 replicações no programa *Alleles In Space* (AIS) 1.0 (Miller, 2005).

## 4. Resultados

### 4.1 Caracterização das seqüências

As análises para os 190 indivíduos (referido de agora em diante como conjunto completo de dados) foram conduzidas com os marcadores plastidiais concatenados. O seqüenciamento gerou um alinhamento de 1109 pares de base (pb), sendo 452 pb (1-452) correspondentes à amplificação do espaçador intergênico plastidial *trnH-psbA* e 657 pb (453-1109) correspondentes à amplificação do espaçador intergênico plastidial *trnS-trnG*.

Foram identificados 13 polimorfismos (8 na região do espaçador *trnH-psbA* e 5 na região do espaçador *trnS-trnG*), sendo duas duplicações, 11 substituições (4 transições e 7 transversões) e uma micro inversão de 29 pb. Foram inferidos 16 haplótipos pelo programa DnaSP. A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) verificada foi de 0.001427 com desvio padrão de  $\pm 0.000955$  e a diversidade haplotípica (Hd) foi de  $0.7327 \pm 0.0275$ . Quando os marcadores foram analisados separadamente, os valores de  $\pi$  e Hd foram, respectivamente,  $0.001536 \pm 0.001156$  e  $0.6286 \pm 0.0248$  para *trnS-trnG* e  $0.001262 \pm 0.001171$  e  $0.4074 \pm 0.0421$  para *trnH-psbA*. O conteúdo de GC (guaninas e citosinas) para os marcadores concatenados foi de 28,77%. As principais características das seqüências analisadas, incluindo os valores calculados para cada localidade, estão expostas na Tabela 2. Os haplótipos, suas respectivas freqüências e as localidades nas quais foram encontrados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2:** Principais características das seqüências analisadas.

Localidade	Nº de indivíduos	Nº de sítios polimórficos*	Nº de haplótipos*	Diversidade nucleotídica* (desvio padrão)	Diversidade haplotípica* (desvio padrão)
L1	02	0	1	0	0
L2	01	-	1	-	-
L3	01	-	1	-	-
L4	01	-	1	-	-
L5	04	0	1	0	0
L6	02	0	1	0	0
L7	02	0	1	0	0
L8	01	-	1	-	-
L9	02	0	1	0	0
L10	01	-	1	-	-
L11	03	0	1	0	0
L12	03	0	1	0	0
L13	02	1	2	0.000936 ( $\pm$ 0.001324)	1 ( $\pm$ 0,5)
L14	01	-	1	-	-
L15	01	-	1	-	-
L16	01	-	1	-	-
L17	01	-	1	-	-
L18	01	-	1	-	-
L19	01	-	1	-	-
L20	01	-	1	-	-
L21	01	-	1	-	-
L22	01	-	1	-	-
L23	02	1	2	0.000936 ( $\pm$ 0.001324)	1 ( $\pm$ 0,5)
L24	01	-	1	-	-
L25	01	-	1	-	-
L26	01	-	1	-	-
L27	04	0	1	0	0
L28	01	-	1	-	-
L29	01	-	1	-	-
L30	01	-	1	-	-
L31	10	0	1	0	0
L32	02	0	1	0	0
L33	02	0	1	0	0
L34	01	-	1	-	-
L35	01	-	1	-	-
L36	01	-	1	-	-
L37	01	-	1	-	-
L38	04	0	1	0	0
L39	04	1	2	0.000624 ( $\pm$ 0.000700)	0.6667 ( $\pm$ 0.2041)
L40	06	1	2	0.000499 ( $\pm$ 0.000549)	0.5333 ( $\pm$ 0.1721)
L41	09	2	3	0.000988 ( $\pm$ 0.000816)	0.7222 ( $\pm$ 0.0967)
L42	09	1	2	0.000473 ( $\pm$ 0.000500)	0.5000 ( $\pm$ 0.1283)
L43	11	0	1	0	0
L44	11	1	2	0.000172 ( $\pm$ 0.000270)	0.1818 ( $\pm$ 0.1436)
L45	08	0	1	0	0
L46	11	1	2	0.000408 ( $\pm$ 0.000445)	0.4364 ( $\pm$ 0.1333)
L47	09	1	2	0.000208 ( $\pm$ 0.000306)	0.2222 ( $\pm$ 0.1662)
L48	06	1	2	0.000312 ( $\pm$ 0.000411)	0.3333 ( $\pm$ 0.2152)
L49	01	-	1	-	-
L50	03	1	2	0.000624 ( $\pm$ 0.000779)	0.6667 ( $\pm$ 0.3143)
L51	05	0	1	0	0
L52	07	1	2	0.000535 ( $\pm$ 0.000559)	0.5714 ( $\pm$ 0.1195)
L53	09	0	1	0	0
L54	06	1	2	0.000562 ( $\pm$ 0.000592)	0.6000 ( $\pm$ 0.1291)
L55	05	1	2	0.000562 ( $\pm$ 0.000615)	0.6000 ( $\pm$ 0.1753)
L56	02	0	1	0	0
<b>Total</b>	<b>190</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>0.001427 (<math>\pm</math> 0.000955)</b>	<b>0.7327 (<math>\pm</math> 0.0275)</b>

\* (-) índices não calculados por tratar-se de localidades com apenas uma amostra.

**Tabela 3:** Haplótipos encontrados nas localidades amostradas.

Haplótipos	Posição Nucleotídica														N° observado	Localidades amostradas
	<i>trnH-psbA</i>							<i>trnS-trnG</i>								
	5 9	6 7	1 5	1 3	2 5	2 6	3 1	3 7	7 0	7 8	8 1	8 4	8 5	9 4		
H1	A	A	G	G	C	C	-	-	C	C	G	-	G	25	L1; L11-13; L22; L23; L39-41; L54; L55	
H2	G	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	-	.	18	L2; L23; L24; L26; L35-37; L39; L41; L54; L55	
H3	G	.	.	.	.	.	-	-	A	.	.	-	.	28	L4-6; L8; L9; L25; L27; L38; L42; L44; L56	
H4	G	.	.	.	.	T	*	-	A	.	.	-	.	2	L7	
H5	G	T	.	.	.	.	-	-	.	.	.	-	.	1	L10	
H6	.	.	.	A	.	.	-	-	.	.	.	-	.	1	L13	
H7	G	.	.	.	.	.	-	-	A	.	T	-	.	89	L14; L15; L17; L19; L20; L28-34; L43-48; L50-53	
H8	G	.	.	A	A	.	-	-	A	.	T	-	.	1	L16	
H9	G	.	.	.	A	.	-	-	A	.	T	-	.	1	L18	
H10	G	.	.	A	.	.	-	-	A	.	T	-	.	1	L21	
H11	.	.	T	.	.	.	-	-	.	.	.	-	.	6	L40 e L41	
H12	G	.	.	.	.	.	-	-	A	.	.	-	T	3	L42	
H13	G	.	.	.	.	.	-	-	A	.	T	§	.	4	L46 e L47	
H14	G	.	.	.	.	.	-	†	A	.	T	-	.	8	L48 e L52	
H15	G	.	.	.	.	.	-	-	A	.	T	-	A	1	L49	
H16	G	.	.	.	.	.	-	-	A	G	T	-	.	1	L50	

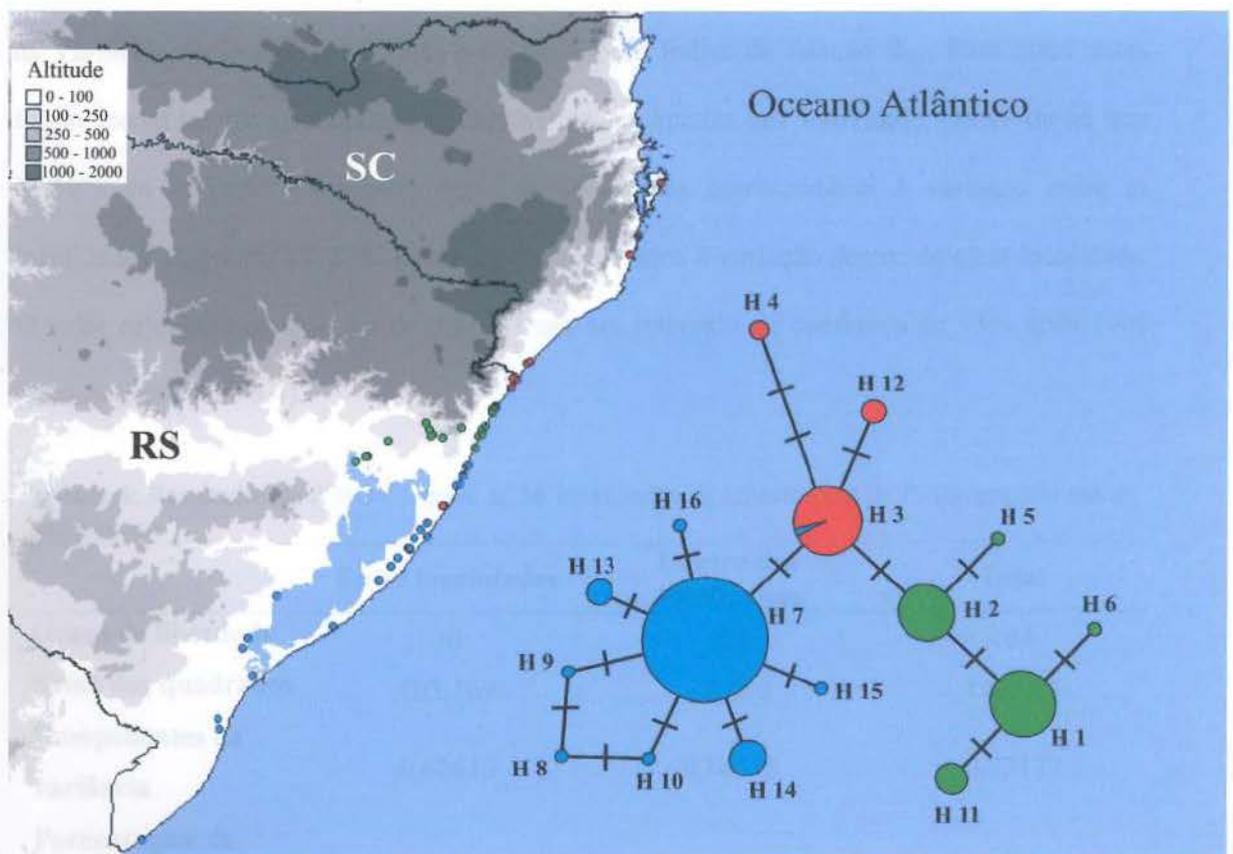
\* duplicação 33 pb (AAAAAAGTCTATGTAAGTAAAATACTAGTAAAT)

† micro inversão 29 pb (ATCATTTTCTGTCTATCAAGAGGGTGC)

§ duplicação 8 pb (ATAAAATA)

## 4.2 Relações evolutivas na amostra

O relacionamento entre as seqüências, inferido através do programa Network 4.5, está representado na Figura 5. Os códigos H1, H2,... Hn, representados na *network*, são correspondentes aos códigos da Tabela 3. Através da confecção da *network* foi possível verificar a existência de três grupos geográficos (Norte, Centro e Sul) separados um do outro por um passo mutacional. A *network* não apresenta estruturação linear entre os haplótipos, sendo as localidades da região Sul e da região Central diretamente relacionadas com as localidades da região Norte



**Figura 5:** *Median-joining network* ( $\epsilon=0$ ) construído a partir das seqüências concatenadas dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. O tamanho dos círculos corresponde à freqüência dos haplótipos. Os sítios polimórficos que separam as seqüências estão representados pelas linhas transversais. As cores dos haplótipos na *network* correspondem à cor da localidade onde foram amostradas assinaladas no mapa. (Construído com pontos georreferenciados em um perfil de altitude, utilizando o programa DIVA ([www.diva-gis.org](http://www.diva-gis.org))).

Dentre as características da rede de haplótipos que mais chamaram a atenção, pode-se destacar o relacionamento entre as localidades que vão de Cidreira até a Praia do Hermenegildo (L14, L15, L17, L19, L20, L28, L29, L30, L31, L32, L33, L34, L43, L44, L45, L46, L47, L48, L50, L51, L52 e L53). Nestas localidades foi encontrado um haplótipo central bastante freqüente (H7, n=89) relacionado a outros menos freqüentes encontrados em algumas das mesmas localidades.

As localidades L42 e L44 (Mostardas), embora estejam na parte Sul da amostragem, mostraram-se geneticamente relacionadas com as localidades do Norte estando presente nelas somente os haplótipos H3 e H12.

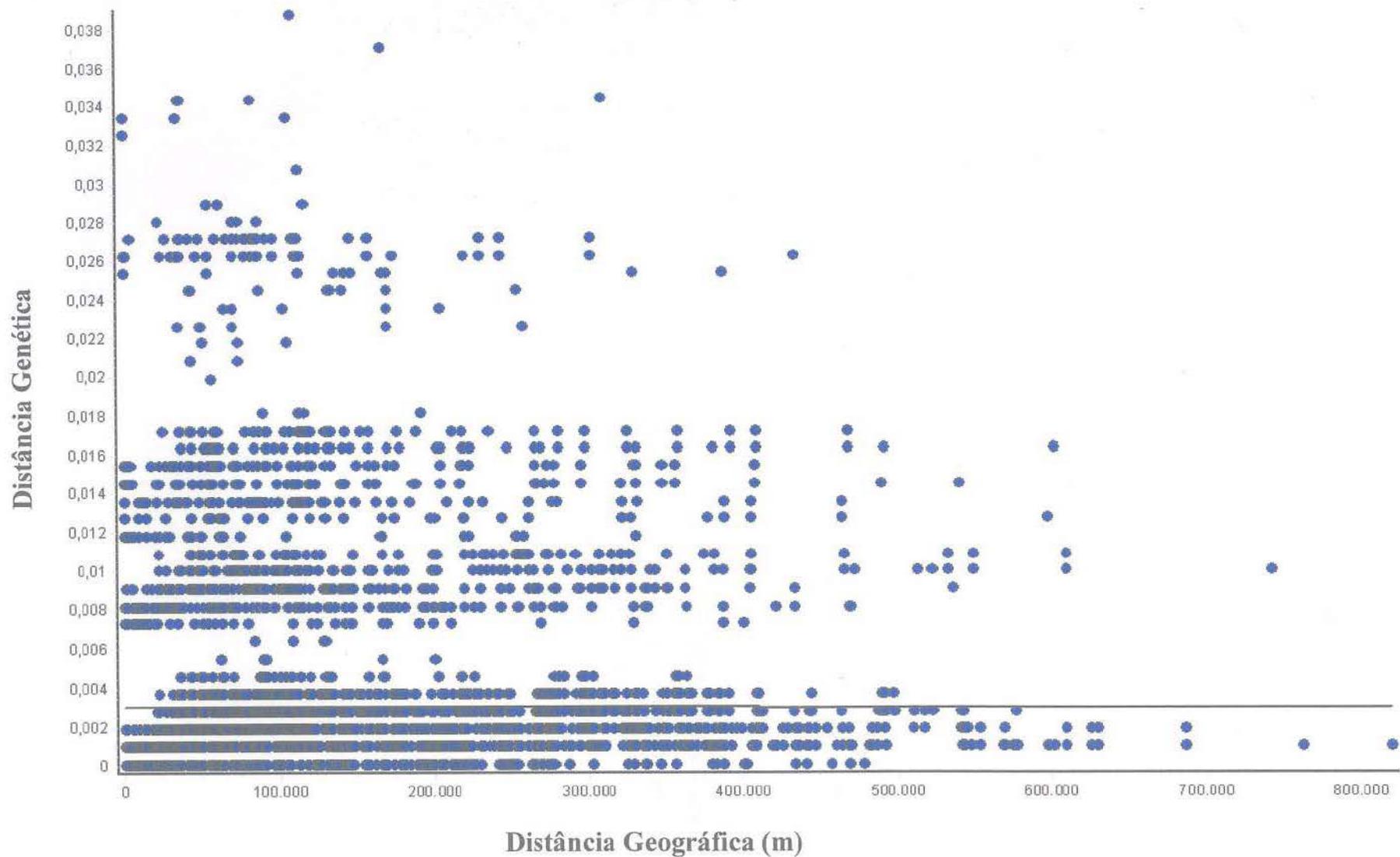
O grau de estruturação genética das localidades pôde ser verificado através da Análise da Variância Molecular (AMOVA) e do cálculo do índice de fixação  $\Phi_{ST}$ . Para estes testes foram excluídas as localidades que apresentavam apenas um indivíduo. Observou-se que 81,18% da variação encontrada entre as seqüências correspondem à variação entre as localidades, enquanto 18,82% da variação são devidos à variação dentro de cada localidade. O valor calculado de  $\Phi_{ST}$  foi de 0,81181 em um intervalo de confiança de 95% após 1000 permutações (Tabela 4).

**Tabela 4:** Resultados da AMOVA entre as 56 localidades de amostragem de *P. integrifolia* subsp. *depauperata*

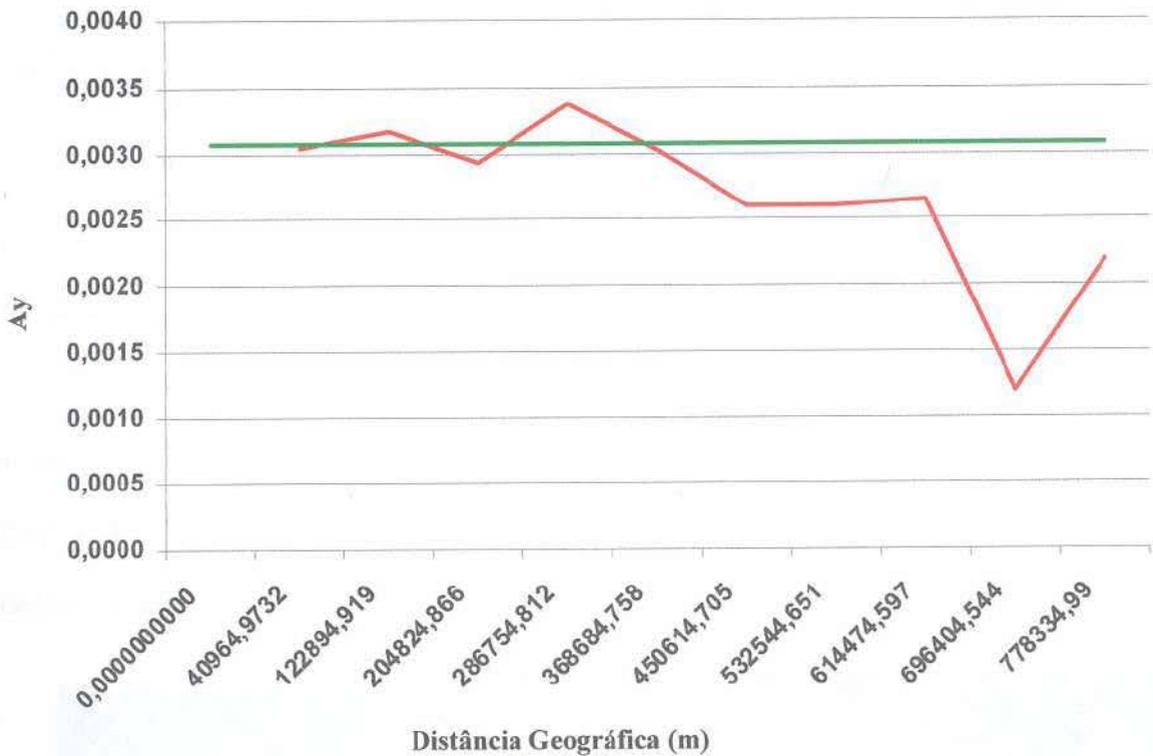
	Entre localidades	Dentro das localidades	Total
<b>Graus de liberdade</b>	30	134	164
<b>Soma dos quadrados</b>	103,169	19,450	122,618
<b>Componentes da variância</b>	0,62613	0,14515	0,77127
<b>Porcentagem de variação</b>	81,18	18,82	
<b>Índice <math>\Phi_{ST}</math> : 0,81181</b>			

Valor P < 0,001 significativo

Os testes de Mantel e Autocorrelação Espacial não apresentaram correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas. Os resultados obtidos para o teste de Autocorrelação Espacial foram:  $V = 0,0007$  (Valor  $P > 0,05$ , não significativo), para o teste de Mantel foram:  $r = -0,0034$  (Valor  $P > 0,05$ , não significativo). Estes resultados não indicaram um padrão de isolamento por distância. Os gráficos de ambos os testes são apresentados, respectivamente, nas Figuras 6 e 7.



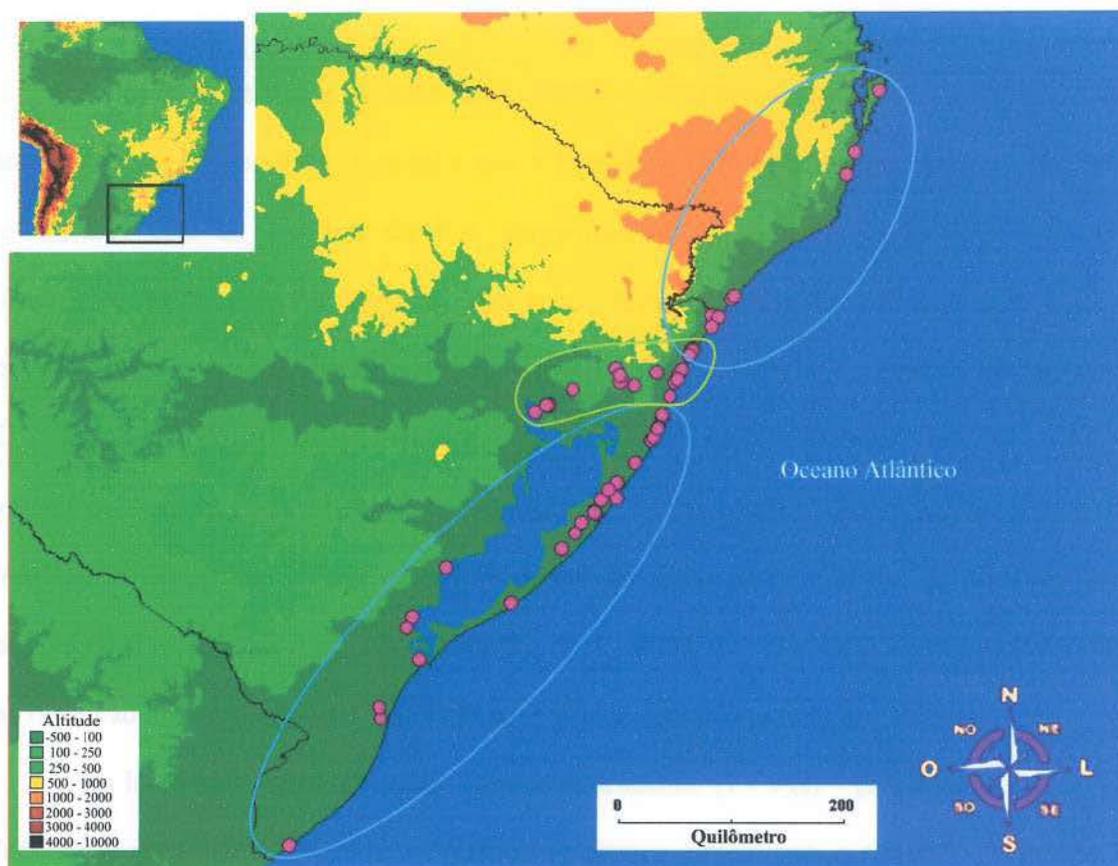
**Figura 6:** Gráfico dos resultados do Teste de Mantel, coeficiente de correlação ( $r = -0,0034$ ) (Valor  $P > 0,05$ , não significativo).



**Figura 7:** Gráfico da Análise de Autocorrelação Espacial. Ay= média da distância genética entre pares de indivíduos. A linha paralela ao eixo “x” (verde) indica o valor médio de Ay para o conjunto de dados (= 0,003064). O teste não foi estatisticamente significativo ( $P > 0,05$ ).

### 4.3 Detecção de grupos geográficos

A fim de detectar grupos geograficamente homogêneos e que se diferenciam geneticamente uns dos outros, foram feitas análises no programa SAMOVA 1.0. Esse programa agrupa as populações de acordo com sua similaridade genética e localização geográfica e a escolha do número de grupos é feita *a priori*. Primeiramente foi testada a hipótese da existência de dois grupos, que separou as localidades da região de Porto Alegre e arredores das demais (Figura 8). A AMOVA comparando estes dois grupos apresentou um valor de  $\Phi_{CT}$  de 0,71060. Dentre a variação observada, 71,06% se deve à variação entre grupos; 19,76% correspondem à variação entre as localidades dentro dos grupos e 9,18% dentro das localidades (Tabela 5).



**Figura 8:** Mapa indicando a localização dos grupos geográficos inferidos pelo programa SAMOVA 1.0 para a hipótese da existência de dois grupos (elipses azuis correspondem a um grupo e elipse verde corresponde a outro grupo). A área de sobreposição de elipses corresponde às localidades L24, L26, L54, L55 (pertencentes à elipse verde) e L25 (pertencente à elipse azul). (Construído com pontos georreferenciados em um perfil de altitude, utilizando o programa DIVA ([www.diva-gis.org](http://www.diva-gis.org))).

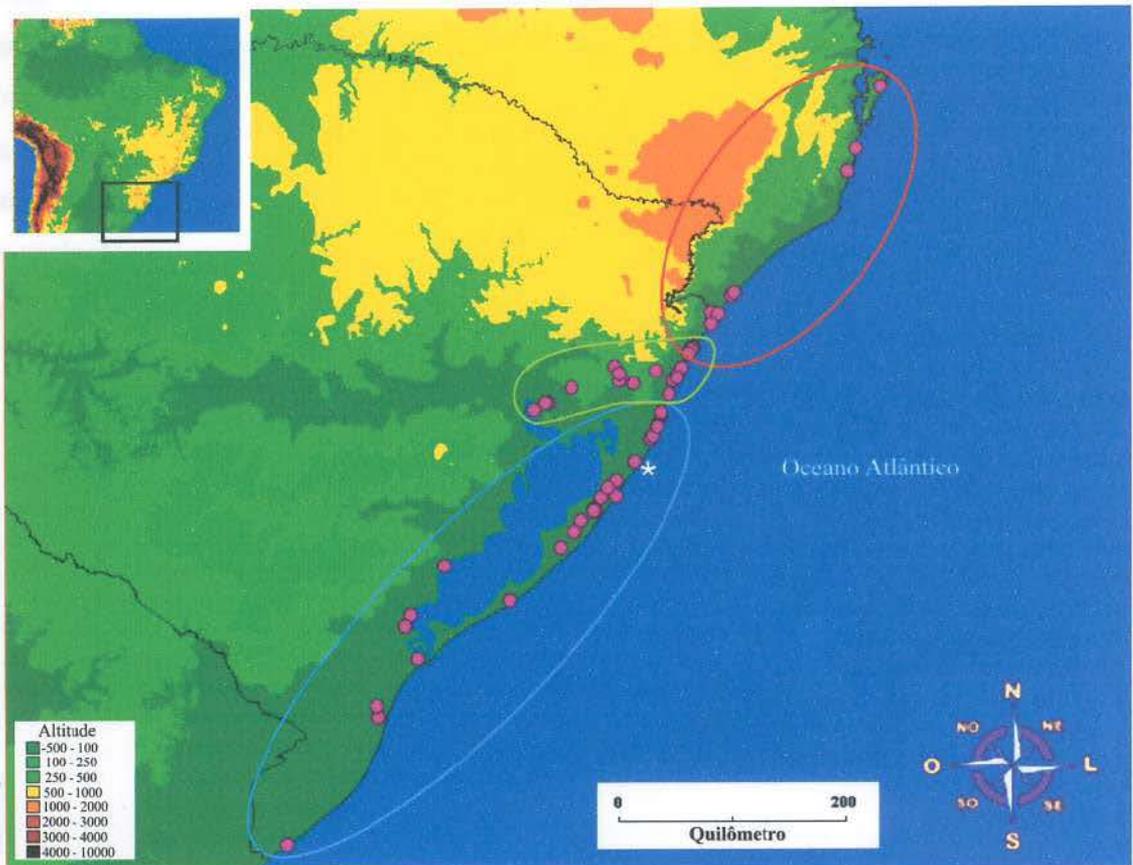
**Tabela 5:** Resultados da AMOVA para a hipótese de dois grupos inferidos pelo programa SAMOVA.

	Entre grupos	Entre localidades dentro dos grupos	Dentro das localidades	Total
<b>Graus de liberdade</b>	1	54	159	214
<b>Soma dos quadrados</b>	83,349	60,336	19,450	163,135
<b>Componentes da variância</b>	0,94691	19,450	0,12232	1,33255
<b>Porcentagem de variação</b>	71,06	19,76	9,18	
<b>Índice <math>\Phi_{CT}</math> : 0,71060</b>				
Valor P < 0,001 significativo				

A seguir foi testada a hipótese da existência de três grupos, que separou as localidades amostradas em regiões Norte, Central e Sul. A localidade L42, embora esteja geograficamente relacionada com as amostras do Sul, apresentou maior similaridade genética com as localidades do Norte sendo incluída neste grupo. Este agrupamento está de acordo com a *network* vista anteriormente, encontrando-se uma clara separação geográfica na Planície Costeira do RS (Figura 9). O índice  $\Phi_{CT}$  calculado para os três grupos foi de 0,77198. A variação observada entre os grupos foi de 77,20%; 11,92% correspondem à variação entre as localidades dentro dos grupos e 10,88% dentro das localidades (Tabela 6). Análises que consideravam a existência de quatro e cinco grupos resultaram em valores de  $\Phi_{CT}$  semelhantes ao observado para três grupos, indicando uma estabilidade dos valores dos índices.

Os índices de fixação têm uma relação dependente:  $(1 - \Phi_{ST}) = (1 - \Phi_{SC}) (1 - \Phi_{CT})$ . O índice  $\Phi_{ST}$  parece ser indiferente ao número de grupos, porém com o aumento de grupos a variação entre as populações dentro dos grupos ( $\Phi_{SC}$ ) diminui (já que o número de populações presentes em cada grupo é reduzido) e conseqüentemente a diversidade entre os grupos ( $\Phi_{CT}$ )

aumenta (Dupanloup *et al.*, 2002). Assim, a existência de três grupos foi considerada a mais provável por apresentar uma maior coerência com o relacionamento entre os haplótipos pertencentes aos diferentes grupos, além do alto valor de  $\Phi_{CT}$ .



**Figura 9:** Localização dos grupos geográficos inferidos pelo programa SAMOVA 1.0 para a hipótese da existência de três grupos. Localidades agrupadas em azul correspondem ao grupo Sul, em verde corresponde ao grupo Centro e em vermelho ao grupo Norte. Área de sobreposição de elipses corresponde às localidades L24, L26, L54, L55 (pertencentes ao grupo Centro) e L25 (pertencente ao grupo Norte)

\* Localidade agrupada com grupo Norte.

**Tabela 6:** Resultados da AMOVA para a hipótese de três grupos inferidos pelo programa SAMOVA.

	<b>Entre grupos</b>	<b>Entre localidades dentro dos grupos</b>	<b>Dentro das localidades</b>	<b>Total</b>
<b>Graus de liberdade</b>	2	53	159	214
<b>Soma dos quadrados</b>	110,554	33,131	19,450	163,135
<b>Componentes da variância</b>	0,86764	0,13395	0,12232	1,12391
<b>Porcentagem de variação</b>	77,20	11,92	10,88	
<b>Índice <math>\Phi_{CT}</math> : 0,77198</b>				
Valor P < 0,001 significativo				

#### 4.4 Dinâmica populacional

Os resultados dos testes de neutralidade para o conjunto completo de dados não apresentaram valores significativos (valores de  $P < 0,05$  são significativos para o teste  $D$  de Tajima e  $P < 0,02$  são significativos para o teste  $F_s$  de Fu). Os valores obtidos para os índices calculados são apresentados abaixo:

→  $D$  de Tajima: -0.55748;  $P > 0,10$

→  $F_s$  de Fu: -6.11582;  $P > 0,10$

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 (*bottleneck*), que também podem causar desvios no modelo neutro de população estacionária no qual eles são baseados.

Os índices de neutralidade também foram calculados para os três grupos gerados através da análise realizada pelo programa SAMOVA, com o objetivo de verificar se o padrão observado na amostragem como um todo se confirma. Para o grupo do Norte, os testes estatísticos  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu tiveram valores negativos, mas não foram significativos (valores de  $P > 0,05$  e  $P > 0,02$ , respectivamente). A análise do grupo do Sul resultou em índices  $F_s$  de Fu e  $D$  de Tajima negativos e significativos (valores de  $P < 0,02$  para ambos os testes). O grupo do Centro não apresentou resultados significativos para nenhum dos índices de neutralidade calculados (valores de  $P > 0,05$  para ambos os testes). Os resultados dos testes de neutralidade para o conjunto completo de dados e para os grupos, com seus respectivos valores de significância, são apresentados na Tabela 7. A significância dos testes de neutralidade para o grupo do Sul sugere que, ao contrário do que é visto na análise do conjunto completo de dados, esse grupo está em expansão demográfica.

**Tabela 7:** Índices de neutralidade calculados para os dados analisados.

Grupos	Nº de Indivíduos	D de Tajima	F <sub>s</sub> de Fu
Conjunto completo de dados	190	-0.55748	-6.11582
Grupo do Norte	32	-0,81026	-0,24753
Grupo do Centro	51	-0,30997	-0,81733
Grupo do Sul	107	-1,69860 <sup>§</sup>	-8,88896*

\* Valores significativos ( $P < 0,02$ )

§ Valores significativos ( $P < 0,05$ )

A análise da *mismatch distribution* para o conjunto completo de dados apresentou sinal de expansão demográfica (valor  $P > 0,05$  significativo; ou seja, não difere dos valores simulados para a hipótese de expansão recente). O gráfico apresentou uma curva unimodal, esperada para eventos de expansão recente.

Quando a *mismatch distribution* é testada para os três grupos formados através do programa SAMOVA, é possível detectar sinal de expansão demográfica para o grupo do Sul, pois o gráfico apresenta uma curva unimodal (dados observados) muito semelhante à curva para a simulação de expansão, além do valor  $P > 0,05$  significativo. Para o grupo do Centro a *mismatch distribution* não indicou expansão populacional. Estes resultados corroboram a significância evidenciada nos índices de neutralidade, que também não apresentaram sinal de expansão. A análise da *mismatch distribution* para o grupo do Norte foi a única que apresentou resultado discrepante com os testes de neutralidade. O gráfico apresentou uma curva unimodal e valor  $P > 0,05$  significativo, indicando expansão. Já os testes de neutralidade não apresentaram sinal de expansão para este grupo. Os gráficos para o conjunto completo de dados bem como para os grupos são apresentados abaixo (Figuras 10, 11, 12 e 13).

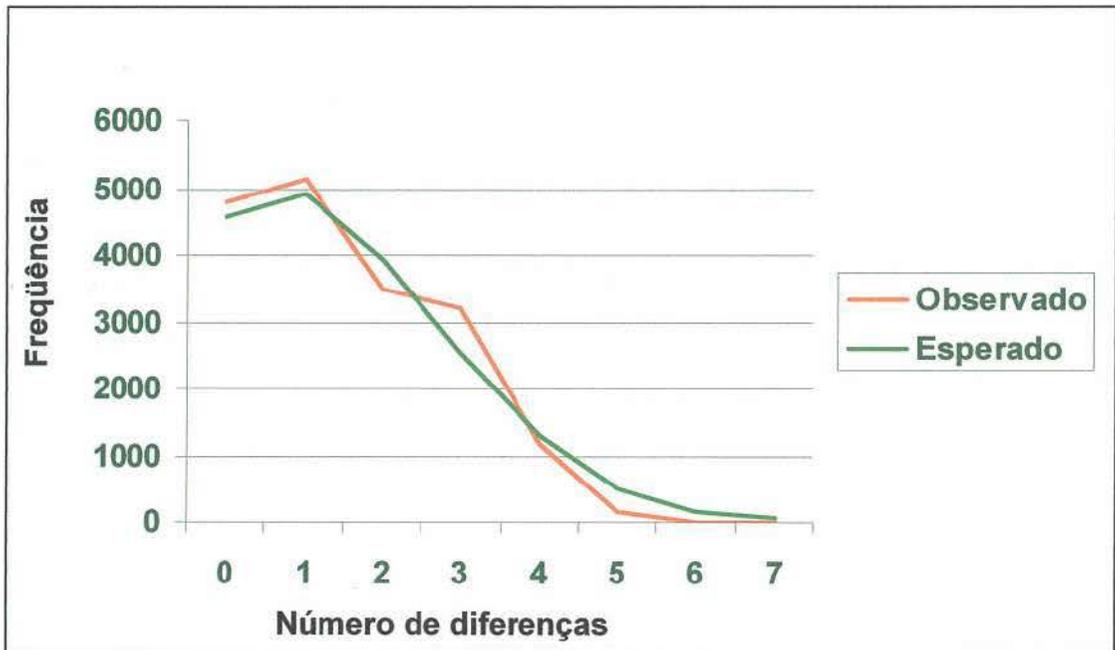


Figura 10: Gráfico ilustrando o resultado da análise de *Mismatch distribution* para o conjunto completo de dados. Valor  $P > 0,05$  significativo, indicando expansão demográfica.

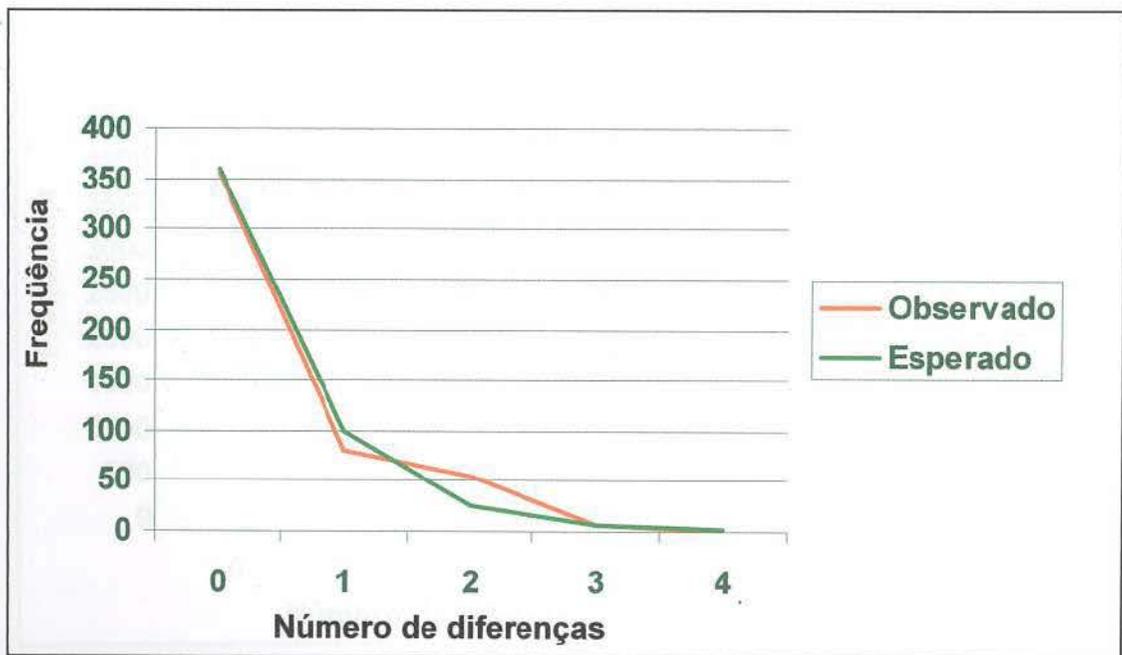
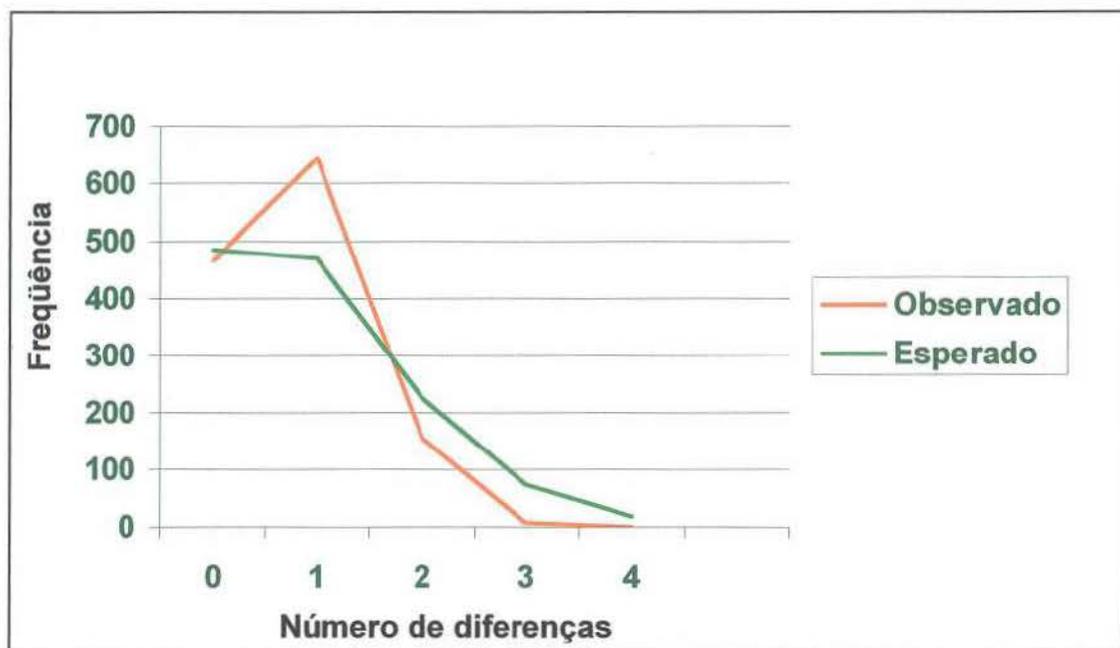
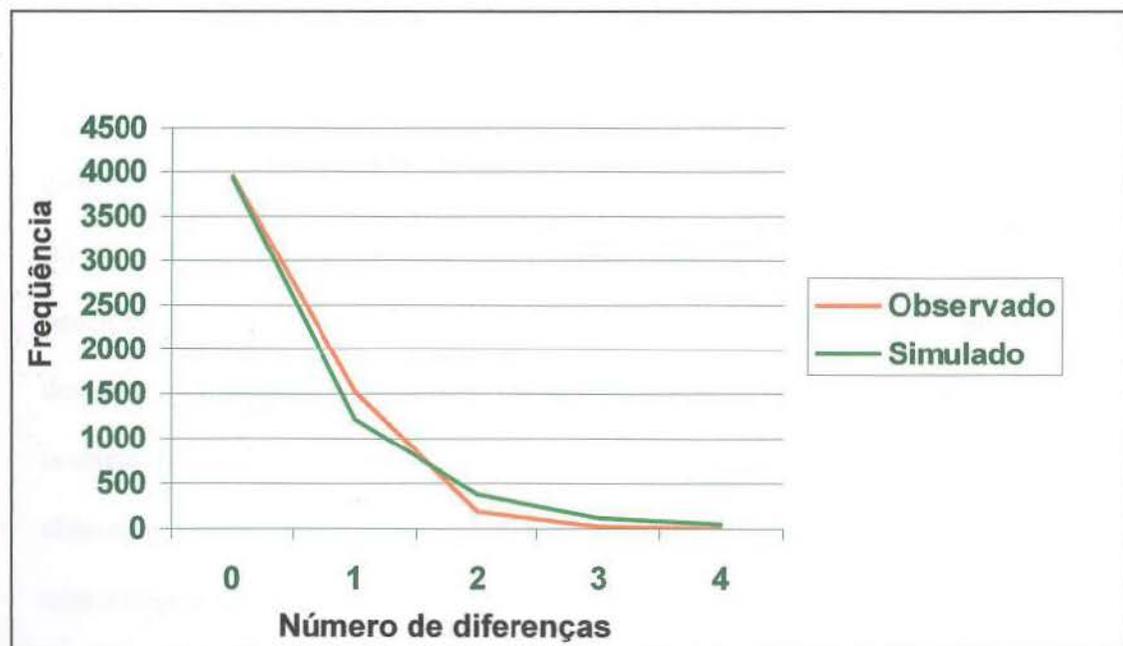


Figura 11: Gráfico ilustrando o resultado da análise de *Mismatch distribution* para o grupo do Norte. Valor  $P > 0,05$  significativo, indicando expansão demográfica.



**Figura 12:** Gráfico ilustrando o resultado da análise de *Mismatch distribution* para população do Centro. Valor  $P < 0,05$  não significativo, não indicando expansão demográfica.



**Figura 13:** Gráfico ilustrando o resultado da análise de *Mismatch distribution* para população do Sul. Valor  $P > 0,05$  significativo, indicando expansão demográfica.

## 5. Discussão

### 5.1 Diversidade dos marcadores utilizados

Os índices de diversidade encontrados em *P. integrifolia* subsp. *depauperata* foram similares a outros estudos dentro do gênero *Petunia*. Lorenz-Lemke (2006) encontrou valores de ( $\pi$ ) e (Hd) para as espécies *P. axillaris*, *P. altiplana* e *P. bonjardinensis*, semelhantes aos verificados neste trabalho. Já a espécie *P. exserta* apresentou índices de diversidade mais baixos em relação aos obtidos para *P. integrifolia* subsp. *depauperata*, resultado esperado pelo fato daquela espécie possuir caráter micro-endêmico (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). A comparação entre os índices de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e diversidade haplotípica (Hd) é uma abordagem simples para inferir uma história demográfica geral (Avise, 2000). Neste trabalho, foram encontrados valores baixos para ( $\pi$ ) e altos para (Hd). Isto sugere crescimento populacional rápido a partir de uma população ancestral com pequeno tamanho, pois houve tempo suficiente para formação de novos haplótipos, mas um tempo curto para um acúmulo de grandes diferenças nas seqüências (Avise, 2000).

Em *Calibrachoa heterophylla* (espécie pertencente ao gênero irmão de *Petunia*, que possui distribuição muito semelhante à *P. integrifolia* subsp. *depauperata*) o índice de diversidade ( $\pi$ ) foi o dobro (0,0037) do valor encontrado nesta linhagem, enquanto que (Hd) foi um pouco maior (0,822) (Mader, 2008). Estes valores, principalmente a diversidade nucleotídica, demonstram que as populações de *C. heterophylla* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata* que ocorrem na PC apresentam histórias demográficas e padrões evolutivos distintos. Estas diferenças podem estar relacionadas com o tempo de divergência entre as linhagens assim com a origem das populações colonizadoras.

## 5.2 Filogeografia e dinâmica populacional de *P. integrifolia* subsp. *depauperata*

Baixos níveis de fluxo gênico foram evidenciados pela AMOVA, ao demonstrar que a maior parte da diversidade genética observada está presente entre as localidades. Este padrão está relacionado com o modo de herança do cloroplasto, que em *Petunia* é materno (Derepas & Dulieu, 1992). Logo, o fluxo gênico observado por marcadores plastidiais se dá exclusivamente através das sementes, que não possuem dispersão a longas distâncias, pois para as espécies de *Petunia* esta é autocórica (sementes que caem junto à planta-mãe). Embora este comportamento seja esperado, a análise dos testes que relacionam distância genética com distância geográfica revelou que não existe um padrão de isolamento por distância nas localidades de *P. integrifolia* subsp. *depauperata* amostradas.

Segundo Longo (2005) um isolamento de populações de *P. integrifolia* em duas áreas geográficas distintas deu origem às linhagens *P. integrifolia* subsp. *depauperata* e *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*. Um possível local de origem para este evento é a região entre Tapes e os morros graníticos de Porto Alegre, visto que esta região é um local de contato entre estas duas subespécies. Assim, a linhagem *P. integrifolia* subsp. *depauperata* teria sua origem nessa região, se expandindo para a PC. Oscilações marinhas subsequentes levaram estas populações que ocupavam a PC a ondas de extinção em algumas localidades, exceto na região dos Morros de Porto Alegre, que não foi atingida pelos eventos de transgressão-regressão, possivelmente servindo de refúgio para estas populações.

A *network* não apresentou uma estruturação geográfica gradual no relacionamento entre o haplótipos, mas uma estruturação em três grupos geográficos distintos: Centro, Sul e Norte, que também foram indicados pelo SAMOVA. A ausência de estruturação gradual, bem como de isolamento por distância, poderiam ser explicados por eventos subsequentes de ocupação. Em um primeiro momento, teria havido uma grande expansão pela PC a partir da região de origem. Estas populações, já na PC, teriam sido afetadas pelas transgressões, com

muitas populações extintas e algumas populações pequenas que voltaram a colonizar rapidamente toda a PC. Num segundo momento, uma nova onda migratória teria “substituído” as populações existentes na porção central da PC, a partir dos refúgios na região de origem da linhagem. O grupo geográfico do centro seria, portanto, representado por estas populações mais estáveis, o que concorda com as análises de dinâmica populacional, que não indicaram expansão recente para o centro.

Já os grupos Norte e Sul teriam se originado a partir de populações que tiveram seu número reduzido devido às oscilações marinhas (com algumas populações extintas) e com subsequente expansão e recolonização destas regiões. No grupo sul, uma expansão recente é fortemente apoiada pelos índices de neutralidade negativos e significativos, *mismatch distribution* unimodal e o padrão de relacionamento “*star-like*” (um haplótipo mais freqüente central, do qual se originam vários haplótipos em menor freqüência). A idade geológica da área também suporta este cenário, visto que a maioria dos indivíduos pertencentes ao grupo Sul estão na Barreira IV, que surgiu há cerca de 5 ka A.P.

No grupo do norte, não é seguro afirmar que tenha havido expansão (testes de neutralidade não significativos), embora tenha sido observada significância na análise da *mismatch distribution*. A faixa da restinga litorânea estende-se como um corredor para o norte, isolada dos planaltos pela Serra Geral, e finda próximo à ilha de Santa Catarina, Florianópolis (Justus, 1990). Possivelmente, esta faixa da Planície Costeira foi colonizada seguindo um gradiente longitudinal do Rio Grande do Sul até Florianópolis. As regressões marinhas ocorridas durante o Quaternário fizeram emergir uma enorme área de plataforma continental e isso poderia ter permitido a migração desta linhagem para o estado de Santa Catarina.

Mäder (2008) encontrou um padrão diferente em *Calibrachoa heterophylla*, espécie com distribuição muito semelhante à de *P. integrifolia* subsp. *depauperata*. Esta espécie

apresentou linhagens estruturadas geograficamente, com barreiras que coincidiram com a localização de dois antigos cursos sugeridos para o Rio Jacuí e o Rio Jaguarão durante o Pleistoceno. Com o fechamento da Laguna dos Patos e da Lagoa Mirim (ocorridos no Holoceno), estes rios tiveram seu curso até o mar interrompido, passando a desaguar nestas lagoas.

Como discutido anteriormente, a colonização da linhagem *P. integrifolia* subsp. *depauperata* no litoral sul deve ter ocorrido durante o Holoceno, pois não existe sinal de isolamento ou grupos genéticos em toda a região sul da PC. Desta forma, com base nestes resultados e na história de formação da planície costeira, podemos concluir que a linhagem *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* é bem mais recente que as populações de *C. heterophylla* presentes na mesma região e descritas por Mader (2008).

### 5.3 Conservação

A zona costeira é uma das áreas sob maior estresse ambiental em nível mundial, devido à excessiva exploração de seus recursos naturais e o uso indevido do solo (Gruber *et al.*, 2003). A extração mineral desordenada tem causado sérios prejuízos ao ecossistema do litoral Catarinense (Diehl & Filho, 1996). Da mesma forma, a paisagem da Planície Costeira do Rio Grande do Sul vem sofrendo constantes modificações ambientais devido à urbanização, à criação de gado e procedimentos de drenagem associados ao plantio de arroz (Freitas, 1995). A urbanização do litoral gaúcho foi sempre caracterizada pela falta de planejamento, ocupação de áreas de risco e destruição ou alteração de áreas protegidas por lei (Tabajara *et al.*, 2005). Estas alterações ameaçam a vida de espécies que habitam este ecossistema, como é o caso do roedor *Ctenomys minutus*, cuja distribuição está sendo fragmentada e restringida a áreas cada vez menores por causa das atividades agrárias (Marinho & Freitas, 2006). O mesmo acontece com as espécies vegetais associadas às dunas.

As populações de *P. integrifolia* subsp. *depauperata*, apesar de estarem localizadas em áreas sob forte influência antrópica, são numerosas e apresentam uma grande quantidade de indivíduos. Aparentemente esta influência não está restringindo sua distribuição. Inclusive, durante as coletas, foram encontradas populações vigorosas ao lado de monoculturas de *Eucaliptus* e também em beiras de estradas. Então, a baixa diversidade genética encontrada deve ser devida a fatores históricos, relacionados com a recente ocupação da PC e ao pouco tempo de divergência entre as linhagens *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata*.

A urbanização intensa também afeta as terras nas proximidades do Lago Guaíba incluindo os morros graníticos de Porto Alegre, que ainda abrigam remanescentes significativos da vegetação nativa. Do ponto de vista genético, a degradação destes remanescentes não promoveu a perda de variabilidade da linhagem, mas compromete sua existência à medida que destrói seu habitat.

#### **5.4 Perspectivas**

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível explicar de maneira geral a história da linhagem. Porém são necessários estudos mais detalhados, com informações sobre a dinâmica demográfica, a idade e o tempo de divergência entre os três grupos identificados. Métodos baseados na teoria da coalescência (que descreve a genealogia de amostras de genes do tempo presente até o ancestral comum mais recente) fornecem tais informações. A utilização de marcadores moleculares de herança biparental e alto grau de variabilidade, como microssatélites, que permitem avaliar mais detalhadamente a influência da polinização e dispersão de sementes podem auxiliar na determinação da dinâmica evolutiva e da história deste grupo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E & Christopherson L (1988) The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Curr Genet* 14:137-146.
- Ando T & 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 & Hashimoto G (1998) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* 50:483-492.
- Archie AE, Maldonado JE, Hollister-Smith JA, Poole JH, Moss CJ, Fleischer RC & Alberts SC (2008) Fine-scale population genetic structure in a fission-fusion society. *Mol Ecol* 17:2666-2679.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Editora Harvard University, Londres, 447 pp.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2ª edição. Editora Sinauer Associates, Sunderland, 684 pp.
- Baldwin BG, Kyhos DW & Dvorak J (1990) Chloroplast DNA evolution and adaptive radiation in the Hawaiian silversword alliance (Asteraceae-Madiinae). *Ann Miss Bot Garden* 77:96-109.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Bettin O, Cornejo C, Edwards PJ & Holderegger R (2007) Phylogeography of the high alpine plant *Senecio halleri* (Asteraceae) in the European Alps: *in situ* glacial survival with postglacial stepwise dispersal into peripheral areas. *Mol Ecol* 16:2517-2524.
- Byrne M (2003) Phylogenetics and the conservation of a diverse and ancient flora. *Comptes Rendds Biologies* 326:S73-S79.

- Calcagnotto D (2001) Taxas de evolução e o relógio molecular. In: Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 52-63.
- Calliari LR, Pereira PS, Oliveira AO & Figueiredo SA (2005) Variabilidade das dunas frontais no litoral norte e médio do Rio Grande do Sul, Brasil. *Gravel* 3:15-30.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, Van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jorgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L & Wilkinson M (2007) A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56:295-299
- Derepas A & Dulieu H (1992) Inheritance of the capacity to transfer plastids by pollen parent in *Petunia hybrida* Hort. *J Hered* 83:6-10.
- Diehl FL & Filho NOH (1996) Compartimentação geológico-geomorfológica da zona litorânea e Planície Costeira do estado de Santa Catarina. *Notas Técnicas* 9:39-50.
- Dillenburg, SR (2005) As barreiras costeiras holocênicas do Rio Grande do Sul. In: Congresso da ABEQUA (Resumos expandidos). Guarapari, Espírito Santo. PDF 0083:1-6.
- Dunn IS & Blattner FR (1986) SharoNS 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res* 15:2677-2698.
- Dupanloup I, Schneider S & Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11:2571-81.
- Dutech C, Seiter J, Petronelli P, Joly HI & Jarne P (2002) Evidence of low gene flow in a neotropical clustered tree species in two rainforest stands of French Guiana. *Mol Ecol* 11:725-738.
- Excoffier LGL, Smouse PE & Quattro M (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier LGL & S. Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50.

- Fineschi S, Turchini D, Grossoni P, Petit RJ & Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy. *Forest Ecol Manag* 156:103-114.
- Fleishman E, Launer AE, Switky KR, Yandell U, Heywood J & Murphy DD (2001) Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. *Biol Cons* 98:45-53.
- Freitas TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in Southern Brazil (Rodentia–Octodontidae). *Stud Neotrop Fauna Environ* 30:53–59.
- Fu YX (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* 143:557–570.
- Gruber NLS, Barbosa EG & Nicolodi JL (2003) Geografia dos Sistemas costeiros e oceanográficos: subsídios para a gestão integrada zona costeira. *Gravel* 1:81-89.
- Guries RP & Ledig FT (1982) Genetic Diversity and Population Structure in Pitch Pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evolution* 36:387-402
- Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79:413-425.
- Hamilton MB (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraespecific variation. *Mol Ecol* 8:513-525.
- Hamilton MB, Braverman JM & Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertions/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Mol Biol Evol* 20:1710-1721.
- Harlin-Cognato A, Bickham JW, Loughlin TR & Honeycutt RL (2006) Glacial refugia and the phylogeography of Steller's sea lion (*Eumatopias jubatus*) in the North Pacific. *J Evol Biol* 19:955-969.
- Hwang SH, Lin TP, Ma CS, Lin CL, Chung JD & Yang JC (2003) Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Mol Ecol* 12:2689-2695.

- Jakob SS & Blattner FR (2006) A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): Long-Term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction, and the consequences for phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* 23:1602-1612.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA & Stevens PF (1999) *Plant Systematics. A phylogenetic approach*. 3ª edição. Editora Sinauer Associates, Sunderland, 464 pp.
- Justus JO (1990) Hidrografia. In: Fundação Instituto Brasileiro de geografia e estatística (Ed). *Geografia do Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE. V2. p. 218.
- Kriedt, RA; Longo, D; Zamberlan, PM; Lorenz-Lemke, AP; Stehmann, JR; Bonatto, SL; Salzano FM & Freitas, LB (2007) Questões taxonômicas no gênero *Petunia* Juss: uma abordagem filogeográfica do complexo *integrifolia*. In: CD-ROM do 53º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia.
- Longo D (2005) Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Lorenz-Lemke (2006) Especiação de plantas no Sul do Brasil: os casos de *Passiflora* e *Petunia*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15:4487-4497.
- Mäder G (2008) Filogeografia e variabilidade genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27:209-220.
- Marinho JR & de Freitas TRO (2006) Population structure of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Ctenomyidae) on the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Theriol* 51:53-59.

- Menegat R, Fernandes LAD, Koester E, & Sherer CMS (1998) Porto Alegre antes do Homem: evolução geológica. In: Menegat R (ed) Atlas ambiental de Porto Alegre. Editora da UFRGS, Porto Alegre, pp 11-24.
- Miller M (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J Hered* 96:722-724.
- Monasterio M & Sarmiento L (1991) Adaptive radiation of *Espeletia* in the cold Andean tropics. *Trends Ecol Evolut* 6:387-391.
- Moritz C & Faith DP (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol Ecol* 7:419-429.
- Mullis K, Falcona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Methods. Enzymol* 155:335-350.
- Nei, M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Editora Columbia University, New York.
- Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ & Ennos RA (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends Ecol Evolut* 14:140-145.
- Nicholas KB & Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. Program available in the internet ([www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc)).
- Ohi T, Kajita T & Murata AJ (2003) Distinct geographic structure as evidence by chloroplast DNA haplotypes and ploidy level in Japanese *Aucuba* (Aucubaceae). *Am J Bot* 90:1645-1652.
- Okaura T & Harada K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88:322-329.
- Oliveira PE, Behling H, Ledru M, Barberi M, Bush M, Salgado-Labouriau ML, Garcia MJ, Medeanic S, Barth OM, Barros MA & Scheel-Ybert R (2005) Paleovegetação e Paleoclimas do Quaternário do Brasil. In: Souza CRG, Suguio K, Oliveira MAS & Oliveira PE (eds) Quaternário do Brasil. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 52-74.

- Olmstead R & Palmer JD (1991) Chloroplast DNA and Systematics of the Solanaceae. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M. and Estrada N (eds) Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp 161-168.
- Olmstead RG & Palmer JD (1994) Chloroplast DNA Systematics: A review of methods and data analysis. *Am J Bot* 81:1205-1224.
- Olmstead RG, Sweere J.A, Spangler RE & Palmer JD (1999). Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee M, Lester RN, Hawkes JG (Eds.) Solanaceae IV. Royal Botanical Garden, Kew, pp.111-137.
- Olson ME (2002) Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int J Plant Sci* 163:51–65.
- Palmé AE, Su Q, Rautenberg A, Manni F & Lascoux M (2003) Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. *Mol Ecol* 12:201-212.
- Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, Chase MW & Manhart JR (1988) Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75:1180–1206.
- Raven PH, Evert RF & Eichhorn SE (2001) *Biologia Vegetal*. 6ª edição. Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, 906 pp.
- Rogers AR & Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552-569.
- Roy A, Frascaria N, Mackay J & Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor Appl Genet* 85:173-180.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X & Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Sang T, Crawford DJ & Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84:1120-1136.

- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT & Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7:465-474.
- Schaal BA, Gaskin JF & Caicedo AL (2003) Phylogeography, Haplotype Trees, and Invasive Plant Species. *J Hered* 91:197-201.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE & Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92:142-166.
- Shrestha MK, Golan-Goldhirsh A & Ward D (2002) Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert. *Biol Conserv* 108:119-127.
- Silva, OS (1994) Importância de *Callonychium petuniae* CURE & WITTMANN, 1990 (Insecta, Hymenoptera, Andrenidae) e outras abelhas no sucesso reprodutivo de *Petunia integrifolia* (HOOKER) SCHINZ et. THELLUNG (Solanaceae). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T & 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 & Downs R (1966) Solanáceas. *Flora Ilustrada Catarinense* (fasc. SOLA):1-321.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Tese de Doutorado.
- Tabajara LL, Gruber NLS, Dillenburg SR & Aquino R (2005) Vulnerabilidade e classificação das dunas da praia de Capão da Canoa, litoral norte do Rio Grande do Sul. *Gravel* 3:71-84.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

- Tomazelli LJ, Dillenburg SR & Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain, southern Brazil. *Rev Bras Geoc* 30:474-476.
- Trewick SA, Morgan-Richards M, Russel SJ, Henderson S, Rumsey FJ, Pintér I, Barret JA, Gibby M & Vogel JC (2002) Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. *Mol Ecol* 11:2003-2012.
- Villwock JA (1972) Contribuição à geologia do Holoceno da Província Costeira do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Villwock JA (1984) Geology of Coastal Province of Rio Grande do Sul. Southern Brazil. A synthesis. *Pesquisas*. 16:5-49.
- Villwock JA, Tomazelli LJ, Loss EL, Dehnhardt EA, Horn NO, Bachi FA & Dehnhardt BA (1987) Geologia da Província Costeira do Rio Grande do Sul. Boletim de Resumos. I Congresso da ABEQUA, Porto Alegre. pp 405-406.
- Villwock JA & Tomazelli LJ (1995) Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8:1-45.
- Watanabe H, Ando T, Iida S, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Hashimoto G & Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *J Japan Soc Horticult Sci* 65:625-634.
- Weschenfelder J (2005) Processos sedimentares e variação do nível do mar na região costeira do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.
- Wijsman HJW (1982) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Bot Neerl* 31:447-490.
- Wijsman HJW & Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. 5. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot Neerl* 34:337-349.

- 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 Bot Neerl* 39:101-102.
- Wittmann D, Radtke R., Cure JR & Schfino–Wittmann, MT (1989) Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* and three purple flowered *Petunia* species in Southern Brazil. *Z. zool. Syst. Evolut.* 28:157-165.
- 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.
- Xu DH, Sakai AJ, Kanazawa M, Shimamoto A & Shimamoto Y (2000) Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. *Theor Appl Genet* 101:724–732.

\* De acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Genética.