

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**História Evolutiva do gênero *Calibrachoa* La Llave & Lex.
(Solanaceae)**

JÉFERSON NUNES FREGONEZI

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

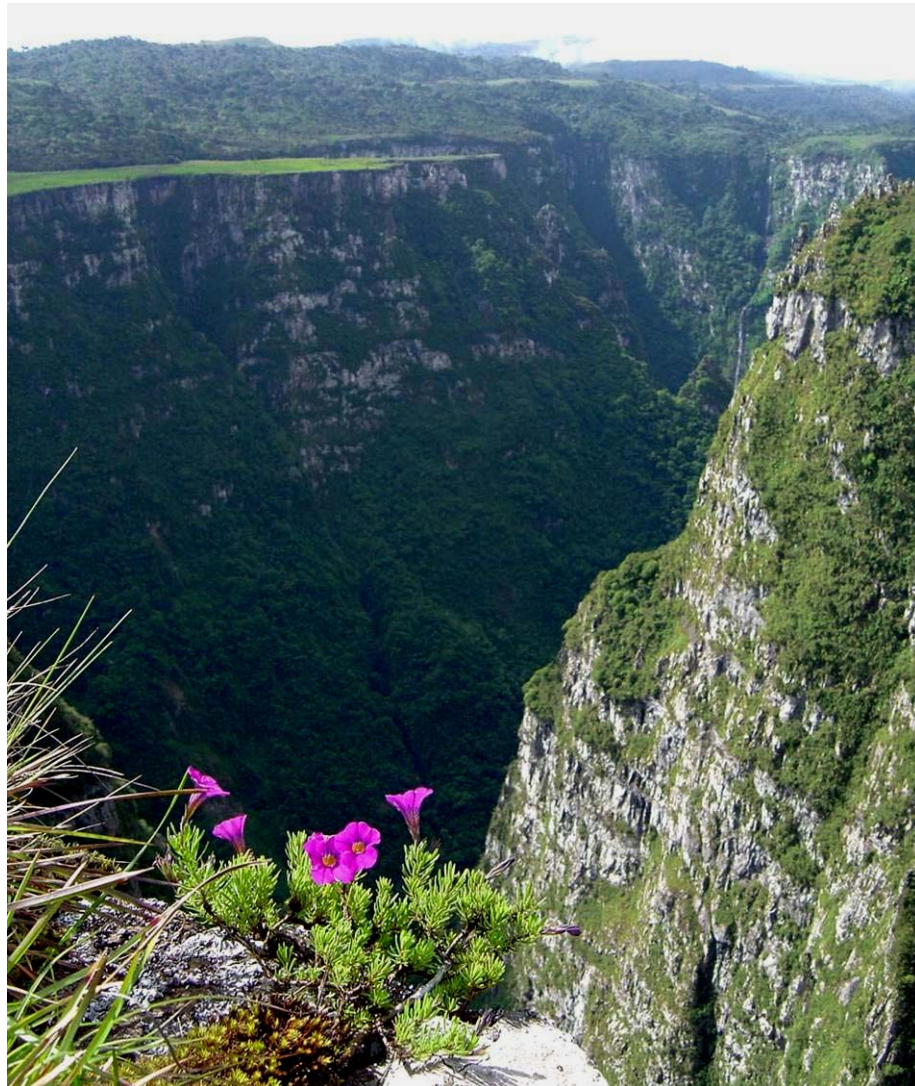
Orientação: Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre, junho de 2009.

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal no Rio Grande do Sul. As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Fontes Financiadoras:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)
- Fundação Biodiversitas/Fundo de Parceria para Ecossistemas Críticos (CEPF)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ - UFRGS)



“Ali, nos mirantes mais altos do Rio Grande do Sul, com as forças milenares da erosão a trabalhar diante dos olhos, com os temerosos abismos dos canhões aos pés, com o pinhal, a mata branca e o campo, tão rio-grandenses, em derredor, com o oceano no horizonte, as gerações do futuro nos hão de agradecer a piedade e reverência com que conservamos as mais grandiosas paisagens da nossa terra.”

(Pe. Balduino Rambo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram na elaboração deste trabalho, em especial:

À minha orientadora, Loreta Brandão de Freitas, pela grande oportunidade oferecida, por todo apoio e orientação ao longo de todo o trabalho, e principalmente pela paciência nos momentos finais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo suporte na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao secretário administrativo Elmo Cardoso, por todo o apoio e pelas eventuais caronas oferecidas nos dias de trabalho prolongados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos conhecimentos compartilhados durante a minha formação.

A todos os colegas que trabalham (ou já trabalharam) no Laboratório de Evolução Molecular, Ana, Aline Lorenz, Caroline, Clênio, Geraldo, Nelson, Pakisa, Priscilla, Raquel, Rosana e Valéria, por compartilharem conhecimentos, experiências e as aventuras durante as saídas de campo.

Ao Prof. João Renato Stehmann, pelo apoio na obtenção e identificação das amostras utilizadas neste trabalho.

À Laci Krupatz, pela ajuda e pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

À minha família, por todo o apoio e oportunidades que me proporcionaram durante toda a vida.

E ao meu grande amor, Aline, pelo imenso apoio, companheirismo e paciência incondicionais, principalmente nos últimos meses. Não tenho palavras para te agradecer.

Te amo muito!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O gênero <i>Calibrachoa</i>	11
1.1.1 Histórico taxonômico: da descrição de <i>Petunia</i> ao estabelecimento do gênero <i>Calibrachoa</i>	11
1.1.2 O gênero <i>Calibrachoa</i> : revisão taxonômica	17
1.1.3 Tratamento taxonômico de <i>Calibrachoa parviflora</i> e <i>Calibrachoa pygmaea</i>	19
1.1.4 Morfologia das demais espécies do gênero	24
1.1.5 Morfologia floral e biologia reprodutiva	26
1.1.6 Distribuição geográfica e hábitat	29
1.2 Campos do Sul e Sudeste do Brasil: evolução e dinâmica atual	37
1.3 Estudos moleculares	51
1.3.1 Uma breve história do pensamento evolutivo	51
1.3.2 Filogenias moleculares	52
1.3.3 Marcadores e estudos moleculares em Solanaceae	56
1.3.4 Filogenias intraespecíficas	63
2. OBJETIVOS	70
3. MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.1 Coleta do material vegetal	71
3.2 Extração do DNA	71
3.3 Amplificação dos marcadores	72
3.4 Sequenciamento	75
3.5 Visualização, alinhamento e caracterização das sequências	76
3.6 Conjuntos de dados utilizados nas análises	76
3.7 Inferências filogenéticas	79
3.7.1 Seleção de modelos evolutivos	79
3.7.2 Métodos de análise	80
3.8 Análises filogeográficas	82

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.1. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica de <i>Calibrachoa</i> no Brasil	84
4.2. Abordagem filogenética do gênero	96
4.2.1. Variação e utilidade filogenética dos marcadores utilizados	112
4.3. Abordagem filogeográfica do gênero	119
4.3.1. Considerações gerais	119
4.3.2. O clado Terras Baixas	130
4.3.3. O clado Terras Altas	140
4.3.4. Filogeografia de <i>Calibrachoa excellens</i> e <i>Calibrachoa linoides</i> : evidências de uma zona de hibridação	144
4.3.5. Variabilidade genética das espécies microendêmicas de altitude e evidências de hibridação entre espécies microendêmicas e <i>Calibrachoa sellowiana</i>	161
4.4. Datação dos principais clados encontrados	169
4.5. O contexto biogeográfico	171
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	178
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179

RESUMO

Calibrachoa La Llave & Lex. (Solanaceae) é um gênero sul-americano com 27 espécies, a maioria delas ocorrendo no sul do Brasil. Com base na distribuição destas espécies e gêneros relacionados, o grupo parece ter ancestrais de origem andina, e distribuiu-se amplamente pelo pampa, restringindo-se cada vez mais a terras altas nos estados de Santa Catarina e Paraná, exclusivamente em áreas de campo, com poucas espécies associadas a bordas de mata. Na região sudeste apresenta poucas populações de uma espécie relativamente abundante (*C. linoides*) e uma espécie endêmica isolada em altitudes superiores a 1000 m em Minas Gerais (*C. elegans*). Além desta, mais quatro espécies são consideradas microendêmicas com registro de uma ou poucas populações.

Este foi o primeiro trabalho que empregou dados de sequência de DNA em abordagens filogenéticas no gênero, sendo utilizados os espaçadores intergênicos plastidiais *trnH-psbA*, *psbB-psbH*, *trnL-trnF* e *trnG-trnS*, e o íntron do gene plastidial *trnL* na análise de 25 das 27 espécies consideradas. As duas espécies não incluídas no estudo foram *C. felipponei* e *C. scabridula*. Além dos estudos filogenéticos tradicionais, foi realizada uma abordagem filogeográfica que incluiu todas as espécies estudadas, através de um conjunto maior de amostras cobrindo a distribuição geográfica da maioria delas. Também foram obtidas as idades para os principais clados formados, com a taxa de substituição de nucleotídeos disponível para dois espaçadores.

A idade do gênero foi estimada em 1,63 milhões de anos, sendo que a taxa de especiação encontrada é comparável à de espécies de rápida radiação em ilhas. As filogenias mostraram baixos valores de suporte, além de falta de resolução entre espécies próximas. A realização de análises filogeográficas, através de *networks* de relacionamento entre haplótipos, permitiu acessar relações mais detalhadas entre as espécies. Estes estudos demonstraram uma alta frequência de sequências ancestrais em espécies morfologicamente distintas. Todos estes resultados revelam que *Calibrachoa* é um gênero extremamente recente, sendo que a rápida divergência morfológica encontrada entre as espécies ainda não deixou registro nos marcadores genéticos utilizados.

Uma grande divergência genética foi observada entre um clado formado por *C. parviflora* e *C. pygmaea* e o clado que compõe as espécies restantes. As duas espécies citadas anteriormente são bem distintas das demais. As idades apresentadas para os clados

evidenciam que estas espécies divergiram das demais há cerca de 500.000 anos, um intervalo de tempo considerável se comparado à idade do gênero. Estes resultados, aliados a outras características, sugerem que estas espécies poderiam ser consideradas como um grupo taxonomicamente distinto do restante. Com relação às demais espécies, os clados formados mostraram uma associação com as regiões de terras baixas do Rio Grande do Sul e Argentina, e com regiões de altitude dos Estados do Paraná e Santa Catarina, além de clados correspondentes às espécies microendêmicas de altitude. O *network* de haplótipos gerado também apresentou grupos de sequências relacionadas, que refletiram os clados encontrados nas filogenias.

Estes resultados sugerem que a grande divergência morfológica encontrada entre as espécies do gênero tenha ocorrido devido aos ciclos de expansão e retração das formações de campo e floresta da região subtropical da América do Sul, alterando sucessivas vezes a distribuição das populações de *Calibrachoa*. Estas mudanças na composição da cobertura vegetal acompanharam as oscilações climáticas resultantes dos ciclos glaciais e interglaciais, que ocorreram pelo menos nove vezes ao longo do último milhão de anos. Além disso, evidências de possíveis expansões recentes, associadas à ocorrência natural de hibridação entre espécies também foram encontradas, demonstrando que, embora existam isolamentos ecológicos e ambientais entre as espécies, alterações causadas na distribuição das mesmas podem acarretar a perda destas barreiras.

Estudos complementares, utilizando marcadores de evolução mais rápida, ampliado a outros genomas, e investigações mais detalhadas no nível populacional, podem trazer informações mais completas sobre os processos que deram origem a esta grande variação morfológica em um intervalo de tempo extremamente curto.

ABSTRACT

Calibrachoa La Llave & Lex. (Solanaceae) is a South American genus, comprised by 27 species, most of them occurring in southern Brazil. The geographical distribution of related genera suggests an Andean origin, and the species are widely distributed in the Pampean region, with more abundant and concentrated occurrence in the highlands of Brazilian states of Parana and Santa Catarina. In Brazilian southeastern region, some disjunct populations of *C. linoides* were found, plus an endemic species (*C. elegans*) isolated at elevations above 1000 m. Another four species are also endemic, with few known individuals so far.

This is the first study that used data from DNA sequencing in phylogenetic investigations in *Calibrachoa*, analysing cpDNA intergenic spacers *trnH-psbA*, *psbB-psbH*, *trnL-trnF* and *trnS-trnG*, as well as the *trnL* intron, in 25 of the 27 species considered. The two species not included in this study was *C. felipponei* e *C. scabridula*. In addition, a phylogeographical approach was conducted from a larger sample set covering the majority of the geographical distribution of the assessed species. Ages for the main clades formed were also obtained, using the nucleotide substitution rate available for two spacers.

The estimated age of the genus was 1.63 million years, and the speciation rate found is comparable to species of rapid radiation on islands. The phylogenetic trees obtained showed low bootstrap support values, and lack of resolution between closely related species. The haplotype networks provided a more detailed relationship between species. These studies showed the occurrence of ancestral sequences in morphologically different species. All these results pointed that *Calibrachoa* is a very recent genus, with high morphological divergence and low genetic differentiation.

However, large genetic divergence was observed between the clade that includes *C. parviflora* and *C. pygmaea*, and the clade comprising the remaining species. *Calibrachoa parviflora* e *C. pygmaea* were quite distinct from other species. The ages presented showed that these clade diverged from the rest about 500,000 years ago, a large period of time, when compared to the age of the genus. These results, together with other traits, suggest that these species could be regarded as a taxonomically distinct group of the remaining species.

In relation to other species, the clades formed showed an association with

geographical regions: the lowlands of Rio Grande do Sul and Argentina, and highlands in the region of Parana and Santa Catarina states. Another three groups were found, corresponding to endemic highlands species. The haplotype network also showed groups of related sequences, which reflected the clades found in the phylogeny.

These results suggest that the large morphological differences found between species of the genus has occurred due to cycles of expansion and retraction of the grasslands and forest areas in the subtropical region of South America, changing the geographical distribution of *Calibrachoa* populations several times. These modifications in the landscape composition along repetitive climatic changes, were the result from glacial and interglacial cycles, which occurred at least nine times over the last million years. Moreover, evidences of possible recent expansions associated with the occurrence of natural hybridization between species were found, suggesting that, although environmental and ecological isolation exists between species, recent changes in the distribution of some species could cause the loss of these barriers.

Additional studies, using rapidly evolving molecular markers, including other genomes, and more detailed investigations at the populational levels, can provide more complete information about the processes that led to this great morphological variation in a very short time.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Calibrachoa*

1.1.1. Histórico taxonômico: da descrição de *Petunia* ao estabelecimento do gênero *Calibrachoa*

As Angiospermas são classificadas atualmente em dois grandes grupos: as Angiospermas Basais (compostas pelas monocotiledôneas e dicotiledôneas do grupo Magnoliidae, definido por Cronquist, 1988) e as “Eudicots” (Soltis *et al.*, 2005). Esta classificação, proposta pelo *Angiosperm Phylogeny Group* (citado posteriormente como “APG”, e detalhado em seções posteriores), baseia-se em uma grande quantidade de caracteres morfológicos e dados moleculares (APG, 1998, APGII, 2003).

O grande grupo das “Eudicots” corresponde a aproximadamente 75% de todas as espécies de Angiospermas (Drinnan *et al.*, 1994), e se divide em dois: o clado denominado “Core Eudicot” e um segundo grupo com cladogramas de divergência mais antiga. As Asteridae *sensu* APG (que correspondem em parte à subclasse Asteridae *sensu* Cronquist, 1988) incluem aproximadamente um terço de todas as Angiospermas, com quase 80.000 espécies em cerca de 4.700 gêneros. Dentro de Asteridae, após os grupos de Cornales e Ericales, que se mostram como grupos-irmãos sucessivos de todo o grupo, o restante é referido como Euasteridae, sendo reconhecidos dois cladogramas: Euasteridae I e Euasteridae II (Soltis *et al.*, 2005).

A ordem Solanales, dentro da classificação proposta por APG, encontra-se no clado Euasteridae I e é formada por cinco famílias, compreendendo aproximadamente 5.000 espécies. Mais de 4/5 destas espécies pertencem a duas grandes famílias: Convolvulaceae Juss., com 1500 espécies, e Solanaceae Juss., com 2800 espécies (Cronquist, 1988). Segundo o APG II (2003), baseado em marcadores moleculares (sequências de DNA nuclear da região correspondente à subunidade ribossomal 18S e dos genes de cloroplasto *rbcL* e *atpB*) são consideradas cinco famílias para a ordem Solanales (Convolvulaceae, Hydroleaceae, Montiniaceae, Solanaceae e Sphenocleaceae), sendo as demais agrupadas dentro destas. Nesta classificação, a família Solanaceae é grupo-irmão de Convolvulaceae.

A família Solanaceae Juss. distingue-se das demais pelas seguintes características morfológicas: (a) óvulos e sementes numerosos, (b) dois carpelos obliquamente orientados, (c) ausência de látex, (d) cotilédones não plicados, (e) estilete simples e (f) estigma único, pouco ou nada lobado (Cronquist, 1988). Esta família possui diversos representantes de importância econômica. Entre as espécies mais utilizadas como alimento estão representantes dos gêneros *Solanum* L. (batata, berinjela, tomate) e *Capsicum* L. (pimenta). A família também possui espécies que são fontes de compostos secundários úteis na medicina e farmacologia, como a beladona (*Atropa belladonna* L.), o meimendo-negro (*Hyoscyamus niger* L.), a mandrágora (*Mandragora officinalis* L.) e muitas espécies de *Datura* L. Outros gêneros possuem representantes que são cultivados como plantas ornamentais, podendo ser destacados *Browallia* Scop., *Brunfelsia* L., *Cestrum* L., *Datura* L., *Nicotiana* L., *Petunia* Juss., *Salpiglossis* Ruiz & Pav., *Solanum* L. e *Solandra* Sw. (Hawkes *et al.*, 1991; Hawkes, 1999).

Representantes de Solanaceae distribuem-se por quase todo o mundo e, embora existam membros muito conhecidos nas regiões temperadas, a maioria dos gêneros e espécies é tropical. O principal centro de diversidade é a América do Sul, com cerca de 50 gêneros, compreendendo aproximadamente 400 espécies. A maior riqueza em diversidade de espécies ocorre na América Central, da região costeira do Oceano Pacífico até a Cordilheira dos Andes (D'Arcy, 1991).

A família é dividida em duas subfamílias: Solanoideae e Cestroideae (Cronquist, 1988). D'Arcy (1991) incluiu ainda Nolanoideae como uma terceira subfamília, além de propor uma subdivisão das três em 14 tribos, baseado na compilação de revisões taxonômicas dos diferentes grupos feitas por outros autores. Para ele, quando são aplicados os critérios derivados de Tubiflorae, Solanoideae pode ser considerada como a subfamília mais ancestral e homogênea, enquanto Cestroideae seria mais derivada e teria divergido a partir de algumas linhagens de solanáceas basais. Esta subfamília é a mais ampla na América do Sul, onde a maioria dos gêneros ocorre em áreas tropicais altas, enquanto poucos gêneros localizam-se em terras tropicais baixas (D'Arcy, 1991).

A tribo Nicotianeae G. Don (Cestroideae) possui nove gêneros, a maioria da América do Sul, com cinco gêneros andinos (*Benthamiela* Speg., *Combera* Sandwith, *Fabiana* Ruiz & Pav., *Latua* Phil. e *Pantacantha* Speg.). O gênero *Nicotiana* L. possui um

padrão de distribuição disjuncto e ocorre na América do Sul, América do Norte e Austrália. Apenas as espécies de uma seção, *Nicotiana* sect. *Alatae*, habitam a região dos pampas atingindo os planaltos do sul e sudeste do Brasil. *Bouchetia* Dunal também se apresenta disjuncto, ocorrendo nas regiões do sul da América do Sul e da América do Norte. O gênero *Nierembergia* Ruiz & Pav. ocorre exclusivamente no pampa. E finalmente os gêneros *Calibrachoa* e *Petunia*, que ao contrário da maioria dos gêneros citados anteriormente, possui distribuição subtropical atlântica, no planalto sul-brasileiro e regiões do pampa (Stehmann 1999). Desta forma, D'Arcy (1991) mencionou a existência de quatro gêneros nativos da tribo no Brasil: *Bouchetia* Dunal, *Nierembergia* Ruiz & Pav., *Nicotiana* L. e *Petunia* Juss. *sensu lato* (compreendendo *Petunia* e *Calibrachoa*), considerado o gênero da tribo com o maior número de representantes no Brasil, sendo a região sul a mais rica em espécies do País (Smith e Downs, 1966).

O gênero *Petunia* foi estabelecido por Jussieu no início do século XIX, mas foi somente no final do século XX (meados de 1980), quando houve um aumento considerável de trabalhos no grupo, que o gênero *Calibrachoa* foi estabelecido. Ainda hoje muitos botânicos sul-americanos continuam denominando todas as espécies como pertencentes ao gênero *Petunia* Juss. *sensu lato*. A seguir, tem-se uma revisão histórica dos principais trabalhos desde a descrição de *Petunia* até o desmembramento em *Calibrachoa*.

Como dito anteriormente, Jussieu estabeleceu o gênero *Petunia* em 1803 através de dois materiais tipo: *P. parviflora* (hoje reconhecida como *Calibrachoa parviflora* (Juss.) Wijsman) e *P. nyctaginiflora* (= *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb). Durante a segunda metade do século XIX, o híbrido de *P. axillaris* e *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. foi desenvolvido e cultivado na Europa como ornamental. Em 1911, Fries publicou uma monografia sobre o gênero, onde reconheceu a existência de 27 espécies e descreveu 12 espécies novas (Stehmann, 1999). Durante os anos seguintes alguns trabalhos foram publicados, principalmente com descrições de novas espécies, mas somente nos últimos trinta anos muitas investigações apontaram grandes diferenças dentro do grupo.

Wijsman (1982), através de análises dos táxons descritos na literatura definiu os parentais da petúnia híbrida, que seriam uma espécie com flores brancas (*P. axillaris*) e outra com flores púrpuras (*P. integrifolia*). No ano seguinte, Wijsman (1983) encontrou grupos de espécies geneticamente distintos, apresentando números cromossômicos,

homologia cariotípica e isoenzimas diferenciadas. Cruzamentos realizados entre espécies de mesmo número cromossômico produziram híbridos, enquanto que os cruzamentos entre espécies com números cromossômicos distintos não foram bem sucedidos. Baseados nestas evidências, Wijsman e Jong (1985) reconheceram dois diferentes gêneros, designados *Petunia* Juss (n=9) e *Stimoryne* Rafin (n=7). Outras diferenças entre os gêneros apontadas por estes autores são o tipo de prefloração (definida como coclear para *Stimoryne* e possuindo uma valva composta de duas pétalas cobrindo as três restantes, em *Petunia*), hábito (herbáceo em *Stimoryne* e subarborescente em *Petunia*) entre outras características florais e vegetativas.









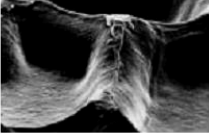
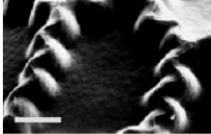
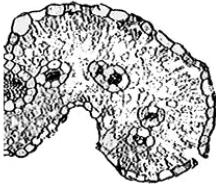
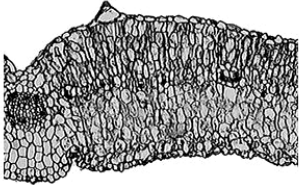
Como o nome *Petunia* já estava associado ao híbrido cultivado como ornamental, Wijnands e Bos (1986) propuseram a conservação de *P. nyctaginiflora* Juss. como o tipo nomenclatural para as espécies com $2n=14$. Assim, as espécies relacionadas ao híbrido ornamental manteriam o nome *Petunia* ao invés de *Stimoryne*. Esta proposta foi aceita e o Comitê Internacional de Espermatófitas (Brummitt, 1989) revalidou o gênero *Calibrachoa* La Llave & Lexarza (com $2n=18$) e manteve o gênero *Petunia sensu stricto* (s.s.), que inclui a petúnia-de-jardim e espécies relacionadas (com $2n=14$).

A separação dos gêneros *Petunia* s.s. e *Calibrachoa* é apoiada por diversas características morfológicas (Quadro 1), sendo que a prefloração é a mais importante, onde a maioria das espécies de *Petunia* s.s. possui prefloração coclear (reconhecida como imbricada por Stehmann, 1999), enquanto as de *Calibrachoa*, conduplicada (Wijsman e Jong, 1985). Somente *Calibrachoa pygmaea* (R.E.Fr.) Wijsman não se encaixa nesta regra, pois possui prefloração imbricada e número cromossômico $2n=18$.

Outra característica diagnóstica importante foi observada na parede anticlinal das sementes, através de microscopia eletrônica de varredura, onde *Petunia* apresenta células da testa com paredes onduladas e finas, enquanto que *Calibrachoa* possui paredes retas e espessadas (Watanabe *et al.*, 1999) (Quadro 1). A anatomia foliar também difere nos gêneros, como demonstrado no trabalho de Reis *et al.* (2002), onde foram observadas células bem diferenciadas no tecido da endoderme de contorno na nervura nas folhas de *Calibrachoa*, enquanto que em *Petunia* o mesmo tecido não possui diferenciação (Quadro 1). Muitos trabalhos demonstram que cruzamentos artificiais entre espécies dos dois gêneros tem falhado, indicando a existência de uma forte barreira genética entre eles

(Wijsman 1983; Watanabe *et al.*, 1996, 1997, 2001; Ando *et al.*, 2001). Entre outras características que também podem ser consideradas diagnósticas (Quadro 1), estão alguns aspectos do cálice e o hábito, subarborescente em *Calibrachoa* e herbáceo em *Petunia*. (Stehmann 1999). Embora a separação entre os gêneros seja muito bem suportada, inclusive por dados moleculares (discutido nas seções seguintes), muitas das características descritas acima sugerem ainda uma divisão dentro das espécies de *Calibrachoa*, onde *C. parviflora* (Juss.) Wijsman e *C. pygmaea* exibem características distintas do restante. Esta heterogeneidade em *Calibrachoa* será discutida mais detalhadamente nas seções seguintes.

Quadro 1. Principais diferenças entre os gêneros *Calibrachoa* e *Petunia*.

	<i>Calibrachoa</i>	<i>Petunia</i>
Número Cromossômico	n = 9	n = 7
Hábito	 Subarbutivo ou herbáceo	 Herbáceo
Cálice	 Lobado até metade do comprimento	 Profundamente lobado
Corola	 Simetria zigomorfa, anteras amarelas, interior do tubo amarelado ou esbranquiçado.	 Simetria actinomorfa ou zigomorfa, anteras amarelas ou violáceas, interior do tubo violáceo.
Prefloração	 Conduplicada	 Imbricada
Testa da Semente (microscopia eletrônica de varredura)	 Paredes retas e espessas	 Paredes onduladas e finas
Anatomia foliar	 Maior diferenciação celular	 Células menos diferenciadas

1.1.2. O gênero *Calibrachoa*: revisão taxonômica

Neste trabalho foram consideradas 25 espécies válidas em *Calibrachoa* (Tabela 1), sendo adotada a classificação proposta pela revisão de Stehmann (1999), além de duas espécies que estão em processo de descrição (não incluídas na Tabela 1), num total de 27 espécies para o gênero. O estabelecimento e a transferência de espécies de *Petunia* para *Calibrachoa* ocorreram muito recentemente, e muitos trabalhos ainda utilizam sinônimos.

Tabela 1. Nomenclatura assumida neste trabalho para as espécies de *Calibrachoa*. As abreviaturas dos países de ocorrência referem-se a: AR: Argentina, BR: Brasil, CAN: Canadá, CH: Chile, EUA: Estados Unidos, MEX: México, PAR: Paraguai, ROM: Romênia e UR: Uruguai.

Espécie (ano da descrição ou recombinação)	Sinônimos encontrados na literatura	País de Ocorrência
1. <i>Calibrachoa caesia</i> (Sendtn.) Wijsman (1990)	<i>Petunia kleinii</i> Smith & Downs	AR, BR, PAR
2. <i>C. cordifolia</i> Stehmann & L. Aguiar (2005)		BR
3. <i>C. duseunii</i> (R.E.Fr.) Stehmann & Semir (1997)		BR
4. <i>C. eglandulata</i> Stehmann & Semir (1997)		BR
5. <i>C. elegans</i> (Miers) Stehmann & Semir (1997)	<i>Petunia ledifolia</i> Sendtn.	BR
6. <i>C. ericifolia</i> (R.E.Fr.) Wijsman (1990)		BR
7. <i>C. excellens</i> (R.E.Fr.) Wijsman (1990)	<i>Petunia hassleriana</i> (Fr.) Wijsman, <i>Petunia variabilis</i> R. E. Fr.	AR, BR, PAR
8. <i>C. felliponei</i> (Sandwith) Stehmann (2007)		UR
9. <i>C. heterophylla</i> (Sendtn.) Wijsman (1990)		BR, UR
10. <i>C. humilis</i> (R.E.Fr.) Stehmann & Semir (1997)		BR, UR
11. <i>C. linearis</i> (Hook.) Wijsman (1990)		AR, BR, PAR, UR
12. <i>C. linoides</i> (Sendtn.) Wijsman (1990)	<i>Calibrachoa regnellii</i> (R.E.Fr.) Wijsman, <i>Calibrachoa macrodactylon</i> (L.B.Sm. & Downs) Wijsman	BR
13. <i>C. micrantha</i> (R.E.Fr.) Stehmann & Semir (1997)		BR
14. <i>C. missionica</i> Stehmann & Semir (2005)	<i>Petunia helianthemoides</i> Sendtn.	AR, BR
15. <i>C. ovalifolia</i> (Miers) Stehmann & Semir (1997)	<i>Petunia calycina</i> Sendtn. e variedades, <i>Petunia helianthemoides</i> Sendtn.	BR, UR
16. <i>C. paranensis</i> (Dusén) Wijsman (1990)	<i>Calibrachoa rupestris</i> (Dusén) Wijsman, <i>Petunia lignescens</i> Witasek	BR
17. <i>C. parviflora</i> (Juss.) Wijsman (1990)	<i>Petunia viscidula</i> (H.B.K.) Miers, <i>Calibrachoa procumbens</i> La Llave & Lex., <i>Calibrachoa mexicana</i> La Llave & Lex.	AR, BR, UR, CH, MEX, EUA, CAN, ROM
18. <i>C. pubescens</i> (Spreng.) Stehmann (2007)		UR
19. <i>C. pygmaea</i> (R.E.Fr.) Wijsman (1990)		BR, UR
20. <i>C. scabridula</i> (C.V.Morton) Stehmann (2007)		UR
21. <i>C. sellowiana</i> (Sendtn.) Wijsman (1990)	<i>Petunia alpicola</i> L.B.Sm. & Downs	BR
22. <i>C. sendtneriana</i> (R.E.Fr.) Stehmann & Semir (1997)	<i>Petunia linoides</i> Sendtn. var. <i>villosa</i> Sendtn.	BR
23. <i>C. serrulata</i> (L.B.Sm. & Downs) Stehmann & Semir (1997)		BR
24. <i>C. spathulata</i> (L.B.Sm. & Downs) Stehmann & Semir		BR
25. <i>C. thymifolia</i> (A.St.-Hil.) Stehmann & Semir (1997)		AR, BR, UR

Após a aceitação e o estabelecimento do gênero *Calibrachoa* La Llave & Lexarza pelo Comitê Internacional (Brummitt, 1989), Wijisman (1990) publicou o primeiro trabalho que adotou a nova nomenclatura e transferiu 15 espécies do gênero *Petunia* para *Calibrachoa*. Em 1992, Ando *et al.* publicaram uma revisão histórica que abordou os problemas de posicionamento taxonômico no grupo, com base nas espécies já publicadas e no trabalho de Wijsmann (1990). Nos 71 trabalhos pesquisados foram encontrados 64 nomes diferentes de espécies para os dois gêneros, dos quais 40 foram considerados possivelmente válidos, 15 foram considerados ambíguos e o restante foi atribuído a novas identificações realizadas independentemente após estas revisões, sem haver um exame minucioso dos espécimes já registrados.

De 1992 a 1997 foram descritas mais cinco espécies de *Petunia* (Ando e Hashimoto, 1993, 1994, 1995, 1996) e uma nova espécie de *Calibrachoa*, *C. eglandulata*, além de nove novas recombinações para o gênero (Stehmann e Semir, 1997). Somente em 1999, com a revisão das espécies brasileiras de *Petunia* e *Calibrachoa*, realizada por Stehmann, é que muitas dúvidas taxonômicas do gênero foram esclarecidas. Por exemplo, Ando *et al.* (1992) classificaram *C. excellens* e *C. variabilis* como espécies distintas baseados em variações do indumento, pequenas diferenças na forma do tubo da corola e no comprimento do pedúnculo. Stehmann (1999) interpretou estas variações como plasticidade fenotípica, sendo inconsistentes para definir unidades taxonômicas e, assim, propôs que *C. variabilis* deva ser considerado um sinônimo de *C. excellens*.

Em 2005, Stehmann e Semir descreveram mais duas espécies novas de *Calibrachoa* (*C. cordifolia* e *C. missionica*) e uma de *Petunia* (*P. secreta* Stehmann & Semir) para o estado do Rio Grande do Sul e, finalmente, em 2007 mais três espécies que ainda permaneciam em *Petunia* foram re combinadas para *Calibrachoa* (Stehmann e Bohs, 2007). Duas novas espécies, coletadas no estado do Rio Grande do Sul e na Província de Corrientes, na Argentina, estão em processo de descrição pelo Prof. Dr. João Renato Stehmann.

1.1.3. Tratamento taxonômico de *Calibrachoa parviflora* e *Calibrachoa pygmaea*

Petunia e *Calibrachoa* são amplamente aceitos como gêneros distintos, como

discutido anteriormente, mas duas espécies incluídas em *Calibrachoa*, *C. parviflora* e *C. pygmaea*, apresentam muitas peculiaridades que acabam trazendo dúvidas quando à classificação em um gênero ou outro.

Watanabe *et al.* (1997) através de cruzamentos interespecíficos demonstraram a presença de uma forte barreira genética entre estas duas espécies e o restante do gênero. Com relação a esta compatibilidade cruzada, estes autores separaram o grande grupo das petúnias em três: 1) Espécies com $2n=14$ (*Petunia* Juss. *sensu stricto*); 2) Duas espécies com $2n=18$ (*C. parviflora* e *C. pygmaea*); 3) Espécies restantes com $2n=18$ (demais espécies de *Calibrachoa*). A morfologia das sementes também suporta a divisão em três grupos, com *Petunia* possuindo paredes das células da testa da semente finas e onduladas, demais espécies de *Calibrachoa* com paredes espessas e retas e *C. parviflora* e *C. pygmaea* com paredes mais planas e menos pronunciadas, com sementes bem mais esféricas que as demais (Watanabe *et al.*, 1999) (Quadro 2).

Mishiba *et al.* (2000) através de medida do conteúdo de DNA nuclear também demonstraram a heterogeneidade do gênero, com *C. parviflora* e *C. pygmaea* possuindo respectivamente cerca de 66 e 54% da média $2C$ das demais espécies. Pequenas diferenças na anatomia foliar também foram verificadas por Reis *et al.* (2002). Como citado na seção anterior, a endoderme diferenciada em torno da nervura primária é exclusiva de espécies de *Calibrachoa*, mas os autores salientam que das 16 espécies estudadas (cerca de 70% do gênero) somente em *C. parviflora* e *C. pygmaea* a endoderme é menos desenvolvida.

Porém as diferenças mais acentuadas estão relacionadas à estratégia reprodutiva, com diferenças florais, de hábito e conseqüentemente no ambiente ocupado e na distribuição geográfica destas espécies.

Quadro 2. Diferenças e semelhanças entre *Calibrachoa parviflora*, *C. pygmaea* e os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*. Os retângulos indicam características comuns entre os organismos. Detalhes e referências dos resultados citados encontram-se no texto.

	<i>Petunia</i>	<i>Calibrachoa</i>	<i>C. parviflora</i>	<i>C. pygmaea</i>
Número Cromossômico	2n=14	2n=18		
Auto compatibilidade	Algumas espécies	Não	Sim	Não
Sucesso em cruzamentos interespecíficos	<i>Petunia</i>	<i>Calibrachoa</i>	<i>C. parviflora</i>	<i>C. pygmaea</i>
Hábito	Herbáceo	Sub-arbustivo e Herbáceo	Herbáceo	Herbáceo
Semente	Elipsóide ou reniforme	Elipsóide ou reniforme	Esferoidal	Esferoidal
Conteúdo de DNA 2C (pg)	3.00	3.00	1.91	1.56
Prefloração	Imbricada	Conduplicada	Conduplicada	Imbricada

Tsukamoto *et al.* (2002) demonstraram através de testes em laboratório que *Calibrachoa parviflora* é a única espécie auto-compatível do gênero, com 100% de frutos formados após autopolinização em laboratório. Os testes concluíram tratar-se de uma espécie autógama (com autopolinização automática). Esta condição parece ser derivada de um ancestral melitófilo, pois apesar do tamanho diminuto das flores (as menores encontradas no gênero, Figura 1) o formato, a coloração e a antese diurna são típicos de espécies melitófilas. Porém, segundo os autores, não foram observados visitantes em plantas de populações naturais.

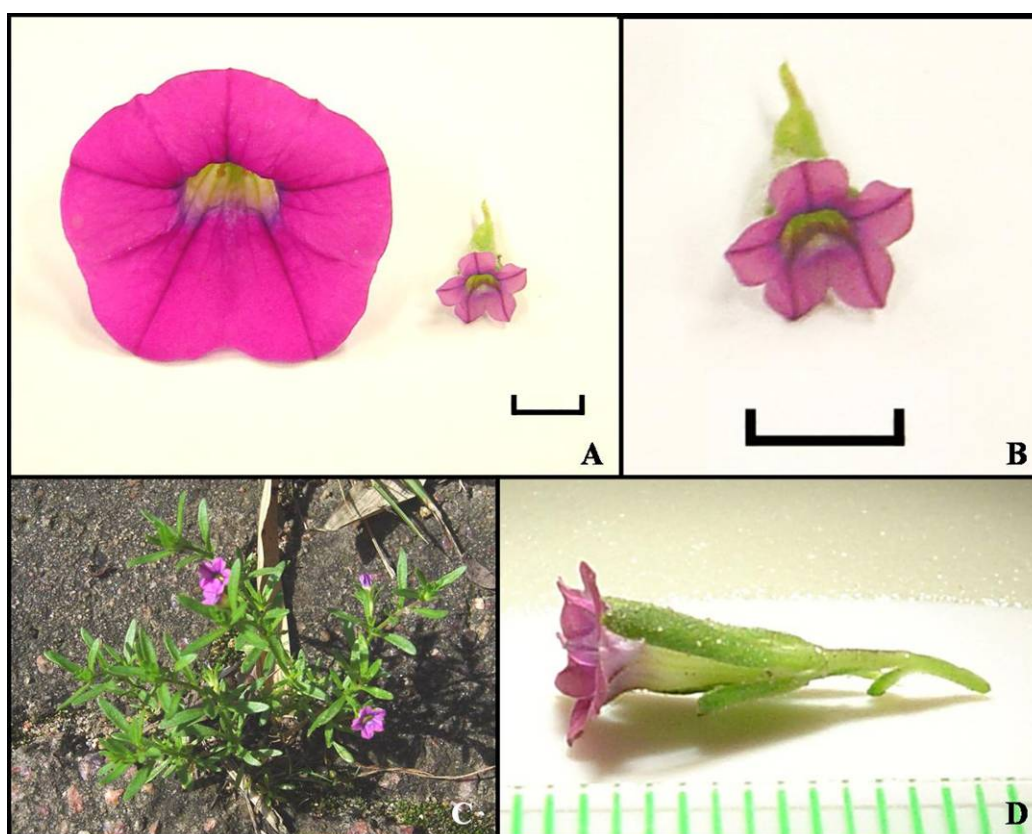


Figura 1. (A) Flor de *Calibrachoa parviflora* (à direita) em comparação com o tamanho médio das flores das outras espécies do gênero, aqui representada por *C. excellens* subsp. *excellens* (à esquerda). A barra corresponde a 5 mm. (B) Flor em detalhe, ressaltando a cor e formato, típicos da síndrome melitófila. (C) Indivíduo jovem crescendo nas frestas do pavimento, Campus do Vale, UFRGS, Porto Alegre-RS. (D) Flor em vista lateral. A distância entre as barras é de 1 mm. Fotos: Jéferson N. Fregonezi.

A condição de autogamia em *C. parviflora* pode estar diretamente relacionada ao sucesso de dispersão da espécie, que ocorre em territórios bem diferentes das demais (como discutido mais adiante). Juntamente com *C. pygmaea*, são as únicas espécies do gênero tipicamente herbáceas, além de ser uma das três espécies (além de *C. elegans* e *C. pygmaea*) com ciclo de vida anual. Suas sementes são muito pequenas, as menores encontradas no gênero, característica associada ao ciclo de vida. Possui hábito repente, isto é, com ramos crescendo junto ao solo, de forma plana e radial (Stehmann, 1999).

Calibrachoa pygmaea apresenta também características singulares, como a corola hipocrateriforme, enquanto as demais espécies apresentam corola infundibuliforme. E, embora algumas espécies de *Petunia* apresentem este tipo de corola (como *P. axillaris*), apenas *C. pygmaea* possui o tubo ventricoso e fortemente constricto no ápice (Figura 2). A

semelhança encontrada com *P. axillaris* é provavelmente resultado de convergência adaptativa ajustada ao mesmo tipo de polinizador. As flores brancas permanecem fechadas nas horas mais quentes do dia e se abrem no final da tarde, liberando uma fragrância forte e adocicada. Estas características são típicas de flores adaptadas à síndrome floral falenófila, que é a atração para polinização por mariposas.

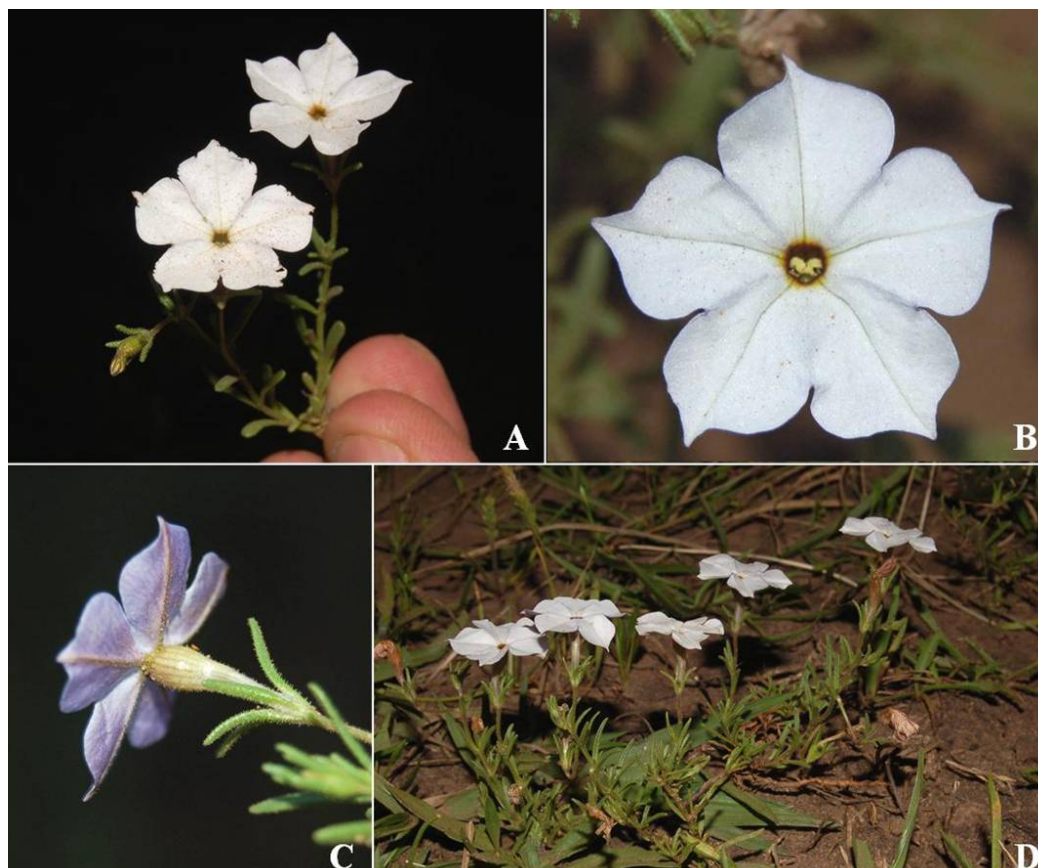


Figura 2. Flores de *Calibrachoa pygmaea*. (A) Ramo com duas flores. (B) Flor em vista frontal. (C) Flor em vista lateral, onde se observa o tubo “ventricoso” e fortemente constricto no ápice. (D) Ramo de um indivíduo com algumas flores abertas durante o anoitecer. Fotos: João R. Stehmann.

Entretanto, a principal inconsistência observada entre estas espécies é o tipo de prefloração, um caráter importante na taxonomia clássica para a separação destes gêneros. A imbricação das pétalas no grande grupo das petúnias ocorre no estágio médio de desenvolvimento e, de acordo com Tucker (1984), a definição morfológica neste estágio costuma distinguir gêneros próximos. A prefloração é usada como um caráter importante na distinção de taxa supra-genéricos como tribos (Hunziker, 1979). *Calibrachoa pygmaea*, embora possua o mesmo número cromossômico das demais espécies de *Calibrachoa*, possui prefloração imbricada, como de *Petunia*. Devido à importância deste caráter,

Stehmann (1999) considerou *C. pygmaea* como um gênero distinto denominado *Petuniopsis* e representado por uma única espécie, *Petuniopsis pygmaea* (R.E.Fr.) Stehmann & Semir. Porém, diversos trabalhos (citados anteriormente) baseados em muitos dados demonstram afinidades entre *C. pygmaea* e *C. parviflora*, embora morfológicamente (principalmente em atributos florais) estas espécies não pareçam próximas. Dados moleculares também suportam esta proximidade genética, como será visto em seções posteriores.

1.1.4. Morfologia das demais espécies do gênero

Excetuando-se *C. parviflora* e *C. pygmaea*, já caracterizadas na seção anterior, as demais espécies de *Calibrachoa* são subarbustivas ou arbustivas. Devido ao porte, sugere-se que a maioria seja perene, sendo que *C. elegans* é comprovadamente anual. Quanto ao hábito, três tipos básicos foram encontrados: ereto, decumbente e repente.

O hábito ereto, presente na maioria das espécies, caracteriza-se pela manutenção de um caule principal lenhoso, inicialmente único e tardiamente ramificado, geralmente com ramificações apicais, sendo que as plantas podem chegar a mais de um metro de altura. Espécies eretas de menor porte, como *C. elegans* podem exibir ramos basais ascendentes. Espécies eretas habitam os mais variados tipos de ambiente, desde afloramentos rochosos (*C. paranensis*) até capoeiras e bordas de mata (*C. linoides* e *C. excellens*) (Figuras 3A,B). As espécies decumbentes apresentam ramos jovens eretos, que quando maiores não se sustentam com o próprio peso, mas continuam com o ápice levemente ascendente, e não ultrapassam 20 cm de altura. Habitam geralmente campos arenosos ou pedregosos e afloramentos e paredões rochosos. São classificadas como decumbentes *C. cordifolia*, *C. eglandulata*, *C. heterophylla*, *C. humilis*, *C. micrantha*, *C. ovalifolia* e *C. sellowiana* (exemplo nas Figuras 3C,D,E). As espécies repentes são aquelas que crescem junto ao solo e emitem raízes adventícias a partir dos nós dos ramos, apresentando um crescimento radial característico. Além de *Calibrachoa parviflora* somente *C. spathulata* é tipicamente repente, e habita afloramentos em campos de altitude (Figuras 3F,G).

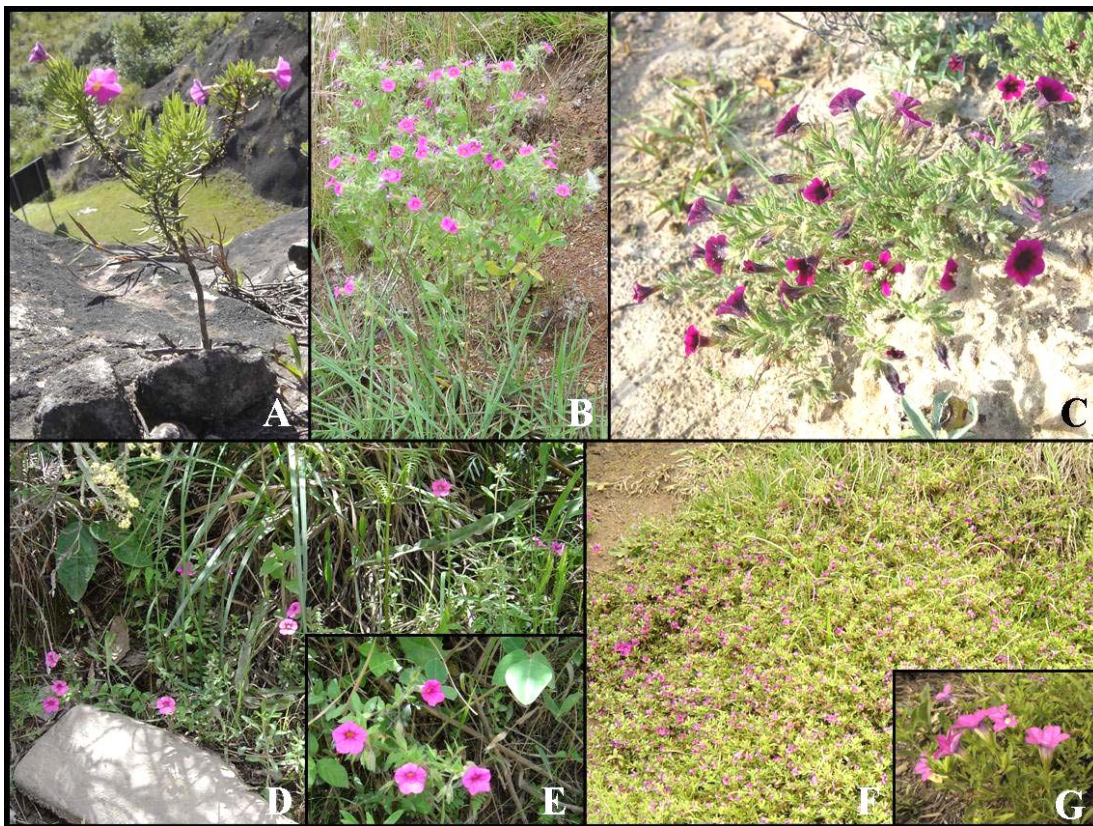


Figura 3. Hábitos de crescimento encontrados em *Calibrachoa*: ereto, como em *C. paranensis* (A) e *C. excellens* (B); decumbente, como em *C. heterophylla* (C) e *C. eglandulata* (D) com detalhe do ápice dos ramos eretos (E); e repente, como observado em *C. spathulata*, que cobre a superfície do solo com seus ramos (F) somente com os ápices ascendentes (G). Fotos: Jéferson N. Fregonezi.

O indumento (superfície da planta, contendo as diferentes formações epidérmicas) apresenta tricomas e braquiblastos (ramos vegetativos curtos, produzidos nas axilas das folhas). As folhas, sésseis com margens inteiras ou revolutas, são pequenas e raramente ultrapassam 5 cm de comprimento, sendo o tamanho e a forma foliar considerados bons caracteres diagnósticos na separação de espécies (Smith e Downs, 1966). Todas as espécies de *Calibrachoa* (exceto *C. eglandulata*) possuem tricomas com ápice glanduloso, unicelular, o que torna o indumento muito viscoso, que além de alguma função bioquímica, pode constituir uma defesa física principalmente contra insetos herbívoros que ficariam presos à superfície. No caso de *C. eglandulata*, a perda da capacidade de secreção pode ser considerada um caráter derivado no gênero (Stehmann e Semir, 1997).

A inflorescência é cimosa e as flores são geralmente pequenas e apresentam padrão

oblíquo (característico do diagrama floral de Solanaceae), sendo que na tribo Nicotianeae, apenas as inflorescências de *Petunia* são semelhantes às de *Calibrachoa*. O cálice é verde, às vezes purpúreo escuro na parte superior. O fruto é uma cápsula com deiscência iniciada do ápice em direção à base, separando duas valvas. Em geral as sementes são muito pequenas, liberadas diretamente no solo abaixo ou próximo à planta-mãe (Stehmann, 1999).

1.1.5. Morfologia floral e biologia reprodutiva

Com exceção de *C. pygmaea*, as espécies do gênero possuem corola com prefloração conduplicada, infundibuliforme, com porção basal tubulosa, subcilíndrica, e androceu formado por cinco estames, arranjados em três alturas (Stehmann, 1999). As diferenças entre espécies distintas geralmente são encontradas nos tamanhos do tubo, filete e estilete, como na coloração das flores. As espécies melitófilas possuem antese diurna, permanecendo as flores abertas desde algumas horas (como em *C. parviflora*) até cinco dias, como observado em *C. elegans* (Stehmann e Semir, 2001).

Quase todas as espécies de *Calibrachoa* são melitófilas, apresentando corolas com limbos de cores branca ou rosada (menos frequentes) e magenta ou púrpura (maioria das espécies), com fauce em geral amarelada ou esbranquiçada, dutos inter-estaminais em geral curtos, e o androceu incluso no tubo da corola. Nas flores de cor magenta e púrpura observam-se uma intensa luminância ou iridescência quando expostas à luz solar (Stehmann e Semir, 2001). Podem possuir ainda coloração contrastante, como em *C. excellens* subsp. *atropurpurea* e *C. heterophylla*, que possuem um anel purpúreo-escuro circundando a abertura da corola. Em flores brancas, ou rosa-claras, pode se observar venações e reticulações muito marcantes, como em *C. humilis* e *C. pubescens* (Figura 4).

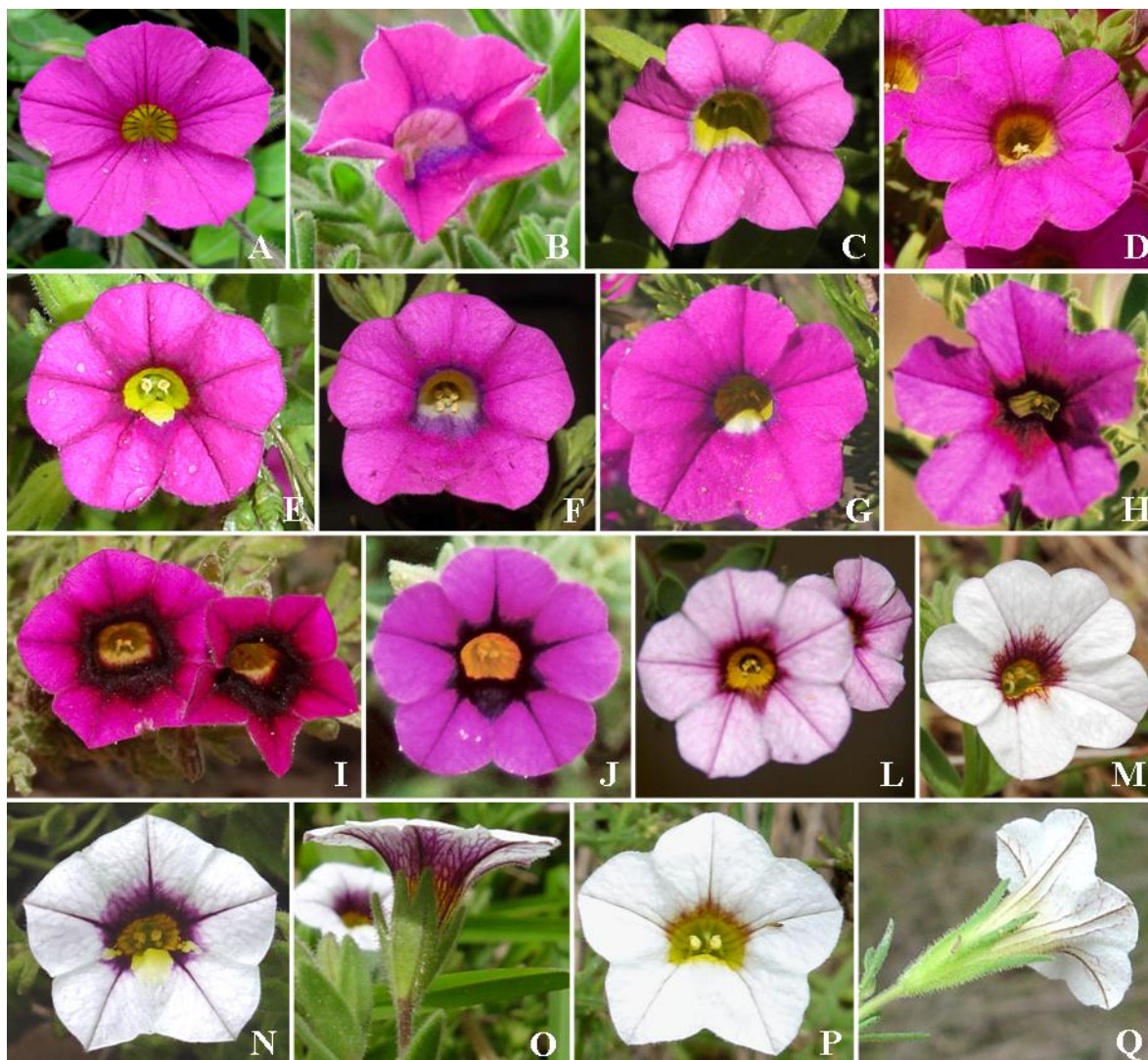


Figura 4. Variação floral em espécies melitófilas de *Calibrachoa*. A maioria das espécies possui flores com coloração púrpura ou magenta, como em *C. eglandulata* (A), *C. elegans* (B), *C. excellens* subsp. *excellens* (C), *Calibrachoa* sp.1 (D), *C. missionica* (E), *C. sellowiana* (F) e *C. paranensis* (G), com pequenas diferenças na posição dos estames, coloração interna e no formato e coloração da abertura da corola. Algumas flores púrpuras apresentam um anel escuro na abertura, como em *C. excellens* subsp. *atropurpurea* (H), *C. heterophylla* (I) e *C. thymifolia* (J). Indivíduos de *C. ovalifolia* podem apresentar flores cor-de-rosa (L) e brancas (M). Espécies com flores brancas, como *C. pubescens* (N) e *C. humilis* (P) apresentam ainda venações bem acentuadas nas pétalas, como visto nas figuras O e Q, respectivamente. Fotos: Jéferson N. Fregonezi, João R Stehmann e Geraldo Mäder.

Trabalhos de biologia floral no grupo são escassos, com informações sobre sistemas de cruzamento (Wijsman, 1983; Watanabe *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 2001; Tsukamoto *et al.*, 2002) e polinização de poucas espécies (Silva, 1994; Stehmann e Semir, 2001). Todas as espécies melitófilas possuem sistemas de auto-incompatibilidade, o que significa que dependem do polinizador para sua reprodução (Tsukamoto *et al.*, 2002). Dentre os grupos de abelhas visitantes, Stehmann (1999) registrou maior frequência da espécie *Hexanthera*

missionica (Colletidae), considerada o polinizador efetivo de diversas espécies do gênero. No Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, populações de *H. missionica* estão associadas exclusivamente a *Calibrachoa elegans*, espécie micro-endêmica dessa região. Stehmann e Semir (2001) atentaram ao fato de que ambas as populações de *Calibrachoa* e *Hexanthera* encontradas em Minas Gerais são as mais setentrionais de ambos os gêneros na América do Sul e que, antes deste estudo, só existiam registros de ocorrência de *Hexanthera* no Sul do Brasil e nas províncias de Formosa e Misiones, na Argentina. Tais dados podem sugerir que *Hexanthera* e *Calibrachoa* possuam uma história biogeográfica comum.

Outra espécie que parece ter grande importância na polinização de espécies de *Calibrachoa* é *Callonychium petuniae* (Andrenidae). Silva (1994) estudou sua importância no sucesso reprodutivo de *Petunia integrifolia* e concluiu que existe uma grande dependência do polinizador para sua efetiva reprodução. A cor púrpura das flores de *P. integrifolia* funciona como um atributo fundamental para a atração de machos e fêmeas de *Callonychium*. A presença de um quarto receptor nos olhos compostos desta espécie permite enxergar o vermelho presente nas flores púrpuras, uma evidência de um processo de especialização ou co-evolução (Wittmann *et al.*, 1990). Várias outras espécies do gênero podem ter relações estreitas com outras espécies de *Petunia* e *Calibrachoa* (Silva, 1994).

As fêmeas de três espécies de *Pseudagapostemon* (Halictidae) também são visitantes ativos e potenciais polinizadores de *Calibrachoa*. A distribuição geográfica coincidente de algumas destas espécies nas regiões dos planaltos do sul do Brasil, no segundo Planalto Paranaense e no Pampa Argentino sugerem também uma história biogeográfica comum (Stehmann 1999).

Apenas duas espécies micro-endêmicas dos campos de altitude de Santa Catarina, *C. sendtneriana* e *C. serrulata*, apresentam síndrome adaptativa para ornitofilia, com corola tubuloso-infundibuliforme, limbos vermelho (*C. serrulata*) e alaranjado (*C. sendtneriana*), dutos interestaminais compridos e anteras posicionadas na altura da boca da corola (Figura 5). O comprimento dos dutos sugere uma maior produção de néctar e a posição das anteras favorece a deposição de pólen na região inferior do bico ou na garganta do beija-flor. Embora não existam trabalhos de biologia floral nestas espécies, pelo menos durante os três últimos anos, em saídas a campo de nosso grupo de pesquisa, foram

observados beija-flores nos arredores das populações, mas nunca visitando as flores. Stehmann (1999) relata visitação de beija-flores tanto em populações naturais como em plantas cultivadas de *C. sendtneriana*.



Figura 5. Flores das espécies de síndrome ornitófila: *Calibrachoa serrulata* (A, B e C) apresenta flores avermelhadas e *C. sendtneriana* (D,E e F) flores laranjas. Os estames com as anteras posicionadas na abertura da corola (como observado nas flores em vista frontal e lateral), o tubo fino e mais alongado e a cor são atributos típicos de polinização por beija-flores. Fotos: Jéferson N. Fregonezi e João R. Stehmann.

1.1.6. Distribuição geográfica e hábitat

Com exceção de *C. parviflora*, o gênero é tipicamente sul-americano, com distribuição subtropical atlântica entre os paralelos 18° e 37°, ocorrendo mais densamente na região oriental ao longo da costa (Figura 6). A partir do limite sul se distribui amplamente pelo pampa em direção norte, restringindo-se cada vez mais a oeste pelas regiões rochosas de solos rasos que sustentam campos abertos até as terras mais altas dos estados de Santa Catarina e Paraná. Na região sudeste do Brasil (limite setentrional da distribuição na América do Sul) o gênero é representado por poucas populações de *C.*

linoides, espécie relativamente abundante mais ao sul, e *C. elegans*, micro-endêmica isolada em altitudes superiores a 1000 metros no estado de Minas Gerais.

Na América do Sul, as espécies de *Calibrachoa* habitam a província biogeográfica Paranaense e parte das províncias Pampeana e do Espinal (de acordo com a classificação de Cabrera e Willink, 1980). De um total estimado de 27 espécies, 15 são do elemento da província Paranaense e 12 são elementos das províncias Pampeana e do Espinal. Em território brasileiro foram encontradas 24, e há registros da ocorrência de oito espécies de *Calibrachoa* no Uruguai, oito na Argentina e quatro no Paraguai. São reconhecidos dois centros de diversidade para o gênero, localizados nas terras altas do sul do Brasil: os planaltos de Curitiba e Ponta Grossa, no Paraná, onde ocorrem sete espécies, e os campos de altitude da borda oriental do planalto na região sul-sudeste de Santa Catarina, onde seis espécies são encontradas (Stehmann, 1999).

Calibrachoa parviflora possui um padrão de distribuição distinto, ocorrendo também na América do Norte (estados da Flórida, Texas, Arizona e Califórnia nos Estados Unidos, além do México) e América Central (Cuba), com alguns registros em cidades portuárias do Canadá e Romênia. Na América do Sul ocorre desde o extremo sul de Santa Catarina, em direção oeste até o noroeste da Argentina, atingindo o sul até a Patagônia subantártica, sendo a única espécie que ocorre no Chile. Sobreposições com outras espécies podem ocorrer no nordeste da Argentina, extremo sul do Brasil, sudeste do Paraguai e por todo o território uruguaio (Figura 6). É uma espécie de terras baixas (pois não alcança as regiões montanhosas no Rio Grande do Sul e Santa Catarina) e cresce em solos arenosos abertos ao longo dos rios e lagos de água doce (Stehmann, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2002). Além destes ambientes, pode ser facilmente encontrada em áreas urbanas, ocupando frestas em calçadas e em pedras de pavimentação, onde nenhuma outra espécie do gênero já foi vista.

Como discutido por Tsukamoto *et al.* (1998, 2002), no grande grupo das petúnias (gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*) as espécies auto-incompatíveis ocorrem em áreas com alta precipitação, enquanto que as auto-compatíveis ocorrem em áreas bem mais secas. Na região subtropical/temperada da América do Sul, a precipitação anual decresce no sentido Leste-Oeste de mais de 1000 mm até praticamente sem chuva na Cordilheira dos Andes. Este mesmo padrão é observado também no gênero *Petunia*, com subespécies de *P.*

axillaris exibindo auto-compatibilidade em regiões subandinas, sugerindo que o volume de precipitação anual pode ser considerado como um fator associado no processo de diferenciação de compatibilidade (Tsukamoto *et al.*, 1998, 2002). A presença de *C. parviflora* na América do Norte é considerada por diversos autores como sendo resultado de introdução acidental, classificada como exótica naturalizada. Uma das hipóteses seria o transporte das sementes por aves migratórias de forma ocasional, pois a espécie não possui síndrome ornitocórica. Porém, o cenário mais provável seria a introdução, entre os séculos XVI e XVIII, pelo transporte acidental de sementes em navios espanhóis, partindo da América do Sul para o México e sul dos Estados Unidos, já que estas regiões pertenciam à Espanha e existia um intenso comércio e transporte de grãos entre as colônias. Embora seja encontrada na porção continental da América do Sul, existem muitos registros de ocorrência em cidades portuárias, desde o sul (Porto Alegre e Rio Grande - Brasil, Montevideu - Uruguai, Buenos Aires - Argentina e Valparaíso - Chile), como também na América do Norte (New Orleans e Laredo, nos Estados Unidos e cidades do Canadá) e Europa (Delta do Danúbio, na Romênia), que reforçam a hipótese de introdução humana por transporte marítimo.

A grande maioria das demais espécies de *Calibrachoa* apresenta um padrão de distribuição contínuo e restrito a uma região fisiográfica específica. Esta restrição parece estar associada a condições edáficas distintas, sendo que o gênero é característico de áreas abertas, ocupando os mais variados substratos (Figura 7), preferencialmente afloramentos rochosos e solo raso, com poucas espécies associadas à borda de matas. Dentre as espécies mais “generalistas” quanto ao ambiente, destacam-se *C. excellens* e *C. linoides*, que conseqüentemente possuem distribuições geográficas bem amplas em comparação com as outras espécies.

Calibrachoa excellens está presente em praticamente toda a região sul do Brasil, tendo como limite norte os campos do Terceiro Planalto do Paraná. É mais abundante na porção continental, estendendo-se para a província de Misiones na Argentina, Paraguai e norte do Uruguai. É encontrada em ambientes variados, desde afloramentos rochosos (graníticos, basálticos e areníticos) como também em campos de solo arenoso ou latossolo (terra roxa). No extremo sul do Brasil e norte do Uruguai são encontradas plantas com folhas e flores bem maiores, que possuem um grande anel escuro circundando suas aberturas. Esta variação de coloração, além do tamanho das flores e da distribuição restrita,

levou Stehmann (1999) a reconhecê-la como subespécie: *C. excellens* subsp. *atropurpurea* (Stehmann e Bohs, 2007). Habita solos de conglomerado arenítico, geralmente pobres.

Calibrachoa linooides é encontrada desde o Rio Grande do Sul até o Paraná, nas regiões dos campos acima de 900 m. Diferentemente de *C. excellens*, é mais abundante nos campos da borda oriental do Planalto das Araucárias. Pode ser encontrada em substratos rochosos ou em latossolo, em campos abertos ou associada a florestas. A região sudeste abriga populações disjuntas, tanto entre si como em relação às populações mais ao sul, nos campos de altitude das Serras da Mantiqueira e do Caparaó, nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Calibrachoa excellens e *C. linooides* são muito parecidas vegetativamente, sendo distinguidas por características florais como formato do estigma. Suas distribuições geográficas no sul do Brasil apresentam uma tendência de ocorrência com *C. excellens* na porção continental e *C. linooides* possuindo maior abundância na região do planalto ocidental. Desta forma podem ser consideradas parapátricas, com uma grande região de contato existente na faixa central dos campos do planalto sul-brasileiro.

Algumas espécies também possuem distribuições relativamente amplas, mas estão associadas à ambientes específicos, principalmente pelo tipo de solo. *Calibrachoa ovalifolia*, por exemplo, é típica da região pampeana, encontrada na metade sul do Rio Grande do Sul (regiões da Campanha, Serra do Sudeste e Depressão Central), norte do Uruguai e províncias de Misiones e Corrientes, na Argentina, ficando cada vez mais rara em direção ao norte, até o planalto. Habita afloramentos rochosos e campos pedregosos. Outra espécie típica do pampa é *C. heterophylla*, encontrada em dunas e campos arenosos tanto ao longo de toda a Planície Costeira (metade sul de Santa Catarina até Uruguai) como também nas regiões arenosas nas margens dos rios Santa Maria e Cacequi, afluentes do Rio Uruguai no interior do estado do Rio Grande do Sul.

Calibrachoa sellowiana está associada exclusivamente aos afloramentos rochosos do planalto sul-brasileiro, no domínio dos campos naturais de 700 até 1800 m de altitude. É encontrada desde o nordeste do Rio Grande do Sul, na borda oriental do planalto, seguindo em sentido norte-noroeste para o interior, até a região de Curitibanos em Santa Catarina e os campos de Palmas, no sul do Paraná.

A grande maioria das espécies possui distribuição mais restrita, porém é relativamente abundante, com muitas populações conhecidas dentro da área de ocorrência. Como exemplo, pode-se citar *C. missionica*, encontrada em afloramentos rochosos na região das Missões, que compreende o noroeste do Rio Grande do Sul, a província de Misiones e parte da província de Corrientes, na Argentina, e o sul do Paraguai (Stehmann e Semir, 2005). *Calibrachoa pygmaea*, espécie bem distinta das demais (como discutido na seção 1.1.3) habita preferencialmente as regiões de campos úmidos, brejos e locais temporariamente alagados na porção sul do Rio Grande do Sul, parte do Uruguai e da Argentina. Outra espécie restrita próxima a essa região é *C. humilis*, que ocorre nos campos pedregosos do sudoeste do Rio Grande do Sul e norte do Uruguai. Os Campos Gerais do planalto de Ponta Grossa, no Paraná, abrigam espécies associadas aos afloramentos areníticos e campos arenosos, entre elas *C. ericifolia*, *C. micrantha* e *C. paranensis*, encontradas desde o norte de Santa Catarina até o sul de São Paulo.

Algumas espécies podem ser consideradas endêmicas de locais muito restritos, com poucas populações e/ou indivíduos conhecidos, e são mais suscetíveis não só pelo pequeno número de representantes conhecidos, mas também por possuírem especializações que as tornariam mais vulneráveis a possíveis alterações nestes micro-ambientes.

A região dos campos de altitude de Santa Catarina abriga três espécies micro-endêmicas encontradas em microhabitats distintos nas porções mais altas do planalto sul-brasileiro, acima de 1200 m. *Calibrachoa eglandulata* ocorre em uma pequena região nas áreas mais altas da borda do planalto sul, próxima à Serra do Corvo Branco em Urubici-SC, onde duas populações são conhecidas. Ela cresce nos afloramentos rochosos em pequenos paredões antes da borda da serra, entre a vegetação arbórea. Exceção no gênero, a tolerância à sombra parece ser uma adaptação desta espécie, que ainda apresenta outra autapomorfia, a ausência de glândulas secretoras nos tricomas (Stehmann e Semir, 1997).

Calibrachoa sendtneriana é endêmica das regiões da borda do planalto, também em altitudes superiores a 1200 m, com poucas populações descritas nos municípios de Bom Jardim da Serra e Bom Retiro, em Santa Catarina. Pode ser encontrada em áreas abertas, como os campos rochosos e turfeiras, mas sempre associada ou próxima à vegetação da orla das matas nebulares, formadas nos vales e contornos dos cursos d'água que correm pelas rochas em direção às bordas dos aparados. *Calibrachoa serrulata* ocorre somente na

região da Serra do Oratório em Bom Jardim da Serra, com poucos registros desde sua descrição. Ocupa as formações rochosas da margem no limite oriental do planalto ou mesmo as paredes rochosas, em altitudes superiores a 1400 m. As duas espécies possuem atributos florais adaptados à polinização por beija-flores, característica derivada no gênero.

Calibrachoa elegans habita os campos na região do quadrilátero ferrífero em Minas Gerais, crescendo exclusivamente sobre a canga, solo de cascalho formado basicamente por minério de ferro. Apresenta folhas com superfície revoluta, estômatos na face abaxial (Reis *et al.*, 2002) e um indumento foliar muito denso que, aliadas ao ciclo de vida anual, são adaptações exclusivas desta espécie ao clima com regime de chuvas bem definido, com quatro meses de estação seca (maio a setembro). É a única espécie do gênero reconhecida como ameaçada, pela inclusão na lista de espécies ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais, na categoria “criticamente em perigo” (COPAM, 1997). Seu habitat, os campos rupestres hematíticos nas serras ao redor da cidade de Belo Horizonte, está cada vez mais reduzido e fragmentado por diversos impactos antrópicos como a mineração, urbanização e a especulação imobiliária.

A região da Depressão Central do Rio Grande do Sul também abriga uma espécie micro-endêmica, *C. cordifolia*, descrita e coletada unicamente em uma área de campo inalterado no município de Itaara, próximo à Santa Maria (Stehmann e Semir, 2005). Esta região é o limite sul da Serra Geral, sendo assim uma zona de contato entre as regiões fisiográficas do Planalto e da Campanha (Mondin e Baptista, 1996). A transição entre floresta estacional e os campos, embora brusca em alguns locais, forma uma paisagem de mosaico entre áreas mais acidentadas com florestas e áreas mais planas com formações campestres.



Figura 6: Distribuição geográfica das espécies do gênero *Calibrachoa*. *C. parviflora* (com distribuição assinalada pela cor amarela) também é encontrada na América do Norte e na Europa, conforme indicado na figura superior esquerda (círculos amarelos). *C. pygmaea* (cor vermelha) tem distribuição restrita ao extremo sudoeste do Rio Grande do Sul e parte do Uruguai. As demais espécies do gênero tem sua distribuição indicada pela cor azul-marinho. Mapa elaborado a partir de dados de Stehmann (1999) e Tsukamoto *et al.* (2002).



Figura 7. Alguns tipos de substratos habitados por representantes de *Calibrachoa*. Afloramentos rochosos na região das missões (noroeste do Rio Grande do Sul) (A), onde pode ser encontrada *C. missionica* (B); dunas arenosas da Planície Costeira (C), onde ocorre *C. heterophylla* (D); vegetação de campo no interior do Rio Grande do Sul (E), onde ocorrem várias espécies, entre elas *C. excellens* subsp. *atropurpurea* (F) e *C. cordifolia*, espécie micro-endêmica com uma população conhecida em Itaara-RS (G); campos dos planaltos entre os estados do Paraná e Santa Catarina (H), ambiente habitado por *C. excellens* subsp. *excellens* (I) encontrada tanto em áreas abertas como em barrancos de latossolo próximo a formações florestais; campos do planalto catarinense (J), onde são encontradas várias espécies, entre elas *C. linoides* (L), que ocupa substratos variados; campos do planalto paranaense (M), onde pode ser encontrada, entre outras, *C. paranensis* (N); vegetação crescendo sobre a canga (solo rico em ferro) em campos de altitude de Minas Gerais, onde se encontra *C. elegans* (P); campos de altitude da borda do planalto sul-brasileiro (Aparados da Serra Catarinense)(Q), onde *C. sellowiana* ocorre em solos rochosos e rasos (R), bem como as espécies micro-endêmicas *C. serrulata* (nas encostas dos aparados, em S) e *C. sendtneriana* (encontrada ao redor das matas nebulares, letras T e U). Fotos: Jéferson N. Fregonezi, João R. Stehmann e Aline P. Lorenz-Lemke.

1.2. Campos do Sul e Sudeste do Brasil: evolução e dinâmica atual

As Angiospermas surgiram mais ou menos no início do período Cretáceo (± 140 milhões de anos atrás). Dentro dos locais de estudo, a metade sul do Rio Grande do Sul deve ter abrigado representantes nessa época, pois parte da formação encontrada hoje teve início no Triássico (± 200 milhões de anos atrás), com predomínio de um clima desértico no continente que antes estava submerso (Leite, 2002; Porto, 2002).

Porém um dos grandes eventos geológicos que afetou toda a região foram os derramamentos de basalto, ocorridos há cerca de 150 milhões de anos. Rambo (1951) afirma que os campos encontrados nos planaltos não só formam a paisagem mais antiga, como também abrigaram a primeira camada de fanerógamos. Estes derrames cobriram mais de um milhão de quilômetros quadrados na Bacia Sedimentar do Paraná e como provavelmente devem ter destruído a biota existente no deserto triássico, pode-se inferir uma idade máxima para o começo da vegetação campestre moderna (Holz, 2003).

Já a vegetação florestal deve ter surgido depois do estabelecimento da vegetação aberta. As Gimnospermas atuais (*Araucaria* e *Podocarpus*) provavelmente não formaram a primeira cobertura vegetal do planalto, pois ocupam ambientes com maior precipitação. Sua formação se deu após a origem da costa brasileira, depois da ruptura do supercontinente Gondwana e do levantamento da plataforma sul-americana, durante o Mesozóico Superior e Terciário (60 milhões de anos atrás) (Almeida *et al.*, 2000). O soerguimento criou uma nova fonte de umidade na margem, propiciando o estabelecimento de florestas pluviais. Assim, esta época pode ser considerada como uma idade máxima para o surgimento das florestas em terras mais altas.

Os eventos tectônicos subsequentes, relacionados com a Reativação da Plataforma Sul-americana, com grandes depressões por falhamento, movimentos de ascensão e subsidência na borda leste continental, devem ter extinguido os possíveis ancestrais dos gêneros *Araucaria* e *Podocarpus* e de outros representantes da atual Floresta Ombrófila Mista (Leite, 2002).

Tanto em períodos anteriores como ao longo do tempo de separação dos continentes, os climas equatoriais eram tropicais como são hoje, mas os gradientes latitudinais na temperatura eram menos pronunciados e os climas terrestres eram

geralmente mais homogêneos. No início do Mioceno (± 24 milhões de anos), o clima global gradualmente se tornou mais frio e mais seco. A extensão da camada de gelo da Antártida e a intensificação da circulação oceânica e atmosférica durante o Mioceno Médio (15 milhões de anos atrás) estabeleceram um forte gradiente térmico latitudinal que se intensificou durante os períodos interglaciais (Leite, 2002; Brown e Lomolino, 2006).

Outras transformações significativas neste período foram a segunda fase de soerguimento dos Andes, que levou a muitas mudanças climáticas como a desertificação da Patagônia, e as mudanças nas bacias hidrográficas, como a origem do atual curso do Rio Paraguai, o que propiciou o desenvolvimento de florestas secas e da vegetação inicial do pampa moderno (Gregory-Wodzicki, 2000). Foi também durante o Plioceno que a América do Sul uniu-se à América do Norte pelo Istmo do Panamá, acabando com a barreira para as biotas americanas.

Todos estes grandes eventos de deriva dos continentes, em maior ou menor grau, mudaram por muitas vezes o padrão de distribuição da vida na Terra. A posição do equador e dos pólos não se alterou, mas a migração continental modificou a distribuição das espécies e alterou a faixa tropical do planeta neste imenso período do tempo geológico. Porém durante os últimos dois milhões de anos, apesar da relativa estabilidade das placas tectônicas, o perfil biogeográfico do planeta pode ter sido transformado tanto quanto em outro período de sua história.

Os eventos glaciais do Pleistoceno, ao contrário dos anteriores, não foram causados pela deriva dos continentes. Foram provocados pela mudança periódica na interceptação e absorção da radiação solar pela superfície da Terra, por mudanças em sua órbita. Três fenômenos periódicos independentes, denominados Ciclos de Millankovitch, afetaram em conjunto a órbita terrestre levando a flutuações na quantidade de energia que a Terra recebe do Sol. Estas flutuações criaram os ciclos glaciais e interglaciais e explicam as diversas reversões climáticas ocorridas no Pleistoceno (Berger, 1988; Brown e Lomolino, 2006).

O principal efeito dos ciclos de Millankovitch foi uma alteração dos períodos climáticos relativamente secos ou mais úmidos nos continentes, desencadeando respostas dos seres vivos e modificações na fisionomia das paisagens vegetais. Estas oscilações em períodos geologicamente curtos ocorreram em conjunto com um resfriamento gradual do

planeta desde o início do Cenozóico. As diferenças de temperaturas em relação à latitude tornaram-se maiores durante o Terciário e, durante o Quaternário, os períodos secos (glaciais) foram mais frios também nos trópicos e os períodos úmidos (interglaciais) foram relativamente quentes (Haffer e Prance, 2002; Oliveira *et al.*, 2005).

Muitos autores focalizaram seus estudos nos episódios de glaciação do Pleistoceno no hemisfério norte, pois 80% do gelo glacial cobriram este hemisfério. Aproximadamente um terço de toda a superfície terrestre do hemisfério norte ficou coberta com espessas geleiras, além de grandes massas de mar congelado nos pólos. Conseqüentemente um grande volume de água saiu dos oceanos, excedendo o equivalente a 50 milhões de km³ de gelo, mais que as atuais camadas de gelo da Antártida e Groenlândia juntas (Brown e Lomolino, 2006). No hemisfério Norte o efeito dos períodos glaciais na distribuição dos organismos foi muito mais intenso, pois o avanço das geleiras levou à extinção ou redução dos habitats disponíveis, principalmente em altas latitudes, alterando rotas de dispersão entre regiões não congeladas. Porém, na América do Sul, a formação efetiva de geleiras ocorreu principalmente na Cordilheira dos Andes, com maior cobertura de gelo no Chile e Argentina (Clapperton, 1993).

Desta forma, ao longo das várias fases climáticas glaciais e interglaciais, havia sempre tipos de vegetação fechada (florestas) e tipos abertos, com suas respectivas comunidades animais, ainda que suas composições específicas variassem em certo grau. O efeito biótico de tais mudanças foi que as comunidades migraram e/ou modificaram suas distribuições de acordo com as mudanças climáticas (Haffer e Prance, 2002).

Para a América do Sul, Webb (1991) propôs um modelo fitogeográfico generalizado para as fases glaciais e interglaciais do Neógeno (que abrange os períodos Oligoceno, Mioceno e Plioceno, de cerca de 30 milhões até cerca de dois milhões de anos atrás) e Quaternário, considerando quatro tipos básicos de vegetação: Deserto, Savana, Floresta Pluvial e Floresta Temperada (Figura 8). Nas fases interglaciais, a distribuição é próxima à observada atualmente; nas glaciais, entretanto, as vegetações campestres dominavam a paisagem, com savanas ou desertos nas regiões subtropicais e temperadas, e florestas encontradas somente em margens de rios (matas de galeria) ou em refúgios pequenos, onde condições mais úmidas eram encontradas por conta da alta pluviosidade (Bolzon e Marchiori, 2002).

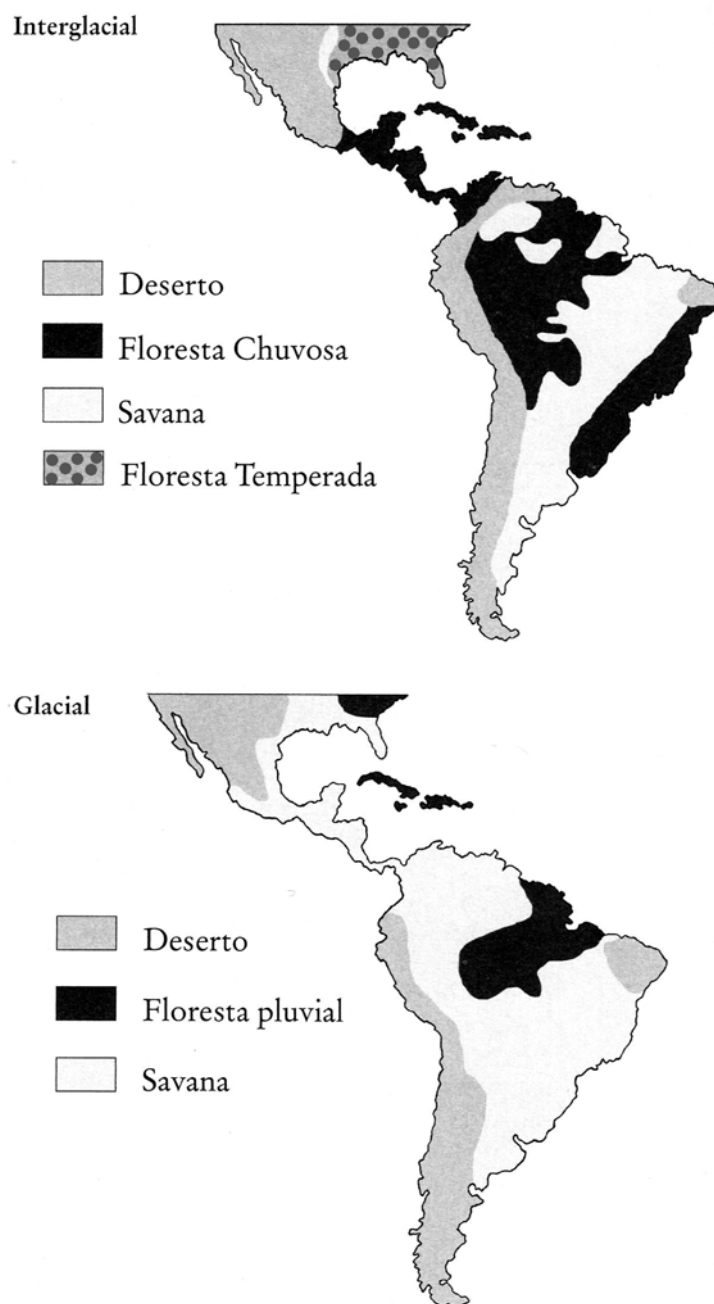


Figura 8: Modelo de distribuição das formações vegetais na América Central e do Sul durante os ciclos glaciais. Modificado de Bolzon e Marchiori (2002).

Estes refúgios úmidos, principalmente na região amazônica, foram muito discutidos e levantados como explicação para a grande diversidade encontrada atualmente nas florestas tropicais. A teoria dos Refúgios da Amazônia, desenvolvida inicialmente por Haffer (1969) para explicar a distribuição e especiação de aves, seguida pelos trabalhos de Vanzolini e Williams com répteis, e exposta resumidamente em Vanzolini e Williams

(1981), postula a persistência de manchas de florestas tropicais úmidas em terras baixas amazônicas durante as fases geralmente secas do Cenozóico (Terciário e Quaternário). A teoria não se restringe ao Pleistoceno, mas aplica-se também ao Cenozóico (inclusive no Quaternário), quando os ciclos de Millankovitch causaram oscilações no nível do mar, nos estratos geológicos e nos climas e vegetações nos continentes (Haffer e Prance, 2002). A existência de refúgios glaciais, bem como teorias de especiação nestes refúgios, não ocorreu somente em florestas tropicais, pois as mudanças foram globais durante os últimos milhões de anos, sendo confirmadas por muitos trabalhos filogeográficos recentes (Hewitt, 2000; Carnaval e Moritz, 2008).

Embora tenham sido identificados vários ciclos climáticos durante o Quaternário, muitos dados palinológicos datados do Último Máximo Glacial (expresso a partir daqui simplesmente como UMG, correspondendo ao período datado entre 26000 e 17000 anos antes do presente, ou A.P.) estão disponíveis para a região sudeste e Sul do Brasil, e demonstram a amplitude das transformações nas paisagens vegetais não só neste período, podendo ser extrapoladas para os demais períodos glaciais e interglaciais.

Durante o UMG as áreas ocupadas atualmente por floresta semidecidual no sul e sudeste do Brasil eram cobertas por campo e, mais ao norte, por vegetação de cerrado. Os campos subtropicais se estenderam ao menos 750 km a partir do sul para o norte (Behling e Lichte, 1997; Behling, 2002a). Atualmente podem ser observadas “manchas” de Floresta Ombrófila Mista na região sudeste, onde *Araucaria angustifolia* tem seu ponto mais setentrional de ocorrência conhecida na Serra do Caparaó, próximo à fronteira de Minas Gerais com o Espírito Santo, o que indica a existência de condições climáticas favoráveis nestas regiões para o domínio desse tipo florestal (Leite, 2002). Durante o UMG, a região era provavelmente uma paisagem coberta por campos, com as araucárias presentes ao longo dos cursos d'água, onde atualmente existe a Floresta Estacional Semidecidual (Behling, 2002a).

Há 26.000 anos A.P., o registro de pólen das terras atlânticas baixas próximas ao limite entre os estados do Paraná e Santa Catarina documenta que a vegetação campestre e florestas adaptadas ao frio ocorriam na região atual da floresta atlântica no sul durante os períodos glaciais. Durante o UMG em particular, os campos eram abundantes nas terras baixas da costa. A floresta tropical deve ter recuado pelo menos 500 km ao norte,

indicando um resfriamento de 3-7° C (Behling, 1997a; Behling e Negelle, 2001).

Dados dos estados do Paraná (Campos Gerais) (Behling, 1997b), Santa Catarina (Behling, 1995) e Rio Grande do Sul (Behling e Negelle, 2001; Behling *et al.*, 2004, 2005) têm demonstrado que extensas áreas de vegetação de campo existiam nas terras altas ao longo dos períodos glaciais e no Holoceno Inicial e Médio. Uma estação seca durando provavelmente três meses por ano foi característica do Holoceno Inicial e Médio (Behling, 2002a,b).

Nos planaltos do Sul, onde hoje existem grandes áreas de Floresta Ombrófila Mista, a vegetação de campos ampla, sem árvores, sugere um clima frio e seco com repetidos eventos de geadas e temperaturas mínimas no inverno abaixo de -10 °C, o que não permite o crescimento de araucárias nas terras altas. Uma depressão nas médias anuais de temperatura é provavelmente similar ao que ocorreu nos campos de altitude do sudeste do Brasil, que estava na faixa de 5-7 °C no UMG (Behling e Pillar, 2007).

As terras baixas do oeste do Rio Grande do Sul foram naturalmente cobertas por campos durante períodos glaciais e interglaciais. Florestas de galeria, encontradas hoje no contorno dos rios, não existiam nestes períodos. A transição do período glacial tardio ao Holoceno (10.460 anos A.P.) reflete uma mudança de clima frio e seco para quente e seco (Behling *et al.*, 2005).

Porém, após o UMG, o gradual aquecimento dos trópicos favoreceu novamente a expansão das florestas sobre as vegetações campestres. A partir de 12.300 anos A.P., as florestas tropicais pluviais substituíram os campos frios das terras atlânticas baixas próximas ao limite entre os estados do Paraná e Santa Catarina (Behling, 2002b). No oeste do Rio Grande do Sul, as florestas de galeria aparecem no registro somente há 5.170 anos A.P., indicando uma mudança para condições climáticas mais úmidas. A máxima extensão de florestas de galeria em 1.550 anos A.P. reflete um período mais úmido (Behling *et al.*, 2005; Behling e Pillar, 2007).

Nos registros de pólen do UMG e Holoceno Inicial, *Araucaria angustifolia* correspondia a 1% do total amostrado (dados do Morro da Igreja, em Santa Catarina, e Serra dos Campos Gerais, no Paraná). Durante o Holoceno Inicial e Médio (11.500-4.320 anos A.P.), a vegetação de campos ainda dominava a paisagem. Os taxa da floresta de araucária cresceram rapidamente, mas ainda eram raros, indicando que as populações

migraram até a área de estudo provavelmente ao longo de pequenos cursos d'água (Behling e Pillar, 2007).

Durante o início do Holoceno Tardio (4.320-1.100 anos A.P.), as florestas de araucária se expandiram para a região, formando uma rede de florestas de galeria ao longo dos rios, enquanto a vegetação de gramíneas dominava. Durante o segundo período no Holoceno Tardio (1.100-430 anos A.P.), uma forte e marcante expansão das florestas, primariamente *A. angustifolia* e *Mimosa scabrella*, substituiu a vegetação de campos. E durante o último período do Holoceno (430 anos até o presente), a floresta ainda continuou se expandindo, reduzindo cada vez mais as áreas de vegetação de campos (Behling, 2002a; Behling e Pillar, 2007).

Antes do início da exploração madeireira, a porcentagem de pólen de araucária nos registros é no mínimo 10 vezes maior que no UMG (ou seja, cerca de 10% do total de pólen), o que significa cerca de 20.000 km² durante os períodos glaciais e o Holoceno Inicial. A área de floresta de araucária cresceu desde o UMG cerca de 900% e o estoque de carbono resultante aumentou para 3,4x10⁹ tC (108%) desde o UMG (Behling, 2002a).

A dinâmica campo-floresta no planalto sul-brasileiro tem sido um tema muito discutido entre os fitogeógrafos, com uma questão principal: as áreas de campo e floresta observadas atualmente são formações naturais ou a manutenção deste cenário está relacionada com a atividade humana? Existem evidências de que, se excluíssemos as atividades de pastejo e fogo, as florestas de araucária atuais continuariam se expandindo sobre os campos (Behling *et al.*, 2005; Behling e Pillar, 2007). Segundo Rambo (1956), os campos devem ter como principal limitação a profundidade dos solos, pois pelas condições climáticas, principalmente pluviosidade, estas regiões tenderiam a possuir formações do tipo florestal.

O balanço hídrico de uma região (que estima a disponibilidade de água no solo para as comunidades vegetais, levando em conta a precipitação, a evapo-transpiração potencial dos tipos vegetais e a capacidade de armazenamento de água no solo) pode impedir o desenvolvimento de florestas em parte da paisagem (como escarpas e encostas). As regiões do estado do Rio Grande do Sul apresentam regimes hídricos que sustentariam formações florestais, com maior intensidade na região de Floresta Ombrófila Mista, no nordeste do Estado (Quadros e Pillar, 2002).

A frequência de paleofogos aumentou do Holoceno Inicial ao Tardio (10.000 a 1.000 anos A.P.) após a ocupação humana pré-colombiana, demonstrando que a ação antropogênica não deve ser desconsiderada. Mas o efeito do fogo pode não somente ter contido a formação florestal nos campos do Estado, como também ter acelerado o processo de avanço da Floresta Ombrófila Mista. Behling (1997b) encontrou uma intrigante coincidência entre a migração da floresta de araucária nos vales para as áreas de campos e a mais alta frequência de fogo. Ao que parece, o fogo é um importante fator na regeneração ou na expansão da araucária, considerada uma espécie seral, que permanece na vegetação em um local quando existe um distúrbio que impede a sucessão (Heringer e Jacques, 2001; Quadros e Pillar, 2002).

Assim, supõe-se que, na região de Floresta Ombrófila Mista, o fogo natural ou antropogênico tenha determinado a distribuição em mosaico das florestas e campos, mesmo que o clima atual pareça não limitar o avanço das florestas. O modelo de simulação de Green prevê um padrão de mosaico, quando dois tipos de vegetação com tendência à queima se ajustam às condições ambientais (Green, 1989). Ou seja, o fogo pode ter sido o principal fator a explicar os padrões de campo-floresta na região.

Porém, na região sudoeste do Rio Grande do Sul, os campos não possuem limites definidos com áreas extensas de florestas e, assim, parecem não depender de fogo para sua manutenção, o que poderia refletir simplesmente a vegetação de climas passados, mais frios e secos. Evidências que apóiam esta hipótese são a ocorrência de espécies prostradas, como também o aumento do potencial osmótico celular e a resistência à coagulação protéica dessa vegetação quando dessecada pelo stress hídrico ou congelamento. Observa-se ainda, nesta região, uma maior frequência de espécies C3, de estação fria, melhor adaptadas às condições locais (Quadros e Pillar, 2002).

De todos os substratos ocupados por representantes de *Calibrachoa*, certamente o mais recente em termos geológicos é a Planície Costeira, ou Província Costeira do Rio Grande do Sul, uma espessa faixa de sedimentos que está sobre rochas do embasamento do Escudo Sul-rio-grandense e Uruguaio. 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. Estes sedimentos foram formados pela sucessão de eventos transgressivos e regressivos do mar durante as alterações cíclicas de climas frios e quentes

dos estágios glaciais e interglaciais do Pleistoceno e o Holoceno. Estas modificações ocasionaram a formação de quatro principais sistemas deposicionais pelo acúmulo de areia na linha de costa, sendo que o mais antigo data de 400.000 anos (Weschenfelder, 2005).

O primeiro evento transgressivo-regressivo ocorreu cerca de 400.000 anos A.P., quando as temperaturas no planeta estavam em elevação, fazendo o mar invadir toda a região de Porto Alegre, restando apenas as terras altas emersas. O mar recuou e um segundo evento transgressivo-regressivo ocorreu há cerca de 325.000 anos A.P. Novamente o nível do mar subiu, invadindo uma área consideravelmente menor que a anterior. Há cerca de 120.000 anos A.P., ocorreu uma nova transgressão marinha, formando barreiras e restingas que isolaram massas de água e formaram a Laguna dos Patos e a Lagoa Mirim. O último grande sistema foi formado há cerca de 5.000 anos A.P., quando ocorreu o último evento transgressivo-regressivo, criando a ligação da planície com o litoral norte do país com a formação de uma restinga arenosa na região de Torres. A praia oceânica atual do RS faz parte desta barreira holocênica (Villwock e Tomazelli, 1995; Menegat *et al.*, 1998; Dillenburger, 2005; Weschenfelder, 2005).

Foi discutida anteriormente a teoria dos refúgios úmidos amazônicos durante os picos glaciais e fases secas do Cenozóico (Haffer e Prance, 2002). Porém, nos períodos interglaciais quentes e úmidos, pode ocorrer o inverso, ou seja, na paisagem tropical e subtropical dominada por florestas, áreas cada vez mais restritas de campo podem constituir refúgios de vegetação aberta, como observado atualmente em alguns locais das regiões sul e sudeste. E o rápido avanço das florestas nos últimos milênios (Behling, 2002a) tem restringido cada vez mais as formações campestres às regiões mais altas, que apresentam temperaturas baixas e solos rasos que não favorecem a manutenção de formações fechadas, apesar do alto índice pluviométrico em algumas regiões. A expressão máxima deste tipo de ambiente são os campos de altitude presentes no sul e sudeste do Brasil.

Estas “ilhas” de altitude podem ser consideradas relíquias de vegetação de clima temperado em altitudes tropicais e subtropicais. As mínimas absolutas nos campos de altitude aproximam-se de temperaturas abaixo de -10°C , e as geadas podem chegar a quase dois meses no ano, muito mais dias que em elevações com temperaturas anuais equivalentes nos Andes equatoriais (Safford, 1999a,b). Nos Aparados da Serra ao sul, o

clima é definido como subtropical e úmido sem períodos secos marcantes. As terras altas formam uma barreira orográfica para os ventos de sudoeste para nordeste. Como consequência, a precipitação é alta, com uma média anual acima de 2000 mm (Behling e Pillar, 2007).

Poucos fitogeógrafos da América do Sul fizeram referência direta ou indireta aos campos de altitude em seus trabalhos. Rambo (1951, 1956) documentou a clara afinidade andina das espécies dominantes nas terras altas do sul do Brasil e discutiu a contribuição de vários elementos fitogeográficos na flora atual da região. Os campos de altitude do sudeste foram muito bem caracterizados por Safford (1999a,b, 2001) e as relações fitogeográficas foram discutidas em Safford (2007).

A principal peculiaridade da vegetação dos campos de altitude é a afinidade com elementos andinos, como observado por Rambo (1951):

“A borda oriental do planalto sulbrasileiro, formada pela rampa da Serra Geral, está, no RGS, entre 1000 e 1200 metros, elevando-se, em Santa Catarina, até perto de 2000. Em consequência disso, a média anual de temperatura é a mais baixa do Brasil, achando-se 14 e 15°, com mínimas ocasionais de até -9°. A muralha da Serra intercepta a brisa marítima causando a condensação da humidade com precipitações até 2500 mm anuais e abundante cerração.

Assim não admira, que os elementos andinos do Brasil meridional pertençam, na sua grande maioria, à mata nebulosa e aos campos turfosos, como os Andes meridionais.”

As observações de Rambo foram confirmadas por Safford (2007), quando comparou a origem das floras de diferentes locais da América do Sul e dos campos de altitude do sul e sudeste do Brasil. Dos locais brasileiros estudados (Aparados da Serra, no Rio Grande do Sul e Santa Catarina; Macaé de Cima, na Serra do Mar no Estado do Rio de Janeiro; Ilha do Cardoso, litoral de São Paulo; os Campos de Altitude do Sudeste compreendendo a Serra do Itatiaia, Serra dos Órgãos e Serra do Caparaó; a região do triângulo Mineiro, em Minas Gerais e a região do pico das Almas, na Bahia), somente os Aparados da Serra e os Campos de Altitude do Sudeste suportam números significativos de

gêneros temperados (cerca de 21% cada um). E cerca de 11% das espécies dos campos de altitude do sudeste compartilham ancestrais andinos, ou seja, possuem espécies relacionadas nas regiões dos Andes temperados e tropicais. Rambo (1951, 1953) chama atenção ao fato de que cerca de 10% da flora do estado do Rio Grande do Sul ter claras afinidades andinas, mas muitos destes *taxa* ele identificou como sendo congêneres com primos andinos muito mais que espécies compartilhadas.

Quando foram analisadas as similaridades florísticas entre os locais estudados (18 localidades, compreendendo regiões de altitude dos Andes e do Brasil, terras baixas e regiões de altitude da região temperada da América do Sul e regiões de baixa altitude no sudeste do Brasil), a maior afinidade com os campos do sudeste foi exatamente com os Aparados da Serra, tanto no nível de gêneros como no nível específico (Safford, 2007). Estes locais estão distantes mais de 1000 km e 7° de latitude, mas a distância florística aumenta muito pouco em relação à distância geográfica. E as conexões entre o Brasil e locais temperados do Sul e do Sul dos Andes são muito fortes, tanto nos Campos de Altitude do Sudeste, como também nos Aparados da Serra catarinense e gaúcha. Mais uma vez, os resultados coincidem com as observações de Rambo (1951), que comentou que as floras das montanhas nos locais de São Paulo e Rio de Janeiro eram extensões mais ao norte do mesmo padrão encontrado no sul e, em essência, são “ilhas” de clima temperado acima da Floresta Atlântica.

Análises adicionais também revelaram que 71% dos gêneros dos campos de altitude são predominantemente polinizados por insetos, e o mecanismo de dispersão mais comum entre os gêneros considerados temperados presentes nestes ambientes é pela gravidade.

Os resultados parecem mostrar que a maioria dos *taxa* temperados existentes nos campos de altitude requeriam conexões terrestres com habitats similares para se mover do oeste da América do Sul até o leste. As distribuições atuais de muitos gêneros temperados ainda guardam fortes sinais de rotas migratórias entre climas temperados de leste e oeste, com uma possível “ponte” existente através do norte da Argentina e terras baixas do Paraguai (Spichiger *et al.*, 2004). Porém, não se pode desconsiderar que algumas das similaridades florísticas também podem ser resultado de *taxa* que tiveram origem no Brasil e colonizaram os Andes tropicais quando habitats apropriados surgiram no Terciário Tardio (Safford, 2007).

Os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* parecem acompanhar esta rota migratória a partir dos Andes. Dos nove gêneros da tribo Nicotianeae, cinco são andinos (*Benthamiela*, *Combera*, *Fabiana*, *Latua* e *Pantacantha*), *Bouchetia* ocorre nas regiões sul da América do Sul e da América do Norte, *Nierembergia* se distribui pelos pampas do sul e os gêneros *Calibrachoa* e *Petunia* possuem distribuição subtropical atlântica (D'Arcy, 1991). A distribuição geográfica da tribo, bem como das espécies de *Petunia* e *Calibrachoa* parece fornecer evidências consistentes de sua origem andina ou andino-pampeana.

A distribuição das espécies de *Calibrachoa*, ao longo das terras altas do leste-sul do Brasil, também suporta cenários de repetidas conexões e desconexões entre ecossistemas montanhosos nos intervalos geográficos atuais. E a diferenciação no gênero parece ter sido primariamente geográfica, a partir de populações que desenvolveram mecanismos de isolamento genético-reprodutivo das espécies que as originaram durante um ou mais períodos de separação geográfica (especiação geográfica ou alopátrica).

Muitas espécies estão confinadas em ilhas de altitude de campos, tanto no sul como no sudeste brasileiro. E além dos fatores históricos que claramente reduziram o habitat destas espécies, a destruição dos remanescentes naturais de campos foi intensa após a ocupação humana. Os biomas de floresta e campo atuais no sul e sudeste são fortemente influenciados pela atividade humana. O desmatamento e a transformação da paisagem pela agricultura e pastagem têm mudado a vegetação original. Somente poucas áreas de campos totalmente naturais existem no Sul e Sudeste do Brasil (Behling, 2002b). Os campos e cerrados foram quase totalmente transformados pela atividade agropecuária, que iniciou utilizando os campos como pastagens naturais, seguido por cultivo de grãos em larga escala e, mais recentemente, pela monocultura de espécies arbóreas introduzidas, principalmente os gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Para o estado do Paraná, somente 9% de toda a cobertura vegetal é nativa (Fundação SOS Mata Atlântica, 1998; Roderjan *et al.*, 2002).

A exploração de *Araucaria angustifolia* também foi muito intensa, devido à qualidade de sua madeira e a abundância das florestas nos planaltos. No Paraná, a construção de uma estrada de ferro no final do século XIX, ligando o planalto aos portos litorâneos, foi decisiva para o início de sua exportação, tendo contribuído fortemente na economia nacional até a década de 1960. Atualmente não se tem notícia de remanescentes

representativos intocados no Estado, nem mesmo constituindo unidade de conservação oficial (Roderjan *et al.*, 2002).

A vegetação florestal do Rio Grande do Sul também tem estado sob intensa interferência humana, especialmente a partir do século XIX, com a colonização européia. As florestas predominavam em grandes áreas na metade norte do Estado, especialmente nas encostas e vales ao longo dos limites leste e sul no planalto basáltico do norte e ao longo do Rio Uruguai (Quadros e Pillar, 2002). A retração da cobertura vegetal original nas últimas décadas na porção sul e sudeste do Brasil é ilustrada na Figura 9.

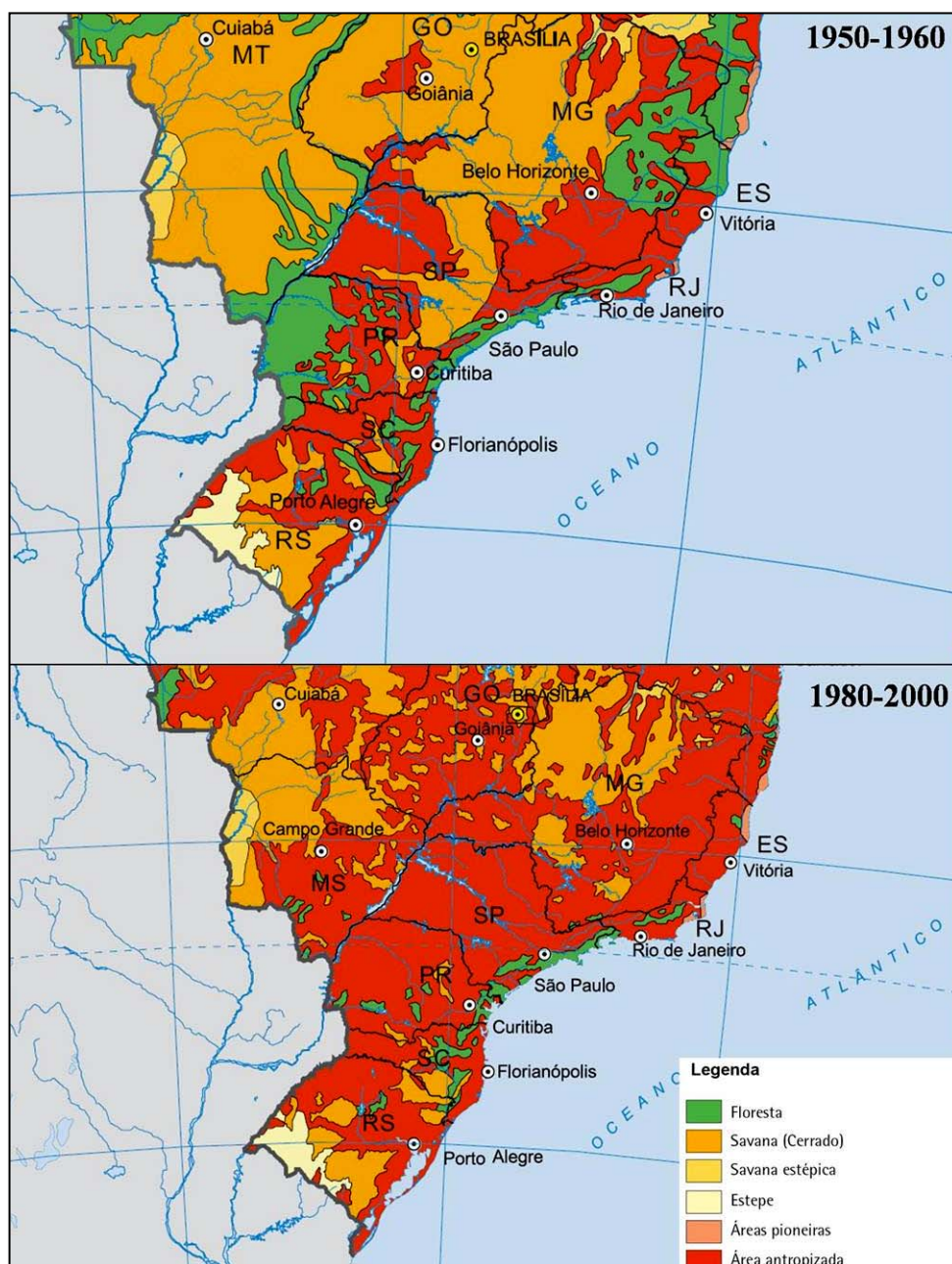


Figura 9. Diminuição da área de vegetação nativa na porção sul e sudeste do Brasil entre as décadas de 1950-1960 e 1980-2000. Figura modificada a partir da original disponível no endereço eletrônico: http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/atlasescolar/mapas_brasil.shtm.

1.3. Estudos Moleculares

1.3.1. Uma breve história do pensamento evolutivo

O pensamento evolutivo, de que as formas de vida não eram imutáveis ou cópias de um tipo perfeito, teve origem muito anterior à publicação de *A Origem das Espécies*, de Charles Darwin. Alguns filósofos gregos já criavam algumas teorias que lembram os princípios evolutivos modernos. Anaximandro, Xenófanes, Empédocles e Aristóteles lançaram teorias que assumiam uma conexão entre os seres vivos observados. Aristóteles, por exemplo, construiu a primeira árvore genealógica, conhecida como “escada dos seres”, mas não tinha ramificações, abrangendo desde os animais mais primitivos até o homem. Durante o domínio da igreja católica na Idade Média, pensamentos contrários à doutrina religiosa eram fortemente combatidos. Um dos mais importantes naturalistas desta época, Linnaeus (1707-1778), que foi o pai da classificação biológica moderna (classificação binomial), passou a estudar a natureza para descobrir o padrão estabelecido pelo plano divino, onde cada espécie é fixa e há uma essência nelas que controla este padrão. Ele não admitia um pensamento evolutivo e dizia que a evolução era a manifestação das essências que estavam latentes em espécies anteriores, e não uma modificação das espécies atuais (Futuyma, 1998; Ridley, 2006).

A partir do século XVIII, com o avanço do Iluminismo, dogmas começaram a ser contrariados com base na razão e no pensamento científico. No século XVII, naturalistas como Buffon e Cuvier, entre outros, já discutiam e começavam a defender a idéia de que o mundo não poderia ser tão jovem e estático como diziam as escrituras religiosas. Os trabalhos de Lamarck também tiveram grande importância nesta mudança, podendo ser considerado o primeiro cientista a interpretar o mundo de uma maneira “evolutiva”.

No decorrer dos cinco anos em que Charles Darwin passou no H.M.S. *Beagle*, ele coletou espécies e fez observações geológicas e biológicas de um grande número de exemplos. Em 1837, o ornitólogo John Gould disse a Darwin que seus espécimes de tordos-dos-remédios das Ilhas Galápagos eram muito distintos de uma ilha para outra e que poderiam ser considerados espécies diferentes. Esta notícia fez com que Darwin pensasse que as espécies poderiam ter se desenvolvido a partir de uma única forma (um ancestral comum) em várias. Darwin recordou que as tartarugas gigantes também diferiam de uma ilha para outra. Além disso, a similaridade dos fósseis que Darwin conhecia com os mamíferos da América do Sul também dava crédito a sua hipótese. Com base nestas

evidências e nas novas idéias que já começavam a aparecer entre outros pensadores da época, Darwin começou a duvidar da teoria de espécies fixas e imutáveis no decorrer do tempo e, observando que os indivíduos de uma população ou espécie também apresentavam variação entre os diferentes locais, ele concluiu que as espécies apresentavam uma variabilidade natural, que faziam com que indivíduos pudessem ocupar diferentes ambientes. Porém a grande contribuição de Darwin não foi a idéia de mudança ao longo de uma determinada linhagem, mas os mecanismos que determinariam a natureza destas mudanças: a teoria da seleção natural. A teoria postula que mudanças nas características poderiam ocorrer ao longo das gerações desde que houvesse variabilidade hereditária e que os organismos lutassem pela sobrevivência dentro de um espaço com recursos limitados (de acordo com a teoria de Malthus). Os fatores ambientais deveriam assim determinar quais das variantes presentes teriam maior sucesso nesta “luta pela sobrevivência”, deixando um maior número de descendentes. Parte das idéias de Darwin foi bem aceita na época, como o conceito de evolução em si e, conseqüentemente, a existência de um ancestral comum a todos os seres vivos. Mas outros conceitos esbarraram na falta de explicações, que só surgiram cerca de 80 anos depois, como a origem inicial da variação fenotípica observada por Darwin, e também como as características observadas eram herdadas.

Entre as décadas 20 e 40 do século passado foram desenvolvidos os princípios que sustentam hoje o conceito conhecido como neodarwinismo ou síntese evolutiva, que combinou a Teoria da Seleção Natural de Darwin com a Genética Mendeliana, tornando-se uma teoria muito bem fundamentada. R.A. Fisher, J.B.S. Haldane, S. Wright, entre outros, desenvolveram as bases teóricas necessárias e a síntese evolutiva foi sendo constantemente formada. Por volta de 1940 muitos trabalhos, como os de Theodosius Dobzhansky, Julian Huxley e Ernst Mayr, contribuíram para o progresso da teoria evolutiva, além de mostrarem a aplicação dos conceitos evolutivos em diversos exemplos, que consolidaram e difundiram o pensamento evolutivo até os dias de hoje (Futuyma, 1998; Ridley, 2006).

1.3.2. Filogenias Moleculares

As novas idéias em torno da Síntese Evolutiva geraram um grande interesse no estudo das relações de parentesco entre os organismos e a reconstrução filogenética consiste em estimar estas relações. As primeiras estimativas de filogenia eram baseadas em

similaridades gerais, ou seja, quanto mais características duas espécies possuísem em comum, mais alto o nível em que elas seriam agrupadas. Porém tal análise não representa necessariamente a filogenia verdadeira, pois se, por exemplo, um estado de caráter evoluir independentemente em duas linhagens diferentes, este estado indicará uma ancestralidade comum, quando na verdade estas linhagens não são derivadas de um ancestral imediato.

Em 1966, Hennig notou que um tipo especial de “similaridade” deveria ser usado para estimar filogenias: caracteres homólogos (herdados do ancestral comum). Esta nova abordagem de inferência filogenética foi denominada Cladística, onde a classificação deve expressar as relações de ramificação entre as espécies. Um cladograma não é baseado na similaridade global das espécies. Ele deve seguir o princípio de que um *taxon* é monofilético, ou seja, ele deve incluir todos os descendentes de um ancestral em particular. Este estudo é empregado principalmente para resolver relações de parentesco entre grupos relacionados, onde, basicamente, comparam-se caracteres ancestrais e derivados destes grupos, na tentativa de se definir linhagens basais e grupos recentes em função do aparecimento de novas características (Ridley, 2006).

Inicialmente, foram utilizadas características morfológicas para a definição de filogenias. Embora os métodos morfológicos sejam muito úteis em uma grande variedade de situações, estes não podem ser aplicados em diversas ocasiões, uma vez que não existem características morfológicas compartilhadas suficientes entre organismos mais distantemente relacionados (Miyaky *et al.*, 2001).

Os primeiros estudos moleculares envolvendo filogenia foram os de distância imunológica e de curvas de hibridação, mas tinham limitações técnicas e falta de resolução. As proteínas receberam maior atenção, já que até meados de 1940 achava-se que eram responsáveis por transmitir as características. Assim, foram as primeiras moléculas diretamente utilizadas para inferência filogenética. Inicialmente, embora bastante trabalhoso, o sequenciamento de proteínas era mais simples que o de ácidos nucleicos. A comparação de padrões de isoenzimas ainda hoje é uma técnica útil, mas perdeu terreno para técnicas mais precisas e informativas. Após os trabalhos de Avery e Watson e Crick, houve um grande interesse no estudo das moléculas de DNA e RNA, pois agora sabia-se que elas eram as responsáveis pelo armazenamento e transmissão da informação. Houve então um avanço nas técnicas de manipulação de ácidos nucleicos,

como a utilização de enzimas de restrição, técnicas de clonagem, hibridação e sequenciamento, entre outras. Hoje, os dados moleculares, principalmente a análise direta da sequência do DNA fornecem uma grande quantidade de variação a ser interpretada por métodos filogenéticos, já que cada nucleotídeo ou aminoácido é um caráter na análise e, mesmo que muitas posições possam não apresentar variação, a quantidade de informação disponível atualmente é muito maior que no passado (Li e Graur, 1991; Swofford *et al.*, 1996).

A natureza da informação contida no DNA e o modo como esta informação se modifica podem ser bem diferentes da evolução de características morfológicas. A variação encontrada entre sequências de DNA se origina por mutação e pode ser mantida ou não em uma população pelos mecanismos de seleção natural ou deriva genética. Estes dois mecanismos são responsáveis, portanto, pela alteração ou substituição de alelos de um determinado gene em uma população. Porém, muitas mutações podem não alterar a função de um determinado gene e as populações naturais apresentam mais variação genética que seria esperada caso essa variação fosse influenciada somente pela Seleção Natural.

Esta descoberta levou ao desenvolvimento da Teoria Neutralista, primeiramente cunhada por Kimura em 1968, que diz que a maioria das mutações são seletivamente neutras, não conferindo vantagem ou desvantagem a seu portador, sendo que as taxas das mutações neutras são praticamente constantes ao longo do tempo. A teoria da evolução neutra trouxe grandes avanços na interpretação e análise da variação do DNA detectada entre organismos, pois tornou possível o entendimento de como, e em que frequência relativa, os vários tipos de substituição ocorrem em uma determinada molécula. A incorporação e aplicação de testes com modelos explícitos de evolução de nucleotídeos trouxeram maior poder e confiabilidade às análises de sequências de DNA (Li e Graur, 1991).

As teorias de evolução neutra também foram baseadas na determinação de tempos de divergência entre linhagens genéticas. Se em um determinado segmento de DNA as substituições alélicas, teoricamente, ocorrem em intervalos mais ou menos regulares de tempo e, se uma ou mais sequências homólogas de nucleotídeos apresentam diferenças, pode-se inferir que, durante a história evolutiva dessas sequências, ocorreram inserções, substituições ou deleções de nucleotídeos. Comparando-se a quantidade de alterações de

nucleotídeos na formação de algumas proteínas e o tempo de divergência de algumas espécies, percebe-se que quanto maior é a distância entre os *taxa*, o número de alterações também aumenta. Desta forma, algumas proteínas começaram a servir de “relógio” para calcular ou estimar o tempo de divergência entre *taxa*.

No início dos anos 60, Zuckerkandl, Pauling e Margoliash analisaram comparativamente sequências de hemoglobina e citocromo *c* de diversas linhagens de mamíferos e observaram que a taxa de substituição de aminoácidos entre estas duas proteínas era praticamente a mesma. Entretanto, outros estudos demonstraram que as taxas de substituição entre genes e proteínas diferentes não são as mesmas. Estas taxas podem variar grandemente entre genes, ou mesmo entre porções do mesmo gene, pois estas substituições dependem da função exercida pelo produto do gene em questão. Muitos estudos demonstram que existem grandes variações nas taxas de substituição de nucleotídeos entre genes, genomas e linhagens diferentes. As variações destas taxas entre linhagens se devem a diferenças nos tempos de geração, nas taxas metabólicas e na eficiência dos mecanismos de reparo. Por estes motivos, algumas críticas são feitas sobre o uso do relógio molecular, e uma análise detalhada dos tipos de genes e sequências utilizados, organismos em estudo e aspectos ecológicos deve ser realizada antes de assumir este pressuposto (Futuyma, 1998).

Assim, os métodos de análise filogenética utilizando sequências também tiveram de ser adaptados a partir dos métodos tradicionais, e abordagens cada vez mais complexas foram criadas. Atualmente são utilizadas várias abordagens na análise de dados moleculares para a inferência filogenética, desde métodos mais simples, como os baseados em análise de distância genética, como abordagens mais robustas, como máxima verossimilhança e análises bayesianas (Felsenstein, 2004).

Os métodos de inferência filogenética baseados em distância são os de computação mais veloz, o que facilita quando se faz análises em um grande número de organismos. Entre eles, o *neighbor-joining* (ou agrupamento de vizinhos) é ainda amplamente utilizado. O método inicia com uma árvore sem resolução, onde se procura um par de OTUs vizinhas que minimize a soma total dos ramos da árvore. Esse par será a primeira bifurcação ou resolução da árvore, que será tratado como uma única OTU quando será procurado o segundo par que minimize a soma total dos ramos da árvore. Dentre as vantagens em se

utilizar este método é que ele é rápido, como dito anteriormente, por se tratar de um método com implementação algorítmica. Ele também permite que cada linhagem tenha uma taxa de evolução diferente das outras, resultando em uma árvore cujas distâncias entre a raiz e os *taxa* terminais pode ser variável. Outra vantagem do *neighbor-joining* é que ele permite a utilização de modelos de evolução molecular para a construção da matriz de distância. Porém, como em qualquer método de distância, há uma grande perda de informação ao se calcular a distância entre duas sequências, já que todo o padrão de diferenças é reduzido a um único valor. Ou seja, o método se baseia em uma versão resumida dos dados (a matriz de distâncias), o que pode diminuir o poder de resolução na inferência filogenética (Russo *et al.*, 2001; Felsenstein, 2004).

Um método mais robusto para inferências filogenéticas é o da Máxima Verossimilhança, que procura a árvore que tenha o maior valor de verossimilhança dentre todas as possíveis para um grupo de sequências. A verossimilhança de uma árvore pode ser definida como a probabilidade de que os dados observados tivessem sido obtidos condicional a uma árvore e a um modelo de evolução. O método consiste em calcular a verossimilhança de cada uma das posições do alinhamento e, depois, multiplicar todas as verossimilhanças para encontrar o valor geral. Assim, para que se possam desenvolver os cálculos e testar os modelos neste método, dois pressupostos centrais devem ser assumidos: de que a evolução em diferentes sítios é independente; e que a evolução em diferentes linhagens também é independente. Assim, podem-se testar as probabilidades individuais para cada sítio e cada organismo. Isso torna os cálculos muito mais intensos, o que toma uma grande quantidade de tempo de computação, dependendo do tamanho da sequência e do número de OTUs (Pereira *et al.*, 2001; Felsenstein, 2004).

1.3.3. Marcadores e Estudos Moleculares em Solanaceae

Entre as sequências de DNA amplamente utilizadas para estudos filogenéticos destacam-se os DNAs ribossomais nucleares (DNAr), sendo os DNAs repetitivos mais estudados. Estes segmentos geram RNAs ribossômicos, que são componentes essenciais na fisiologia celular, pois formam as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese de proteínas. Genes que codificam os RNAs ribossomais 18S, 5,8S e 25-28S (também

chamados de DNAr 45S) representam uma das maiores famílias de sequências repetitivas em eucariotos (Gorab, 2001). O DNAr, em especial regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), tem sido útil para estudos filogenéticos em vários níveis taxonômicos, inclusive na identificação de espécies em vários grupos. As regiões ITS evoluem rapidamente, sendo sua caracterização apropriada para discriminar espécies proximamente relacionadas ou, até mesmo, variedades dentro de uma mesma espécie. O fato das regiões de ITS serem flanqueadas por regiões altamente conservadas, aliado ao seu pequeno tamanho (500 a 800 pb) e grande número de cópias por genoma, permite que elas sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade usando *primers* universais (Marshall *et al.*, 2001).

Porém outros genes nucleares não são comumente utilizados porque frequentemente *primers* que tornem seu estudo possível não são conhecidos. O conhecimento do número de cópias e a ação da evolução em concerto entre elas é crítico para se realizar uma estratégia razoável de amostragem entre indivíduos. E ainda não existem sequências suficientes à disposição dentro de um número grande de unidades taxonômicas para fornecer uma estimativa inicial de utilidade filogenética (Mason-Gamer *et al.*, 1998).

Em plantas, o DNA de cloroplasto (cpDNA) tem sido amplamente utilizado em estudos filogenéticos devido, especialmente, ao grande número de cópias desta molécula presente no citoplasma das células vegetais. Além disso, o cpDNA é relativamente pequeno (aproximadamente 150.000 pb) e bastante conservado evolutivamente, o que permite sua utilização na avaliação de diferentes níveis taxonômicos, principalmente em *taxa* mais elevados. A taxa de substituições sinônimas deste genoma é cerca de 3-4 vezes mais lenta que a do DNA nuclear (Wolfe *et al.*, 1987). Em função de suas propriedades evolutivas e padrão de herança, o polimorfismo do DNA plastidial é uma ferramenta poderosa para entender os padrões de diferenciação entre espécies de plantas. O cpDNA é transmitido matematicamente na maioria das espécies, exceção feita para Gimnospermas e algumas espécies de Angiospermas, onde a herança é paterna (Olmstead e Palmer, 1991).

Sequências de genes plastidiais relativamente conservados, que possuem uma taxa evolutiva mais lenta, também são utilizadas para reconstrução filogenética em Angiospermas basais. Dentre estes genes, o *rbcL* (que codifica a enzima Rubisco -

ribulose-1,5-bifosfato carboxilase, responsável pela fixação do gás carbônico na fotossíntese) tem sido usado para um grande número de grupos de Angiospermas. A variação encontrada é pequena entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, e a conservação de posição permite o alinhamento não ambíguo das sequências, o que é muito útil em estudos filogenéticos neste nível taxonômico (Clegg, 1993).

O primeiro trabalho relevante em sistemática molecular de Angiospermas foi publicado por Chase *et al.*, em 1993, que incluiu a análise de 499 sequências de *rbcL*, resolvendo relacionamentos até o nível de família ou ordem em alguns casos. O avanço e difusão de técnicas moleculares mais avançadas (como o sequenciamento baseado em PCR) juntamente com progressos computacionais permitiram a análise de um volume grande de dados. Em 1997, Soltis *et al.* publicaram resultados com 18S rDNA e logo depois foram publicados resultados usando regiões dos três genomas (gene *atp* mitocondrial, *rbcL* do cloroplasto e 18S rDNA nuclear) (Soltis *et al.* 2000). Os resultados obtidos até então foram incorporados na classificação taxonômica das Angiospermas, através da formação de uma equipe científica internacional de 29 taxonomistas denominada *Angiosperm Phylogeny Group* (APG, 1998), coordenada por Kåre Bremer, Mark Chase e Peter Stevens, considerado um dos trabalhos cooperativos mais relevantes em sistemática, que superou as pesquisas em animais neste nível taxonômico pela primeira vez na história. Após 1998, a classificação das Angiospermas tem sido frequentemente atualizada com base na disponibilidade de novos dados incorporados (APGII 2003; Soltis *et al.*, 2005).

No nível taxonômico de família, diversos segmentos que incluem íntrons e espaçadores são utilizados. Cinco regiões não codificadoras do cloroplasto foram utilizadas para reconstruir a filogenia da família *Altigiaceae* (Ickert-Bond e Wen, 2006), onde foi obtido um bom sinal filogenético, apesar de que dois espaçadores exibiram muitas regiões mononucleotídicas repetidas, sendo utilizados cinco *primers* para obter a região completa. Sequências do íntron *trnL* e do espaçador *trnL-trnF* foram utilizadas para a reconstrução filogenética das tribos em *Asteraceae* (Bayer e Starr, 1998). As topologias das árvores filogenéticas obtidas concordaram com outros estudos entre as tribos, onde a monofilia da família foi semelhante à encontrada por dados morfológicos, além da constatação de que a tribo *Cichorioideae* é parafilética, como reportado em outros estudos.

Entre os trabalhos envolvendo a determinação das relações entre Solanaceae e famílias evolutivamente relacionadas de Asteridae, destaca-se o de Olmstead e Palmer (1991), onde foram utilizados segmentos de DNA de cloroplasto gerados por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*).

Olmstead *et al.* (1999), através de análises de RFLP do genoma completo do cloroplasto e das sequências dos genes *rbcL* e *ndhF* (subunidade da NADH desidrogenase do cloroplasto) propuseram a revisão da classificação taxonômica da família Solanaceae. Basicamente, as diferenças entre a classificação proposta por estes autores e as demais são: adoção de princípios filogenéticos, que resulta no rompimento de grupos não-monofiléticos, mais notavelmente a subfamília Cestroideae; grupos que haviam sido excluídos da família foram novamente incluídos nesta classificação (p/ ex: Nolaneae, Goetzeoideae); a tribo Solaneae foi fragmentada em várias tribos e subtribos. De toda forma, uma forte congruência é observada entre as diferentes classificações, o que reflete a coincidência de inferências baseadas em caracteres morfológicos utilizados na taxonomia convencional com aquelas baseadas em características do cpDNA.

Como a taxa de evolução do cpDNA é relativamente lenta, tanto em substituição de bases como por rearranjos estruturais (Wolfe *et al.*, 1987), sua variação permite estudar padrões de diferenciação genética entre espécies e entre regiões do próprio genoma, pois apresenta taxas evolutivas diferenciadas, pela presença de genes que codificam proteínas com diferentes graus de conservação (Gaut *et al.*, 1993). No caso das espécies da família Solanaceae, outra vantagem é o fato de que o genoma plastidial de *Nicotiana tabacum* foi o primeiro a ser completamente sequenciado entre as Angiospermas, tornando os estudos comparativos dentro da família bem mais confiáveis.

Dentro da família Solanaceae, os estudos de filogenia molecular são relativamente abundantes, principalmente naqueles grupos de interesse econômico. Em nível infragenérico, Clarkson *et al.* (2004) analisaram o gênero *Nicotiana*, (sequências do íntron *trnL*, o espaçador de *trnL-trnF*, o espaçador de *trnG-trnS* e dois genes, *ndhF* e *matK*), onde os resultados forneceram um suporte filogenético confiável para a taxonomia atualmente disponível para o gênero. Outros gêneros de interesse econômico bem estudados são *Solanum* (Spooner *et al.*, 1993; Bohs, 2004; Weese e Bohs, 2007) e *Capsicum* (Walsh e Hoot, 2001). Recentemente Tate *et al.*, (2009) estudaram o gênero *Nierembergia*, grupo

próximo de *Calibrachoa*, utilizando sequências do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear (ITS) e do *intron* do gene plastidial *rpl16*. As análises mostraram dois clados, separando as espécies herbáceas e arbustivas, suportados também por dados cromossômicos.

No grande grupo das petúnias (*Petunia sensu* Juss., ou *sensu lato*, que inclui os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*) alguns estudos foram realizados na tentativa de inferir relações entre espécies. Mishiba *et al.* (2000), através de medidas de conteúdo de DNA, apresentaram evidências de que o gênero poderia ser dividido em dois grupos: *C. parviflora* juntamente com *C. pygmaea* tem menor conteúdo de DNA que as demais espécies. Muitas outras características também suportam este agrupamento, como discutido em seções anteriores (Wijisman e Jong, 1985; Reis *et al.*, 2002).

Ando *et al.* (2005) utilizaram RFLP de DNA de cloroplasto para inferir relações em *Petunia* Juss. e concluíram que o grupo consiste de dois clados irmãos: *Petunia* e *Calibrachoa*. Em *Calibrachoa*, *C. parviflora* e *C. pygmaea* formaram um clado basal, irmão do grupo das espécies restantes, com alto valor de suporte. Porém, dentro do gênero *Calibrachoa* foram estabelecidas relações fracas entre grupos e regiões geográficas. Dois aspectos merecem atenção: a falta de resolução na árvore de distância, com um número elevado de politomias, e o pequeno comprimento dos ramos, que podem sugerir uma diversificação bem recente no grupo, sendo que a variação fornecida pela técnica de RFLP não foi suficiente para resolver os relacionamentos interespecíficos, que não corresponderam à taxonomia infragenérica. Assumindo que a distância genética observada seja proporcional ao tempo (taxas evolutivas similares entre os gêneros), a diversificação em *Calibrachoa* parece ser um pouco mais antiga que em *Petunia*.

O primeiro trabalho utilizando dados de sequências de DNA foi de Kulcheski *et al.* (2006), que analisaram onze espécies do gênero *Petunia s.s.* através de sete marcadores (a região nuclear do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal, ITS, os espaçadores intergênicos plastidiais *trnL-trnF*, *trnH-psbA*, *psbB-psbH* e *trnS-trnG*, o íntron do gene plastidial *trnF*, além do íntron do gene mitocondrial *nad1*), totalizando 4532 pares de bases (pb). Novamente, a falta de resolução entre as espécies do gênero, bem como o comprimento curto dos ramos sugerem uma diversificação recente em *Petunia*. O gênero ficou dividido em dois clados, que refletem a distribuição geográfica: um clado com

espécies que ocorrem em terras baixas (abaixo de 500 m) e outro com as espécies de terras altas (acima de 500 m).

Chen *et al.* (2007) investigaram a variação de sequência de um dos genes codificadores da enzima Flavonóide-3',5'-hidroxilase, o *Hfl*, entre espécies de *Petunia s.l.*, em comparação com sequências do íntron plastidial *trnK*, além de parte do gene *matK*. Foram encontrados clados com certa consistência geográfica, mas as espécies agrupadas diferiram daquelas encontradas por Kulcheski *et al.* (2006). Embora o marcador nuclear tenha mostrado mais variação que a porção plastidial, não houve resolução suficiente dentro dos agrupamentos que resolvesse o relacionamento de espécies mais próximas.

O baixo nível de variação nas sequências do cpDNA poderia ser uma limitação na sua utilização no nível intra-específico. Entretanto, regiões não-codificadoras (espaçadores intergênicos e íntrons) apresentam alta frequência de mutações, pois acumulam mudanças sem pressão seletiva. Tais segmentos tem sido amplamente utilizadas em filogenias, inclusive em níveis taxonômicos baixos, onde o DNA não-codificador oferece grande resolução, possibilitando estudos evolutivos e identificação de marcadores intra-específicos (Taberlet *et al.*, 1991).

Uma das regiões mais utilizadas é a *trnL-trnF*, que contém o gene *trnL*, o qual é dividido por um íntron do grupo 1, um espaçador intergênico e o exon *trn-L*. O íntron *trnL* foi o primeiro íntron do grupo 1 descrito em cloroplasto e também o primeiro descrito por interromper um gene de tRNA. Na região do espaçador, foi observada baixa relação entre ts/tv, ou seja, taxas similares de transições e transversões, que não foram atribuídas a possível saturação, pois estes valores foram encontrados também em estágios recentes de divergência de sequências. Assim, a região parece exibir taxas similares de transições e transversões (relação ts/tv igual a 1) em contraste com valores em torno de 2 para sequências codificadoras e não-codificadoras no mtDNA animal, e entre 1-1,5 no DNA nuclear como ITS. As altas porcentagens de bases A+T (63%-67%) em regiões *trnL-F* de Angiospermas podem explicar a alta proporção de transversões encontradas (Bakker *et al.*, 2000).

Bohle *et al.* (1994), em um estudo com o espaçador *trnL-trnF* no gênero *Echium* (Boraginaceae) encontraram uma taxa de substituições nucleotídicas três vezes maior que as sequências correspondentes do gene *rbcL* que, em muitos casos, pode ser utilizado para

comparações infragenéricas.

Outra região altamente variável é o espaçador entre os genes *trnH* e *psbA*. Aldrich *et al.* (1988), caracterizaram a natureza de suas variações, sendo muito rica em eventos de inserção/deleção (*indels*) e em sequências repetidas de AT variáveis em comprimento. Sang *et al.* (1997) encontraram maior variação neste espaçador em comparação com o gene *matK* e o espaçador *trnL-trnF*. De acordo com Shaw *et al.* (2007) esta é uma das regiões não-codificadoras mais variáveis do cloroplasto, variando de 18% a 105% mais que as outras oito regiões mais variáveis (Kress *et al.*, 2005). Uma possível limitação seria o pequeno tamanho do marcador (Shaw *et al.*, 2005) aliado a sua grande variação, o que impediria a comparação entre organismos um pouco mais distantes pela impossibilidade de um alinhamento confiável. Chase *et al.* (2007) propuseram sua utilização, juntamente com os genes *rpoCl* e *matK* na criação de um “código de barras genético” para as plantas terrestres. Este enorme projeto centralizado no Jardim Botânico de Kew (Inglaterra), conta com pesquisadores de 11 instituições em sete países e tem como objetivo buscar potenciais marcadores plastidiais que possam ser obtidos com protocolos e *primers* padronizados e sejam capazes de discriminar todas as espécies de plantas terrestres (Kress *et al.*, 2005; Chase *et al.*, 2007). Estudos populacionais com o espaçador *trnH-psbA*, aliados a outros marcadores plastidiais que exibem uma variação elevada têm sido muito úteis em estudos filogeográficos (Hamilton *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Bettin *et al.*, 2007).

Também existem disponíveis outros *primers* para regiões intergênicas altamente variáveis, flanqueadas por exons para garantir a conservação dos sítios de anelamento, sendo muito úteis para estudos populacionais (Hamilton, 1999; Shaw *et al.*, 2005). Entre eles, destaca-se também o espaçador *trnS-trnG*, com variação em diferentes níveis taxonômicos dentro das Angiospermas (Hamilton, 1999). Este espaçador é mais informativo que outras nove regiões não codificadoras do cpDNA em espécies de *Glycine* (Fabaceae) (Xu *et al.*, 2000). Em um trabalho com *Moringa* (Moringaceae), este espaçador também apresentou alta variabilidade intra-específica (Olson, 2002).

1.3.4. Filogenias intraespecíficas

Os estudos filogeográficos buscam evidências sobre a história da divergência entre populações, examinando as relações genealógicas das sequências dentro de um contexto geográfico. O objetivo da filogeografia é desvendar os processos atuais e históricos que influenciaram a variação genética observada atualmente nas populações (Avice, 2000).

A filogeografia oferece novas abordagens sobre a função do fluxo gênico na estruturação das populações de plantas e pode discriminar entre fluxo gênico e padrões causados por polimorfismos ancestrais. Os métodos filogenéticos tradicionais, estimados através de árvores bifurcadas não são os mais adequados para inferir filogenias intra-específicas. Abordagens através da construção de *networks*, ou rede de relacionamentos entre haplótipos, podem revelar processos que agem no nível específico e fornecem uma maneira de representar mais informações filogenéticas presentes no conjunto de dados (Posada e Crandall, 2001).

Através de estudos filogeográficos, é possível interpretar padrões de relação entre distribuição geográfica e os haplótipos e suas relações genealógicas. Um padrão de congruência significa que haplótipos relacionados estão geograficamente restritos e ocorrem em proximidade uns com os outros, indicando um padrão antigo de fluxo gênico restrito. Assumindo que populações não são panmíticas, este padrão surge porque novas mutações ficarão localizadas dentro do contexto geográfico de suas origens. Como uma coroa, os haplótipos mais antigos tenderão a se localizar no centro da árvore de genes e ser geograficamente mais amplos, enquanto que os haplótipos mais recentes tenderão a aparecer nas extremidades da árvore gênica e possuírem uma distribuição geográfica mais restrita (Schaal *et al.*, 1998).

Os estudos moleculares em nível populacional ainda são menos abundantes em plantas que em animais, principalmente pelo relativo atraso na descoberta de marcadores genéticos com variação suficiente, comparado aos segmentos mitocondriais utilizados em animais (Schaal *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 1999). Seu crescimento se deu principalmente na última década, relacionando as variações intra-específicas encontradas com processos históricos. Como exemplo, os padrões filogeográficos encontrados em *Acacia acuminata* (Leguminosae), foram interpretados como resultado de fragmentação do ambiente devido a

mudanças durante o Pleistoceno (Byrne *et al.*, 2002).

Um número elevado de trabalhos em plantas descreve padrões resultantes de migração pós-glacial a partir de refúgios do período pleistoceno. Mitton *et al.* (2000) através da análise de polimorfismos de tamanho do segundo íntron do gene mitocondrial *nad1* detectou sete regiões de refúgios glaciais na América do Norte para a espécie *Pinus flexilis*, dos quais a espécie se expandiu atingindo a distribuição atual. Fineschi *et al.* (2002) utilizaram espaçadores gênicos plastidiais (*trnC-D*, *trnD-T*, *psaA-trnS* e *trnT-trnF*) no estudo filogeográfico de cinco espécies de carvalho branco (*Quercus*) na Itália. A distribuição dos haplótipos demonstrou uma divisão clara entre a região central-sul e a parte norte da península, e possibilitou constatar diferentes rotas de colonização para as diferentes regiões estudadas. Palmé *et al.* (2003) inferiram padrões de recolonização pós-glacial recente no continente europeu pela espécie arbórea *Betula pendula*, através de marcadores plastidiais amplificados por PCR e clivados com enzimas de restrição. Os resultados encontrados para a espécie *Senecio halleri* através desta mesma técnica revelam que sua distribuição era ampla em períodos inter-glaciais, mas durante os períodos glaciais, muitas populações foram extintas, restando apenas dois refúgios glaciais localizados em *nunataks* (topo de montanhas cercadas por gelo; Bettin *et al.*, 2007). Outros trabalhos também mostram a influência das mudanças climáticas do pleistoceno na dinâmica populacional e distribuição atual das espécies, como demonstrado nos trabalhos de Larena *et al.* (2002), Hwang *et al.* (2003) e Dobes *et al.* (2004).

No gênero *Petunia*, investigações filogeográficas foram realizadas utilizando os espaçadores plastidiais *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *psbB-psbH*. Longo (2005) utilizou estes marcadores em análises filogeográficas na tentativa de esclarecer as relações evolutivas dentro de um complexo de espécies de *Petunia* de difícil delimitação taxonômica. Os resultados moleculares revelaram que apenas uma entidade taxonômica (*Petunia inflata*) poderia ser considerada uma espécie distinta de *Petunia integrifolia*. Outras quatro espécies descritas faziam parte de duas linhagens genéticas independentes, sendo posteriormente reconhecidas, inclusive por caracteres morfológicos, como duas subespécies de *Petunia integrifolia*. Lorenz-Lemke (2006) estudou algumas espécies do gênero, e estes marcadores plastidiais confirmaram eventos de hibridação interespecífica entre duas espécies, *P. axillaris* e *P. exserta*, apesar da baixa variação encontrada, o que indica também uma divergência recente entre estas espécies. A variação destes marcadores

plastidiais em outras seis espécies de *Petunia* dos planaltos das regiões sul e sudeste do Brasil também indicaram uma divergência recente. Ramos (2008) utilizou os espaçadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG* em um estudo filogeográfico com *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*, que ocorre na Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Os resultados sugerem eventos sucessivos de ocupação desta subespécie, influenciados pelas oscilações marinhas ocorridas durante o Pleistoceno e o Holoceno.

Em *Calibrachoa*, o único trabalho filogeográfico foi realizado por Mäder (2008) com *C. heterophylla*, que habita substratos arenosos da Planície Costeira do Rio Grande do Sul e do interior do Estado. Os espaçadores plastidiais utilizados, *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, revelaram linhagens estruturadas geograficamente, coincidindo com possíveis barreiras pleistocênicas de paleorrios da região. Este trabalho mostrou que estes segmentos plastidiais exibem variação no nível intra-específico, podendo ser úteis na investigação de outras espécies do gênero.

Outro papel importante desempenhado por estudos filogeográficos é a identificação de unidades genéticas para conservação. A riqueza de espécies representa a medida mais amplamente utilizada para a biodiversidade, e é geralmente descrita para níveis taxonômicos elevados. Entretanto o polimorfismo intra-específico é geralmente negligenciado devido à dificuldade de quantificá-lo. Abordagens filogeográficas podem revelar a distribuição da diversidade genética intra-específica, que é reconhecida como um componente fundamental da biodiversidade (Moritz e Faith, 1998; Taberlet, 1998). Marcadores maternalmente herdados, como o cpDNA em muitas Angiospermas e mtDNA em Gimnospermas, tendem a mostrar alta diferenciação, em parte por causa do menor potencial para dispersar sementes que o pólen e, em parte, por causa da grande deriva genética para o genoma haplóide em pequenas populações de refúgio (Newton *et al.*, 1999).

Estudos filogenéticos abaixo do nível de espécies são valiosos para diferenciar linhagens genéticas com histórias evolutivas únicas. Se linhagens ou populações distintas em uma espécie forem raras, elas requerem ações de proteção e conservação, como Unidades Evolutivamente Significantes (do inglês, *ESUs*, *evolutionarily significant units*). O termo significativo em uma *ESU* pode ser entendido como um reconhecimento de que as populações têm sido historicamente isoladas e, desta forma, esperado que tenham

potenciais genéticos distintos (Moritz, 1994, 1995). Enquanto a conservação prática está normalmente voltada para espécies raras e restritas, as *ESUs* podem também estar presentes nos recursos genéticos de espécies de distribuição ampla. O reconhecimento destas linhagens evolutivas únicas é importante para o manejo do ecossistema, especialmente na conservação e reabilitação de pequenas porções de vegetação nativa (Byrne, 2003). A informação genética também se torna muito útil quando somente um subconjunto das populações atuais pode ser protegido e a identificação das áreas de maior diversidade é essencial no estabelecimento de estratégias de conservação a curto prazo (Schemske *et al.*, 1994).

Moritz (1994) sugere que critérios genéticos devam ser usados para definir *ESUs* dentro de espécies. Se o genoma organelar (mtDNA ou cpDNA) mostra divergência significativa entre populações e monofilia dentro delas, e os *loci* nucleares mostram diferenças significantes entre as frequências alélicas, então estas populações devem ser definidas e controladas separadamente como *ESUs*. Unidades de Manejo (do inglês *MU*, *management units*), entretanto, são reconhecidas como populações com divergência significativa de frequências alélicas em *loci* nucleares ou não, independentemente da distinção filogenética dos alelos.

Crandall *et al.* (2000) propuseram que outros critérios também sejam levados em conta na definição das *ESUs*. As populações devem ser classificadas de acordo com as trocas genéticas ou ecológicas recentes. Esta proposta tenta delinear se existe diferenciação adaptativa, se existe fluxo gênico e se o fluxo gênico é histórico ou devido a eventos recentes. Outro problema da classificação de Moritz é que é preciso testar os conjuntos de dados dentro de um nível de significância, que muitas vezes depende mais dos tamanhos amostrais que da divergência absoluta de uma população. Petit *et al.* (1998) ressaltam que além de medidas de diversidade e de frequências alélicas, a riqueza de alelos também deve ser um critério relevante para conservação de populações, já que a preservação de alelos é mais importante que a manutenção das frequências.

Muitos trabalhos têm utilizado medidas de diversidade e divergência genética para traçar estratégias de conservação para as espécies vegetais. Shrestha *et al.* (2002) sugerem a conservação separada das doze populações estudadas de *Acacia raddiana* (Fabaceae) no deserto de Negev, em Israel, devido à alta diferenciação genética entre elas, evitando o

cruzamento entre populações distintas pelo risco de depressão exogâmica (diminuição do valor adaptativo de populações naturais pela introdução de genótipos adaptados a outras condições ambientais). Zawko *et al.* (2001), entretanto, sugerem cruzamentos entre populações de *Leucopogon obtectus*, espécie altamente ameaçada dos desertos do oeste australiano, com menos de 500 indivíduos conhecidos em quatro populações. Mesmo apresentando populações pequenas e isoladas, foram encontrados altos níveis de diversidade intrapopulacional, com ausência de uma diferenciação entre elas, sugerindo que a espécie possui grupos genéticos extremamente diversos, devendo ser mantidos ao longo de toda a distribuição,

Rosseto *et al.* (2000) estudaram quatro espécies do gênero *Fontainea*, altamente ameaçadas e distribuídas em locais restritos nas florestas pluviais no litoral leste australiano, com *F. oraria* restrita a um local com cerca de dez indivíduos adultos. Foi identificada uma unidade genética distinta, originada por introgressão entre *F. rostrata* e *F. australis*, sugerindo que esta população seja protegida e monitorada separadamente das outras populações, o que mostra a importância de identificar indivíduos ou populações entre espécies relacionadas e que divergiram recentemente.

A hibridização seguida de introgressão entre espécies próximas pode ter consequências importantes para as espécies envolvidas, e merece atenção do ponto de vista da conservação. No exemplo anterior, houve um aumento na diversidade genética, podendo levar a um aumento no *fitness* e na capacidade adaptativa daquelas populações. Entretanto, a introgressão pode comprometer a viabilidade da população, devido à perda de diversidade genética, assimilação genética e depressão exogâmica (Haig, 1998).

Embora a hibridação seja um fenômeno comum e um componente importante na evolução das plantas (onde 70% das espécies parecem descender de híbridos, Rieseberg e Ellstrand, 1993), a conservação se torna importante quando cruzamentos interespecíficos efetivos podem ocorrer entre populações de uma espécie mais restrita e vulnerável e a espécie relacionada, com distribuição mais ampla e menos vulnerável.

Estes cruzamentos podem acarretar duas principais consequências genéticas, ambas com riscos grandes à espécie ameaçada. Se os híbridos das gerações posteriores forem vigorosos e férteis, a espécie está em risco por assimilação genética. Se a progênie híbrida for estéril ou tiver vigor reduzido, então a espécie está em risco de depressão exogâmica.

Geralmente o risco maior para populações pequenas é a assimilação genética, que tem seus efeitos cada vez mais intensos conforme o tamanho da população ameaçada decresce em relação ao congênere simpátrico (Ellstrand e Elam, 1993; Levin, 1996).

O isolamento reprodutivo em espécies de *Petunia* e *Calibrachoa* é primariamente pré-zigótico, seja por isolamento geográfico das espécies ou por modificações morfológicas para distintos polinizadores. Os estudos filogenéticos sugerem uma diversificação muito recente, com espécies geneticamente próximas (Ando *et al.*, 2005; Lorenz-Lemke, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007) e os testes de laboratório mostraram que, com exceção de *C. parviflora* e *C. pygmaea* (que só produzem híbridos quando cruzadas entre si) as demais espécies exibem capacidade potencial de se intercruzarem, com graus variáveis de produção de sementes (Watanabe *et al.*, 1997).

Lorenz-Lemke *et al.* (2006), através da análise de sequências dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *psbB-psbH* e estudos morfológicos comprovaram a hibridação natural entre *Petunia exserta*, espécie micro-endêmica restrita a poucas populações localizadas na Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, e *P. axillaris*, espécie geneticamente relacionada e amplamente distribuída pelo Pampa. Esta hibridação pode constituir um risco para a manutenção das populações típicas de *P. exserta*, pela perda das adaptações exclusivas desta espécie a condições específicas, como a polinização mediada por beija-flores e a restrição aos substratos encontrados nas formações rochosas da região.

Em *Calibrachoa*, híbridos naturais são encontrados em pequeno número nas regiões de simpatria entre espécies, tanto por nosso grupo de trabalho em saídas de campo, como também reportado por Stehmann (1999). O risco para a integridade das espécies envolvidas ainda é desconhecido, pois se a formação de híbridos se der em uma pequena frequência, a identidade das espécies não parece estar ameaçada. Mas, como em *P. exserta*, algumas espécies de *Calibrachoa* possuem distribuições muito restritas, com um número diminuto de indivíduos e populações em simpatria com espécies de distribuição ampla. Os casos mais extremos são as espécies *C. sendtneriana* e *C. serrulata*, representadas por poucas populações nos campos do Planalto Catarinense, onde também é encontrada *C. sellowiana*, que se distribui amplamente pelos planaltos desde o Rio Grande do Sul até o Norte de Santa Catarina.

Além do risco por introgressão, muitas espécies do gênero estão ameaçadas

simplesmente pela destruição dos ambientes naturais e dos habitats, muitas vezes restritos e únicos. *Calibrachoa elegans*, por exemplo, ocupa um tipo de substrato muito peculiar e raro, disperso em pequenas manchas em regiões de altitude no estado de Minas Gerais. A preservação destas formações naturais é também de vital importância para as espécies do gênero pela dependência de vetores de polinização para a manutenção das mesmas, devendo ser prioritária não só a conservação da espécie vegetal, mas a do sistema planta-polinizador (Kearns *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a distribuição atual das espécies do gênero *Calibrachoa* em território brasileiro, bem como entender as relações evolutivas do gênero através de análises filogenéticas e filogeográficas, a partir de sequências de marcadores de cloroplasto. Abordagens filogeográficas também foram realizadas em algumas espécies, tendo como objetivos específicos:

- Estudar as relações entre as espécies *C. excellens* (*C. excellens* subsp. *excellens*, *C. excellens* subsp. *atropurpurea*), e *C. linoides*, ambas com ampla distribuição geográfica e áreas de sobreposição nos campos da região central do sul do Brasil;
- Estimar os níveis de variação genética das espécies endêmicas de distribuição muito restrita (*C. eglandulata*, *C. sendtneriana* e *C. serrulata*) que podem estar ameaçadas, como também de *C. elegans*, ameaçada de extinção, e suas relações com as espécies de distribuição mais ampla.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do Material Vegetal

O material analisado foi obtido através de coletas na natureza realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Evolução Molecular, como também por amostras coletadas e enviadas pelo Prof. Dr. João Renato Stehmann (Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte), durante os últimos sete anos, cobrindo a distribuição da maior parte das espécies do gênero. Espécimes provenientes da Argentina foram coletados em colaboração com os professores Dra. Viviana G. Solís Neffa e Dr. Guillermo Seijo (Instituto de Botánica Del Nordeste, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes) e Dr. Julián A. Greppi (Facultad de Agronomía, Universidad de Morón, Buenos Aires). Para cada espécime foram retiradas folhas jovens, tentando minimizar os danos aos indivíduos. As folhas foram colocadas em sílica gel para desidratação. Para cada ponto de coleta de uma população foram também coletados ramos com flores e frutos para a confecção de pelo menos uma exsicata. Estas foram depositadas no Herbário BHCB (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Minas Gerais). A identificação taxonômica foi realizada pelo Dr. João Renato Stehmann, especialista no grupo. Em cada ponto de coleta também foram anotadas as coordenadas geográficas obtidas através do sistema de posicionamento global (GPS). Em todo o trabalho foram analisados 589 indivíduos, divididos em conjuntos de dados para as análises filogenéticas e filogeográficas. Estes conjuntos serão detalhados posteriormente.

3.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído através da técnica descrita por Roy *et al.* (1992), modificada e adaptada para espécies de *Calibrachoa*. Cerca de 20 mg do produto pulverizado em nitrogênio líquido a partir das folhas desidratadas foram transferidos para um microtubo padrão de 1,5 ml, seguido da 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 (10 mg/ml). Após incubação a 65°C por 30 minutos (com homogeneização a cada 5 minutos), e emulsão com 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1), os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 14000 rpm; e a fase aquosa foi

transferida para outro tubo. Após adição de igual volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio; o material foi resfriado a -18° por até 24 horas e centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70°GL; seco em temperatura ambiente e eluído em 200 µl de água ultra pura estéril com 2µl de RNase (10 mg/ml).

Para muitas espécies foi adotada uma metodologia complementar (Michaels *et al.*, 1994) para a retirada de polissacarídeos, presentes em grande quantidade na solução final que continha o DNA, impossibilitando a amplificação por PCR. Após a etapa de precipitação na metodologia descrita acima (*pellet* de DNA desidratado), foram adicionados 500 µl de NaCl 0,25 M e Tris-HCl pH 8,0 10 mM. O material foi dissolvido em vórtex, mantido a 10 °C por 20 min, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, e a fase aquosa transferida para um novo tubo. O DNA limpo foi então precipitado e solubilizado em água ultra pura estéril com RNase.

Os produtos de extração foram verificados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com “GelRed” (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Cada amostra foi quantificada através da comparação, em gel, com o marcador de concentração “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen).

3.3. Amplificação dos marcadores

As sequências analisadas neste trabalho foram obtidas através de reações de PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando iniciadores (*primers*) e protocolos específicos, descritos na literatura, para cada um dos marcadores utilizados.

Foram utilizadas neste trabalho cinco regiões não-codificadoras do genoma plastidial: os espaçadores intergênicos *trnH-psbA*, *psbB-psbH*, *trnL-trnF* e *trnS-trnG*, e intron do gene *trnL*. Os protocolos de amplificação, sequência dos iniciadores e referências estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Condições de laboratório para amplificação das sequências dos marcadores utilizados.

Marcador Utilizado	Componentes da Reação de PCR	Condições de Amplificação	Primers utilizados	Literatura consultada	
<i>pbsA-trnH</i>	Tampão	1X		Sang <i>et al.</i> , 1997	
	dNTP	0,2 mM	94 °C por 3 min		
	MgCl ₂	2 mM			
	Primer <i>pbsA F</i>	0,2 mM	30 ciclos de: 94 °C por 45 s		Primer <i>pbsA F</i> 5' GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C 3'
	Primer <i>trnH R</i>	0,2 mM	58 °C por 1 min		Primer <i>trnH R</i> 5' CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC 3'
	Taq Polimerase	1U	72 °C por 1 min 30 s		
DNA	50 ng	72 °C por 10 min			
<i>psbB-psbH</i>	Tampão	1X		Hamilton, 1999	
	dNTP	0,2 mM	94 °C por 5 min		
	MgCl ₂	2 mM			
	Primer <i>psbB</i>	0,2 mM	30 ciclos de: 94 °C por 1 min		Primer <i>psbB</i> 5' GTT TAC TTT TGG GCA TGC TTC G 3'
	Primer <i>psbH</i>	0,2 mM	50 °C por 1 min		Primer <i>psbH</i> 5' CGC AGT TCG TCT TGG ACC AG 3'
	Taq Polimerase	1U	72 °C por 1 min		
DNA	50 ng	72 °C por 10 min			
<i>trnL-trnF</i>	Tampão	1X		Taberlet <i>et al.</i> , 1991	
	dNTP	0,2 mM	95 °C por 3 min		
	MgCl ₂	2 mM			
	Primer <i>E</i>	0,2 mM	35 ciclos de: 94 °C por 1 min		Primer <i>E</i> 5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3'
	Primer <i>F</i>	0,2 mM	55 °C por 1 min		Primer <i>F</i> 5' TTT GAA CTG GTG ACA CGA G 3'
	Taq Polimerase	1U	72 °C por 1 min		
DNA	50 ng	72 °C por 5 min			

Continuação Tabela 2. Condições de laboratório para amplificação das sequências dos marcadores utilizados.

Marcador Utilizado	Componentes da Reação de PCR	Condições de Amplificação	Primers utilizados	Literatura consultada	
<i>trnS-trnG</i>	Tampão	1X		Hamilton, 1999	
	dNTP	0,2 mM	96° C por 5 min		
	MgCl ₂	2 mM			
			40 ciclos de:		5' GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC 3'
	<i>Primer 1</i>	0,4 mM	96° C por 1 min		
	<i>Primer 2</i>	0,4 mM	52° C por 1 min		<i>Primer 2 (trnG UCC)</i>
	Taq Polimerase	1U	72° C por 1 min		5' GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C 3'
DNA	50 ng				
		72° C por 5 min			
Íntron do gene <i>trnL</i>	Tampão	1X		Taberlet <i>et al.</i> , 1991	
	dNTP	0,2 mM	94 °C por 3 min		
	MgCl ₂	2 mM			
			35 ciclos de:		
	<i>Primer c</i>	0,2 mM	94 °C por 1 min		
	<i>Primer d</i>	0,2 mM	55 °C por 1 min		
	Taq Polimerase	1U	72 °C por 1 min		<i>Primer d</i>
DNA	50 ng		5' GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3'		
		72 °C por 3 min			

3.4. Sequenciamento

A quantificação do DNA amplificado por PCR foi realizada através de comparação de intensidade das bandas das amostras com as do marcador de concentração (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen), após eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium). A purificação dos produtos de PCR foi feita de acordo com Dunn e Blattner (1987): adição de igual volume de PEG (polietilenoglicol) 20% (p/v) ao produto, incubação a 37 °C por 30 min, centrifugação a 14000 rpm por 20 min, descarte do sobrenadante, adição de 125 µl de EtOH 80% gelado, incubação por 1 min e centrifugação por 2 min, descarte do sobrenadante, adição de 125 µl de etanol absoluto gelado, incubação por 1 min e centrifugação por 2 min, descarte do sobrenadante, evaporação do etanol residual a 70 °C por 10 min, solubilização do produto de PCR em 15 µl de H₂O ultra-pura estéril e incubação à temperatura ambiente por 12 horas.

O sequenciamento do DNA foi realizado em sequenciador automático MegaBACE 1000 (*GE Healthcare Life Sciences*), seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamicTMET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente. As condições da reação de amplificação para sequenciamento estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições das reações de PCR para sequenciamento

Componentes da reação	Condições de amplificação	
<i>DYEnamicTMET terminator sequencing premix</i>	4 µl	35 ciclos:
Produto de PCR purificado	40 ng	95° C por 20 s
Primer	0.25 µM	50° C por 15 s
Água estéril	completar 10 µl	60° C por 1 min

Antes da injeção no sequenciador, cada amostra foi purificada diretamente nas placas de sequenciamento, como descrito: adição de 1 µl de acetato de amônio 7,5 M e 30 µl de etanol absoluto, mistura por 30 inversões, centrifugação da placa por 45 min a 1780 RCF a 20 °C, descarte do sobrenadante, adição de 100 µl de etanol 70% (temperatura ambiente), *spin* a 1780 RCF, descarte do sobrenadante, adição de 10 µl de *Loading Solution* e fechamento da placa com adesivo, ressuspensão em vórtex por 5 min, *spin* a 1780 RCF e encaminhamento ao sequenciador.

3.5. Visualização, alinhamento e caracterização das sequências

Os cromatogramas gerados foram visualizados no programa Chromas 2.0 (Technelysium, Helensvale, Australia). Os alinhamentos das sequências foram realizados primeiramente através do programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e revisados manualmente com auxílio do programa GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997). Os sítios variáveis e a composição nucleotídica foram estimados no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Devido à presença de eventos mutacionais do tipo inserção/deleção presentes nos espaçadores, as análises filogenéticas de *neighbor joining* e máxima parcimônia foram realizadas com os *gaps* de cada conjunto de dados codificados conforme o modelo proposto por Simmons *et al.* (2001), implementado no programa GapCoder (Young e Healy, 2003). Alguns espaçadores também apresentaram regiões com repetições mononucleotídicas A/T, que são reconhecidos como sítios altamente homoplásicos (Kelchner, 2000) e por esta razão sua variação não foi considerada nas análises.

3.6. Conjuntos de dados utilizados nas análises

Foram realizadas reconstruções filogenéticas com os cinco marcadores de cloroplasto utilizando representantes de cada espécie em dois conjuntos: o primeiro contendo um representante por espécie (denominado conjunto 1), e o segundo com mais de um representante para as espécies com distribuições mais amplas (conjunto 2). Como grupo externo, foram utilizadas amostras de *Petunia axillaris* e *Petunia integrifolia*. O local de coleta das amostras utilizadas nestes dois conjuntos estão nas Tabelas 4 (contendo todas as amostras do conjunto 1) e 5 (amostras adicionadas ao conjunto 1, formando o conjunto 2). Duas espécies pouco conhecidas e recombinadas recentemente para o gênero, *C. felliponei* e *C. scabridula* (Stehmann e Bohs, 2007), com ocorrência descrita para a região de fronteira entre o Brasil, Uruguai e Argentina, não serão abordadas neste trabalho. Embora tenham sido feitas buscas em campo pelo nosso grupo nas prováveis regiões de ocorrência em território nacional, não foram encontrados representantes destas espécies, bem como nos registros de coletas realizados pelo professor Julián A. Greppi na Argentina.

Após avaliação da variação dos marcadores (detalhada no capítulo seguinte), os dois segmentos mais variáveis (espaçadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*) foram amplificados para utilização em análises filogenéticas (árvore filogenética e *network* de haplótipos) a partir de uma amostra mais ampla, contendo sequências representando toda a variação encontrada em 595 indivíduos de 95 locais de coleta, cobrindo a distribuição de praticamente todas as espécies do gênero. A partir deste conjunto, foram amostradas sequências representando cada um dos haplótipos determinados pelo programa DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003), formando um alinhamento de 102 sequências, com duas sequências de espécies de *Petunia* utilizadas como grupo externo. Por se tratarem de espécies com amplitudes de distribuição muito diferentes, algumas espécies tiveram um número maior de representantes amostrados. As amostras analisadas neste conjunto (denominado conjunto 3) estão descritas na Tabela 1, em anexo.

As sequências de *Calibrachoa excellens* e *C. linooides* que foram utilizadas para a geração dos haplótipos do conjunto 3 também foram utilizadas na sua totalidade em abordagens filogeográficas. As populações analisadas, localização e número de indivíduos estão na Tabela 1, em anexo. O mesmo foi feito para as espécies *C. elegans*, *C. eglandulata*, *C. sendtneriana* e *C. serrulata* (espécies micro-endêmicas restritas). Para estas espécies também foram estimados e comparados os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica em uma amostra com o espaçador *trnS-trnG*, que possui um número maior de sequências a serem analisadas. Os indivíduos e populações analisados para estas estimativas serão descritos juntamente com os resultados.

Tabela 4. Amostras incluídas na análise filogenética contendo uma sequência por espécie (Conjunto 1).

Espécie	Locais de Coleta	Coordenadas Geográficas
<i>Calibrachoa caesia</i>	Rodovia SC301, entre São Bento do Sul e Campo Alegre, a cerca de 4 km da cidade de Campo Alegre - Santa Catarina.	26 12' 26.87299"S 49 18' 31.01876"W
<i>Calibrachoa cordifolia</i>	Barragem Rodolfo da Costa e Silva. Itaara - Rio Grande do Sul.	29 30' 39.66756"S 53 45' 15.67637"W
<i>Calibrachoa dusenii</i>	Fazenda São Roque. Porto Amazonas - Paraná	25 28' 56.84430"S 49 47' 29.05882"W
<i>Calibrachoa eglanulata</i>	Estrada Urubici-Serra do Corvo Branco. Urubici - Santa Catarina	28 02' 34.75477"S 49 24' 30.69243"W
<i>Calibrachoa elegans</i>	Serra da Calçada. Brumadinho - Minas Gerais	20 05' 35"S 43 59' 01"W
<i>Calibrachoa ericifolia</i>	Rodovia PR 340, sentido Castro-Tibagi, a cerca de 42 km de Castro. Tibagi - Paraná	24 39' 00.24468"S 50 13' 29.22658"W
<i>Calibrachoa excellens subsp. atropurpurea</i>	Rodovia BR 293, sentido Dom Pedrito-Bagé. Bagé - Rio Grande do Sul	31 18' 02.27867"S 54 02' 41.88645"W
<i>Calibrachoa excellens subsp. excellens</i>	Rodovia SC430, entre São Joaquim e Urubici, a cerca de 12 km do trevo para a SC438. Vila Pericó, São Joaquim - Santa Catarina	30 32' 58.00215"S 53 32' 32.25504"W
<i>Calibrachoa heterophylla</i>	Estrada para o camping Itapeva. Torres - Rio Grande do Sul	29 34' 59"S 55 06' 03"W
<i>Calibrachoa humilis</i>	Margem do Rio Ibicui ao lado da ponte da estrada Uruguaiana-Itaqui. Uruguaiana - Rio Grande do Sul	29 25' 05.80637"S 56 41' 38.75415"W
<i>Calibrachoa linearis</i>	Área urbana de Concordia, em frente ao parque industrial. Departamento de Concordia, Província de Entre-Rios. Argentina	31 24'S 58 05'W
<i>Calibrachoa linoides</i>	Estrada de terra a partir da BR282, sentido Urubici-Bom Retiro a cerca de 10 km de bom Retiro. Bom Retiro - Santa Catarina	27 50' 46.67382"S 49 31' 31.53716"W
<i>Calibrachoa micrantha</i>	Fazenda São Nicolau. Bom Sucesso de Itararé - São Paulo	24 19' 04.08"S 49 08' 38.04"W
<i>Calibrachoa missionica</i>	Afloramento rochoso próximo a estrada entre Santo Cristo e Porto Vera Cruz. Porto Vera Cruz - Rio Grande do Sul	27 45' 07.03233"S 54 50' 39.88593"W
<i>Calibrachoa ovalifolia</i>	Caminho para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 31' 54.79217"S 53 33' 05.07502"W
<i>Calibrachoa paranensis</i>	Reserva Natural Buraco do Padre. Ponta Grossa - Paraná	25 10' 18.04831"S 49 58' 05.21379"W
<i>Calibrachoa parviflora</i>	Calçada próxima ao edifício do Departamento de Genética, Campus do Vale, UFRGS. Porto Alegre - Rio Grande do Sul	30 04' 12.12"S 51 07' 10.02"W
<i>Calibrachoa pubescens</i>	Rodovia RS165 entre São Luiz Gonzaga e Serrinha, a cerca de 10 km de São Luiz Gonzaga. São Luiz Gonzaga - Rio Grande do Sul	28 22' 09.42643"S 54 52' 38.67255"W
<i>Calibrachoa pygmaea</i>	Rodovia BR293, entre Quaraí e Santana do Livramento, a cerca de 35 km de Quaraí. Santana do Livramento - Rio Grande do Sul	30 32' 57.73208"S 56 07' 06.22586"W
<i>Calibrachoa sellowiana</i>	Rodovia BR 116 entre Monte Castelo e Santa Cecília, a cerca de 20 km de Santa Cecília. Santa Cecília - Santa Catarina	26 49' 16.30910"S 50 21' 20.68088"W
<i>Calibrachoa sendtneriana</i>	Estrada Serra do Rio do Rastro-Bom Jardim da Serra. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 22' 31.19970"S 49 33' 38.09984"W
<i>Calibrachoa serrulata</i>	Borda Norte do Cânion da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 23' 09.40649"S 49 32' 41.28241"W
<i>Calibrachoa sp.1</i>	BR287, entre São Pedro do Sul e Mata, São Pedro do Sul-Rio Grande do Sul.	29 38' 18.44812"S 54 18' 16.65114"W
<i>Calibrachoa sp.2</i>	Rodovia RN94 sentido Azara, Departamento de Santo Tome, Província de Corrientes. Argentina	29 39'S 56 09'W
<i>Calibrachoa spathulata</i>	Rodovia PR170, entre Bituruna e General Carneiro, a cerca de 20 km de Bituruna. Bituruna - Paraná	26 17' 11.68496"S 51 29' 23.87539"W
<i>Calibrachoa thymifolia</i>	Estrada secundária à direita da rodovia BR101, sentido São José do Norte-Estreiro. São José do Norte - Rio Grande do Sul	31 57' 36.87472"S 51 59' 02.33134"W
<i>Petunia axillaris</i>	Rodovia BR 290, entre Cachoeira do Sul e Pantano Grande, a 8 km de Pantano Grande. Pantano Grande - Rio Grande do Sul	30 12' 11"S 52 27' 23"W
<i>Petunia integrifolia</i>	Estrada para Piriqui. Cachoeira do Sul - Rio Grande do Sul	30 27' 11.34621"S 52 56' 08.46725"W

Tabela 5. Amostras adicionadas ao Conjunto 1 para análise de mais de uma sequência para algumas espécies (formando o Conjunto 2).

Espécie	Locais de Coleta	Coord. Geográficas
<i>Calibrachoa ericifolia</i>	Passo do Pupo, a 7 km da BR 376. Ponta Grossa - Paraná	25 08' 48.86654"S 49 57' 17.38877"W 1061m
<i>Calibrachoa excellens subsp. excellens</i>	Estrada para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 58.00215"S 53 32' 32.25504"W
<i>Calibrachoa heterophylla</i>	Estrada de terra próxima a Balsa Nova. Lapa - Paraná	25 35' 48,70688"S 49 38' 39,03514"W
	Estrada em direção ao litoral a partir da RS471, próximo a Lagoa das Flores. Rio Grande - Rio Grande do Sul	32 31' 26.26021"S 52 32' 47.80889"W
<i>Calibrachoa linoides</i>	Estrada de acesso ao balneário, a 2 km do mar, próximo a Bojuru. São José do Norte - Rio Grande do Sul	31 40' 00.24527"S 51 25' 32.75352"W
	Rodovia SC301, entre São Bento do Sul e Campo Alegre, a cerca de 4 km de Campo Alegre. Campo Alegre - Santa Catarina	26 12' 29.03864"S 49 18' 23.65972"W
<i>Calibrachoa ovalifolia</i>	Campo próximo à estrada de acesso à Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 32.43228"S 53 33' 19.79975"W
<i>Calibrachoa paranensis</i>	Estrada Guarapuava-Laranjeiras do Sul. Guarapuava - Paraná	25 25' 04.59812"S 51 40' 17.12380"W
<i>Calibrachoa parviflora</i>	Área urbana de Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 30' 31.82008"S 53 29' 27.77868"W
<i>Calibrachoa pygmaea</i>	Rodovia BR290 km 649 sentido Alegrete-Uruguaiana, a cerca de 1 km do trevo para Quaraí. Uruguaiana - Rio Grande do Sul	30 01' 10.48805"S 56 24' 51.27712"W
<i>Calibrachoa sellowiana</i>	Estrada secundária a partir da rodovia RS020, cerca de 7 km ao sul de Cambará do Sul. Cambará do Sul - Rio Grande do Sul	29 05' 32.79583"S 50 11' 18.57672"W

3.7. Inferências filogenéticas

3.7.1. Seleção de modelos evolutivos

As probabilidades *a priori* das frequências dos nucleotídeos, o modelo para variação das taxas de substituição entre os sítios e o número de tipos de substituição para cada conjunto de dados foram estimados com o auxílio de dois programas. Nas reconstruções filogenéticas pelos métodos de *neighbor-joining*, máxima verossimilhança e inferência bayesiana foi usado o programa jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008). Para as inferências bayesianas obtidas a partir do programa MrBayes v3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) foram utilizados modelos determinados com auxílio do programa MrModeltest (Nylander, 2004). Os modelos utilizados nas análises foram aqueles

estimados pelo critério bayesiano (*Bayesian Information Criterion* - BIC), utilizando o programa jModeltest, e pelo *Akaike Information Criterion* (AIC), quando da utilização do programa MrModeltest. A principal diferença entre os três testes empregados para avaliação de modelos (*hierarchical Likelihood Ratio Test*, AIC e BIC) é que o primeiro realiza comparações hierárquicas passo a passo entre dois modelos de substituição de acordo com escala de complexidade através de um teste de razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio Test*), onde sequencialmente o modelo com menor valor naquela comparação é descartado, o que não garante que o melhor modelo entre todos foi o escolhido. Os dois últimos critérios (AIC e BIC) selecionam aquele modelo que apresenta o melhor valor de *likelihood* (AIC) ou probabilidade posterior (BIC) entre todos os modelos de substituição (Posada e Buckley, 2004; Kelchner e Thomas, 2007).

Tabela 6. Modelos Evolutivos selecionados para cada conjunto de dados utilizados nas análises filogenéticas.

Conjunto de Dados	Programa utilizado	
	jModeltest	MrModeltest
1	F81	GTR + G
2	F81	GTR + G
3	GTR + G	GTR + G

3.7.2. Métodos de análise

Com os Conjuntos 1 e 2 foram realizadas reconstruções filogenéticas através dos métodos de distância, máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana.

As análises através de distância foram realizadas pelo método de *neighbor-joining* (NJ) (Saitou e Nei, 1987), no programa PAUP* versão 4.0 (Swofford, 1998) para Windows, com modelo evolutivo selecionado no programa jModeltest. Foram realizadas 1000 replicações de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) para cada análise.

As análises através do método de máxima parcimônia (MP) também foram realizadas no programa PAUP* versão 4.0 para Windows. Foi utilizada busca heurística, com adição de *taxa* passo a passo (*stepwise addition*) e TBR (*Tree Bisection and*

Reconnection) como método de rearranjo dos ramos. Foram realizadas 1000 replicações de *bootstrap* para cada análise.

O método de máxima verossimilhança (ML) foi realizado no programa PhyML (Guindon e Gascuel, 2003), com árvore inicial gerada pelo método de *neighbor-joining*, com 1000 replicações de *bootstrap* para cada análise.

As reconstruções através de inferência bayesiana foram realizadas no programa MrBayes v3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Foram utilizadas quatro cadeias de Markov - Monte Carlo (MCMC) com um milhão de gerações em cada análise. As árvores foram amostradas a cada 100 gerações e o número de gerações necessárias até que cada parâmetro se tornasse estável (*burn-in*) foi definido após inspeção dos valores de *log-likelihood* correspondentes às gerações realizados pelo programa MrBayes. Para determinar a probabilidade posterior de cada nó, uma árvore consenso foi construída utilizando a regra do consenso da maioria (*50% majority-rule consensus*).

O conjunto de dados 3 foi utilizado em análises filogenéticas pelos métodos de inferência bayesiana, com datação dos principais clados formados, através do programa BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) v1.4.3 (Drummond e Rambaut, 2007). Para as estimativas de datação, foram considerados somente os eventos de substituição, enquanto que para a geração das topologias, os eventos de inserção/deleção (*indels*) também foram considerados.

No BEAST foram realizadas duas análises com 100.000.000 de gerações de cadeias de Markov - Monte Carlo (MCMC), com amostragem de árvores e seus respectivos valores de verossimilhança a cada 1000 gerações. O modelo evolutivo, determinado com auxílio do programa jModeltest, foi o GTR com correção *gamma*, com seis tipos de substituição (Tabela 6). Os parâmetros utilizados para as análises foram: condições de um relógio molecular relaxado com distribuição *log-normal*, conforme recomendação dos autores (Drummond *et al.*, 2006), com o modelo de especiação de Yule, que assume uma taxa de especiação constante e probabilidades iguais de especiação para todos os terminais.

Os cálculos das idades dos ancestrais comuns mais recentes (t_{MRCAs}) dos clados foram baseados na taxa de substituição calculada para o conjunto dos espaçadores de cloroplasto *trnH-psbA* e *trnS-trnG* em *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*, cuja linhagem ocorre exclusivamente na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, área com

idade geológica máxima de 400.000 anos (Villwock e Tomazelli, 1995). A taxa baseada na divergência desta linhagem foi de $2,8 \times 10^{-9}$ ($\pm 5,4 \times 10^{-11}$) substituição/sítio/ano (A. P. Lorenz-Lemke *et al.*, comunicação pessoal). O programa Tracer v1.4 (disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) foi utilizado para verificar a convergência das gerações das cadeias de Markov - Monte Carlo e determinar o ponto de corte (*burn-in*) ou dispensa das árvores geradas (25% iniciais). A amostra de árvores foi sumarizada em uma árvore alvo (*target tree*) do tipo máxima credibilidade de clados (*Maximum clade credibility*), com valores de probabilidade posterior, através da utilização do programa TreeAnnotator (disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator>). Para fins comparativos, foi calculada uma taxa de especiação para o gênero, baseada no modelo de Yule, que assume uma taxa constante de formação de linhagens sem extinção (taxa de especiação = $\ln n_1 - \ln n_0/T$, onde n_1 é o número de espécies atuais, n_0 é o número de linhagens inicial, assumida como sendo = 1, e T é a idade do clado expressa em milhões de anos) (Baldwin e Sanderson, 1998).

3.8. Análises Filogeográficas

A determinação dos haplótipos nas análises filogeográficas foi realizada com auxílio do programa DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). A análise de *networks* (rede de haplótipos) para os haplótipos amostrados foi realizada com o programa Network 4.5 (disponível no site <http://www.fluxus-engineering.com>), através do método de *median joining network* (Bandelt *et al.*, 1999). Para a geração dos haplótipos, o alinhamento das sequências foi modificado, pois o programa utilizado considera cada posição nucleotídica alterada como um evento independente. Assim, os *indels* de mais de 1 pb foram codificados como um evento mutacional único. O alinhamento não “codificado” apresenta o mesmo número e relacionamento entre os haplótipos, mas o *network* gerado apresenta um número de passos mutacionais superestimado.

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

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, 1997) e a *pairwise mismatch distribution* (distribuição do número de diferenças observadas entre todos os haplótipos tomados par a par; Rogers e Harpending, 1992) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de *bootstrap* (programa Arlequin 3.11).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica de *Calibrachoa* no Brasil

Todo o material utilizado neste trabalho foi procedente de coletas na natureza, realizadas por nosso grupo de pesquisa nos períodos de florescimento e frutificação das plantas (principalmente no período da primavera, entre agosto e final de dezembro, estendendo em algumas espécies até abril e maio). As coletas foram iniciadas no ano de 2002 e intensificadas entre 2005 e 2008, cobrindo toda a distribuição do gênero em território brasileiro, sendo que algumas destas coletas foram realizadas em colaboração com o Prof. João Renato Stehmann. Dados adicionais sobre a distribuição de algumas espécies em território argentino também serão discutidos neste levantamento. Estas informações foram obtidas por amostras enviadas pelo Prof. Julián A. Greppi, como também através de uma coleta realizada por nosso grupo em novembro de 2008, com a colaboração dos professores Viviana G. Solís Neffa e Guillermo Seijo.

No Brasil foram coletados 2847 indivíduos em 184 locais e, embora tenham sido encontradas populações na grande maioria das localidades, em alguns pontos de coleta (principalmente das espécies microendêmicas) foram amostrados um ou poucos indivíduos. Sendo assim optou-se por classificar os pontos de coleta como locais e não como populações. A distribuição geográfica observada na maioria das espécies corroborou os dados da literatura, sendo mostradas nas Figuras 10 a 15. A Tabela 7 contém o número de locais e indivíduos coletados para cada espécie, inclusive para aquelas que não ocorrem em território brasileiro, mas que foram amostrados para as análises filogenéticas.

No Brasil, a espécie com distribuição contínua mais ampla é *Calibrachoa excellens* (compreendendo as duas subespécies, *C. excellens* subsp. *excellens* e *C. excellens* subsp. *atropurpurea*), encontrada desde Canguçu, no Rio Grande do Sul, até Guarapuava, no Paraná, sendo os pontos extremos distantes cerca de 670 km. *Calibrachoa excellens* subsp. *atropurpurea* é restrita à região centro-sul do estado do Rio Grande do Sul (Figura 10). Até 1999 esta subespécie possuía poucos registros de ocorrência, sendo um deles no norte do Uruguai e os demais em território brasileiro, apenas no município de Caçapava do Sul (RS) (Stehmann, 1999). Porém foram observadas populações em uma área maior, tendo

atualmente como limites norte/oeste a cidade de São Vicente do Sul, o limite sul em Canguçu, e o leste em Encruzilhada do Sul (Figura 10).

Tabela 7. Número de locais e indivíduos coletados para cada espécie de *Calibrachoa*. As informações adicionais referem-se às coletas realizadas na Argentina.

Espécie	Locais de coleta	Indivíduos	Locais Adicionais	Indivíduos Adicionais
<i>Calibrachoa caesia</i>	1	1	2	4
<i>Calibrachoa cordifolia</i>	2	4		
<i>Calibrachoa dusenii</i>	1	32		
<i>Calibrachoa eglanulata</i>	2	46		
<i>Calibrachoa elegans</i>	4	84		
<i>Calibrachoa ericifolia</i>	6	207		
<i>Calibrachoa excellens subsp. atropurpurea</i>	10	59		
<i>Calibrachoa excellens subsp. excellens</i>	24	322	2	3
<i>Calibrachoa heterophylla</i>	15	507		
<i>Calibrachoa humilis</i>	1	3	4	6
<i>Calibrachoa linearis</i>			6	8
<i>Calibrachoa linoides</i>	27	237		
<i>Calibrachoa micrantha</i>	1	5		
<i>Calibrachoa missionica</i>	1	33	10	11
<i>Calibrachoa ovalifolia</i>	22	148	7	7
<i>Calibrachoa paranensis</i>	9	252		
<i>Calibrachoa parviflora</i>	7	26	2	2
<i>Calibrachoa pygmaea</i>	8	243		
<i>Calibrachoa pubescens</i>	3	29		
<i>Calibrachoa sellowiana</i>	26	359		
<i>Calibrachoa sendtneriana</i>	6	55		
<i>Calibrachoa serrulata</i>	3	19		
<i>Calibrachoa</i> sp.1	2	81	1	1
<i>Calibrachoa</i> sp.2			1	1
<i>Calibrachoa spathulata</i>	2	62		
<i>Calibrachoa thymifolia</i>	1	33	1	3
Total de locais coletados	184		36	
Total de indivíduos coletados		2847		46

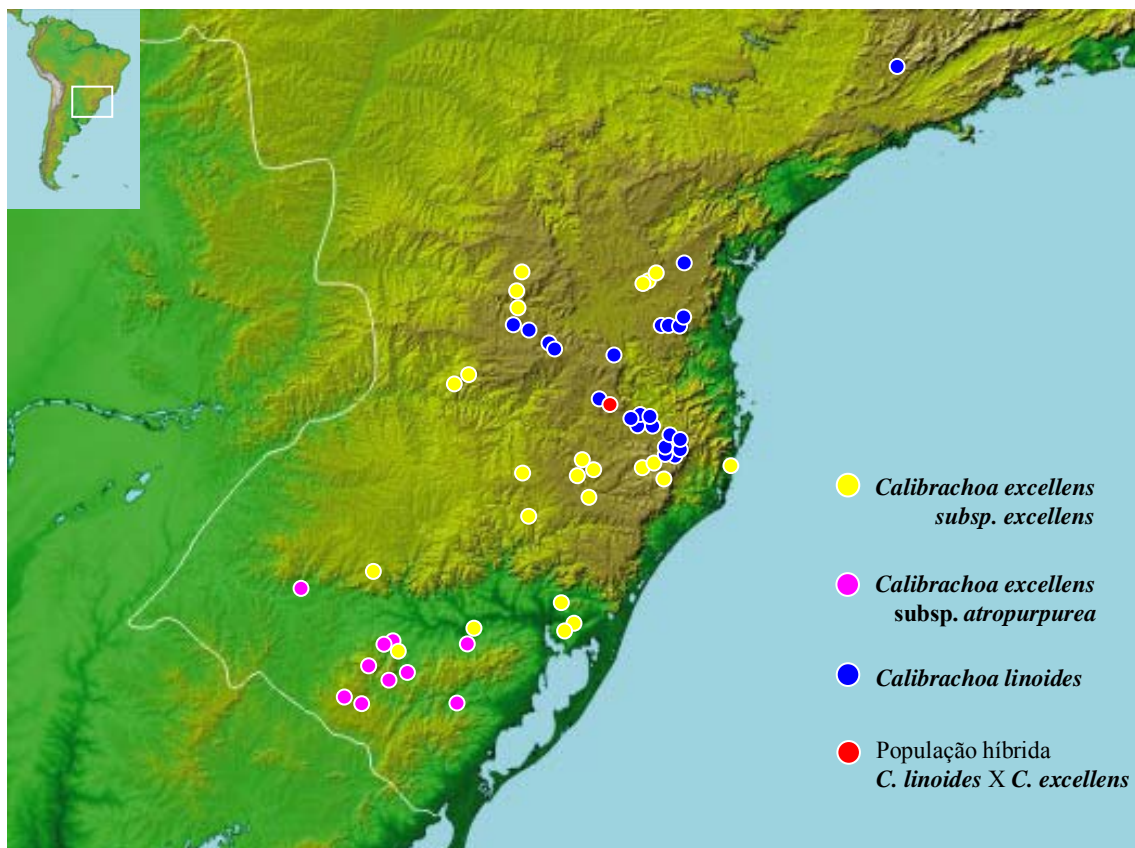


Figura 10. Locais de coleta das espécies *Calibrachoa excellens*, *C. linooides*, e da população híbrida entre *C. excellens* X *C. linooides*.

Com exceção de *Calibrachoa parviflora* (espécie autógama com maior distribuição do gênero), *C. excellens* subsp. *excellens* parece ser a mais generalista quanto aos substratos e outros fatores limitantes, como altitude. Populações foram encontradas desde Caçapava do Sul (RS) até Guarapuava (PR), ocupando diferentes substratos e formações vegetais: dunas arenosas no município de Imbituba (Santa Catarina), próximas ao nível do mar; áreas abertas no domínio da Floresta Estacional Decidual, nos municípios de Xaxim e Xanxerê (SC), cerca de 850 m de altitude; e nos municípios de Urubici (SC) a 1200 m de altitude, e Guarapuava (PR) a cerca de 900 m de altitude, ocupando áreas de campo associado com Floresta Ombrófila Mista.

Calibrachoa linooides também possui uma das distribuições mais amplas do gênero no Brasil, mas diferentemente de *C. excellens*, esta não é contínua, possuindo populações disjuntas na região sudeste, em campos de altitude das Serras da Mantiqueira e do Caparaó (estados de Minas Gerais e São Paulo, respectivamente) (Stehmann, 1999). Nesta região,

foram amostradas populações no município de Camanducaia (Minas Gerais), distantes cerca de 430 km da população mais setentrional na região sul, em Curitiba (PR). A partir deste ponto, a espécie possui uma distribuição contínua nos campos de altitude do planalto, com maior concentração na borda oriental, em altitudes que variaram de 800 a 1200 m, com populações coletadas ao sul até o município de Urubici (SC). Embora existam registros de ocorrência no planalto e serras do Rio Grande do Sul (municípios de Cambará do Sul, Caxias do Sul e Gramado) (Stehmann, 1999), durante os períodos de coleta não foram encontradas populações desta espécie nestas regiões.

Como descrito na literatura, a distribuição encontrada para as duas espécies acima parece seguir um padrão geral: *C. excellens* subsp. *excellens* é encontrada em todo o Rio Grande do Sul, ocorrendo, em sentido norte, nas porções mais continentais em altitudes variadas. Já *C. linoides* ocorre em altitudes superiores a 800 m na porção mais oriental do planalto, com maior abundância nos campos de altitude de Santa Catarina até o Paraná. As duas espécies são consideradas parapátricas, com possíveis regiões de contato na região central dos estados de Santa Catarina e Paraná (Stehmann, 1999). Embora não tenham sido encontradas populações de ambas as espécies em sobreposição, tampouco populações de *C. excellens* na região central de Santa Catarina, foi identificada, no município de São Cristóvão do Sul (SC) (assinalado em vermelho na Figura 10), uma população composta de indivíduos com caracteres morfológicos de ambas as espécies, além de indivíduos com morfologia intermediária. A distinção morfológica entre estas espécies é fundamentada em caracteres florais: *C. linoides* possui estigma capitado, globoso ou discóideo (mais raramente) e a corola com fauce amarela; *C. excellens* possui estigma transversalmente lobado e corola com fauce em geral esbranquiçada. Neste caso, a presença de indivíduos com flores de coloração e estigmas de formatos intermediários levaram à conclusão de que se tratava de uma população híbrida, corroborando a hipótese de possíveis zonas de contato entre as espécies na região central dos estados de Santa Catarina e do Paraná, levantada por Stehmann (1999). Estes indivíduos foram analisados juntamente com outras populações de ambas as espécies e os resultados moleculares obtidos serão discutidos posteriormente.

No estado do Rio Grande do Sul foram encontradas 12 espécies (incluindo populações das duas subespécies de *C. excellens* e populações de *C. sellowiana*, espécie típica dos campos de altitude de Santa Catarina, com o limite sul de sua distribuição no Rio Grande do Sul). Destas, *C. ovalifolia* mostrou a maior distribuição, desde o leste do

Estado, passando pelas regiões da Serra do Sudeste, Depressão Central, regiões da Campanha, além das províncias de Corrientes e Misiones, na Argentina (Figura 11). *Calibrachoa parviflora*, espécie de maior distribuição no gênero, também foi encontrada ao longo de toda a metade sul do Estado e Argentina (Figura 11). *Calibrachoa pygmaea* (espécie típica e restrita às regiões de campos úmidos, borda de brejos e locais alagadiços no sul do Estado, Uruguai e Argentina), e *C. humilis* (restrita aos campos do sudoeste do Rio Grande do Sul, província de Corrientes, na Argentina e norte do Uruguai), também são apresentadas na Figura 11, com os registros de coleta em território brasileiro e argentino. Os dados recolhidos em campo confirmaram os registros de distribuição encontrados na literatura, sumarizados por Stehmann (1999).

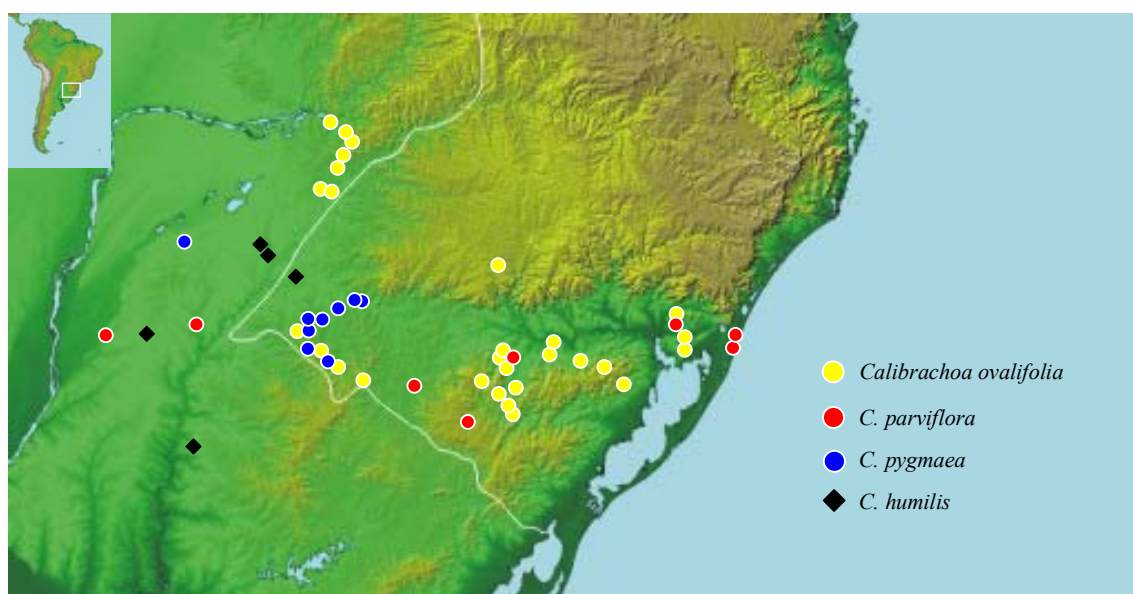


Figura 11. Locais de coleta das espécies *Calibrachoa ovalifolia*, *C. parviflora*, *C. pygmaea* e *C. humilis*

Com relação às demais espécies que ocorrem no Estado, foram obtidas novas informações de distribuição, com a descrição de novos locais de ocorrência, além da descoberta de uma nova espécie para o gênero. *Calibrachoa heterophylla* era reconhecida como endêmica do litoral, ocorrendo em toda a área costeira do Rio Grande do Sul e metade sul de Santa Catarina. É encontrada exclusivamente em substrato arenoso, desde dunas próximas à praia, até campos arenosos em meio à vegetação de restinga. Além da distribuição conhecida, em toda a faixa litorânea (Figura 12), foram encontradas

populações no interior do Estado, nos barrancos arenosos às margens dos rios Ibicuí e Santa Maria, no município de Cacequi, como também às margens de um arroio próximo à estrada que liga os municípios de São Francisco de Assis e Rivadávia Rodrigues (Figura 12). Estes novos registros indicam que a espécie não é endêmica da região da Planície Costeira, ocorrendo também em regiões continentais com substratos similares ao do litoral. E embora algumas análises preliminares de modelagem de nicho ecológico tenham indicado probabilidade de ocorrência nas margens do rio Jacui, a espécie não foi encontrada nesta região. Como as variáveis utilizadas nestas análises são basicamente informações climáticas, os fatores que limitam a ocorrência desta espécie parecem ser o tipo de substrato (arenoso), e o tipo de vegetação (formações pioneiras) encontrados nestes ambientes.

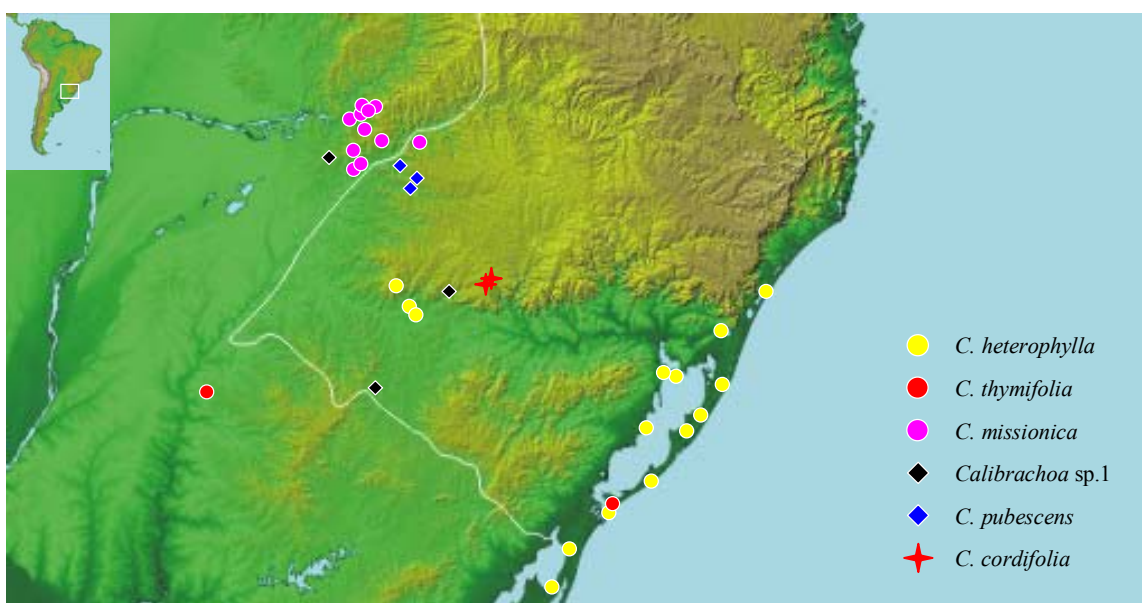


Figura 12. Locais de coleta das espécies *Calibrachoa heterophylla*, *C. thymifolia*, *C. missionica*, *Calibrachoa* sp.1, *C. pubescens* e *C. cordifolia*.

De fato, a distribuição de *C. heterophylla*, quando sobreposta às unidades de vegetação do Rio Grande do Sul (de acordo com Velloso *et al.*, 1991), coincide com as regiões de formação pioneira de influência marinha e fluvial/lacustre no Estado, tanto na faixa litorânea como nos locais coletados do interior, que compreende principalmente as margens arenosas das bacias dos Rios Santa Maria e Cacequi, na porção oeste (Figura 13). Assim, novas investigações devem ser realizadas na região continental para confirmar estas ocorrências e fornecer dados mais completos a respeito da distribuição desta espécie.

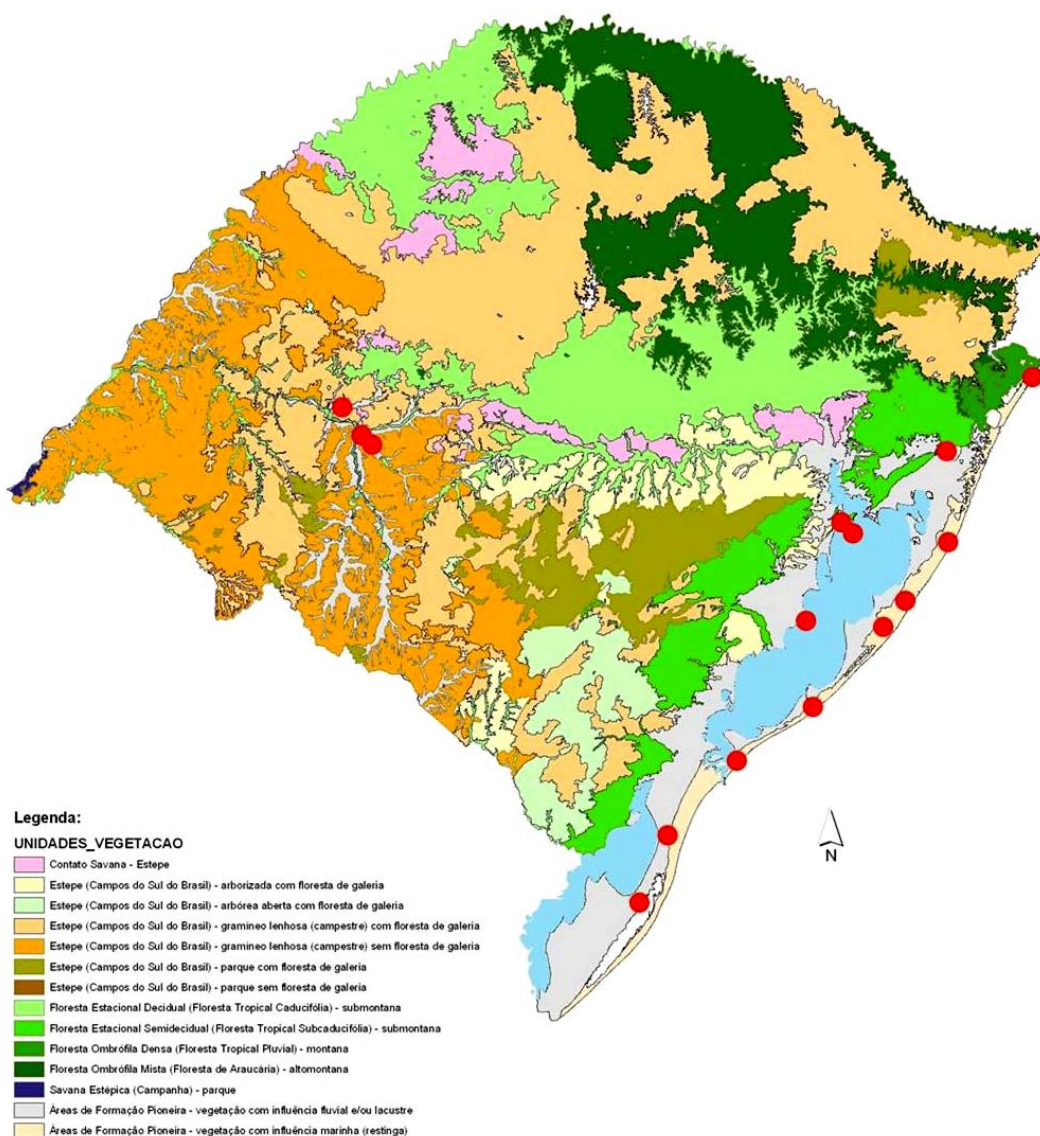


Figura 13. Pontos de coleta de *Calibrachoa heterophylla* no Rio Grande do Sul, coincidindo com as unidades de formação pioneira no Estado. Mapa disponível em <http://www.biodiversidade.rs.gov.br>, baseado na classificação de unidades de vegetação de Velloso *et al.*(1991).

Também na região da Planície Costeira, mais precisamente no município de São José do Norte, foi identificada uma população da espécie *C. thymifolia*, que possui descrições de ocorrência exclusiva no extremo oeste do Estado (região de Uruguiana) bem como nas regiões adjacentes, Departamento de Artigas, no Uruguai, e província de Entre-Ríos, na Argentina. De acordo com o levantamento feito por Stehmann (1999) esta espécie foi descrita por Saint-Hilaire, a partir do material tipo coletado em 1821, em um arroio próximo ao município de Uruguiana, e desde então não foi coletado novamente em

território brasileiro. De acordo com as informações nos materiais de herbário, os locais de ocorrência parecem ser as margens arenosas e praias do Rio Uruguai e seus afluentes, ambientes muito similares àqueles onde algumas populações de *C. heterophylla* foram encontradas, como descrito no parágrafo anterior. *Calibrachoa thymifolia* é muito semelhante vegetativamente à *C. heterophylla*, diferindo principalmente pelo formato do estigma, globoso em *C. thymifolia* e transversalmente lobado em *C. heterophylla*. Outra informação relevante é que somente esta população coletada na planície costeira foi identificada com sendo de *C. thymifolia*, enquanto as outras populações coletadas na mesma época foram identificadas como *C. heterophylla*. Na Figura 12 estão indicados estes locais de coleta, cuja distância entre as populações mais próximas das duas espécies é de cerca de 10 km. Neste caso, os novos registros de ocorrência das duas espécies trouxeram dúvidas a respeito da consistência dos caracteres morfológicos utilizados na delimitação taxonômica entre elas, o que será tratado com mais detalhes em seções posteriores, juntamente com a discussão dos dados moleculares.

Calibrachoa missionica é uma espécie típica da região das Missões (noroeste do Rio Grande do Sul, província de Misiones e parte da província de Corrientes, na Argentina, e o sul do Paraguai) encontrada principalmente em solos rasos junto a afloramentos rochosos. Sua descrição, realizada por Stehmann e Semir (2005), foi baseada no tipo coletado em 1976 no município de Santo Ângelo (RS). Além deste, existe somente mais um registro, datado de 1963, no município de Giruá (RS), que menciona a ocorrência da espécie em território brasileiro. A ausência de outros relatos pode ser resultado da grande alteração que o ambiente natural sofreu pela atividade humana na região, onde são encontradas atualmente extensas áreas de monoculturas. Durante as saídas de campo, toda a região foi visitada e somente uma população foi encontrada no município de Porto Vera Cruz, em afloramentos rochosos associados com Floresta Estacional Decidual, a cerca de 5 km do rio Uruguai, fronteira com a Argentina (Figura 12). Possivelmente existam outras populações em ambientes similares, próximos às margens do Rio Uruguai onde a vegetação natural ainda persiste. Nos países vizinhos a espécie parece ocorrer em maior abundância, de acordo com os registros em herbário, como também pelos dados obtidos em território argentino (Figura 12).

Na mesma região de coleta de *C. missionica* também foram encontradas populações de *C. pubescens*, sendo este o primeiro relato desta espécie no Brasil. Sua recombinação do

gênero *Petunia* para *Calibrachoa* foi realizada há dois anos (Stehmann e Bohs, 2007) com base no tipo coletado no Uruguai em meados de 1920. Foram encontradas três populações distintas, nos municípios de São Luiz Gonzaga, Rolador e Roque Gonzalez (Figura 12).

Além das ocorrências inéditas para as espécies citadas anteriormente, também foram encontradas populações em dois locais do Estado que possuem características distintas o suficiente para a proposição de uma nova espécie no gênero. Estas populações, encontradas em outubro de 2006 nos municípios de São Pedro do Sul e Santana do Livramento, exibem flores com estames de comprimentos bem diferentes, sendo que os mais longos se posicionam na abertura da corola (Figura 4D). Estas são as principais características que levaram ao reconhecimento de uma nova espécie (*Calibrachoa* sp.1). Além dos locais descritos acima, uma amostra coletada em novembro de 2005 pelo Prof. Julián A. Greppi também foi identificada como pertencente a *Calibrachoa* sp.1. Os locais de ocorrência da nova espécie estão indicados na Figura 12.

Com relação às espécies consideradas microendêmicas, *C. cordifolia* (com poucos indivíduos conhecidos somente em uma localidade em Itaara, RS) e *C. eglandulata*, *C. serrulata* e *C. sendtneriana* (com uma ou poucas populações conhecidas nos campos de altitude de Santa Catarina), foram realizadas visitas mais intensas durante os períodos de floração, na tentativa de encontrar novas populações e indivíduos.

Calibrachoa cordifolia foi descrita em 2005, com base em amostras coletadas próximas à barragem Saturnino de Brito, na Reserva Biológica Ibicuí-Mirim, entre os municípios de Santa Maria e Itaara, na região central do estado do Rio Grande do Sul (Stehmann e Semir, 2005). Em outubro de 2006, foram encontrados mais dois indivíduos próximos a esta reserva, em uma área da Brigada Militar e, em dezembro de 2006, outro indivíduo foi encontrado em uma área da 13ª CIA Divisão de Armas e Munição do Exército, cerca de 5 km de distância do ponto anterior. No total, quatro indivíduos foram coletados (Figura 12), sempre em áreas de campo, nesta região de transição entre o Planalto e a Depressão Central, entre a Floresta Estacional Decidual e os campos com Floresta de Galeria.

Nas terras altas de Santa Catarina, a espécie *C. eglandulata*, descrita em 1997 por Stehmann e Semir, está restrita a uma localidade no município de Urubici, com poucos indivíduos crescendo junto à vegetação nas margens da estrada da Serra do Corvo Branco,

em altitudes superiores a 1300 m. Este local está a poucos quilômetros da borda do Planalto, a cerca de 12 km do ponto mais alto da Região Sul do Brasil, o Morro da Igreja (1822 m). Em 2006, uma nova população foi descoberta a cerca de quatro quilômetros deste local, com 12 indivíduos. Ao todo, 46 indivíduos foram coletados desde 2002 nestes dois locais (Figura 14).

Calibrachoa sendtneriana ocorre nos Aparados da Serra de Santa Catarina, associada às matas nebulares e cursos d'água próximos à borda meridional, possuindo poucas descrições de ocorrência em duas regiões: nas serras ao sul do município de Bom Jardim da Serra e no Campo dos Padres, uma área relativamente extensa de campo de altitude localizada no município de Bom Retiro. Até 2006, apenas seis indivíduos tinham sido coletados em três locais próximos à Serra do Rio do Rastro, em Bom Jardim da Serra. Em 2006, a área sul do Campo dos Padres foi visitada, mas não foram encontrados representantes da espécie. Em novembro de 2007, outras regiões foram investigadas, a cerca de 5 km ao norte da Serra do Rio do Rastro, em Bom Jardim da Serra, e novos indivíduos foram encontrados. No total, 55 indivíduos foram coletados desde 2002, em uma área de aproximadamente 20 km² (Figura 14). Entre eles, um indivíduo apresentou uma clara morfologia híbrida entre *C. sendtneriana* e *C. sellowiana*, espécie abundante no Planalto Catarinense. As flores apresentaram coloração, formato e posição de estames intermediários em relação aos encontrados nas duas espécies, sugerindo que possíveis eventos de hibridação possam estar ocorrendo entre elas.

Calibrachoa serrulata é endêmica da Serra do Oratório (SC), denominação antiga de uma pequena região dos Aparados localizada no município de Bom Jardim da Serra. Sua descrição foi realizada com base em materiais coletados em 1958 e desde então não havia sido coletada novamente (Stehmann, 1999). Em 2005, onze indivíduos foram encontrados na borda norte do cânion da Serra do Rio do Rastro, juntamente com indivíduos de *C. sellowiana*. Em 2007, as regiões adjacentes foram percorridas e mais oito indivíduos foram encontrados a cerca de 3 km ao norte do ponto de coleta anterior, em dois locais ao longo dos paredões dos cânions, totalizando 19 indivíduos encontrados (Figura 14). Entre eles, alguns também apresentaram morfologias intermediárias, sugerindo novamente que possíveis eventos de hibridação possam estar ocorrendo entre esta espécie e *C. sellowiana*.

Indivíduos e populações das três espécies encontradas nestas localidades (*C. sellowiana*, *C. sendtneriana* e *C. serrulata*) foram investigados através de análises moleculares, e os resultados obtidos serão discutidos em seções posteriores.

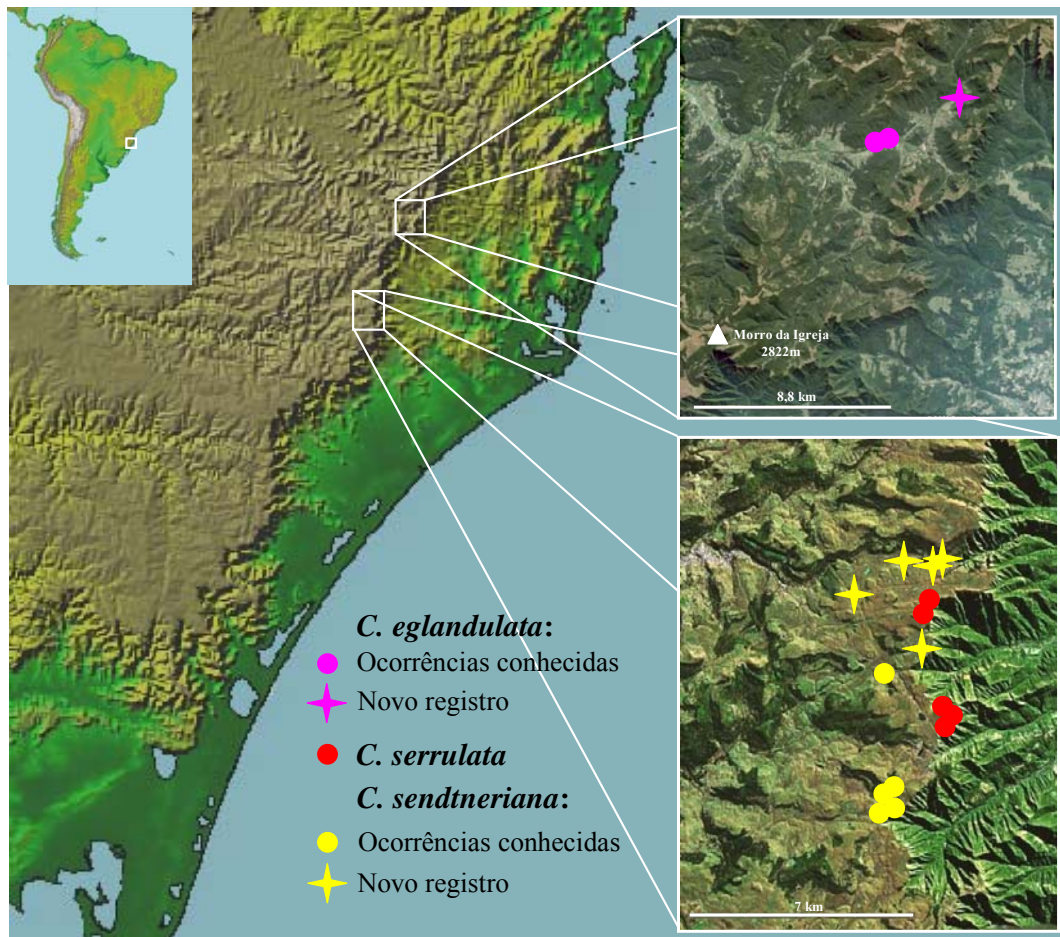


Figura 14. Locais de coleta das espécies *Calibrachoa eglandulata*, *C. serrulata* e *C. sendtneriana*.

Calibrachoa elegans, outra espécie endêmica de altitude encontrada em Minas Gerais, possuía populações conhecidas somente na região do Quadrilátero Ferrífero, em municípios da grande Belo Horizonte, incluindo a Capital, além de Brumadinho, Itabira, Itabirito, Moeda, Nova Lima e Ouro Branco (Stehmann, 1999). Porém, em 2006, uma população foi localizada pelo Prof. João Renato Stehmann em uma área disjunta, no município de Santana do Garambéu, cerca de 160 km ao sul da área das populações conhecidas (Figura 15). Foram coletados 21 indivíduos neste local, num total de 84 coletados ao longo dos últimos sete anos.

As demais espécies do gênero coletadas em território brasileiro (*C. sellowiana*, presente no Planalto Catarinense, e aquelas que habitam os campos do estado do Paraná, *C. caesia*, *C. dusenii*, *C. ericifolia*, *C. micrantha* e *C. paranensis*) seguiram o padrão de distribuição relatado na literatura (Stehmann, 1999). Os pontos de coleta destas espécies estão mostrados na Figura 15.

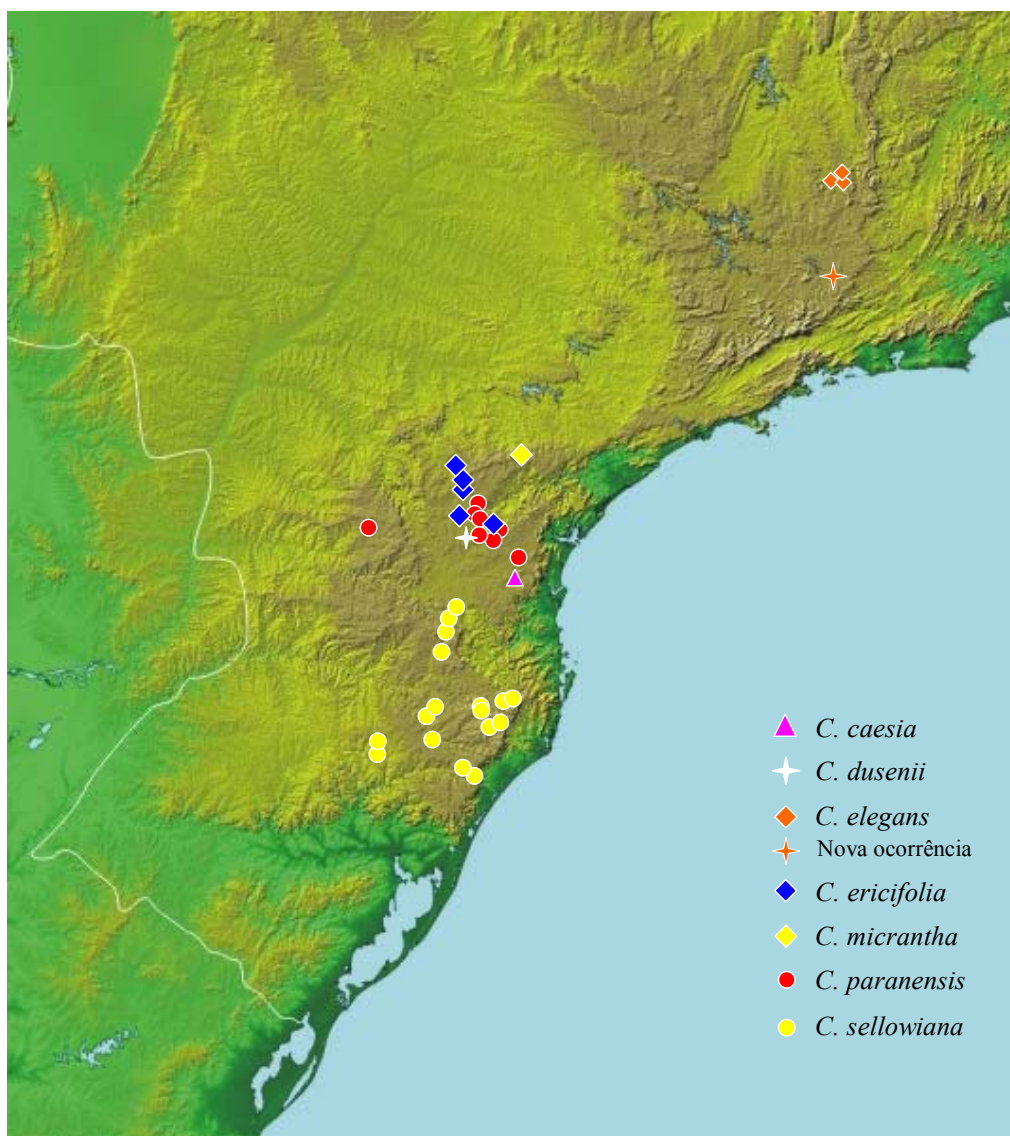


Figura 15. Locais de coleta das espécies *Calibrachoa caesia*, *C. dusenii*, *C. elegans*, *C. ericifolia*, *C. micrantha*, *C. paranensis* e *C. sellowiana*.

4.2. Abordagem filogenética do gênero

Na família Solanaceae, os estudos filogenéticos em níveis supragenéricos são abundantes, e o relacionamento entre subfamílias e gêneros é bem estabelecido, desde os trabalhos de Olmstead *et al.* (1999) até trabalhos recentes, como de Olmstead *et al.* (2008). Os estudos filogenéticos dos gêneros na família Solanaceae, embora abundantes quando comparados a outras famílias de angiospermas, concentram-se nos grupos com maior interesse econômico, como os gêneros *Nicotiana* (Clarkson *et al.*, 2004), *Solanum* (Spooner *et al.*, 1993; Bohs, 2004; Weese e Bohs, 2007) e *Capsicum* (Walsh e Hoot, 2001). Em estudo recente, Tate *et al.* (2009) publicaram uma filogenia de *Nierembergia*, gênero próximo à *Calibrachoa*, utilizando sequências de ITS e do íntron plastidial *rpl16*. O gênero *Petunia* também foi investigado através de dados de sequências por Kulcheski *et al.* (2006) e Chen *et al.* (2007). Em *Calibrachoa*, o único trabalho de filogenia utilizando dados moleculares foi de Ando *et al.* (2005), através de RFLP do DNA plastidial.

O presente trabalho é o primeiro a utilizar dados de sequência de DNA em abordagens filogenéticas no gênero. A investigação do cpDNA não-codificador através de sequenciamento, quando comparada com resultados de RFLP, fornece uma imagem mais completa dos polimorfismos presentes nos segmentos de DNA, pois mostra todas as diferenças nucleotídicas observadas (Böhle *et al.*, 1994).

Os marcadores utilizados nas reconstruções filogenéticas resultaram em alinhamentos com 2787 e 2788 pares de bases (para os conjuntos 1 e 2, respectivamente). A diferença observada se deve à adição, ao conjunto 2, da amostra de *Calibrachoa ericifolia* de Ponta Grossa-PR (Tabela 5), que possui uma inserção exclusiva de uma guanina na posição 205 do espaçador *trnS-trnG*. As árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de reconstrução empregados (*neighbor-joining*, máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana), para os dois conjuntos de dados, são mostradas nas Figuras 16 a 23.

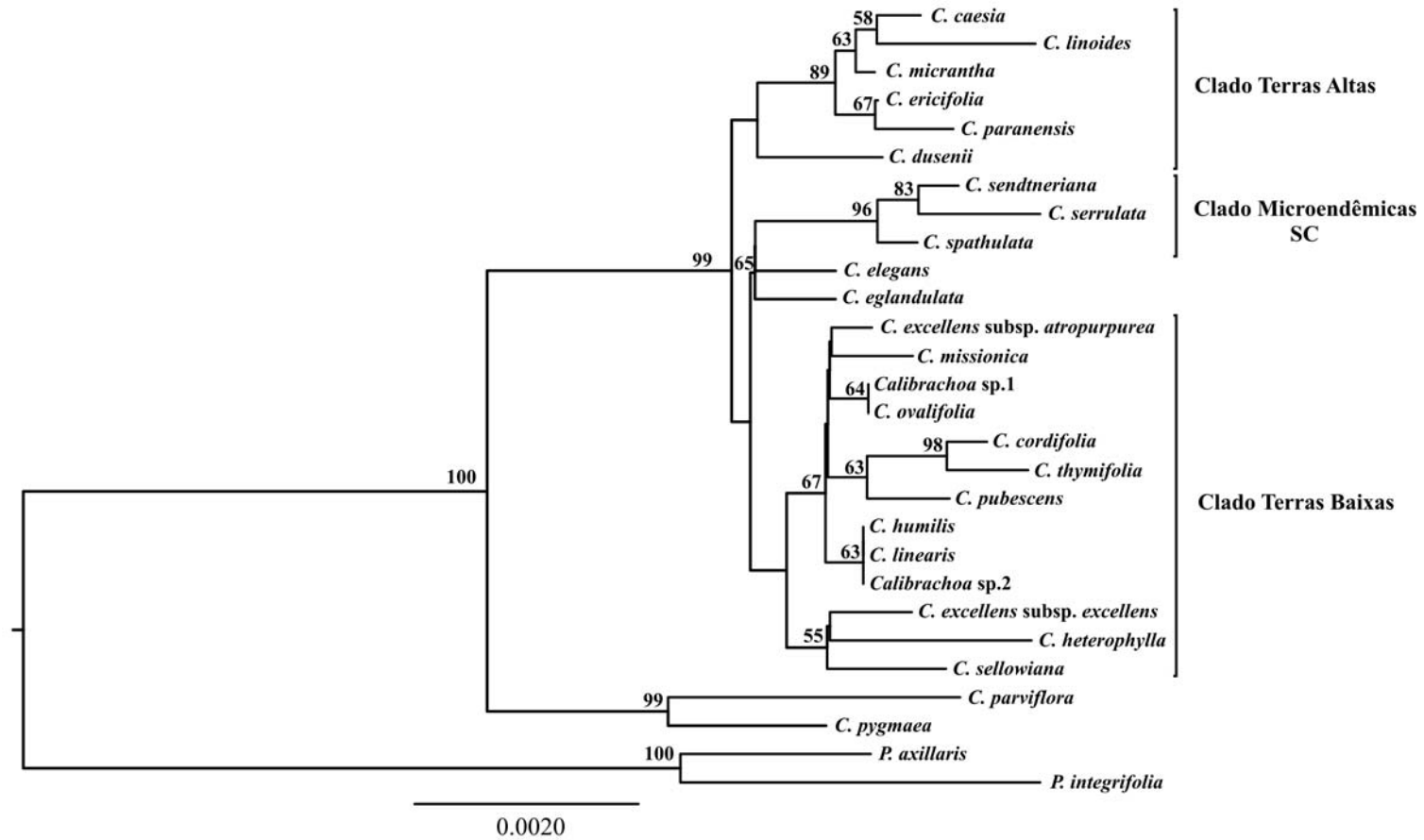


Figura 16. Árvore obtida através do método de *neighbor-joining* com o conjunto de dados 1. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 replicações) relativos ao agrupamento em questão. O valor apresentado na escala representa o número de mutações/sítio.



Figura 17. Árvore obtida através do método de máxima parcimônia com o conjunto de dados 1. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 replicações) relativos aos agrupamentos em questão. O valor apresentado na escala representa o número de mutações.

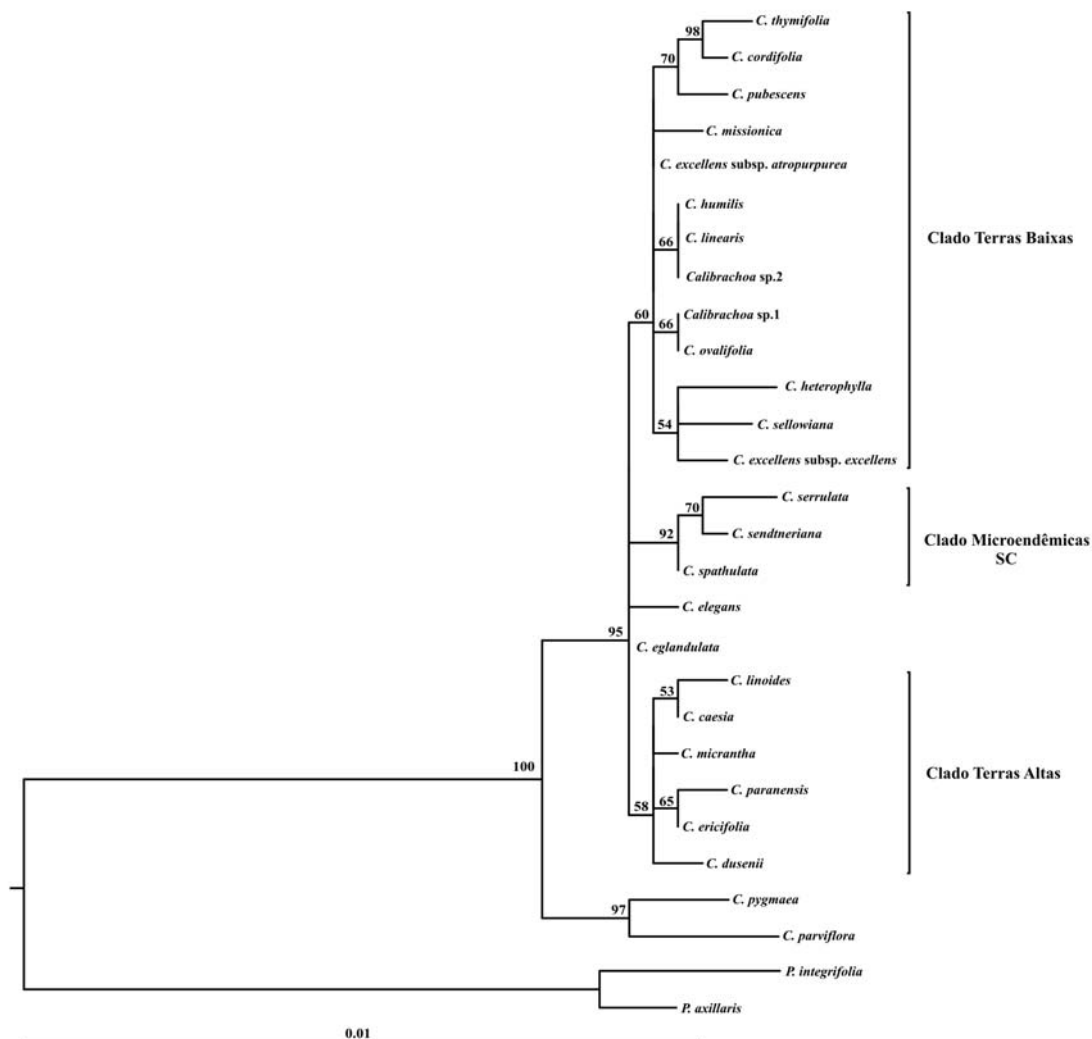


Figura 18. Árvore obtida através do método de máxima verossimilhança com o conjunto de dados 1. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 replicações) relativos aos agrupamentos em questão. O valor apresentado na escala representa o número de substituições/sítio.

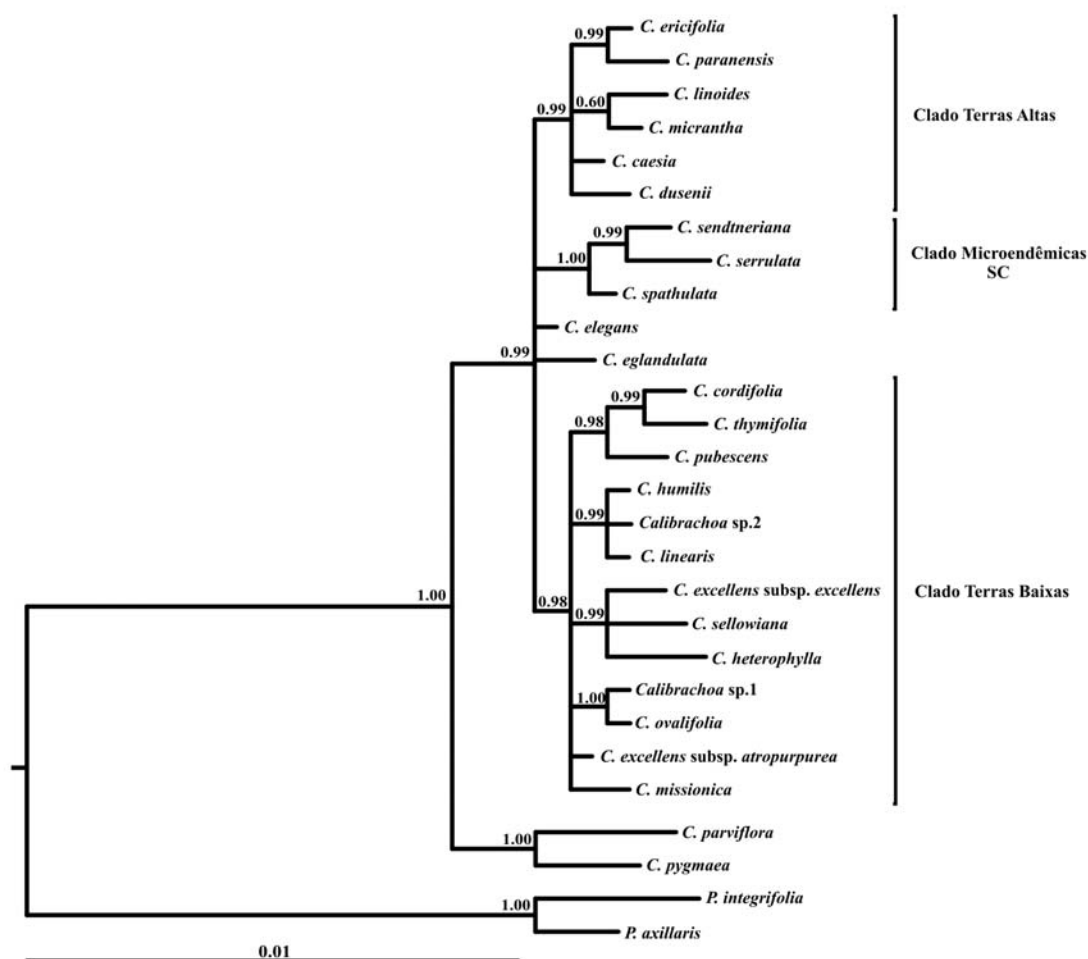


Figura 19. Árvore obtida através do método de análise bayesiana com o conjunto de dados 1. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de probabilidade posterior relativos aos agrupamentos em questão. O valor apresentado na escala representa o número de substituições/sítio.

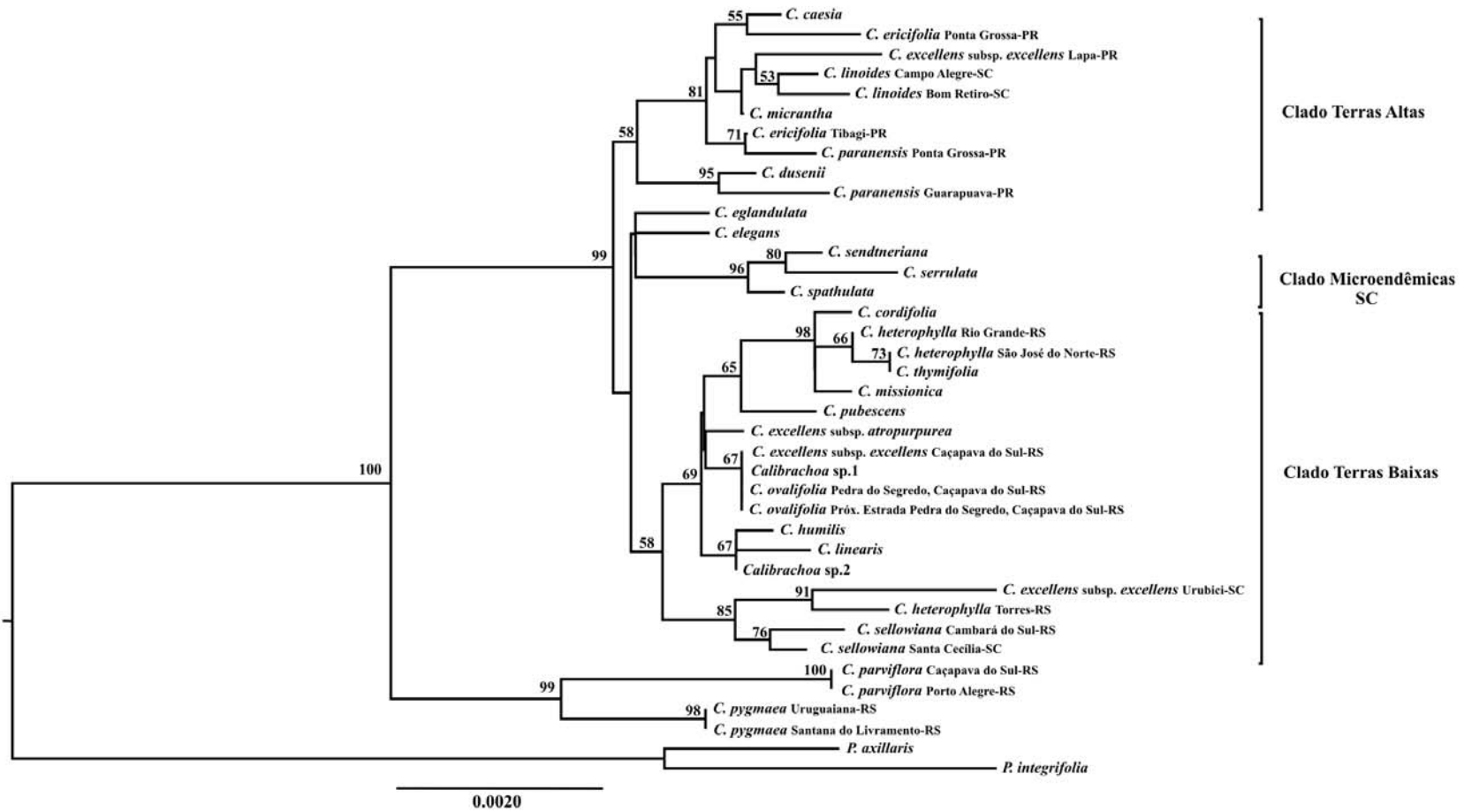


Figura 20. Árvore obtida através do método de *neighbor-joining* com o conjunto de dados 2. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 replicações) relativos aos agrupamentos em questão. O valor apresentado na escala representa o número de mutações/sítio.

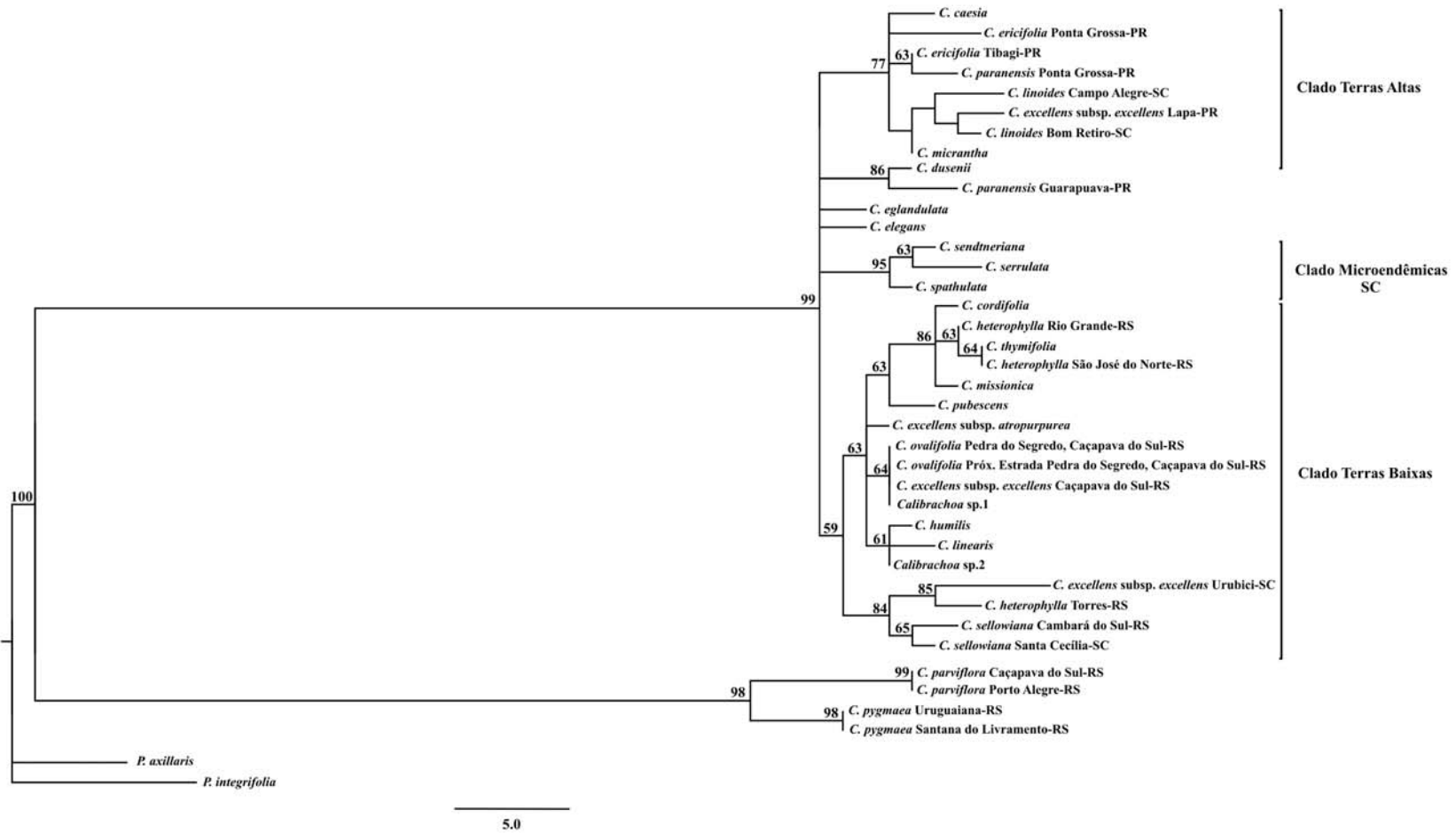


Figura 21. Árvore obtida através do método de máxima parcimônia com o conjunto de dados 2. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 replicações) relativos aos agrupamentos em questão. O valor apresentado na escala representa o número de mutações.

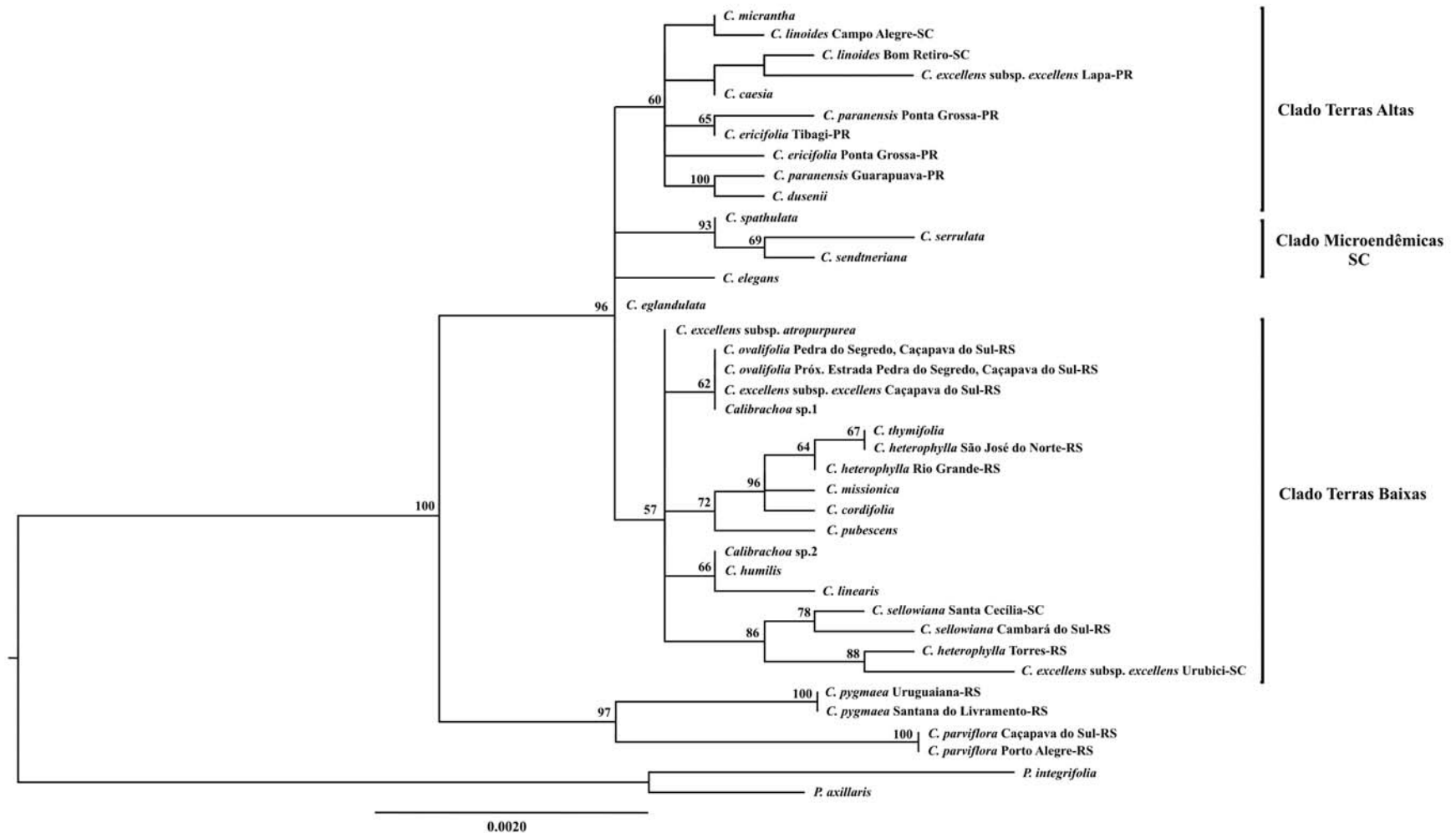


Figura 22. Árvore obtida através do método de máxima verossimilhança com o conjunto de dados 2. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 replicações) relativos aos agrupamentos em questão. O valor apresentado na escala representa o número de substituições por sítio.

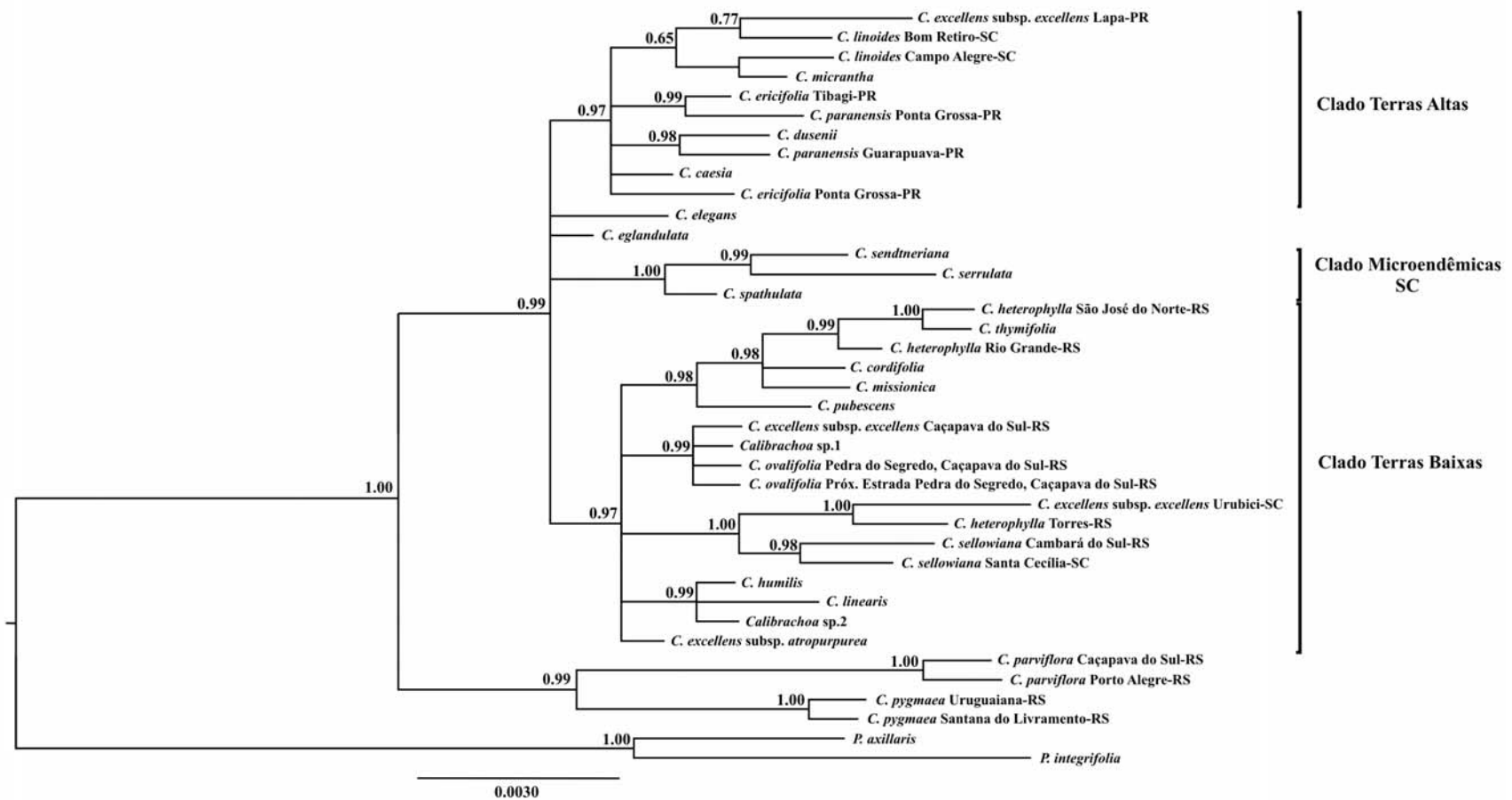


Figura 23. Árvore obtida através do método de análise bayesiana com o conjunto de dados 2. Os números localizados nos ramos ao lado esquerdo dos nós representam os valores de probabilidade posterior relativos aos agrupamentos em questão. O valor apresentado na escala representa o número de substituições/sítio.

Os resultados obtidos com todos os métodos e com os dois conjuntos de dados mostram uma clara divisão do gênero em dois clados com valores de suporte máximos (*bootstrap*=100 e probabilidade posterior=1, Figuras 16 a 23): um clado contendo as espécies *C. parviflora* e *C. pygmaea*, e o outro clado com o restante das espécies de *Calibrachoa*. Esta heterogeneidade também é revelada por outras características, inclusive morfológicas, que levantam dúvidas a respeito da inclusão de pelo menos uma destas espécies no gênero, como visto na seção 1.1.3. Esta questão taxonômica será abordada em detalhes posteriormente.

Com respeito às espécies restantes, observa-se uma relação geral entre clados e regiões geográficas, além de agrupamentos correspondentes a algumas espécies endêmicas de altitude (indicados nas Figuras 16 a 23). Esta relação geral também pode ser visualizada na Figura 24. A primeira região, denominada Terras Altas, abrange os Planaltos de Curitiba e Ponta Grossa, no Paraná, e também o Planalto Catarinense. No Paraná, são encontradas as espécies *C. caesia*, *C. dusenii*, *C. ericifolia*, *C. micrantha* e *C. paranensis*. *Calibrachoa excellens* subsp. *excellens* está presente tanto em terras baixas quanto em terras altas, e *C. linooides* ocorre desde o Paraná em direção sul até o Planalto Catarinense. Como pode ser visto na Figura 17, *C. dusenii* não fica agrupada com as demais espécies na árvore gerada por máxima parcimônia para o conjunto de dados 1, porém se agrupa nas demais filogenias baseadas no mesmo conjunto (Figuras 16, 18 e 19, com valores de *bootstrap* baixos na Figura 18 e na Figura 16, onde o valor foi inferior a 50 e não foi mostrado). Com o conjunto de dados 2, a árvore gerada por máxima parcimônia também não inclui *C. dusenii* no clado em questão, mas mostra esta espécie agrupada com a amostra de *C. paranensis* de Guarapuava-PR (Figura 21). Estas duas amostras mostram-se altamente relacionadas em todas as árvores geradas com o conjunto 2, e estão inseridas no clado Terras Altas nas demais árvores (Figuras 20, 22 e 23). Porém, observa-se que há uma perda de confiabilidade (valores de *bootstrap* nas metodologias que empregam este teste) no clado formado com todas as espécies de Terras Altas.

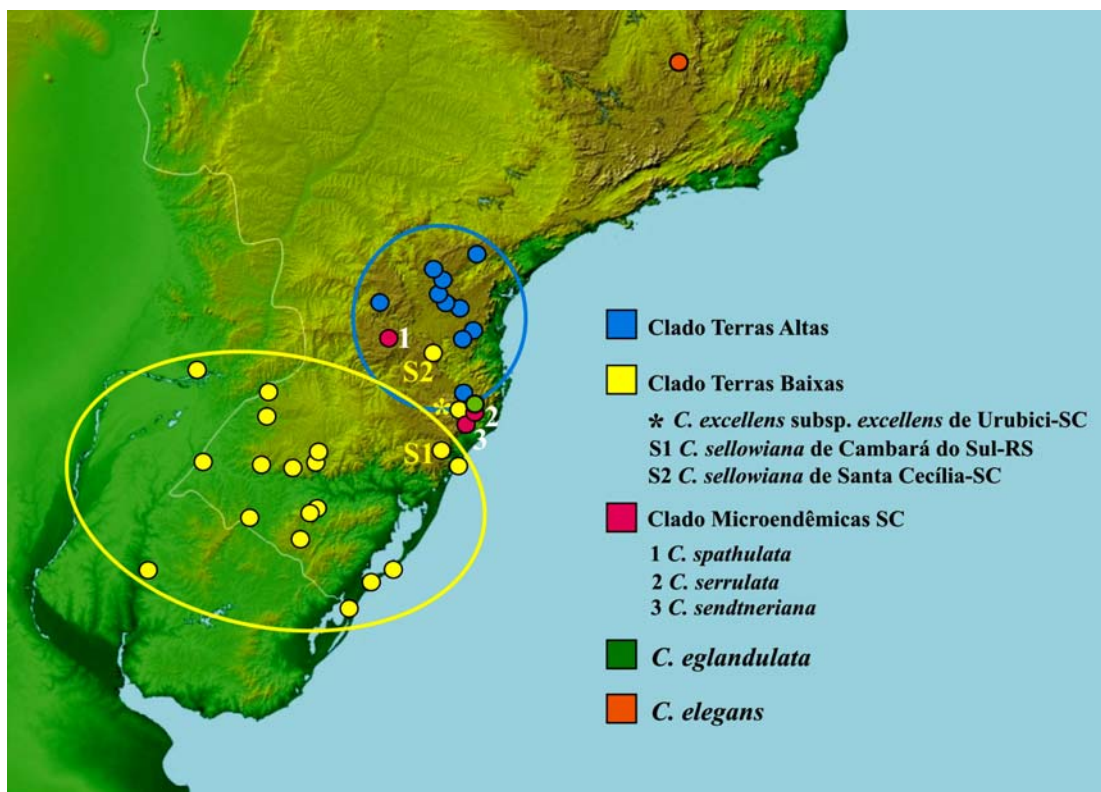


Figura 24. Localização das amostras utilizadas nas análises filogenéticas e sua relação com os clados observados nas filogenias. Os pontos são relativos às amostras do conjunto de dados 2. No Clado Terras Baixas, as amostras que não seguiram o padrão geral de associação entre clados e regiões estão assinaladas (amostra de *C. excellens* subsp. *excellens* de Urubici-SC, com um asterisco, e as amostras de *C. sellowiana*, assinaladas como S1 e S2). As espécies *C. spathulata*, *C. serrulata* e *C. sendtneriana*, presentes no clado denominado Microendêmicas SC, estão assinaladas com os número 1, 2 e 3, respectivamente. Os locais amostrados de *Calibrachoa eglandulata* e *C. elegans*, que não se mostraram relacionados com os demais grupos e nem entre si, estão assinalados em verde e laranja, respectivamente.

A segunda região, denominada Terras Baixas, refere-se às áreas do estado do Rio Grande do Sul de baixa altitude (excluindo a metade norte do Estado, limite sul do Planalto da Serra Geral) além de parte do Uruguai, Argentina e Paraguai (Figura 24). Nestas áreas são encontradas as espécies *C. cordifolia*, *C. excellens* subsp. *atropurpurea*, *C. excellens* subsp. *excellens*, *C. heterophylla*, *C. humilis*, *C. linearis*, *C. missionica*, *C. ovalifolia*, *C. pubescens*, *Calibrachoa* sp.1, *Calibrachoa* sp.2 e *C. thymifolia*.

Duas espécies não se enquadram nesta relação entre os clados e regiões citadas. No primeiro caso está *C. sellowiana*, que se encontra no clado Terras Baixas, mas se distribui em altitudes acima de 700 m, a partir do nordeste do Rio Grande do Sul, ocupando todo o Planalto, até o sul do Paraná (amostras assinaladas na Figura 24). No segundo caso está *C. excellens*, que possui ampla distribuição (encontrada tanto em terras baixas como terras

altas) e também não segue o padrão geral de associação entre clados e regiões. Como pode ser visto em todas as filogenias, em especial com o conjunto 2 (Figuras 20 a 23), a amostra de *C. excellens*, proveniente de Urubici-SC (assinalada com um asterisco na Figura 24), está presente no clado Terras Baixas, formando um pequeno clado com *C. heterophylla* de Torres-RS e com as amostras de *C. sellowiana*. Esta proximidade genética e a localização da amostra de *C. heterophylla* são evidências de uma possível dispersão de algumas populações ancestrais de Terras Baixas (localizadas nas proximidades da Serra) até as regiões de altitude do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, onde são encontradas *C. sellowiana* e populações de *C. excellens*.

Outra inconsistência revelada pelas filogenias com o conjunto 2 também envolve *C. excellens*, cujas amostras aparecem presentes em ambos os clados. Nas filogenias apresentadas nas Figuras 20 a 23, as amostras de *C. excellens* subsp. *atropurpurea* de Bagé-RS e *C. excellens* subsp. *excellens* provenientes de Caçapava do Sul-RS e Urubici-SC se encontram no clado Terras Baixas, e a amostra proveniente de Lapa-PR se encontra no clado Terras Altas. Assim, *C. excellens* se mostra polifilética nas reconstruções apresentadas, ao menos com relação aos dois grandes agrupamentos abordados (clados Terras Baixas e Terras Altas).

Esta suposição, de uma possível polifilia, leva em conta somente os grandes clados formados, pois não se observa uma coesão absoluta entre amostras de uma mesma espécie e clados observados. O critério de monofilia recíproca, empregado para delimitar espécies em uma árvore com dados moleculares, parece não se aplicar neste caso. Poucas amostras de espécies mostram-se monofiléticas, como *C. sellowiana*, *C. parviflora* e *C. pygmaea* (Figuras 20 a 23). Estes resultados novamente sugerem uma divergência morfológica recente no grupo. Espécies de divergência recente tendem a não ser definidas dentro do critério de monofilia recíproca, pois os polimorfismos ancestrais não foram totalmente eliminados, e não refletem a associação de espécies em uma árvore de dados moleculares. Resultados preliminares a partir de análises probabilísticas indicam que uma delimitação precisa de espécies é possível, mesmo com retenção de polimorfismos ancestrais e discordâncias entre *loci* (Knowles e Carstens, 2007). Estas descobertas indicam que não necessariamente se devem pressupor critérios de exclusividade (como limites genéticos e regras gerais) e assim assumir tais problemas associados à delimitação de espécies, o que pode levar a conclusões equivocadas.

Calibrachoa sendtneriana, *C. serrulata* e *C. spathulata* aparecem agrupadas em clados altamente suportados (valores de *bootstrap* acima de 92 e probabilidade posterior = 1) em todas as filogenias apresentadas. *Calibrachoa sendtneriana* e *C. serrulata* são endêmicas dos campos de altitude de Santa Catarina. *Calibrachoa spathulata* possui populações nos campos das serras do norte de Santa Catarina e sul do Paraná e em afloramentos rochosos no litoral de Santa Catarina (município de Laguna), separadas por uma grande região florestal entre o Planalto e o Litoral Catarinenses. Como discutido por Stehmann (1999), esta disjunção pode ser resultado de dispersão acidental (por aves ou pelo homem, já que naturalmente as sementes são liberadas diretamente no solo) ou de convergência morfológica a partir de linhagens independentes. Nesta análise não foram amostradas as populações litorâneas e a resposta a esta questão ainda não poderá ser esclarecida. Entretanto, a proximidade genética entre as populações amostradas da serra e as espécies microendêmicas é evidente. Este clado seria, portanto, composto por espécies de altitude de Santa Catarina (designado como Microendêmicas de SC nas Figuras 16 a 24).

Nas árvores geradas pelo método de *neighbor-joining* (Figuras 16 e 20), o clado formado por *C. sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* (além de *C. eglandulata* e *C. elegans*) está inserido no clado Terras Baixas, mas os valores de suporte são muito baixos e possivelmente não refletem algum tipo de proximidade com as espécies em questão. Estes agrupamentos não são observados nas demais árvores. Provavelmente isso se deve à premissa do próprio método de reconstrução empregado, que agrupa as OTUs passo a passo até a resolução final da árvore (Felsenstein, 2004). *Calibrachoa elegans* e *C. eglandulata* não estão inseridas em clados com outras espécies do gênero nas árvores geradas pelos outros métodos. Estas espécies também ocorrem em extremos de altitude, na borda oriental do Planalto Catarinense (*C. eglandulata*) e nos campos rupestres hematíticos em Minas Gerais (*C. elegans*).

Desta forma, podemos constatar, com base nas filogenias geradas, que no clado das demais espécies de *Calibrachoa* (excetuando-se *C. parviflora* e *C. pygmaea*) são encontrados cinco grupos evolutivamente aparentados, correspondentes aos clados denominados Terras Altas e Terras Baixas, o clado formado por *C. sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* (denominado “Microendêmicas SC” nas Figuras 16 a 24), além de *C. eglandulata* e *C. elegans*, que não se mostraram relacionadas com os demais grupos

e nem entre si (pois saem diretamente da raiz, dentro do clado das demais espécies de *Calibrachoa*).

Na Figura 25 é apresentada a filogenia obtida por Ando *et al.* (2005), cuja topologia também indica a divisão do gênero em dois clados, separando *C. parviflora* e *C. pygmaea* do restante, além de uma associação de alguns clados a duas regiões geográficas, denominadas Pampa Oriental (*Eastern Pampa*) e Terras Altas do Paraná (*High altitude Paraná*).

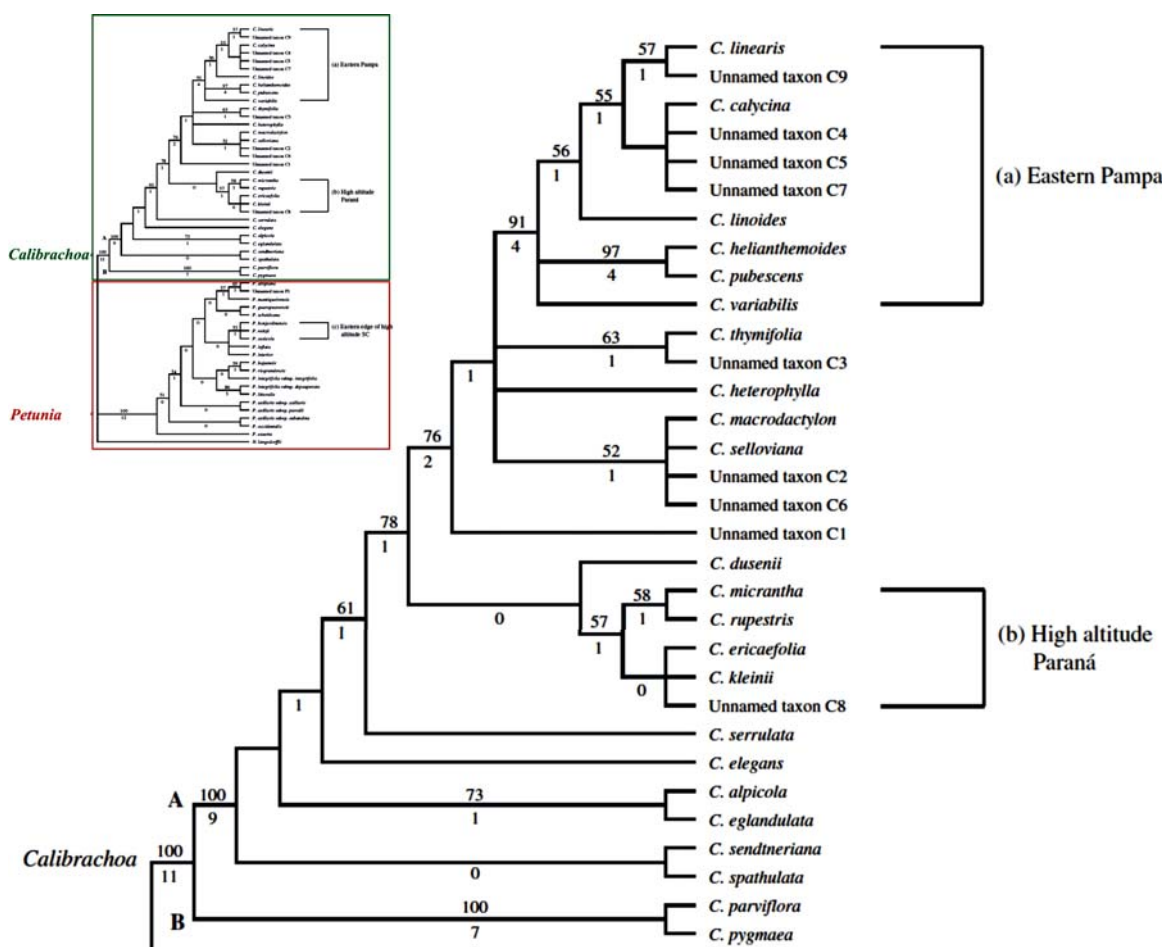


Figura 25. Árvore de consenso da maioria, a partir de 3420 árvores mais parcimoniosas obtidas com dados de RFLP de cloroplasto. O estudo foi realizado com os dois gêneros (*Petunia* e *Calibrachoa*, detalhe no canto superior esquerdo), mas somente o clado de *Calibrachoa* é mostrado. Retirado de Ando *et al.*, 2005.

A árvore apresentada é o consenso da maioria (*50% majority consensus tree*) de 3420 árvores mais parcimoniosas, construídas a partir de uma matriz de presença e ausência de sítios de restrição e tamanho de fragmentos gerados por RFLP do cloroplasto.

Não há certeza sobre a homologia entre as bandas comparadas e, assim, a árvore representa as similaridades gerais entre as espécies e não necessariamente as relações filogenéticas baseadas em homologia de caracteres.

A classificação taxonômica utilizada por estes autores (que consideraram 32 unidades taxonômicas do gênero *Calibrachoa* na análise) não é a mesma que foi utilizada no presente trabalho, onde a taxonomia adotada foi baseada na revisão de Stehmann (1999) (ver seção 1.1.2 e Tabela 1). Além disso, muitos *taxa* considerados por Ando *et al.* (2005) não possuem identificação (somente indicação do local de origem, em geral o Estado brasileiro onde foi realizada a coleta), e os critérios utilizados para assumir tal classificação não foram explicitados pelos autores, não fornecendo subsídio para uma discussão comparativa. Mesmo assim, os relacionamentos observados mostram alguma semelhança aos encontrados no presente trabalho, e a relação entre os clados e as regiões geográficas apresenta certa coincidência.

O clado Pampa Oriental apresentado por Ando *et al.* (2005), que representa uma parte das espécies inseridas no clado Terras Baixas definido no presente estudo, engloba as espécies de ocorrência a partir da metade central do Rio Grande do Sul, em direção a oeste. Porém, uma incoerência pode ser observada quanto à espécie *C. linoides*, presente no clado Pampa Oriental, que é encontrada no Planalto Catarinense. Nossas análises indicaram a inclusão de *C. linoides* no clado Terras Altas, corroborando a posição desta espécie com sua localização geográfica.

Calibrachoa thymifolia e *C. heterophylla*, que também ocorrem no Rio Grande do Sul, além de *C. sellowiana* (que de acordo com nossas análises, também pertence ao clado Terras Baixas) não foram inseridas no clado Pampa Oriental por falta de suporte na árvore apresentada pelos referidos autores. Este resultado é coincidente em parte com os resultados aqui apresentados, onde *C. heterophylla* e *C. sellowiana* (além de *C. excellens* subsp. *excellens*) mostram-se mais próximas, em um clado divergente das demais espécies de terras baixas (Figuras 16 a 19). Nas filogenias com o conjunto 2, como discutido acima, as amostras de *C. heterophylla* de Torres, *C. excellens* subsp. *excellens* de Urubici e *C. sellowiana* formam um clado dentro do grupo das espécies de terras baixas (Figuras 20 a 23). Já *C. thymifolia* está incluída no clado Terras Baixas, relacionada à *C. cordifolia* nas

árvores geradas com o conjunto 1 (Figuras 16 a 19), e à amostra de *C. heterophylla* de São José do Norte – RS, nas árvores baseadas no conjunto de dados 2 (Figuras 20 a 23).

No clado High Altitude Paraná, *C. dusenii* não foi considerada pelos autores por falta de suporte no agrupamento. Novamente, como discutido acima, as árvores de máxima parcimônia das Figuras 17 e 21 também não mostram esta espécie no clado em questão, mas nas outras topologias ela está incluída no clado Terras Altas.

Outro resultado semelhante, não discutido pelos autores, é a falta de relacionamento de *C. elegans*, *C. eglandulata*, *C. sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* com os grandes clados encontrados, e sua relação com os locais de ocorrência, já que todas estas espécies (com exceção das populações disjuntas de *C. spathulata*, discutido anteriormente) ocorrem em regiões de altitude em Santa Catarina e em Minas Gerais.

Adotando a classificação considerada por Ando *et al.* (2005), as entidades *C. calycina* e *C. helianthemoides* (consideradas variações morfológicas de *C. ovalifolia* por Stehmann, 1999) e *C. variabilis* (sinônimo de *C. excellens*) estão no clado Pampa Oriental, coincidindo com os resultados aqui apresentados. O mesmo ocorre com *C. rupestris* (sinônimo de *C. paranensis*) e *C. kleinii* (sinônimo de *C. caesia*) ambas encontradas nos clados correspondentes à região de altitude do Paraná.

Por outro lado, duas espécies (*C. macrodactylon* e *C. alpicola*) não possuem correspondência geográfica com seus sinônimos adotados no presente trabalho. A primeira é considerada sinônimo de *C. linooides* por Stehmann (1999), ocorre no Planalto Catarinense, mas de acordo com sua posição na árvore apresentada por Ando *et al.* (2005), ela não tem relação genética com outras espécies desta região. *Calibrachoa alpicola*, considerada sinônimo de *C. sellowiana*, possui um relacionamento próximo a *C. eglandulata* na árvore apresentada pelos autores. De acordo com nossos resultados, *C. sellowiana* e *C. eglandulata* não possuem relacionamento filogenético próximo, localizando-se em posições distintas nas filogenias. Smith e Downs (1966), que descreveram *C. alpicola*, relatam sua ocorrência como endêmica da região de maior altitude do Planalto Sul-brasileiro, em altitudes de cerca de 1800 m, no município de Bom Retiro, em Santa Catarina. A amostra de *C. alpicola* utilizada por Ando *et al.*, (2005) foi coletada nesta região, no município de Urubici, vizinho de Bom Retiro. Coincidentemente, *C. eglandulata* também ocorre na região de maior altitude do Planalto, em Urubici. Já *C.*

sellowiana possui uma distribuição ampla, com populações numerosas em toda a região de altitude. A proximidade genética destes *taxa* mostrada pelos autores (Figura 25), combinada com os locais de ocorrência descritos para *C. alpicola*, podem levantar dúvidas quanto à validade da sinonimização proposta por Stehmann (1999), sugerindo que ela possa ser uma espécie-irmã de *C. eglandulata*, que possui distribuições muito restritas em extremos de altitude próximos geograficamente. Estas hipóteses precisam ser testadas com uma avaliação mais detalhada, e a inclusão de um maior número de exemplares de cada uma destas espécies, inclusive com os materiais revisados e sinonimizados por Stehmann (1999).

4.2.1. Variação e Utilidade Filogenética dos Marcadores Utilizados

As informações sobre os marcadores utilizados nos conjuntos de dados, bem como a natureza da variação encontrada estão disponíveis nas Tabelas 8 e 9. A proporção de sítios informativos de cada marcador nos diferentes conjuntos de dados pode ser visualizada na Figura 26.

Tabela 8. Informações sobre os marcadores utilizados nas reconstruções filogenéticas relativas ao conjunto de dados 1.

Marcador	Variação de Comprimento (bp)	Conteúdo GC Médio (%)	Número de sítios variáveis	Porcentagem de sítios variáveis	Número de sítios parcimoniosamente informativos	Porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos	Substituições		Inserções/Deleções	
							Eventos únicos	Parc. informativos	Eventos únicos	Parc. Informativos
<i>psbB-psbH</i>	745-751	35,8	6	0,80	1	0,13	3	0	2	1
Intron <i>trnL</i>	477-481	34,6	6	1,25	2	0,41	4	1	0	1
<i>trnL-trnF</i>	356-360	35,2	7	1,94	2	0,55	3	2	2	0
<i>trnS-trnG</i>	738-754	31,0	27	3,58	11	1,46	13	8	3	3
<i>trnH-psbA</i>	417-441	26,5	25	5,67	12	2,72	10	8	3	4
TOTAL	2733-2787	32,7	71	2,54	28	1,00	33	19	10	9

Tabela 9. Informações sobre os marcadores utilizados nas reconstruções filogenéticas relativas ao conjunto de dados 2.

Marcador	Variação de Comprimento (bp)	Conteúdo GC Médio (%)	Número de sítios variáveis	Porcentagem de sítios variáveis	Número de sítios parcimoniosamente informativos	Porcentagem de sítios parcimoniosamente informativos	Substituições		Inserções/Deleções	
							Eventos únicos	Parc. informativos	Eventos únicos	Parc. Informativos
<i>psbB-psbH</i>	745-751	35,8	7	0,93	1	0,13	5	0	1	1
Intron <i>trnL</i>	477-481	34,0	6	1,24	4	0,83	2	3	0	1
<i>trnL-trnF</i>	356-360	35,2	9	2,50	5	1,38	2	5	2	0
<i>trnS-trnG</i>	738-755	31,0	36	4,77	19	2,52	11	15	6	4
<i>trnH-psbA</i>	417-441	26,5	27	6,12	20	4,53	6	13	1	7
TOTAL	2733-2788	32,7	85	3,04	49	1,75	26	36	10	13

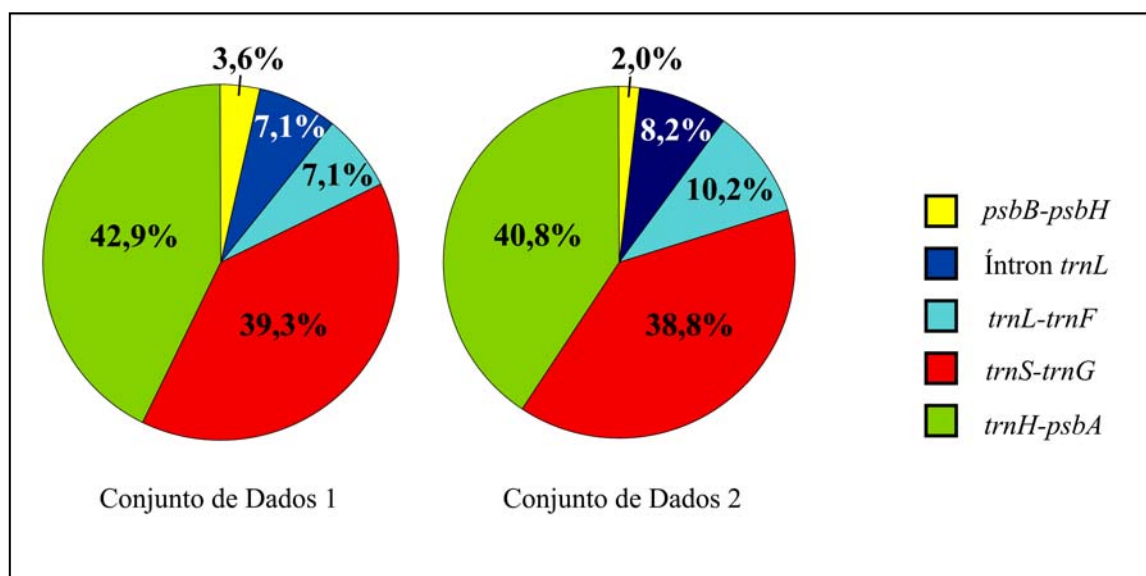


Figura 26: Porcentagem de sítios informativos de cada marcador nos conjuntos de dados utilizados.

Os marcadores mais informativos foram os espaçadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, que somados foram responsáveis por 82,2% e 79,6% da informação utilizada nas análises com os conjuntos de dados 1 e 2, respectivamente. O espaçador *psbB-psbH* foi o menos informativo, exibindo uma deleção na posição 269 presente nas espécies *C. parviflora* e *C. pygmaea*.

Estes resultados coincidem com os níveis de variação apresentados por estes marcadores em outros organismos, mesmo quando utilizados em diferentes níveis taxonômicos. O espaçador *trnL-trnF* e o íntron do gene *trnL* tem sido utilizados na grande maioria dos trabalhos para resolver filogenias infragenéricas (Taberlet *et al.*, 1991; Böhle *et al.*, 1994; Clarkson *et al.*, 2004; Ickert-Bond e Wen, 2006). O espaçador *psbB-psbH*, cujos *primers* foram desenhado por Hamilton (1999) e utilizados em nível populacional, mostrou-se menos informativo que outros segmentos como *trnS-trnG*, *trnH-psbA* e *trnT-trnL* (Xu *et al.*, 2000) e foi considerado por Shaw *et al.* (2005) como uma região pouco informativa abaixo do nível específico.

Já os marcadores *trnS-trnG* e *trnH-psbA* estão entre os espaçadores mais variáveis do cloroplasto, sendo amplamente utilizados em estudos populacionais (Olson, 2002; Hamilton *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Kress *et al.*, 2005; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006;

Bettin *et al.*, 2007, Shaw *et al.*, 2007).

A utilização de marcadores muito variáveis em filogenias no nível específico pode ser inadequada em muitos casos, pois pode resultar em homoplasias por eventos múltiplos em um único sítio. A solução mais adequada nestes casos seria aumentar o número de marcadores com taxas evolutivas mais lentas, melhorando assim a resolução e o suporte dos agrupamentos formados (Wortley *et al.*, 2005).

Os espaçadores *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *psbB-psbH* apresentam variação populacional no gênero *Petunia*, e foram utilizados para responder questões neste nível taxonômico (Longo, 2005; Lorenz-Lemke, 2006; Mäder, 2008; Ramos, 2008). Porém, na análise filogenética do gênero, realizada por Kulcheski *et al.* (2006), foram utilizados, além dos marcadores citados acima, outros quatro segmentos, incluindo porções nucleares e mitocondriais (totalizando 4532 pb) e a filogenia resultante apresentou baixos valores de suporte, falta de resolução entre as espécies próximas e ramos de pequenos comprimentos (Figura 27). O mesmo aconteceu quando Chen *et al.* (2007) analisaram as sequências do gene *Hfl* que é considerado um marcador filogenético eficiente na determinação das relações evolutivas entre espécies.

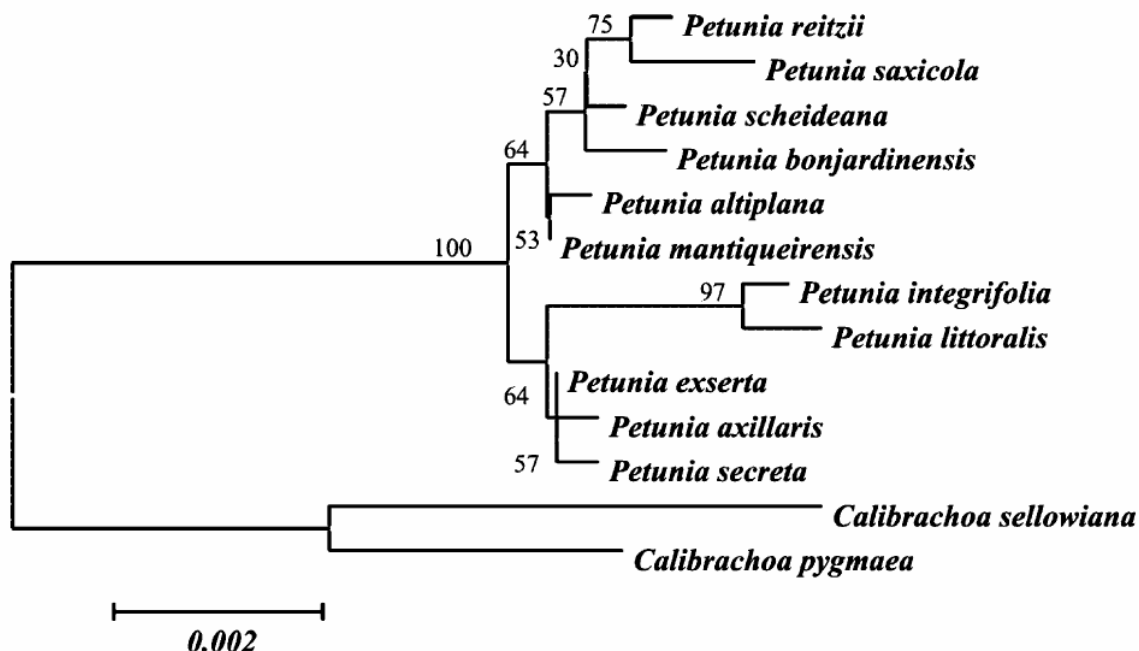


Figura 27. Árvore obtida pelo método de *neighbor-joining* para as espécies do gênero *Petunia*. Foram utilizados dados de sequência do espaçador nuclear ITS, dos espaçadores intergênicos plastidiais *trnL-trnF*, *trnH-psbA*, *psbB-psbH* e *trnS-trnG*, do intron do gene plastidial *trnL*, e do intron do gene mitocondrial *nad1*, totalizando 4532 pares de bases. Os valores de *bootstrap* dos agrupamentos formados são mostrados ao lado de cada nó. Retirado de Kulcheski *et al.*, 2006.

Na filogenia apresentada por Ando *et al.* (2005) também se observam valores baixos de suporte em muitos clados, além da falta de resolução entre espécies próximas, mesmo sendo utilizada uma técnica considerada poderosa em acessar a variabilidade molecular, como o RFLP (Anne, 2006). O mesmo ocorre em *Calibrachoa*, como pode ser visto nas árvores apresentadas. Um número elevado de valores de *bootstrap* inferiores aos valores considerados como o limiar de significância para os clados é encontrado em todas as filogenias discutidas, tanto as apresentadas no presente trabalho, como nas obtidas por Ando *et al.* (2005), Kulcheski *et al.*, (2006) e Chen *et al.* (2007). Hillis e Bull (1993) propuseram um limiar de 70%, enquanto Li (1997) propõe que valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 95% apóiam significativamente um agrupamento. Já os valores de probabilidade posterior referentes às árvores obtidas pelas análises bayesianas se apresentam bem mais altos em comparação aos valores correspondentes de *bootstrap*. Mas como discutido por Suzuki *et al.* (2002), estes valores de confiança geralmente apresentam-se superestimados.

Os marcadores dos genomas nuclear e mitocondrial utilizados por Kulcheski *et al.* (2006) também foram testados neste trabalho, mas não apresentaram variação suficiente em *Calibrachoa*. O íntron b/c do gene mitocondrial *nad1* foi sequenciado para 15 espécies do gênero, e o alinhamento composto de 1068 pares de bases exibiu uma substituição informativa, compartilhada por *C. parviflora* e *C. pygmaea*, espécies que já se mostram fortemente agrupadas com os marcadores plastidiais utilizados nas demais análises. O espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear (ITS) também foi testado em dez espécies, exibindo 25 substituições compartilhadas pelas mesmas espécies descritas acima, em um alinhamento apresentando 595 pares de bases. Assim, a adição destes marcadores não contribuiria para a resolução de espécies mais próximas, e estes dados não foram utilizados no presente trabalho.

Todos estes resultados sugerem que *Petunia* e *Calibrachoa* são gêneros de diversificação muito recente, pois abordagens filogenéticas utilizando marcadores moleculares de evolução rápida não resolvem relações entre espécies próximas.

Quando o conjunto de sequências amostradas nas análises filogenéticas foi aumentado (conjunto 2) observa-se também um aumento considerável de sítios informativos (Tabelas 9 e 10). Este aumento se deve, em parte, a mutações compartilhadas

entre sequências amostradas de uma mesma espécie (que não eram informativas nas análises com o conjunto de dados 1, mas passaram a ser informativas no conjunto 2). Quando uma análise detalhada destes sítios é feita, observa-se que os marcadores utilizados também exibem variação no nível populacional em duas espécies, *C. heterophylla* e *C. excellens*, como pode ser visto na Tabela 10.

Tabela 10. Nível de variação das mutações informativas utilizadas nas reconstruções filogenéticas com o conjunto de dados 2

<i>psbB-psbH</i>																					
Posição no alinhamento	269																				
Tipo de Evento	I																				
Nível de Variação	E																				
Intron <i>trnL</i>																					
Posição no alinhamento	59	208	236	302																	
Tipo de Evento	S	I	S	S																	
Nível de Variação	E	3	E	E																	
<i>trnL-trnF</i>																					
Posição no alinhamento	24	44	269	318	353																
Tipo de Evento	S	S	S	S	S																
Nível de Variação	3	E	1	E	4																
<i>trnS-trnG</i>																					
Posição no alinhamento	47	98	116	138	263	281	302	306	345	396	404	444	467	514	588	598	606	738	756		
Tipo de Evento	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	I	
Nível de Variação	E	E	2	E	3	1	E	1	3	E	E	E	4	E	2	E	E	E	2		
<i>trnH-psbA</i>																					
Posição no alinhamento	4	6	21	26	27	30	40	91	126	129	135	166	190	201	217	222	228	232	306	330	
Tipo de Evento	S	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I
Nível de Variação	E	E	E	E	2	E	E	E	E	2	E	2	2	4	E	E	E	E	2	E	
Tipo de Evento:	S: substituição I: Indel																				
Nível de Variação:	E: Inter-específico																				
	1: Populacional em <i>C. excellens</i>																				
	2: Populacional em <i>C. excellens</i> e inter-específico																				
	3: Populacional em <i>C. heterophylla</i> e inter-específico																				
	4: Populacional em <i>C. excellens</i> , <i>C. heterophylla</i> e inter-específico																				

Embora a maioria da variação ocorra no nível específico (31 sítios informativos de 49 amostrados), 18 sítios variam entre populações das espécies *C. excellens* e *C. heterophylla* (sendo três sítios exclusivos de *C. excellens* e os outros 15 exibindo variação em ambos os níveis taxonômicos, conforme descrito na Tabela 11). Isto sugere que estas espécies não tiveram uma origem tão recente quanto às demais, pois exibem uma diferenciação genética maior. Esta heterogeneidade no gênero traz problemas em uma abordagem filogenética, pois parece ser inviável encontrar marcadores moleculares com variação suficiente em um mesmo nível taxonômico para todas as espécies.

A falta de variabilidade intragenérica é reportada em vários grupos de plantas com diversificação recente. Em um estudo com o gênero *Trollius* (Ranunculaceae), sequências de ITS não mostraram informação no nível intra-genérico, sendo que o DNA de

cloroplasto foi mais informativo, mas as relações entre espécies baseadas no DNA plastidial não mostraram consistência com as seções previamente descritas. A análise de AFLP, neste caso, resolveu as relações complexas entre estas entidades morfológicas (Després *et al.*, 2003). No gênero neotropical *Inga* (Leguminosae – Mimosoideae), as sequências de ITS e do espaçador *trnL-trnF* exibiram um pequeno número de substituições, gerando filogenias mal-resolvidas (Richardson *et al.*, 2001). Zhang *et al.* (2001) estudaram o gênero *Soldanella* (Primulaceae), através da variação obtida em sequências de ITS e por marcadores de AFLP, onde também se observou falta de resolução entre espécies. Porém neste caso, além de uma diversificação recente, as inconsistências observadas também foram resultado de hibridação entre as espécies.

Desta forma optou-se por realizar uma abordagem filogeográfica no gênero *Calibrachoa*, acessando a relação entre espécies através de *networks* de relacionamento entre haplótipos, ao invés de árvores filogenéticas tradicionais. Estes métodos foram desenvolvidos para abordagens intra-específicas, pois como observado por Posada e Crandal (2001), as filogenias tradicionais partem do pressuposto de que as espécies apresentam monofilia recíproca, com conjuntos gênicos isolados, relativos a diferentes espécies que mantiveram o isolamento reprodutivo por um longo período de tempo. No caso de relações intra-específicas (onde se espera um relativo número de mutações recentes) as abordagens filogenéticas vão gerar pouca resolução, além de possíveis relações genealógicas inadequadas.

O gênero *Hordeum* (Poaceae) foi investigado por Jakob e Blattner (2006) através de análises filogenéticas e por *networks* de haplótipos do espaçador plastidial *trnL-trnF*. As filogenias resultaram em árvores pouco resolvidas, com grupos exibindo baixos valores de *bootstrap*. As relações entre os haplótipos, entretanto, forneceram evidências de eventos de especiação distintos, através de subdivisões de grandes populações e dispersões a longas distâncias.

A filogenia apresentada por Jakob e Blattner (2006) mostra, além de baixos valores de suporte, a ocorrência de ramos com comprimento zero, o que também é observado nas filogenias de *Calibrachoa*. Estes ramos podem indicar a persistência de haplótipos ancestrais juntamente com seus descendentes, e também que múltiplas linhagens derivadas evoluíram a partir de um tipo ancestral de cloroplasto (Posada e Crandall, 2001). Os

métodos filogenéticos não representam este tipo de relação multifurcada e a coexistência de ancestrais e seus derivados, enquanto que a abordagem do *network* usada em análises populacionais foram desenvolvidas para lidar com estes fenômenos. *Networks* de haplótipos também foram utilizados por Shaw (1999), na tentativa de definir os limites entre espécies de grilos do gênero *Laupala* (Trigonidiinae, Gryllidae) composto por 37 espécies morfológicamente semelhantes, distinguidas com base nas diferenças entre os cantos dos machos para a atração de fêmeas.

Foram utilizados para este estudo em *Calibrachoa* os espaçadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, que foram os mais variáveis dentre os espaçadores utilizados (Figura 26), em uma amostra mais ampla, principalmente com amostras de várias populações das espécies *C. excellens*, *C. heterophylla* e *C. linoides*, que apresentam uma distribuição geográfica maior em comparação com as espécies restantes.

4.3. Abordagem filogeográfica do gênero

4.3.1. Considerações gerais

Os marcadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG* foram amplificados em 587 amostras, provenientes de indivíduos coletados em 93 locais, abrangendo 25 espécies do gênero. Os dois marcadores agrupados mostraram uma variação de tamanho de 1148 a 1196 pares de bases, com 129 sítios variáveis, sendo 90 substituições (47 informativas e 43 únicas), e 39 eventos de inserção/deleção (15 eventos informativos e 24 eventos únicos), distribuídos em 102 haplótipos. As informações sobre os locais de coleta, e os haplótipos encontrados em cada um deles estão disponíveis na Tabela 1 (em anexo). O *network* de relacionamento dos haplótipos é mostrado na Figura 28. Nesta seção serão discutidos aspectos gerais sobre os resultados obtidos pela abordagem filogeográfica, fornecendo subsídios para as discussões mais detalhadas em seções específicas.

A relação genética dos haplótipos, assim como demonstrado pelas filogenias, permite distinguir grandes grupos correspondentes aos clados discutidos anteriormente. Os haplótipos mais divergentes (H87 e H89, em cinza na Figura 28), foram encontrados em *C. parviflora* e *C. pygmaea*, respectivamente. Além do elevado número de passos que os separa dos demais, eles também se mostram bem distintos entre si, separados por oito mutações e um vetor médio. Este por sua vez, está separado por mais oito mutações (não mostradas na Figura 28) de um vetor médio central, do qual partem mais cinco ramificações, que refletem os grupos discutidos com base nas análises filogenéticas.

O grupo de haplótipos localizado acima deste vetor médio central, composto por todas as sequências relacionadas e encontradas a partir do haplótipo H51, corresponde ao clado Terras Altas (marcados em azul na Figura 28), enquanto que aqueles relacionados a partir do haplótipo H62 correspondem ao clado Terras Baixas (em amarelo na Figura 28). As ramificações menores contêm os haplótipos encontrados nas espécies endêmicas de altitude: o clado Microendêmicas SC, formado por *C. sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* (haplótipos H92 a H100, em rosa na Figura 28), além de ramificações independentes contendo as espécies *C. eglandulata* (haplótipos H4 e H5, em laranja) e *C. elegans* (haplótipos H6 e H7, em verde).

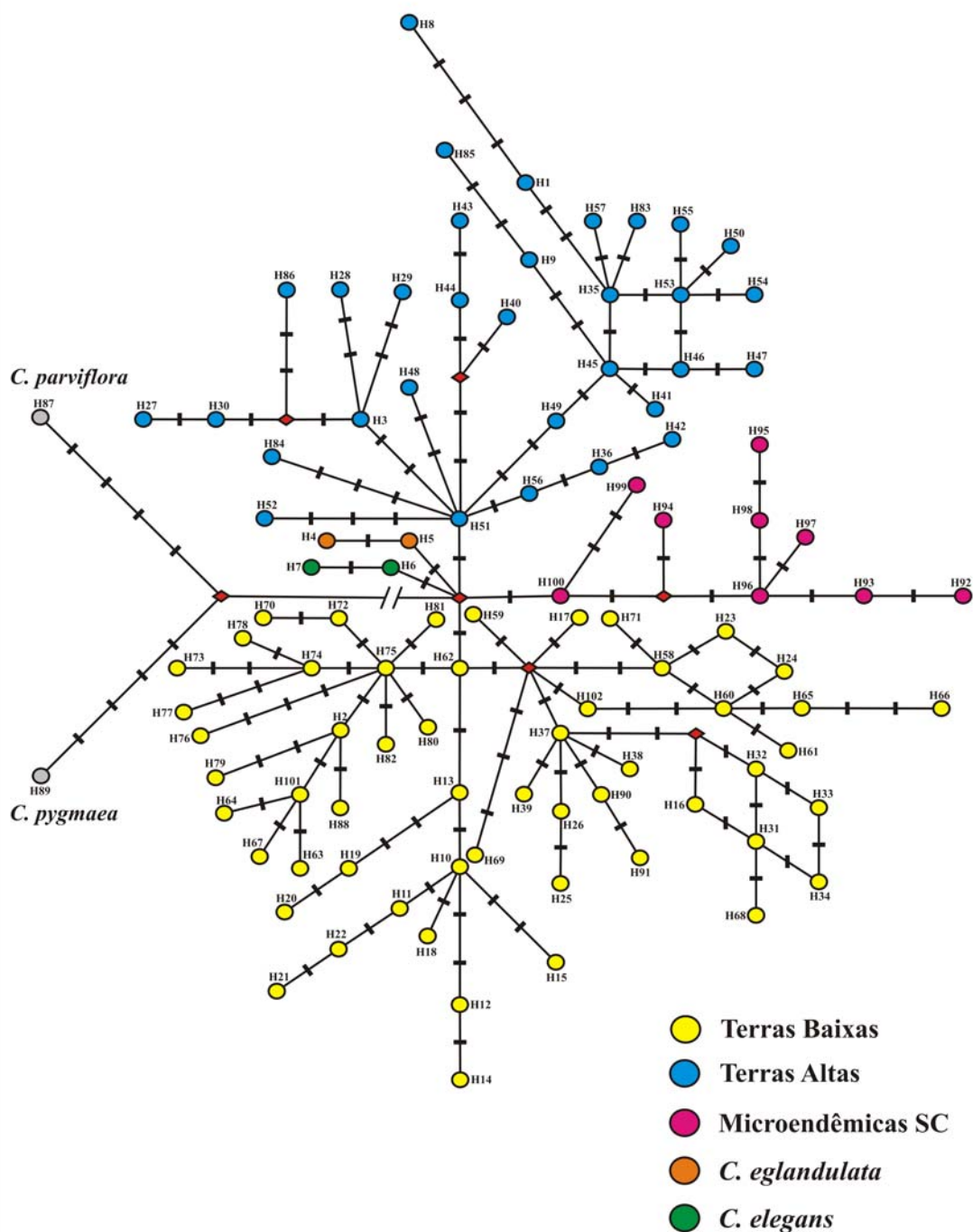


Figura 28. Network de relacionamento entre os 102 haplótipos obtidos a partir de sequências dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG* de 587 amostras em 25 espécies do gênero *Calibrachoa*. As cores dos haplótipos indicam o clado correspondente determinado pelas análises filogenéticas. O número de mutações que distinguem cada haplótipo corresponde ao número de traços entre eles.

Quando se observa a distribuição dos haplótipos referentes aos grupos citados nos respectivos locais onde foram encontrados (Figura 29), a relação geral entre clados e regiões geográficas, discutida no capítulo anterior, ainda se sustenta.

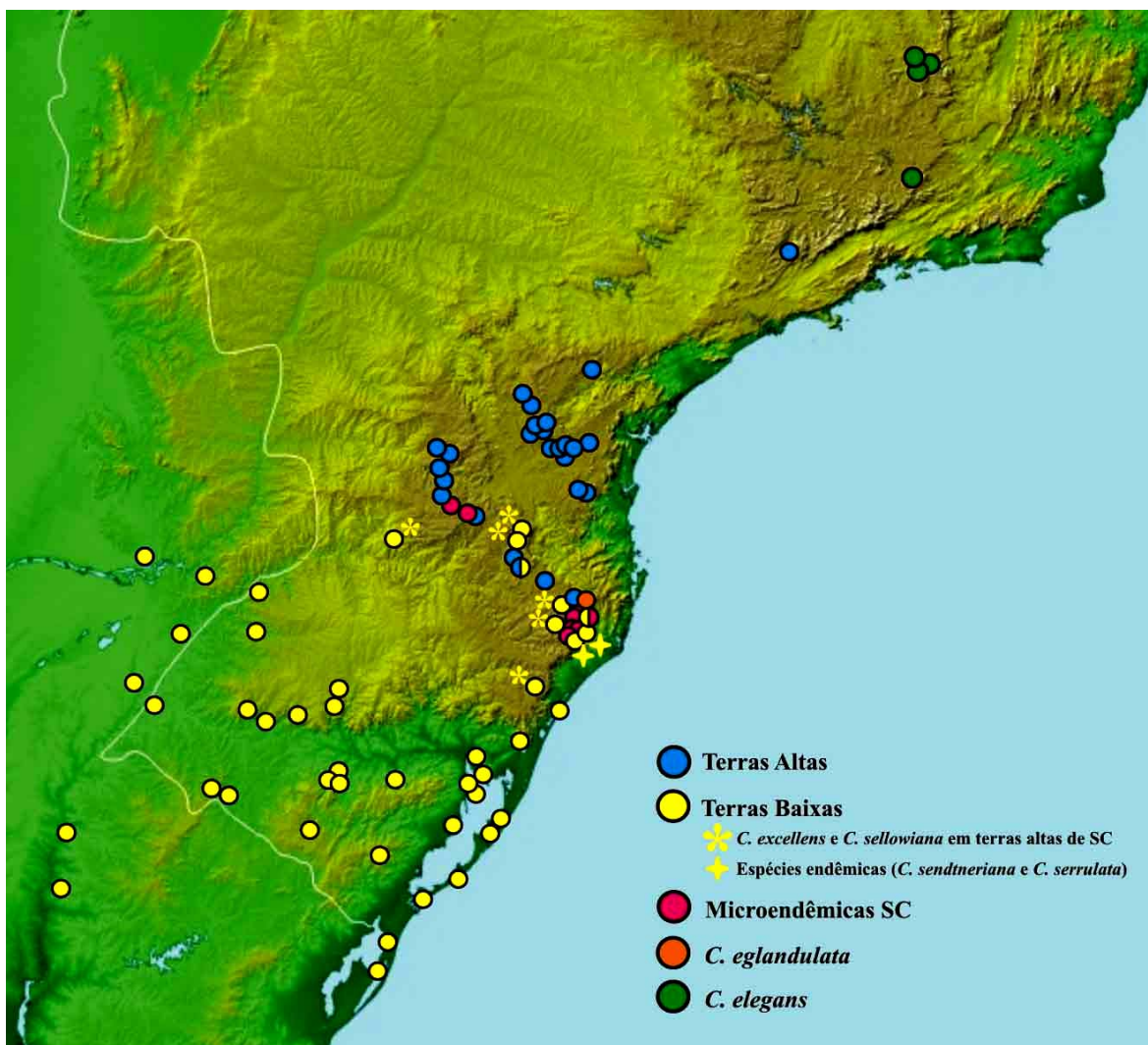


Figura 29. Distribuição geográfica nos haplótipos relacionados aos clados encontrados nas filogenias. Os círculos no mapa correspondem aos locais de coleta das amostras utilizadas na construção do *network*, e as cores de cada círculo indicam o clado ao qual os haplótipos se relacionam. Em dois locais na região de altitude de Santa Catarina foram encontrados haplótipos de diferentes clados, representados por círculos contendo duas cores: o círculo amarelo e azul corresponde à localização da população híbrida entre as espécies *C. linoides* e *C. excellens*, e o círculo contendo as cores amarelo e rosa indica a localização de uma população de *C. sellowiana* que apresenta indivíduos com haplótipos relacionados aos clados Terras Baixas e Microendêmicas SC. Os círculos amarelos assinalados com asterisco indicam os locais de ocorrência de populações das espécies *C. excellens* subsp. *excellens* e *C. sellowiana*, que possuem haplótipos relacionados ao clado Terras Baixas, mas ocorrem em regiões de altitude de Santa Catarina. Os círculos indicados com uma estrela indicam locais de ocorrência das espécies endêmicas *C. sendtneriana* e *C. serrulata*, que exibiram um haplótipo de Terras Baixas. Mais detalhes são discutidos no texto.

Entretanto a utilização de uma amostragem mais ampla possibilita, neste momento, observar de uma maneira mais clara as exceções discutidas anteriormente entre clados e regiões, envolvendo as espécies *C. excellens* subsp. *excellens* e *C. sellowiana*. Na Figura 29 pode se observar que em alguns locais de altitude do estado de Santa Catarina foram encontrados haplótipos relacionados ao clado Terras Baixas (círculos amarelos assinalados com um asterisco). Estes haplótipos (H25, H26, H37, H38, H90 e H91, na Figura 28), foram encontrados em populações de *C. sellowiana* e *C. excellens* subsp. *excellens*. Além destas populações, observam-se mais quatro locais: dois em amarelo assinalados com estrelas, e locais indicados por semi-círculos com uma metade na cor amarela. Estes casos, discutidos a seguir, também são amostras e populações que possuem haplótipos de terras baixas (H37, H39 e H90). A presença destes haplótipos em regiões de altitude reforça a hipótese de que populações ancestrais, geneticamente relacionadas ao clado Terras Baixas, podem ter se expandido em direção norte, sendo observadas atualmente como uma exceção dentro do padrão geral de distribuição encontrado.

A outra inconsistência discutida com base nas análises filogenéticas foi a presença de amostras de *C. excellens* subsp. *excellens* tanto no clado Terras Baixas como no clado Terras Altas. Os haplótipos encontrados nas amostras desta espécie confirmam esta inconsistência, como visto de uma maneira geral na Figura 30. *Calibrachoa excellens* exibe haplótipos bem divergentes, distribuídos em várias posições do *network* (assinalados em amarelo). Os haplótipos H27, H28, H29, H30, H35 e H36, localizados entre as sequências de Terras Altas, foram encontrados em populações desta espécie no estado do Paraná. Estes haplótipos não são relacionados geneticamente aos encontrados nas populações de Santa Catarina, que como dito no parágrafo anterior, pertencem ao clado Terras Baixas (H25, H26, H37 e H38 nas Figuras 28 e 30).

Calibrachoa linoides (espécie de distribuição ampla nas áreas altas, da qual também foram amostrados um número maior de populações nesta análise), também apresenta haplótipos em várias posições do *network*, mas estes ficam restritos ao clado Terras Altas (haplótipos em azul na Figura 30). A proximidade genética das populações de *C. excellens* do Paraná com o clado Terras Altas, e conseqüentemente a distância genética observada em relação ao restante das populações da espécie (presentes no Clado Terras Baixas) coincide com a discussão realizada com base nos resultados filogenéticos, que consideraram *C. excellens* polifilética, com relação aos dois grandes clados propostos.

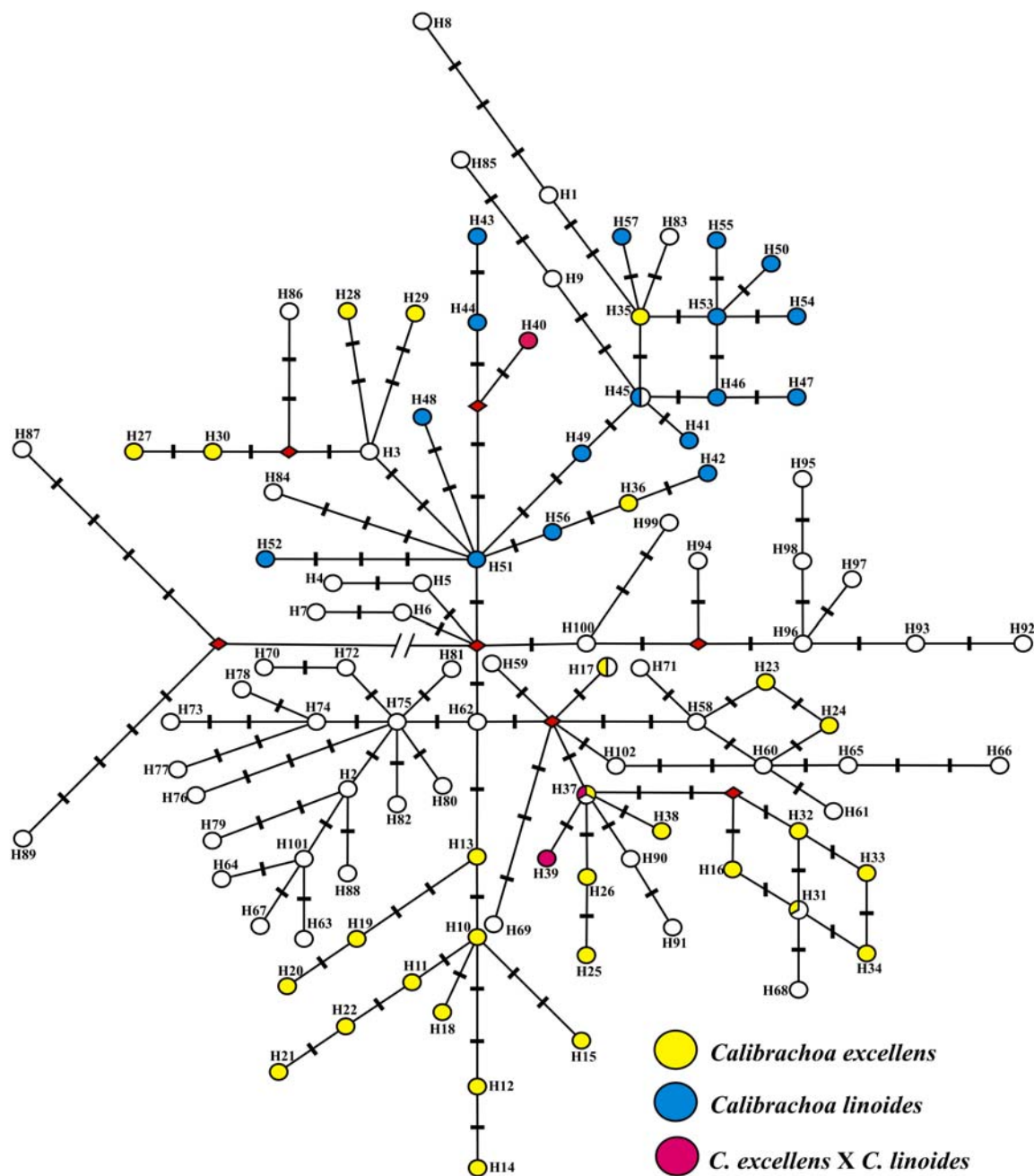


Figura 30. Destaque dos haplótipos encontrados nas espécies *C. excellens* (em amarelo) e *C. linoides* (em azul) no *network* obtido para 25 espécies do gênero *Calibrachoa*. As demais espécies apresentaram os haplótipos que estão em branco. Os haplótipos H17, H31, H37 e H45, cujos círculos correspondentes não se apresentam totalmente destacados pelas cores, são compartilhados entre as espécie citadas e outras espécies relacionadas. Os haplótipos exibidos pela população híbrida entre estas espécies estão destacados pela cor rosa. Mas detalhes são discutidos no texto.

A falta de resolução das árvores filogenéticas, os baixos valores de suporte dos cladogramas e a presença de ramos curtos foram interpretados como evidências de uma diversificação recente no gênero. A observação de algumas características do *network* e a distribuição dos haplótipos entre as espécies também pode levar a tal conclusão, como o número reduzido de vetores médios separando os haplótipos de cada espécie e o compartilhamento de haplótipos entre elas.

A presença de vetores médios em um *network* de haplótipos construído com o método de *median-joining* pode ser interpretada biologicamente como possíveis sequências existentes que não foram incluídas na amostra, ou sequências ancestrais que foram extintas (Bandelt *et al.*, 1999). Assim, um *network* construído a partir de sequências de diferentes espécies deveria apresentar vetores médios entre os haplótipos de cada uma delas, que é o esperado para espécies divergentes, cujo ancestral possivelmente já tenha sido extinto. Isto é observado entre *C. parviflora*, *C. pygmaea* e o restante do gênero, mas não é observado nas espécies restantes, onde haplótipos de espécies distintas estão conectados diretamente uns aos outros, sugerindo que não houve tempo suficiente para uma maior divergência e consequente extinção de haplótipos ancestrais.

Observa-se também o compartilhamento de haplótipos entre espécies, que pode ser o resultado de dois eventos não relacionados: a retenção de polimorfismos ancestrais, no caso de espécies que divergiram recentemente, ou hibridação entre espécies já estabelecidas. Nesta abordagem foram utilizados somente segmentos plastidiais para inferir as relações entre estas espécies, limitando o poder em distinguir os dois eventos que podem resultar em compartilhamento de haplótipos. Porém, evidências fornecidas por características morfológicas, distribuições geográficas e o relacionamento genético entre as espécies envolvidas, podem ajudar na distinção entre os eventos que deram origem aos compartilhamentos observados. A Tabela 11 apresenta a ocorrência dos haplótipos entre as espécies estudadas, sendo que dos 102 haplótipos detectados, dez são compartilhados entre duas espécies, e dois haplótipos são compartilhados por três espécies.

A grande maioria dos haplótipos compartilhados parece ser resultado de retenção de polimorfismos ancestrais. Os haplótipos H2, H17, H37, H45, H60, H74, H75, H95 e H101 são compartilhados por espécies geneticamente próximas, agrupadas nos grandes cladogramas formados nas análises filogenéticas e filogeográficas, discutidas ao longo deste capítulo.

Tabela 11. Haplótipos gerados com as sequências dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, e sua ocorrência nas 25 espécies analisadas no gênero *Calibrachoa*. Dos 102 haplótipos encontrados, doze são compartilhados entre espécies. Os detalhes são discutidos no texto.

Haplótipo	Espécie	Haplótipo	Espécie
H1	<i>C. caesia</i>	H52	<i>C. linoides</i>
H2	<i>C. cordifolia</i> , <i>C. ovalifolia</i>	H53	<i>C. linoides</i>
H3	<i>C. dusenii</i>	H54	<i>C. linoides</i>
H4	<i>C. eglandulata</i>	H55	<i>C. linoides</i>
H5	<i>C. eglandulata</i>	H56	<i>C. linoides</i>
H6	<i>C. elegans</i>	H57	<i>C. linoides</i>
H7	<i>C. elegans</i>	H58	<i>C. heterophylla</i>
H8	<i>C. ericifolia</i>	H59	<i>C. heterophylla</i>
H9	<i>C. ericifolia</i>	H60	<i>C. heterophylla</i> , <i>C. thymifolia</i>
H10	<i>C. excellens subsp. atropurpurea</i>	H61	<i>C. heterophylla</i>
H11	<i>C. excellens subsp. atropurpurea</i>	H62	<i>C. heterophylla</i>
H12	<i>C. excellens subsp. atropurpurea</i>	H63	<i>C. heterophylla</i>
H13	<i>C. excellens subsp. atropurpurea</i>	H64	<i>C. heterophylla</i>
H14	<i>C. excellens subsp. atropurpurea</i>	H65	<i>C. heterophylla</i>
H15	<i>C. excellens subsp. atropurpurea</i>	H66	<i>C. heterophylla</i>
H16	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H67	<i>C. heterophylla</i>
H17	<i>C. excellens subsp. excellens</i> , <i>C. excellens subsp. atropurpurea</i> , <i>C. heterophylla</i>	H68	<i>C. heterophylla</i>
H18	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H69	<i>C. heterophylla</i>
H19	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H70	<i>C. heterophylla</i>
H20	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H71	<i>C. heterophylla</i>
H21	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H72	<i>C. heterophylla</i>
H22	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H73	<i>C. humilis</i>
H23	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H74	<i>C. humilis</i> , <i>Calibrachoa</i> sp.2
H24	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H75	<i>Calibrachoa</i> sp.1, <i>C. ovalifolia</i>
H25	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H76	<i>Calibrachoa</i> sp.1
H26	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H77	<i>C. linearis</i>
H27	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H78	<i>C. linearis</i>
H28	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H79	<i>C. missionica</i>
H29	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H80	<i>C. missionica</i>
H30	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H81	<i>C. ovalifolia</i>
H31	<i>C. excellens subsp. excellens</i> , <i>C. heterophylla</i> , <i>C. ovalifolia</i>	H82	<i>C. ovalifolia</i>
H32	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H83	<i>C. paranensis</i>
H33	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H84	<i>C. paranensis</i>
H34	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H85	<i>C. paranensis</i>
H35	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H86	<i>C. paranensis</i>
H36	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H87	<i>C. parviflora</i>
H37	<i>C. excellens subsp. excellens</i> , <i>C. sellowiana</i> População híbrida <i>C. excellens</i> X <i>C. linoides</i>	H88	<i>C. pubescens</i>
H38	<i>C. excellens subsp. excellens</i>	H89	<i>C. pygmaea</i>
H39	População híbrida <i>C. excellens</i> X <i>C. linoides</i>	H90	<i>C. sellowiana</i> , <i>C. sendtneriana</i> , <i>C. serrulata</i>
H40	População híbrida <i>C. excellens</i> X <i>C. linoides</i>	H91	<i>C. sellowiana</i>
H41	<i>C. linoides</i>	H92	<i>C. sellowiana</i>
H42	<i>C. linoides</i>	H93	<i>C. sellowiana</i> , <i>C. sendtneriana</i>
H43	<i>C. linoides</i>	H94	<i>C. sendtneriana</i>
H44	<i>C. linoides</i>	H95	<i>C. sendtneriana</i> , <i>C. serrulata</i>
H45	<i>C. linoides</i> , <i>C. micrantha</i>	H96	<i>C. sendtneriana</i>
H46	<i>C. linoides</i>	H97	<i>C. sendtneriana</i>
H47	<i>C. linoides</i>	H98	<i>C. sendtneriana</i>
H48	<i>C. linoides</i>	H99	<i>C. spathulata</i>
H49	<i>C. linoides</i>	H100	<i>C. spathulata</i>
H50	<i>C. linoides</i>	H101	<i>C. heterophylla</i> , <i>C. thymifolia</i>
H51	<i>C. linoides</i>	H102	<i>C. thymifolia</i>

Outras evidências que suportam a hipótese de retenção de polimorfismos ancestrais nestas espécies (ao invés da hipótese de hibridação) são as divergências morfológica e ecológica exibidas pelas amostras em questão. Os caracteres diagnósticos (geralmente associados à morfologia floral, e conseqüentemente, aos polinizadores) são suficientes para classificá-las como espécies distintas pela taxonomia tradicional. Os habitats encontrados entre as espécies também são diferentes, principalmente os tipos de substrato de ocorrência.

Processos de especiação e o conseqüente isolamento reprodutivo resultaram na divergência morfológica apresentada por estas espécies atualmente. A presença de genomas plastidiais semelhantes em espécies com morfologias distintas sugerem uma divergência recente. Isto ocorre porque os cruzamentos entre indivíduos de morfologias semelhantes, adaptadas a polinizadores e ambientes específicos, tendem a resultar em um número maior de descendentes. Assim, a fixação de alelos nucleares responsáveis por caracteres morfológicos adaptativos é mais rápida do que a fixação de haplótipos específicos que diferenciem cada espécie. E embora os genomas de transmissão uniparental apresentem metade do tamanho efetivo dos alelos nucleares (e deste modo, um tempo de coalescência menor) (Avise, 2000), o curto período de tempo desde isolamento reprodutivo ainda não resultou em linhagens únicas de genomas organelares (linhagens com monofilia recíproca) (Avise *et al.*, 1987).

A retenção de polimorfismos ancestrais pode ainda ser acentuada quando há um rápido aumento no número de indivíduos, e igualmente, no tamanho efetivo da população, o que causa uma substituição de linhagens mais lenta, e uma maior probabilidade de fixação e persistência de todos os haplótipos (Avise, 2000). A manutenção de haplótipos ancestrais também pode ocorrer no caso de populações que se mantem mais isoladas e permanecem com o genoma ancestral, enquanto outras que possuem um fluxo gênico mais intenso acabam extinguindo estes haplótipos, o que pode resultar em tempos de coalescência diferentes entre elas, mesmo que tenham tamanhos semelhantes (Nei e Takahata, 1993).

Portanto, os compartilhamentos dos haplótipos citados anteriormente (H2, H17, H37, H45, H60, H74, H75, H95 e H101) são considerados resultado de divergência morfológica recente entre as espécies envolvidas. Uma exceção são as espécies *C. heterophylla* e *C. thymifolia* (que compartilham os haplótipos H60 e H101). Embora ainda

sejam formalmente consideradas válidas, os caracteres morfológicos utilizados na distinção destas duas espécies parecem não apresentar consistência suficiente. E como discutido na seção 4.1, evidências sobre a distribuição geográfica destas espécies também levantam dúvidas sobre a atual classificação empregada. Este problema de ordem taxonômica será abordado posteriormente e, desta forma, uma discussão sobre compartilhamento de haplótipos entre espécies cuja delimitação é duvidosa não faz muito sentido.

Do total de haplótipos compartilhados descritos na Tabela 11, três deles (H31, H90 e H93) parecem não ter sido resultado de retenção de polimorfismos ancestrais. A presença de diferentes genomas em algumas populações pode ser resultado de hibridação, já que o isolamento reprodutivo entre espécies pode não ser completo.

No gênero *Calibrachoa*, os mecanismos de isolamento são primariamente pré-zigóticos, e estudos em laboratório demonstraram que uma barreira genética efetiva é encontrada entre dois grupos de espécies. *Calibrachoa parviflora* e *C. pygmaea* não geram descendentes quando cruzadas com outras espécies do gênero, mas podem gerar híbridos entre si, enquanto que as demais espécies podem gerar híbridos, em maior ou menor número de descendentes dependendo das espécies parentais em questão (Watanabe *et al.*, 1997). Em ambiente natural, híbridos já foram encontrados em regiões de contato entre espécies de *Calibrachoa* (Stehmann, 1999). Porém, indivíduos de morfologia híbrida geralmente são encontrados em número reduzido, o que pode ser considerado comum em espécies de plantas com mecanismos de isolamento pré-zigótico. Assim, não há um comprometimento da integridade das espécies envolvidas, onde prevalecem as divergências morfológicas.

Entre os haplótipos compartilhados, o H31 mostrou-se presente em amostras de três espécies distintas: *C. excellens* (subsp. *excellens*), *C. heterophylla* e *C. ovalifolia*. A hipótese de hibridação neste caso poderia ser considerada com base em duas evidências: o próprio compartilhamento de um haplótipo por três espécies distintas, e a mesma localização geográfica de duas das amostras envolvidas. Entretanto não foram encontrados indivíduos de morfologias intermediárias entre as espécies que pudessem corroborar esta hipótese. Outra causa possível seria a falta de variação encontrada entre sequências plastidiais de espécies próximas. Desta forma não existem evidências consistentes que possam apontar para um dos possíveis processos que resultaram este compartilhamento.

Já os haplótipos H90 e H93, que se mostram bem divergentes (como demonstrado

pelo posicionamento distinto em diferentes regiões no *network*) são compartilhados pelas espécies *C. sellowiana*, *C. sendtneriana* e *C. serrulata* (sendo o H90 compartilhado pelas três espécies citadas, e o H93 por *C. sellowiana* e *C. sendtneriana*). Estas espécies ocorrem em simpatria na borda oriental do Planalto Catarinense. *Calibrachoa sendtneriana* e *C. serrulata* são endêmicas desta região, possuindo uma distribuição muito restrita, como mostrado na seção 4.1, enquanto *C. sellowiana* é uma espécie abundante em todo o Planalto. Neste caso, o compartilhamento dos dois haplótipos entre as três espécies na região de simpatria, além da ocorrência de indivíduos de morfologia intermediária (como descrito na seção 4.1) são evidências que suportam a hipótese de hibridação entre estas espécies.

A região de maior altitude do estado de Santa Catarina é considerada um dos centros de diversidade do gênero, e como mostrado na Figura 29, abriga espécies divergentes geneticamente, pertencentes a diferentes clados. Nesta região encontram-se espécies do clado Terras Baixas (*C. excellens* subsp. *excellens* e *C. sellowiana*, cujas populações amostradas estão representadas pelos círculos amarelos assinalados com asterisco na Figura 29), espécies do clado Terras Altas (*C. linooides*, representada pelos círculos azuis), além das espécies endêmicas (*C. sendtneriana* e *C. serrulata*, círculos rosa, e *C. eglandulata*, representada pelos círculos verdes). A ocorrência de híbridos naturais parece ser mais frequente nesta região. Stehmann (1999) relatou a ocorrência de prováveis híbridos naturais entre *C. linooides* e *C. sellowiana* em São Joaquim, município vizinho de Bom Jardim da Serra, onde foram encontrados os indivíduos híbridos entre *C. sellowiana* e *C. sendtneriana*, como também entre *C. sellowiana* e *C. serrulata* (como descrito na seção 4.1).

A possibilidade de hibridação entre as espécies endêmicas e *C. sellowiana* pode ser suportada através da visualização, na Figura 29, de uma população de *C. sellowiana* (cuja localização é representada por um círculo contendo as cores amarelo e rosa) que apresenta haplótipos correspondentes ao Clado Terras Baixas (H90 e H91, representados em amarelo) e haplótipos do clado Microendêmicas SC (H92 e H93, representados em rosa). O haplótipo H90 (compartilhado pelas três espécies, e relacionado ao clado Terras Baixas) foi encontrado em indivíduos das espécies endêmicas, cuja localização está representada pelos círculos amarelos marcados com uma estrela na Figura 29.

Além da população de *C. sellowiana*, a população híbrida entre *C. excellens* e *C.*

linoides, coletada no município catarinense de São Cristóvão do Sul (como descrito na seção 4.1), também apresentou haplótipos pertencentes aos Clados Terras Baixas e Terras Altas (cuja localização está representada pelo círculo assinalado com as cores amarelo e azul, na Figura 29).

Desta forma, além da evidência morfológica, os dados genéticos também demonstram que esta população possui genomas plastidiais relacionados à *C. excellens* (H37 e H39) e *C. linoides* (H40), destacados em rosa na Figura 30. Estas espécies possuem uma grande área de contato em toda a região central dos estados de Santa Catarina e do Paraná, diferentemente da zona de possível hibridação que abrange as espécies endêmicas, em uma área bem restrita.

A presença de uma população híbrida entre *C. linoides* e *C. excellens* poderia sugerir que outros eventos semelhantes possam ter ocorrido em diferentes locais ao longo da extensa área de contato entre as espécies. Esta suposição, caso seja verdadeira, poderia ser uma explicação para a condição polifilética atribuída à *C. excellens*, que apresenta populações no estado do Paraná que não se mostraram relacionadas ao restante das populações da espécie, como observado na Figura 30 (haplótipos H27, H28, H29, H30, H35 e H36, geneticamente relacionados aos haplótipos do Clado Terras Altas, destacados em amarelo).

O evento que explicaria a condição polifilética em *C. excellens* seria a possível introgressão do genoma plastidial relacionado ao clado Terras Altas em populações de *C. excellens* que hibridizaram com populações de *C. linoides*. A introgressão é a incorporação de parte dos genomas de uma espécie pela outra, através dos híbridos. Muitos trabalhos relatam a ocorrência de introgressão resultante de hibridação em grupos vegetais (Rieseberg e Soltis, 1991; Rieseberg *et al.*, 1996; Sang *et al.*, 1997; Okuyama *et al.*, 2004).

E em plantas, o DNA plastidial pode ainda persistir em populações independentemente do genoma nuclear, pois devido à herança uniparental materna do cloroplasto, e à limitação de dispersão de sementes em algumas espécies de plantas, é esperado que um segmento citoplasmático seja mais facilmente fixado de uma espécie para outra do que um gene nuclear (Okuyama *et al.*, 2004). Este fenômeno, denominado captura de cloroplasto, pode então ser detectado quando há inconsistência entre filogenias de genes nucleares e plastidiais (Rieseberg e Soltis, 1991; Rieseberg *et al.*, 1996). Neste estudo, por terem sido utilizadas somente sequências plastidiais nas análises, a identificação da captura

de cloroplasto fica prejudicada. Entretanto, evidências reveladas pelas análises filogeográficas nestas duas espécies, apóiam este cenário.

Nas seções seguintes serão realizadas descrições mais detalhadas sobre a distribuição e relação dos haplótipos encontrados entre espécies de cada um dos clados propostos, e também entre as espécies envolvidas nos processos de hibridação descritos anteriormente. Deste modo, os resultados obtidos para as espécies *C. excellens* e *C. linooides* serão abordados em uma seção específica, como também os resultados obtidos para as espécies *C. sellowiana*, *C. sendtneriana* e *C. serrulata*.

4.3.2. O Clado Terras Baixas

Dentre os clados propostos para o gênero *Calibrachoa*, o grupo denominado Terras Baixas é o que contem o maior número de espécies. Dentre as 25 espécies estudadas neste trabalho, 12 são relacionadas a este grupo. A Figura 31 mostra a distribuição geográfica dos três principais grupos de haplótipos de Terras Baixas ao longo dos locais amostrados, refletindo uma tendência na relação entre os grupos geneticamente relacionados com as regiões onde estas espécies são encontradas.

Os haplótipos assinalados em amarelo foram encontrados em populações das duas subespécies de *C. excellens*, localizadas na região da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, sendo que muitas destas amostras foram coletadas no município de Caçapava do Sul. O número relativamente elevado de haplótipos pertencentes a estas populações, quando comparado ao total encontrado para as demais espécies do clado, deve-se à presença de um maior número de amostras de *C. excellens* no conjunto total de dados e, assim, o grupo assinalado em amarelo não deve ser comparado proporcionalmente aos outros grupos de haplótipos observados. A descrição detalhada dos resultados encontrados em *C. excellens* será realizada em uma seção específica.

Os haplótipos destacados em vermelho pertencem a amostras de *C. heterophylla*, *C. excellens*, *C. sellowiana* e *C. thymifolia*, presentes desde o sul da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, até as regiões de altitude de Santa Catarina. O haplótipo H62, que não foi destacado com as cores de nenhum grupo (já que se apresenta em uma posição central no clado Terras Baixas) também pertence a *C. heterophylla*.

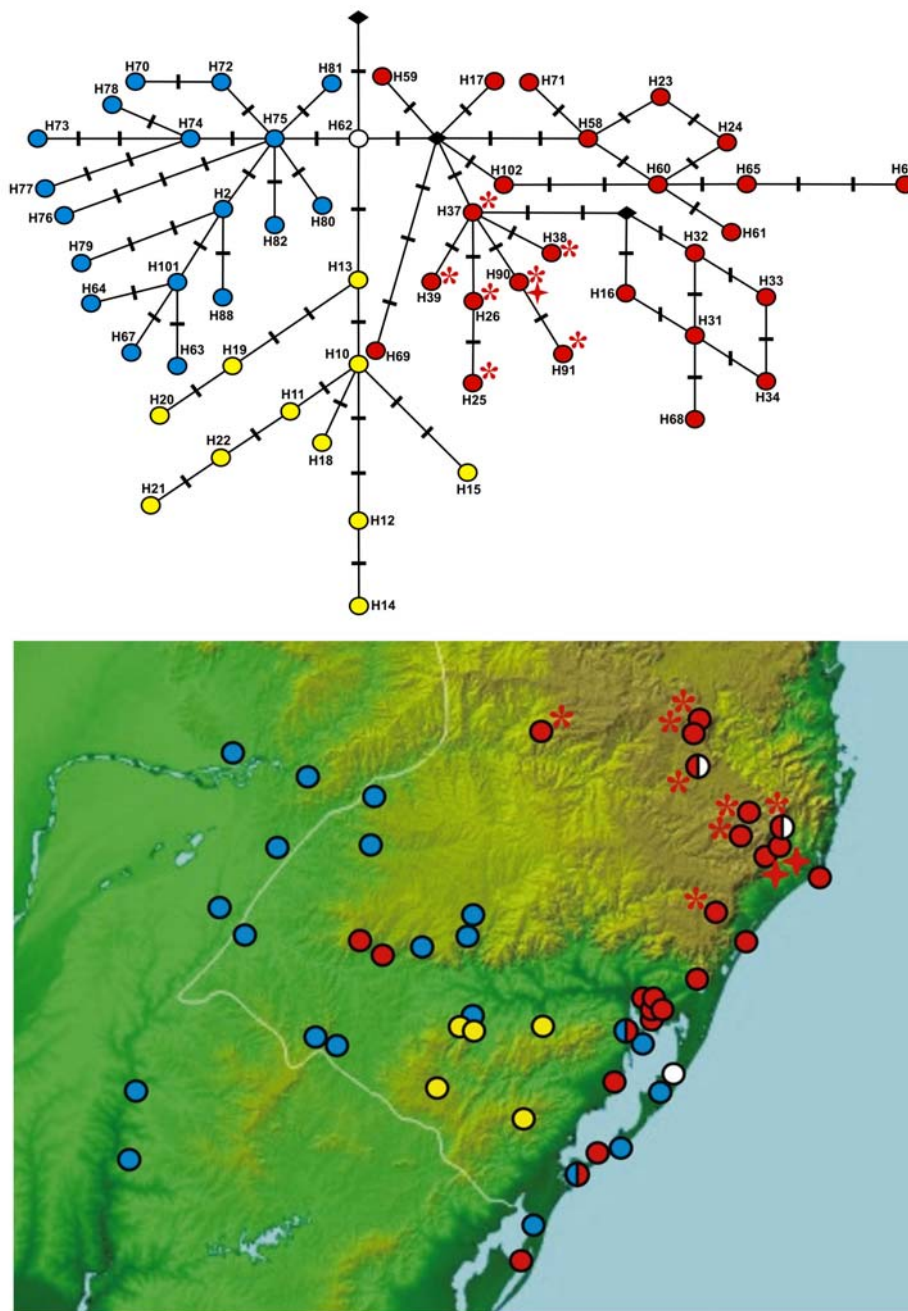


Figura 31. Parte do *network* de relacionamento dos haplótipos encontrados no gênero *Calibrachoa*, relativo ao clado Terras Baixas, destacando os grandes grupos de haplótipos relacionados. Os círculos no mapa correspondem às amostras analisadas, e a cor destes círculos corresponde às cores indicadas nos grupos de haplótipos. O haplótipo H62, que não possui uma maior proximidade com nenhum dos grupos destacados, está presente na amostra indicada pelo círculo branco no mapa. Os círculos localizados em Santa Catarina que possuem somente uma metade destacada em vermelho correspondem aos locais onde também foram encontrados haplótipos relacionados ao clado Terras Altas. Os haplótipos em vermelho destacados com um asterisco no *network*, bem como os locais no mapa destacados com um asterisco, correspondem aos haplótipos e populações de *C. excellens* e *C. sellowiana* que se distribuem nos locais de altitude de Santa Catarina. O haplótipo e os círculos no mapa destacados por uma estrela correspondem ao haplótipo e locais de amostras das espécies microendêmicas de altitude, que exibiram este haplótipo (H90) relacionado ao clado Terras Baixas. Mais detalhes são fornecidos no texto.

Além destas espécies, um indivíduo de *C. ovalifolia* encontrado no Parque Estadual de Itapuã, município de Viamão, Rio Grande do Sul, exibiu o haplótipo H31, compartilhado entre *C. heterophylla* e *C. excellens*, e relacionado ao grupo assinalado em vermelho. Como discutido na seção anterior, não existem evidências claras sobre quais fenômenos poderiam ter produzido este compartilhamento, já que os demais haplótipos exibidos por esta espécie não possuem proximidade com o haplótipo H31 como será mostrado na sequência.

As populações de *C. excellens* e *C. sellowiana* presentes nas Terras Altas de Santa Catarina (representadas por um asterisco no mapa da Figura 31), bem como os indivíduos das espécies microendêmicas do Planalto Catarinense (indicadas por uma estrela no mesmo mapa), apresentaram os haplótipos H25, H26, H37, H38, H39, H90 e H91 (indicados por asteriscos e pela estrela no *network* da Figura 31). Este grupo de haplótipos geneticamente relacionados constitui a exceção ao padrão geográfico proposto para o clado, como discutido em capítulos anteriores. O grupo se relaciona a haplótipos de outras populações de *C. excellens* e *C. heterophylla* presentes no nordeste do Rio Grande do Sul, região que engloba áreas adjacentes ao município de Porto Alegre, em direção à Planície Costeira do Estado. O possível ancestral de *C. sellowiana* e das populações de *C. excellens* de altitude poderia, portanto, ter relacionamento com as populações ancestrais presentes nesta região.

Duas amostras que possuem haplótipos do grupo assinalado em vermelho estão localizadas na região centro-oeste do Estado (mapa da Figura 31). Estas amostras correspondem a quatro indivíduos de *C. heterophylla* encontrados no município de São Francisco de Assis, e cinco indivíduos de *C. excellens* subsp. *atropurpurea* encontrados no município de São Vicente do Sul, que possuem o haplótipo H17 em comum. Embora este haplótipo seja bem divergente dos demais encontrados nas populações de *C. excellens* subsp. *atropurpurea*, não há evidências adicionais de que eventos de hibridação tenham ocorrido entre estas espécies e, assim, este compartilhamento parece ser resultado de retenção de polimorfismos ancestrais em uma população mais isolada de *C. excellens* subsp. *atropurpurea*.

O grupo de haplótipos assinalados com a cor azul na Figura 31 corresponde, quase na totalidade, às espécies que ocorrem da região central do Rio Grande do Sul em direção oeste até o território argentino, dominada por terras baixas da região pampeana e parte da

região chaquenha. Das dez espécies que possuem haplótipos no grupo assinalado em azul na Figura 31, sete delas (*C. cordifolia*, *C. humilis*, *C. linearis*, *C. missionica* e *C. pubescens*, *Calibrachoa* sp.1 e *Calibrachoa* sp.2) se distribuem exclusivamente na região definida acima. Os haplótipos encontrados em cada local amostrado estão descritos na Tabela 1 em anexo, e a correspondência entre haplótipos, espécies e locais de coleta pode ser visualizada na Figura 32. Apesar do número reduzido de amostras destas espécies no conjunto total de sequências utilizadas no *network*, a proximidade genética entre elas é clara, tanto pelo compartilhamento de alguns haplótipos entre espécies, como também pela ausência de vetores médios unindo estes haplótipos.

Calibrachoa ovalifolia exibiu quatro haplótipos (H2, H75, H81 e H82 na Figura 32) relacionados ao grupo definido no parágrafo anterior, sendo que dois deles (H2 e H75) são compartilhados com *C. cordifolia* e *Calibrachoa* sp.1, respectivamente. *Calibrachoa ovalifolia* se distribui não só pela região da Campanha do Estado e áreas adjacentes do Uruguai, Argentina e Paraguai, como também pelas regiões da Depressão Central, Serra do Sudeste e também em áreas do Planalto, atingindo toda a metade sul do Rio Grande do Sul. Esta distribuição ampla, além de características morfológicas relativamente próximas a muitas espécies relacionadas sugerem que *C. ovalifolia* seja a provável espécie-irmã de várias outras do gênero que possuem distribuições mais restritas. O haplótipo H75, além de ser compartilhado com *Calibrachoa* sp.1, está conectado a outros seis haplótipos, dos quais três (H2, H74 e H80) são encontrados em espécies morfológicamente semelhantes. *Calibrachoa* sp.1, espécie nova que se encontra em processo de descrição, diferencia-se principalmente pelo comprimento dos estames e coloração das flores. *Calibrachoa cordifolia* (que compartilha o haplótipo H2) pode ser distinguida de *C. ovalifolia* pelo formato das folhas e coloração das flores. *Calibrachoa missionica* também compartilha algumas características, mas é distinta principalmente pela coloração magenta das flores. *Calibrachoa pubescens* que também é uma espécie muito semelhante e próxima geneticamente (possuindo o haplótipo H88, separado por uma mutação do H2), apresenta como diferenças diagnósticas em relação a *C. ovalifolia* o formato da corola e a presença de nervação reticular muito pronunciados. As espécies *C. humilis*, *C. linearis* e *Calibrachoa* sp.2 também são próximas geneticamente a *C. ovalifolia*, e também possuem algumas semelhanças morfológicas, em maior ou menor grau.

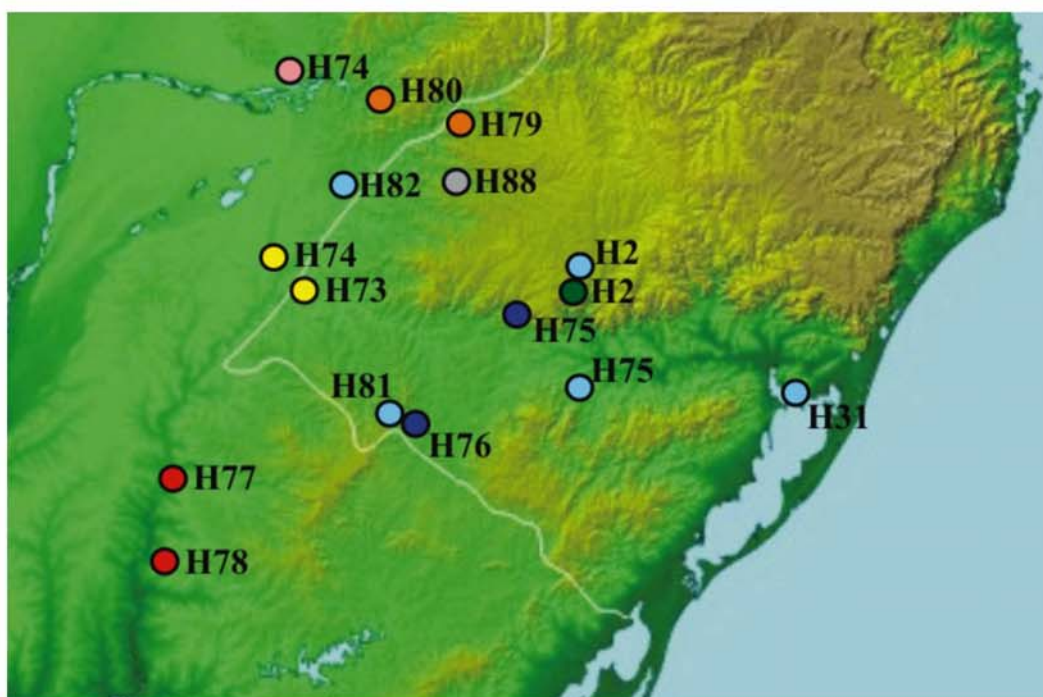
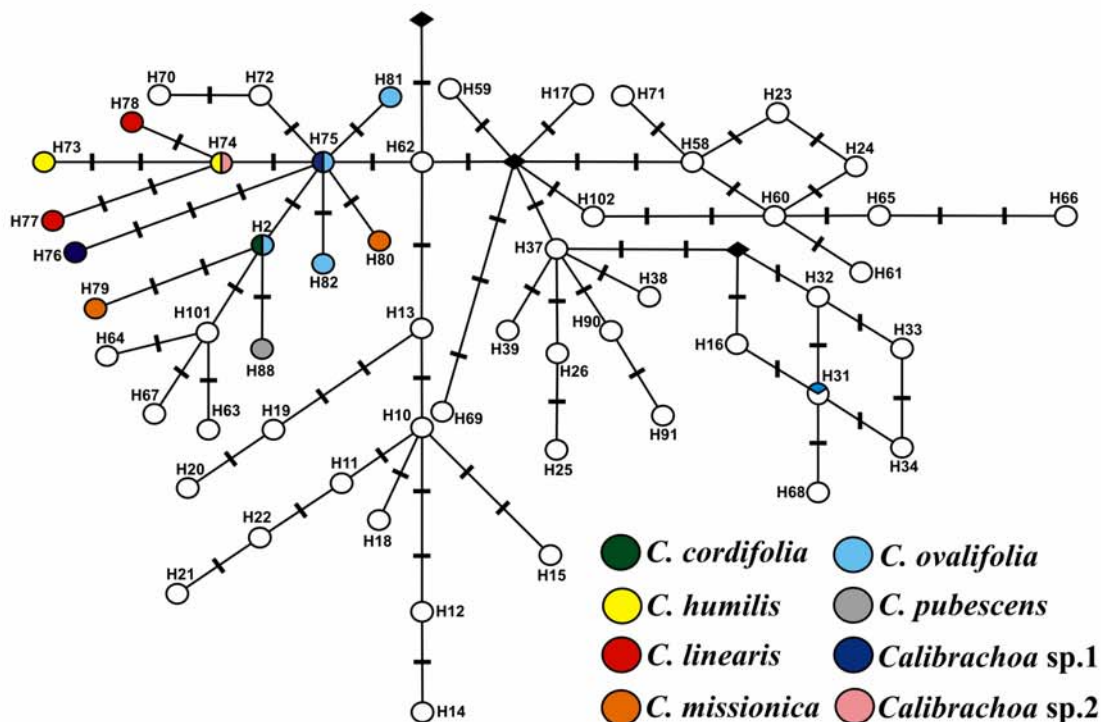


Figura 32. Parte do *network* de relacionamento dos haplótipos encontrados no gênero *Calibrachoa*, relativo ao clado Terras Baixas, destacando os haplótipos encontrados nas espécies *C. cordifolia* (haplótipos em verde escuro) *C. humilis* (em amarelo), *C. linearis* (em vermelho), *C. missionica* (em laranja), *C. ovalifolia* (em azul claro), *C. pubescens* (em cinza), *Calibrachoa* sp.1 (em azul marinho) e *Calibrachoa* sp.2 (em rosa). A localização das amostras de cada espécie bem como os haplótipos encontrados em cada uma delas estão indicados no mapa, sendo que as cores dos locais correspondem às mesmas cores das espécies indicadas nos haplótipos. Mais detalhes são fornecidos no texto.

Assim, este grupo com várias espécies relacionadas, tanto em caracteres morfológicos, como geneticamente, parece ter sido resultado de eventos recentes de divergência morfológica, a partir de prováveis populações ancestrais relacionadas à espécie *C. ovalifolia*.

Também é possível visualizar na Figura 32 a localização geográfica e a posição do haplótipo H31 no *network*, que como citado anteriormente, foi encontrado em um indivíduo de *C. ovalifolia*. A distância genética do H31 em relação aos haplótipos H2, H75, H81 e H82 (presentes nas demais amostras da espécie) e o compartilhamento deste haplótipo com um indivíduo de *C. excellens* subsp. *excellens* são evidências de um possível evento de hibridação entre populações de *C. ovalifolia* e *C. excellens* presentes no Parque Estadual de Itapuã, onde as duas amostras foram coletadas. Entretanto, estas amostras não exibiram morfologias que pudessem sustentar tal cenário. Assim, as evidências apresentadas não são suficientes para confirmar este evento. Investigações mais detalhadas, com um número maior de indivíduos de ambas as populações e marcadores moleculares mais informativos poderão corroborar esta hipótese.

Dentre as espécies presentes no clado Terras Baixas, *C. heterophylla* e *C. thymifolia* também apresentam haplótipos localizados tanto nos grupos assinalados em vermelho como nos grupos em azul no *network* apresentado na Figura 31 (além de *C. ovalifolia*, como discutido anteriormente). No mapa apresentado na mesma figura, localidades assinaladas em azul podem ser observadas ao longo de toda a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, e em áreas continentais às margens da Laguna do Patos, que correspondem a populações de *C. heterophylla*. Além destes locais, dois círculos aparecem assinalados com ambas as cores e também se referem a populações das espécies que apresentaram haplótipos dos dois grupos referentes às cores indicadas. O círculo localizado mais ao norte corresponde a uma população de *C. heterophylla* que apresentou os haplótipos H71 e H72. Já o círculo mais ao sul representa a população de *C. thymifolia*, que apresentou os haplótipos H70, H101 e H102. A Figura 33 apresenta os haplótipos referentes a estas espécies no clado Terras Baixas, bem como a localização geográfica das amostras que apresentaram tais haplótipos.

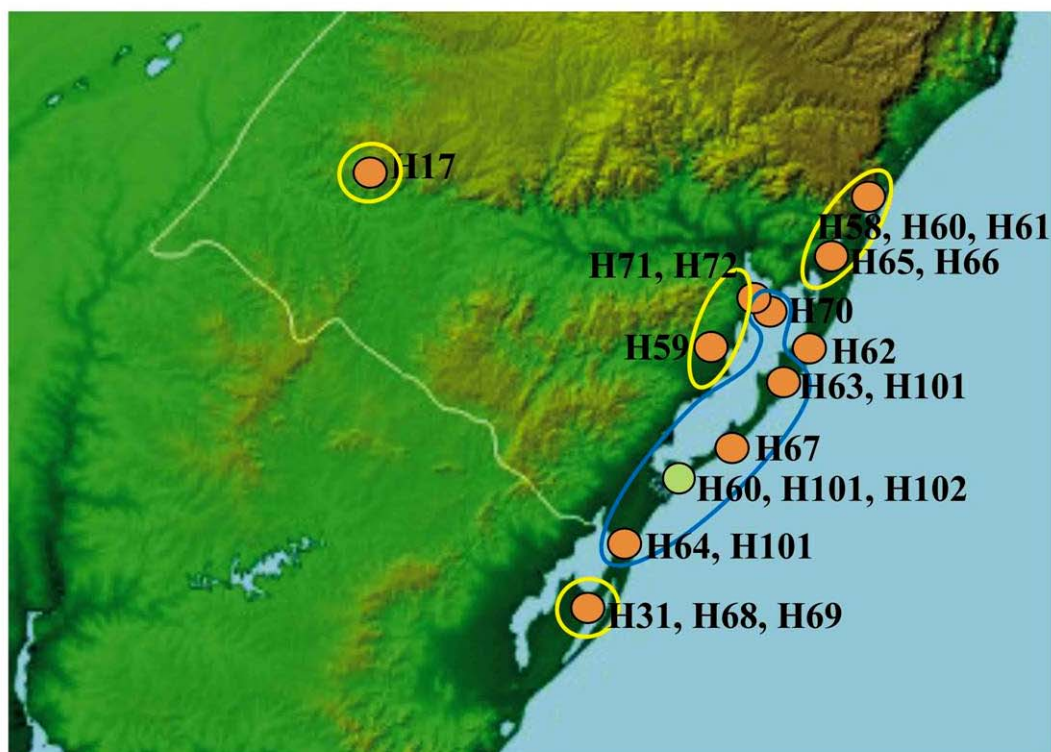
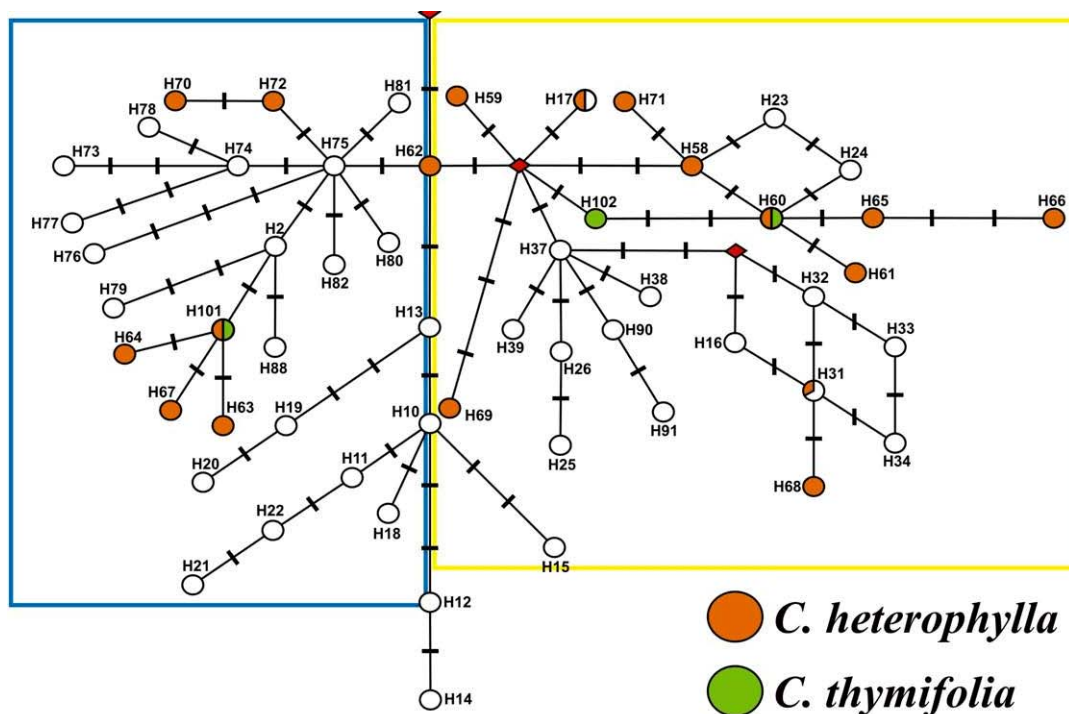


Figura 33. Parte do *network* de relacionamento dos haplótipos encontrados no gênero *Calibrachoa*, relativo ao clado Terras Baixas, destacando os haplótipos encontrados nas espécies *C. heterophylla* (em laranja) e *C. thymifolia* (em verde). A localização das amostras de cada espécie bem como os haplótipos encontrados em cada uma delas estão indicados no mapa. O grupo de haplótipos destacado em azul corresponde aos haplótipos relacionados às demais espécies do clado encontradas no interior do estado do Rio Grande do Sul, enquanto que o grupo em amarelo corresponde aos haplótipos relacionados às demais espécies do clado encontradas na região nordeste do Estado. As populações indicadas pelas cores no mapa apresentam os haplótipos dos grupos de mesma cor no *network*. Mais detalhes são fornecidos no texto.

Calibrachoa heterophylla apresenta haplótipos bem divergentes, encontrados em diferentes posições ao longo do *network*. Estes haplótipos são relacionados a ambos os grupos de espécies discutidos a partir da Figura 31 (grupo de haplótipos em azul, encontrados nas espécies a partir do centro do Estado para o oeste, e grupo em vermelho, referentes às espécies *C. excellens* e *C. sellowiana*, presentes no nordeste do Estado e em Santa Catarina). Assumindo que a distribuição observada dos haplótipos seja resultado de retenção de polimorfismos ancestrais, a presença destes haplótipos divergentes pode indicar que *C. heterophylla* seja uma das espécies mais antigas entre as espécies deste clado. As outras espécies de distribuição ampla encontradas nesta região, *C. ovalifolia* e *C. excellens*, possuem haplótipos mais relacionados entre si, refletindo os grupos definidos na Figura 31, enquanto *C. heterophylla* exibe haplótipos relacionados aos dois grupos, e desta forma, relacionados às duas espécies citadas acima.

A distribuição geográfica dos haplótipos não mostra uma relação direta entre grupos genéticos e regiões geográficas. Mas se considerarmos os haplótipos de *C. heterophylla* como pertencentes aos dois grupos relacionados (grupo do nordeste do Estado e Santa Catarina e grupo interior do Estado), observa-se uma certa relação entre alguns grupos de populações, como pode ser visto na Figura 33.

Os haplótipos H17, H31, H58, H59, H60, H61, H65, H66, H68, H69 e H71 (relacionados aos haplótipos de populações de *C. excellens* do nordeste do Estado, e indicados no *network* e no mapa pela cor amarela) estão presentes nas populações no extremo norte da Planície Costeira, na população do extremo sul, em Santa Vitória do Palmar, e nas amostras do interior do Estado e na porção continental, às margens da Laguna dos Patos.

Os haplótipos H63, H64, H67, H70, H72 e H101 (relacionados aos haplótipos de populações de *C. ovalifolia* que habitam o interior do Estado, indicados pela cor azul no *network* e no mapa) estão presentes nas populações da porção central e sul da Planície Costeira, além da amostra localizada na Ilha Barba Negra, no norte da Laguna dos Patos. A população continental mais próxima à Ilha, coletada no Horto Florestal da Aracruz, apresentou haplótipos de ambos os grupos (H71 e H72,) e não foi inserida em um ou outro grupo na Figura 33. Já o haplótipo H62 não foi classificado como pertencente a nenhum dos grupos, pois se encontra relacionado a ambos, como pode ser visto no *network*.

Desta forma, uma visão geral entre grupos de sequências geneticamente

relacionadas e regiões geográficas pode ser vista na Figura 33. Mäder (2008) encontrou resultados similares em uma investigação filogeográfica mais ampla da espécie, onde foram detectados três grupos de populações geneticamente relacionados: um grupo no centro-sul da Planície Costeira, o segundo na porção norte da Planície Costeira e o terceiro correspondendo à população localizada em Santa Vitória do Palmar, no extremo sul da distribuição das amostras. Estes grupos distintos, como proposto por Mäder (2008), podem ter sido resultado de ondas migratórias distintas em diferentes períodos da história, a partir de populações de diferentes locais do Estado. A presença de rios durante o período Pleistoceno em alguns locais da Planície Costeira também pode ter contribuído para a formação dos grupos de populações geneticamente relacionadas que se observa no presente.

As ondas de colonização distintas em diferentes períodos do tempo geológico também coincidem com a própria história de formação de toda a região litorânea. O formato e distribuição atual das regiões da Planície Costeira é resultado de vários eventos sucessivos de transgressão e regressão do mar durante as alterações entre ciclos glaciais e interglaciais nos períodos Pleistoceno e Holoceno. Durante os últimos 400.000 anos houve pelo menos quatro grandes ciclos que moldaram a distribuição dos sedimentos na região (Villwock e Tomazelli, 1995; Menegat *et al.*, 1998; Dillenburg, 2005; Weschenfelder, 2005).

Desta forma, a contribuição do presente trabalho aos resultados obtidos por Mäder (2008) é a evidência de que populações ancestrais de *C. heterophylla* são relacionadas a prováveis populações ancestrais das espécies *C. excellens* e *C. ovalifolia*, e que as diferenças genéticas encontradas nas populações atuais são resultado de colonização a partir de populações ancestrais distintas, relacionadas a espécies presentes atualmente tanto no interior como no nordeste do estado do Rio Grande do Sul. A descoberta recente de que *C. heterophylla* também possui populações no interior do Estado (como discutido na seção 4.1), indica que são necessárias coletas de outras populações, na tentativa de esclarecer as relações evolutivas entre *C. heterophylla* e espécies próximas.

As amostras de *C. thymifolia* incluídas no presente trabalho se mostram geneticamente próximas a algumas populações de *C. heterophylla*, sendo que os haplótipos encontrados se relacionam tanto ao grupo de populações do centro-sul, como ao grupo do norte da Planície Costeira. As amostras de ambas as espécies foram obtidas em coletas no

mesmo período, e como descrito na seção 4.1, este foi o primeiro registro de *C. thymifolia* nesta região. Entre todas as populações coletadas, somente esta foi identificada como sendo desta espécie. Até então, a região conhecida de ocorrência eram as encostas arenosas da região do extremo oeste do Estado, e áreas adjacentes do Uruguai e Argentina (como descrito na seção 4.1). Outras amostras coletadas recentemente na Argentina pelo Prof. João R. Stehmann apontaram ainda que *C. linearis*, espécie cuja distribuição se assemelha à descrita para *C. thymifolia*, exibiu variação nos caracteres diagnósticos, trazendo dúvidas na diferenciação entre as duas espécies. Assim, os critérios de classificação empregados atualmente parecem estar baseados em características morfológicas muito variáveis entre representantes das três espécies envolvidas (*C. heterophylla*, *C. linearis* e *C. thymifolia*). Esta confusão taxonômica se intensificou após os novos registros de ocorrência, como a presença de *C. heterophylla* no interior do Estado e *C. thymifolia* na Planície Costeira. A informação de que *C. heterophylla* era uma espécie endêmica da região costeira, enquanto *C. thymifolia* habitava as regiões arenosas do interior, também tinha utilidade taxonômica.

Historicamente, a identificação das três espécies é confusa, como descrito por Stehmann (1999) na revisão do gênero. Amostras identificadas por outros autores como pertencentes à *C. linearis* foram consideradas por Stehmann (1999) como sendo de *C. heterophylla*, enquanto outras classificadas como *C. heterophylla* foram reconhecidas como exemplares de *C. thymifolia* pelo autor. Estas espécies, juntamente com *C. humilis* (que também ocorre no oeste do Estado, como *C. linearis* e *C. thymifolia*) possuem folhas semelhantes, de formato linear, e podem ser confundidas quando se observa somente a porção vegetativa.

Calibrachoa humilis, entretanto, possui flores bem diferentes das demais, com coloração branca ou rosa (como pode ser visto nas Figuras 4P e 4Q), e é encontrada em um habitat distinto, os campos com solos rasos e pedregosos. Mas sua identificação a partir de materiais herborizados pode ser tornar complicada, quando não há uma descrição precisa do local de coleta e da cor da corola, já que a coloração original das flores é perdida nas exsiccatas.

As flores das outras três espécies são muito semelhantes, com coloração magenta ou púrpura e fauce amarela, circundada por um anel de coloração mais escura (como pode ser visto nas flores de *C. heterophylla* e *C. thymifolia*, respectivamente nas Figuras 4I e 4J). A distinção entre elas é formalmente realizada com base no tamanho e formato dos

órgãos reprodutivos. Em *C. heterophylla*, o estigma é transversalmente lobado, enquanto que em *C. linearis* e *C. thymifolia* este se apresenta sem lobos. Entre estas duas espécies, *C. linearis* se diferencia por possuir folhas e flores maiores, estames bem inclusos na corola, e estilete curvo. Estas diferenças, entretanto, não apresentaram coesão entre exemplares coletados recentemente de cada uma das espécies, e poderiam ser interpretadas como uma variação entre diferentes populações de uma mesma espécie.

Os dados moleculares obtidos no presente trabalho não apresentaram variação suficiente para delimitar a grande maioria das espécies do gênero, onde se observa grande divergência morfológica e baixa diferenciação genética. Porém, a relação entre haplótipos exibida no *network* mostra uma maior proximidade genética entre *C. heterophylla* e *C. thymifolia*, assim como entre *C. linearis* e *C. humilis*. Com base na discussão a respeito da validade dos caracteres morfológicos e dos dados de distribuição geográfica das populações analisadas, e levando-se em conta a proximidade genética entre as espécies em questão, pode-se sugerir que ao menos entre *C. heterophylla* e *C. thymifolia*, não existem evidências conjuntas que dêem suporte à distinção entre espécies.

4.3.3. O Clado Terras Altas

Este clado inclui as espécies que ocorrem nas regiões de altitude dos estados de Santa Catarina, Paraná e do extremo sul de São Paulo. *Calibrachoa linoides* é a espécie que possui a distribuição mais ampla neste clado, se estendendo desde o início das terras altas, no sul de Santa Catarina, até o Paraná, e possui algumas populações disjuntas nos campos de altitude da região sudeste do Brasil. *Calibrachoa excellens* também possui representantes no clado, encontrados nos campos de altitude do norte de Santa Catarina e do Paraná. Estas duas espécies, entretanto, serão discutidas separadamente na próxima seção. Na região dos Planaltos de Curitiba e Ponta Grossa, no Paraná, populações das sete espécies do clado podem ser encontradas, o que faz desta região um dos principais centros de diversidade do gênero (Stehmann, 1999).

As cinco espécies restantes (*C. caesia*, *C. dusenii*, *C. ericifolia*, *C. micrantha* e *C. paranensis*) exibem uma distribuição mais restrita, nos campos encontrados entre as formações de Floresta Ombrófila Mista, nos Planaltos a partir do norte de Santa Catarina até o sul de São Paulo. *Calibrachoa caesia* possui ainda algumas populações no Paraguai e

na província de Misiones, na Argentina, mas amostras destes locais não foram incluídas no trabalho. A Figura 34 destaca os haplótipos encontrados nestas cinco espécies, bem como a localização geográfica das amostras estudadas. Mais detalhes a respeito dos locais de coleta estão disponíveis na Tabela 1, em anexo.

Os haplótipos exibidos não mostram algum tipo de proximidade, mesmo entre populações de uma mesma espécie, como se observa em H83, H84, H85 e H86, encontrados em *C. paranensis*. Nesta espécie, a amostra mais distante geograficamente (no município de Guarapuava) exibiu o haplótipo H86, que também se mostra geneticamente distante dos demais haplótipos encontrados na espécie. Estes, por sua vez, foram encontrados em populações muito próximas, das quais uma (no município de Balsa Nova) exibiu os haplótipos H83 e H84 (como pode ser visto na Figura 34).

Todos estes haplótipos divergentes entre si se relacionam aos demais que, em sua maioria, estão presentes em populações de *C. linoides* (como observado na Figura 30), sugerindo que estas espécies compartilham ancestrais relacionados. A distribuição mais ampla desta espécie, além do relacionamento genético próximo podem ser consideradas evidências consistentes que apóiam esta origem comum.

A região habitada pelas espécies (os Planaltos de Curitiba e Ponta Grossa) faz parte das unidades geomorfológicas do Primeiro e Segundo Planaltos Paranaenses, localizados na borda oriental da Bacia do Paraná. Estes planaltos são constituídos de rochas formadas principalmente no período Devoniano (400 milhões de anos), e o relevo observado hoje foi resultado de diferentes fenômenos geológicos, sendo que o mais recente foi o derramamento magmático ocorrido no Cretáceo (130 milhões de anos), dando origem à Serra Geral, a oeste (Melo, 2006). Nos Planaltos de Curitiba e Ponta Grossa são encontradas áreas de campo limpo, interrompidas pela ocorrência de matas de Araucária, que aparecem nos cursos de rios ou em solos mais profundos, na forma de capões isolados, em altitudes acima de 1000 metros.

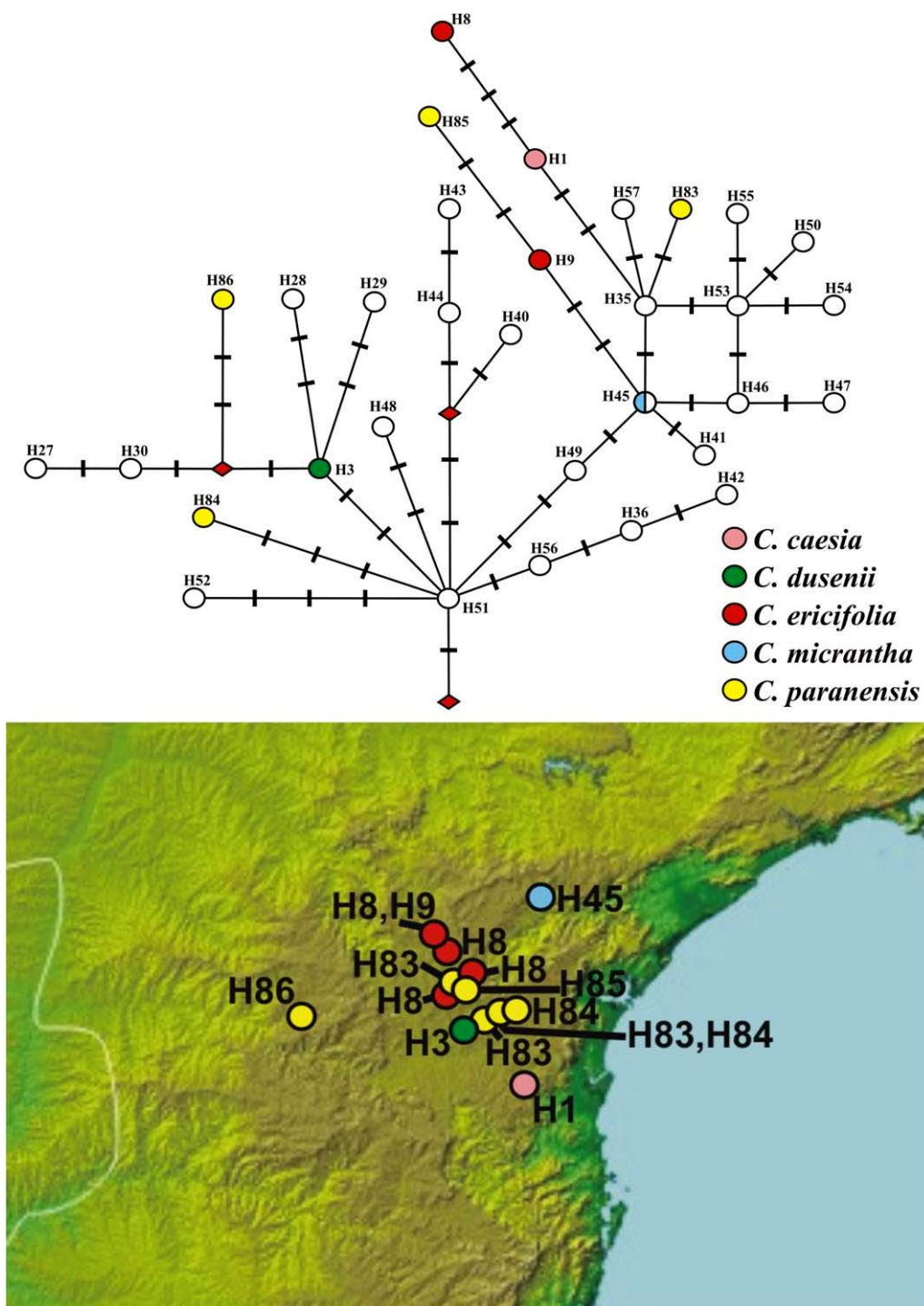


Figura 34. Parte do *network* de relacionamento dos haplótipos encontrados no gênero *Calibrachoa*, relativo ao clado Terras Altas, destacando os haplótipos encontrados nas espécies *C. caesia* (em rosa), *C. dusenii* (em verde), *C. ericifolia* (em vermelho), *C. micrantha* (em azul) e *C. paranensis* (em amarelo). A localização das amostras de cada espécie está indicada no mapa, com a cor correspondente utilizada no *network*, além dos haplótipos encontrados em cada local. Mais detalhes são fornecidos no texto.

Uma grande área da região faz parte do domínio da Floresta Ombrófila Mista. Esta paisagem de mosaico entre formações florestais e campestres acaba por isolar áreas de campos e afloramentos rochosos, o que pode ter isolado populações ancestrais de *Calibrachoa*, que sofreram alterações morfológicas ao longo do tempo, direcionadas por pequenas diferenças micro-ambientais. Este é um cenário bem plausível, e coincide com ocorrência de algumas destas espécies em micro-ambientes ao longo dos Planaltos.

As mudanças entre formações vegetais, ocorridas mais intensamente nesta região durante as oscilações climáticas do Pleistoceno suportam ainda a hipótese de um isolamento recente entre estas populações. De acordo com dados palinológicos, nos períodos glaciais do Pleistoceno, extensas áreas de campos eram encontradas nas regiões de altitude, enquanto nos períodos interglaciais, a expansão das formações florestais foi grande, substituindo boa parte das áreas abertas. (Behling, 1997b; Behling, 2002a; Behling e Pillar, 2007). Os dados moleculares parecem apoiar este cenário, já que se observam haplótipos bem divergentes em uma mesma espécie, resultado provável de retenção de polimorfismos existentes em grandes populações ancestrais, que sofreram fragmentação, sendo observados atualmente alguns haplótipos que se mantiveram em pequenos grupos de morfologia similar, correspondendo às espécies existentes.

Além do isolamento físico, a existência de diferenças morfológicas e ambientais observadas atualmente entre as espécies do clado refletem adaptações ecológicas, acentuando o isolamento entre elas e garantindo a manutenção das mesmas em uma área relativamente pequena. *Calibrachoa dusenii* possui distribuição restrita, em uma pequena área do Primeiro Planalto, em campos de altitude úmidos limitados pela Floresta Ombrófila Mista. *Calibrachoa caesia* é encontrada nos campos do centro-norte de Santa Catarina e centro-sul do Paraná, e habita preferencialmente as áreas da orla das matas ciliares e capões, sendo raramente encontrada em áreas mais abertas.

Já as espécies *C. ericifolia*, *C. paranensis* e *C. micrantha* são encontradas quase que exclusivamente em afloramentos areníticos de áreas abertas, localizados desde o norte de Santa Catarina, passando pelos Planaltos do Paraná, até o sul de São Paulo. De acordo com os registros levantados por Stehmann (1999) pode existir, inclusive, áreas de simpatria entre estas espécies, sendo que *C. micrantha* ocorre em uma região mais restrita, no nordeste do Paraná e sul de São Paulo. Porém, diferenças no tamanho das flores exibidas por estas espécies sugerem que o isolamento entre elas seja pela seleção de polinizadores

de tamanhos distintos. *Calibrachoa linooides* também é encontrada nas áreas de campo, mas sempre associada a latossolos, evidenciando mais uma vez as diferenças ambientais (neste caso, adaptações a diferentes tipos de solo) associadas às espécies que ocupam os Campos Gerais do Paraná.

Os dados moleculares, neste caso, indicaram que a divergência morfológica, levando à especiação neste grupo de espécies, foi um evento muito recente, já que ainda não houve tempo suficiente para que o isolamento entre espécies resultasse também em uma divergência molecular entre elas. A presença de haplótipos não relacionados em espécies distintas e o compartilhamento de haplótipos entre elas (como o H45, entre *C. linooides* e *C. micrantha* na Figura 34) são evidências desta rápida diferenciação. A proximidade entre os haplótipos de *C. linooides* também é um indicativo de que possíveis populações ancestrais relacionadas a esta espécie tenham dado origem às espécies que habitam atualmente os campos da região dos Planaltos no Paraná.

4.3.4. Filogeografia de *Calibrachoa excellens* e *Calibrachoa linooides*: evidências de uma zona de hibridação

Como exposto em maiores detalhes nas seção 1.1.6., a grande maioria das espécies do gênero apresenta distribuição relativamente restrita, limitada por tipos de solo. Entretanto, as espécies *C. excellens* e *C. linooides* mostram-se mais “generalistas”, possuindo distribuições geográficas bem mais amplas, com a ocorrência de uma grande região de contato existente na faixa central dos campos do planalto sul-brasileiro. A existência desta ampla região de simpatria aumentaria a possibilidade de hibridação natural entre estas espécies, o que foi confirmado morfológicamente através da descoberta de uma população híbrida, coletada no município catarinense de São Cristóvão do Sul (como descrito na seção 4.1). E como mostrado na seção 4.3.1, esta população apresentou genomas plastidiais relacionados à *C. excellens* e *C. linooides* (H37, H39 e H40, destacados em rosa na Figura 30).

A constatação da existência desta população híbrida entre *C. linooides* e *C. excellens* sugere que eventos similares possam ocorrer (ou ter ocorrido) nesta região de contato, o que seria uma possível explicação para a condição polifilética de *C. excellens* (como descrito na seção 4.3.1.). Evidências adicionais, reveladas por algumas características

exibidas pelos relacionamentos dos haplótipos destas espécies, também parecem apoiar este cenário. As análises filogeográficas, realizadas com algumas populações das espécies em questão são descritas a seguir, sendo que os haplótipos encontrados são os mesmos apresentados no *network* geral do gênero (já que a amostra utilizada é a mesma, descrita na Tabela 1, em anexo). Porém nesta seção as amostras foram analisadas para cada espécie separadamente, e em um conjunto contendo sequências de *C. excellens*, *C. linoides* e da população híbrida.

Em *C. excellens*, as populações analisadas, com informações dos locais de coleta, número de indivíduos e haplótipos encontrados nesta análise estão descritos na Tabela 12. A caracterização dos haplótipos encontrados é mostrada na Tabela 13. O *network* de haplótipos para este conjunto, bem como o local de ocorrência das amostras, são mostrados na Figura 35.

Tabela 12. Populações de *C. excellens* subsp. *excellens* e *C. excellens* subsp. *atropurpurea* utilizadas na construção do *network* de haplótipos da Figura 35

Subespécie	População	Local	Coordenadas Geográficas	Indivíduos analisados	Haplótipos encontrados
<i>Calibrachoa excellens</i> subsp. <i>atropurpurea</i>	Pexca1	Estrada para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 32.43228"S 53 33' 19.79975"W	11	H1, H2, H3 e H5
	Pexca2	Rodovia BR 293, sentido Dom Pedrito-Bagé. Bagé - Rio Grande do Sul	31 18' 02.27867"S 54 02' 41.88645"W	3	H4
	Pexca3	Estrada de terra próxima a Rodovia RS265, a cerca de 5k de Canguçu. Canguçu - Rio Grande do Sul	31 20' 35.22"S 52 40' 47.08"W	3	H6
	Pexca4	Rodovia RS241, entre São Vicente do Sul e Loreto. São Vicente do Sul - Rio Grande do Sul	29 43' 20.27086"S 54 50' 25.99946"W	5	H8
<i>Calibrachoa excellens</i> subsp. <i>excellens</i>	Pexce1	Estrada para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 58.00215"S 53 32' 32.25504"W	7	H1, H9, H10, H11, H12 e H13
	Pexce2	Rodovia BR471 entre Rio Pardo e Encruzilhada do Sul, a cerca de 20km de Encruzilhada do Sul. Encruzilhada do Sul - Rio Grande do Sul	30 22' 08.90669"S 52 25' 47.22034"W	2	H1
	Pexce3	Rodovia SC430, entre Urubici e São Joaquim, a cerca de 25km de Urubici. Urubici - Santa Catarina	28 08' 55.96694"S 49 42' 59.81104"W	9	H16 e H17
	Pexce4	Paleodunas próximas à BR 101. Imbituba - Santa Catarina	28 18' 37.83"S 48 43' 04.69"W	3	H14 e H15
	Pexce5	Rodovia PR170, sentido Guarapuava-Colônia Socorro, a cerca de 10km de Guarapuava. Guarapuava - Paraná	25 28' 49.79847" S 51 32' 17.70033" W	7	H18 e H19
	Pexce6	Rodovia PR170, sentido Pinhão-Faxinal do Céu, a cerca de 3km de Pinhão. Pinhão - Paraná	25 44' 10.11846" S 51 37' 15.16975" W	14	H20 e H21
	Pexce7	Rodovia PR170, Entre Faxinal do Céu e Bituruna. Pinhão - Paraná	25 56' 56.33881"S 51 36' 39.99251"W	9	H21
	Pexce8	Caminho para o observatório, Morro Santana. Porto Alegre - Rio Grande do Sul	30 02' 34.70063"S 51 06' 46.82451"W	8	H8, H22, H23, H24 e H25
	Pexce9	Estrada de terra próxima a Balsa Nova. Lapa - Paraná	25 35' 48.70688"S 49 38' 39.03514"W	14	H26 e H27
	Pexce10	Área urbana próxima a BR282. Município de Xaxim - Santa Catarina	26 57' 08.30443"S 52 30' 42.78935"W	6	H28 e H29
	Pexce11	Parque Estadual de Itapuã. Viamão - Rio Grande do Sul	30 21' 54.97225"S 51 01' 35.14032"W	2	H7

Tabela 13 : Haplótipos encontrados em *Calibrachoa excellens* subsp. *excellens* e *C. excellens* subsp. *atropurpurea*

		Posição Nucleotídica																																																										
		<i>trnH - psbA</i>																				<i>trnS - trnG</i>																																						
		1	3	3	5	5	6	6	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	5	6	7	7	7	7	7	8	8	9	9	9	9	1	1	1	1									
		6	0	9	5	9	0	3	3	6	6	6	9	0	2	3	5	9	0	1	1	2	3	3	5	7	8	1	2	4	9	0	4	7	8	8	9	7	9	1	3	5	0	0	0	2														
							0	0	4	5	9	0	4	5	6	9	7	5	7	2	4	5	1	7	7	8	7	5	7	6	9	1	2	8	6	0	1	1	4	6	0	2	7	1																
Hapl.																																																												
H1		G	-	-	T	T	-	A	G	A	G	A	-	G	A	A	C	G	C	T	G	T	A	G	-	-	G	C	T	-	T	-	-	G	C	T	A	T	T	A	C	-	A	T	G	G														
H2		†									
H3								
H4							
H5							
H6		.	.	‡						
H7						
H8					
H9				
H10				
H11			
H12			
H13			
H14			
H15		
H16		
H17			
H18		A
H19		A	*	
H20		A	
H21		A	
H22	
H23		
H24		
H25		
H26		
H27		
H28		
H29		

* Inserção 8 pb (CATTITTA) ‡ Duplicação 10 pb (GTAAGTAAAA) ■ Deleção 11 pb (TTTTTGAAAA) £ Inserção 5 pb (TTTTC)
 † Inserção 15 pb (ATTTTTACATTATT) ▲ Duplicação 10 pb (TAAATAAAAA) ◇ Deleção de 8 pb (TATATAAA) ‡ Deleção 14 pb (ACATTATTTAATTT)
 § Inserção 3 pb (ACT) ● Duplicação 8 pb (CTTTATCT) ◆ Duplicação 5 pb (TTTTA)

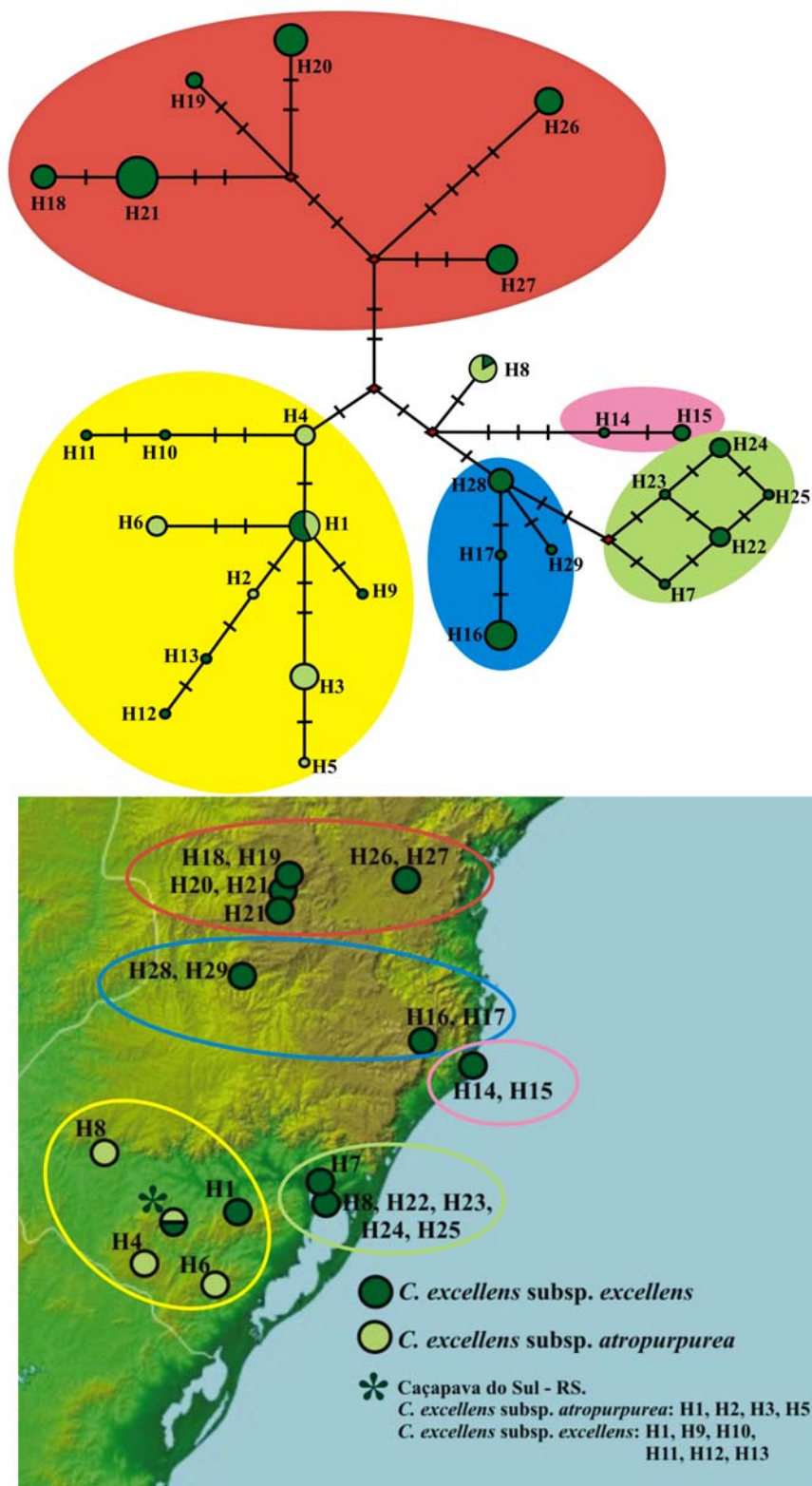


Figura 35. Network de relacionamento dos haplótipos de *Calibrachoa excellens* subsp. *excellens* (destacados em verde escuro) e *C. excellens* subsp. *atropurpurea* (destacados em verde claro). A localização das amostras de cada população, bem como os haplótipos encontrados em cada uma delas, estão indicados no mapa. Os destaques coloridos de cada grupo de haplótipos correspondem à localização destacada da mesma cor no network. Mais detalhes são fornecidos no texto.

Pode se observar uma associação clara entre regiões e grupos de haplótipos, coincidente com a associação discutida para o clado Terras Baixas em seções anteriores (mostrada na Figura 31). Neste caso, esta relação torna-se mais clara, com três grandes grupos de haplótipos: aqueles encontrados em populações localizadas na Serra do Sudeste do estado do Rio Grande do Sul (destacados em amarelo na Figura 35); em populações do extremo norte da distribuição das amostras, no estado do Paraná (destacados em vermelho na Figura 35); e um terceiro grupo com haplótipos presentes nas populações do leste do estado do Rio Grande do Sul, no litoral e em algumas regiões de altitude do sul e oeste de Santa Catarina (destacados respectivamente pelas cores verde, rosa e azul na Figura 35).

O grupo destacado em amarelo possui haplótipos de populações presentes na Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, sendo que a maioria destas populações pertencem à *C. excellens* subsp. *atropurpurea*, endêmica desta região, habitando principalmente solos areníticos. Algumas populações da subespécie tipo também ocorrem nestes locais, e apresentam haplótipos relacionados a este grupo. Uma exceção é o haplótipo H8, presente em uma população de *C. excellens* subsp. *atropurpurea* coletada no município de São Vicente do Sul, e também em alguns indivíduos coletados no morro Santana, em Porto Alegre. Este haplótipo é o único presente em amostras da subespécie *atropurpurea* que não mostrou proximidade com o restante dos haplótipos do grupo destacado em amarelo na Figura 35.

Calibrachoa excellens subsp. *atropurpurea* se diferencia da subespécie tipo por apresentar folhas e flores bem maiores, além de um anel escuro circundando a abertura da corola. Outras espécies que ocorrem no pampa também exibem este anel mais escuro nas flores (como *C. heterophylla*, *C. linearis* e *C. thymifolia*). A ocorrência desta característica parece ser uma adaptação à polinização no ambiente pampeano, já que somente nesta região são encontradas tais variações florais. Porém, estudos de biologia floral são raros, e não há informação sobre quais espécies poderiam discriminar estas alterações de coloração.

As diferenças morfológicas entre as subespécies são bem marcantes, sendo que traços morfológicos bem menos pronunciados são utilizados em outras situações para diferenciar espécies dentro do gênero. Além disso, a distribuição geográfica da subespécie *atropurpurea* é bem distinta, apesar de serem encontradas algumas populações da

subespécie tipo na Serra do Sudeste. Os dados moleculares também mostram uma certa estruturação entre as subespécies, mesmo considerando a ocorrência de haplótipos compartilhados entre elas, o que pode ser um efeito da retenção de polimorfismos ancestrais, como observado para diferentes casos no gênero. Deste modo, o *status* de subespécie atribuído a este grupo talvez devesse ser reavaliado, já que estas evidências poderiam suportar a condição de espécie, o que ocorre em circunstâncias semelhantes com outras espécies do gênero.

As outras populações distribuídas no Rio Grande do Sul exibiram haplótipos correspondentes ao grupo destacado em verde na Figura 35 (além do haplótipo H8, citado anteriormente). Estas populações foram coletadas no leste do Estado (municípios de Porto Alegre e Viamão), e são próximas geneticamente a populações de Imbituba, no litoral catarinense (destacado em rosa na Figura 35), das regiões de altitude no oeste (município de Xaxim) e da borda oriental do Planalto (município de Urubici), também no Estado de Santa Catarina (destacados em azul na Figura 35).

As populações de *C. excellens* encontradas nas áreas de altitude de Santa Catarina são relacionadas à *C. sellowiana*, e como discutido anteriormente, constituem a exceção de distribuição do clado Terras Baixas. Esta proximidade genética com todas as populações citadas no parágrafo anterior sugere que possíveis ancestrais relacionados a estas populações atingiram as porções mais elevadas, ao norte, colonizando o Planalto Catarinense e dando origem às atuais populações de *C. excellens* e a *C. sellowiana*. A rota de migração não necessariamente seria em direção norte, a partir da região de Porto Alegre, pois as populações de Xaxim (haplótipos H28 e H29) estão localizadas bem mais a oeste. Infelizmente a ausência de amostras cobrindo toda a metade norte do Rio Grande do Sul não possibilita, neste momento, inferir rotas específicas de colonização. Assim, assume-se que provavelmente esta expansão em direção norte ocorreu a partir de diferentes regiões do Estado, inclusive pela região litorânea, como demonstrado pela proximidade genética da amostra de Imbituba.

O terceiro grupo de haplótipos (destacado em vermelho na Figura 35) foi encontrado em populações localizadas no Paraná, em regiões de altitude do centro-sul do Estado (municípios de Guarapuava e Pinhão), e na região do Primeiro Planalto (município de Lapa). Este grupo, geneticamente relacionado ao clado Terras Altas, contém os

haplótipos H27, H28, H29, H30, H35 e H36 indicados na Figura 30, na seção 4.3.1., e são muito próximos aos encontrados em *C. linoides*. Esta discussão será retomada a seguir, quando será apresentado o *network* com os dados combinados das duas espécies.

As populações analisadas de *C. linoides*, com as informações dos locais de coleta, número de indivíduos e haplótipos encontrados estão descritos na Tabela 14. A caracterização dos haplótipos é mostrada na Tabela 15. O *network* de haplótipos da espécie, bem como o local de ocorrência das amostras, são mostrados na Figura 36.

Tabela 14. Populações de *Calibrachoa linoides* utilizadas para construção do *network* de haplótipos da Figura 36.

População	Local	Coordenadas Geográficas	Indivíduos analisados	Haplótipos encontrados
Plino1	Rodovia SC301, entre São Bento do Sul e Campo Alegre, a cerca de 4 km de Campo Alegre. Campo Alegre - Santa Catarina	26 12' 29.03864"S 49 18' 23.65972"W	2	H1 e H2
Plino2	Rodovia BR 470 entre Rio do Sul e Curitiba, a cerca de 20 km de Curitiba. São Cristóvão do Sul - Santa Catarina	27 18' 44.36680"S 50 23' 15.17060"W	6	H3, H4, H5 e H6
Plino3	Estrada entre Otacílio Costa e Petrolândia, a cerca de 20km de Otacílio Costa. Otacílio Costa - Santa Catarina	27 34' 37.22102"S 50 00' 04.19263"W	5	H7, H13, H14 e H15
Plino4	Estrada de terra a partir da BR282, sentido Urubici-Bom Retiro a cerca de 10km de bom Retiro. Bom Retiro - Santa Catarina	27 50' 46.67382"S 49 31' 31.53716"W	3	H8, H9 e H11
Plino5	Estrada de acesso para a Cascata do Avencal. Urubici - Santa Catarina	28 02' 55.06124"S 49 36' 56.62954"W	7	H10
Plino6	Rodovia PR170, a cerca de 3 km da cidade de Bituruna. Bituruna - Paraná	26 10' 11.41205"S 51 35' 59.44898"W	9	H11
Plino7	Rodovia SC302, entre General Carneiro e Matos Costa, a cerca de 10km de Matos Costa. Matos Costa - Santa Catarina	26 28' 08.12045"S 51 10' 47.08482"W	5	H12
Plino8	Reserva Biológica Mata Viva, Centro Politécnico, UFPR. Curitiba - Paraná	25 26' 47.81875"S 49 14' 04.24471"W	4	H16
Plino9	Estrada de acesso a Monte Verde, a cerca de 1km da zona urbana. Monte Verde - Minas Gerais	22 51' 59.52392"S 46 02' 53.34103"W	2	H17

Tabela 15 Haplótipos encontrados para *Calibrachoa linoides*

Haplótipos	Posição Nucleotídica																		Nº Observado	Populações amostradas		
	<i>trnH- psbA</i>									<i>trnS - trnG</i>												
	1	2	3	7	1	1	1	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	8			8	1
	7	5	7	6	2	3	5	7	0	8	0	4	1	6	2	1	4	5	5	0	1	1
					9	7	4	9	0	3	4	3	7	1	6	0	7	5	9	4	0	1
																			7	1	5	
H1	C	A	A	A	G	T	G	-	A	C	C	G	C	‡	C	-	T	T	T	A	C	T
H2	.	C	*	.	.	A	.	-	.	T	T	T	.	-	.	-
H3	A	C	*	.	C	A	.	-	-	.	-	.	.	.	C	.	C
H4	.	C	*	.	C	A	.	-	-	.	-	.	.	.	C	.	C
H5	.	C	-	‡	.	-
H6	.	C	-	‡	.	-	.	.	.	A	.	.
H7	.	C	C	-	‡	.	-	.	.	.	A	.	.
H8	.	C	*	.	.	A	.	-	-	.	-	.	-	G	.	.	.
H9	.	C	-	-	.	-
H10	.	C	-	G	‡	.	-	†	.	.	A	.	.
H11	.	C	*	.	.	A	.	-	-	.	-
H12	.	C	*	T	.	A	.	T	-	.	§
H13	.	C	-	G	‡	.	-	.	.	.	A	.	.
H14	.	C	-	G	‡	A	-	.	.	.	A	.	.
H15	.	C	-	G	-	.	-	.	.	.	A	.	.
H16	.	C	*	.	.	A	.	-	.	.	.	T	.	-	.	-
H17	.	C	-	G	.	.	.	G	‡	.	-

* Deleção 3 pb (ACT)

‡ Duplicação 8 pb (CTTTATCT)

§ Duplicação 6 pb (TTTGTT)

† Deleção 8 pb (TATATAAA)

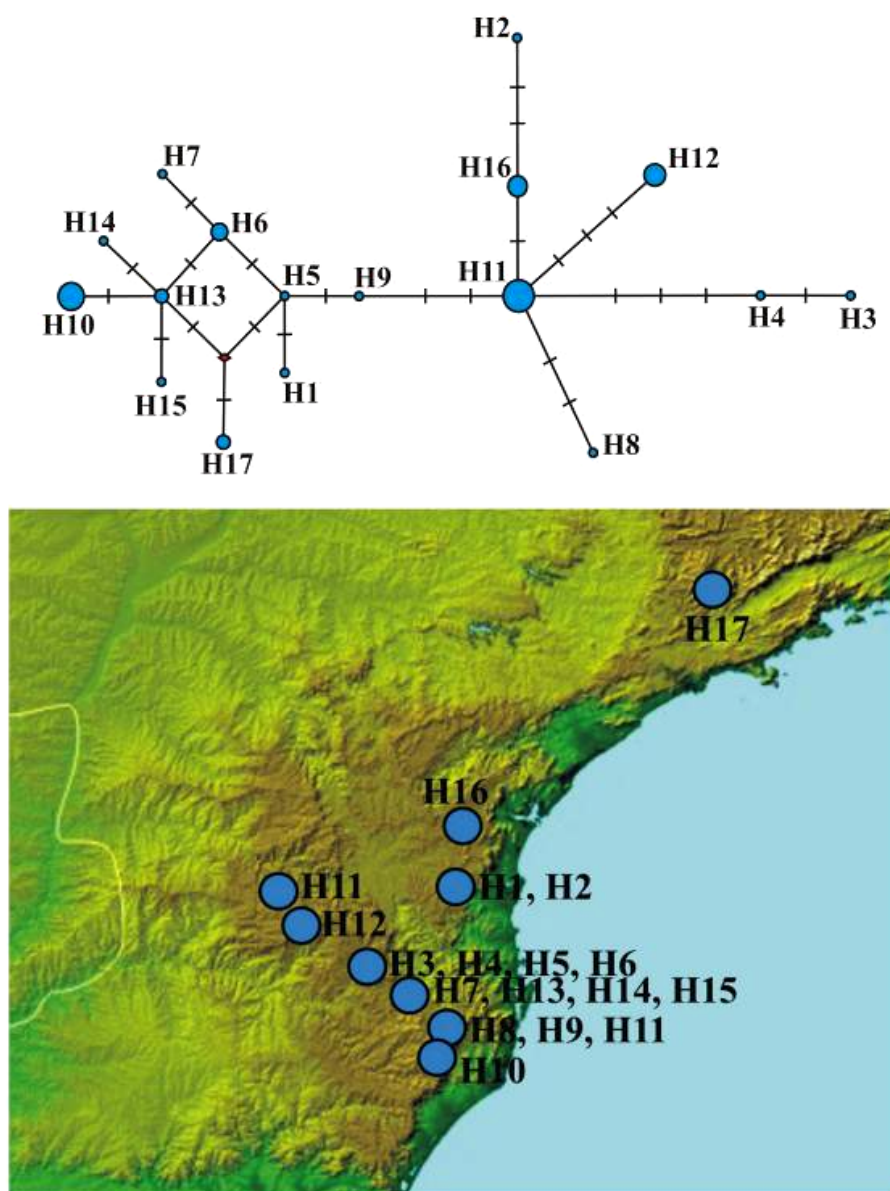


Figura 36. Network de relacionamento dos haplótipos de *Calibrachoa linoides*. A localização das amostras de cada população, bem como os haplótipos encontrados em cada uma delas, estão indicados no mapa. Mais detalhes são fornecidos no texto.

Não se observa uma relação entre a posição dos haplótipos e a localização geográfica das amostras correspondentes, já que muitas populações possuem haplótipos não relacionados geneticamente (como a localidade de São Cristóvão do Sul, onde foram detectados os haplótipos H3, H4, H5 e H6, que não apresentam uma proximidade no *network*). O haplótipo encontrado na amostra coletada no estado de Minas Gerais (H17), também é próximo geneticamente aos encontrados em outras populações.

Em comparação com outros relacionamentos já discutidos neste trabalho, a distância genética entre as populações do sul e sudeste é muito pequena, considerando a grande distância geográfica que separa a população de Minas Gerais da população mais próxima na região sul. Esta ausência de diferenciação genética em populações tão distantes indica que o estabelecimento delas na região aconteceu em períodos muito recentes na história do grupo. O clima mais frio e seco, característico das fases glaciais ocorridas muitas vezes durante o Pleistoceno, possibilitou a expansão de populações de *Calibrachoa* pelas formações abertas em direção norte. Nestes períodos, os campos cobriam as áreas do sul e sudeste do Brasil, onde atualmente são encontradas formações de Floresta Estacional Semidecidual (Behling e Lichte, 1997; Behling, 2002a).

A presença do vetor médio entre os haplótipos encontrados nestas populações poderia ser interpretada como um possível haplótipo extinto, que seria um resultado esperado dentro do contexto histórico de oscilações climáticas e a consequente expansão e retração dos campos, levando a redução das áreas abertas e extinção de populações de *C. linooides* nestas áreas. Entretanto, o *network* construído com as sequências de *C. excellens*, *C. linooides*, e da população híbrida entre estas espécies (mostrado na Figura 37, com os respectivos haplótipos descritos na tabela 16) revela que este vetor médio corresponde a um haplótipo presente na população de *C. excellens* localizada no município de Lapa, no Paraná. Este haplótipo (H26 na Figura 37) se diferencia por uma mutação do haplótipo de *C. linooides* de Minas Gerais (H48).

Tabela 16. Informações sobre as populações de *Calibrachoa excellens*, *Calibrachoa linoides*, da população híbrida entre *C. excellens* e *C. linoides*, *C. parviflora* e *C. pygmaea* utilizadas para construção do *network* de haplótipos da Figura 37.

Espécie	População	Local	Coordenadas Geográficas	Indivíduos analisados	Haplótipos encontrados
<i>Calibrachoa excellens</i> <i>subsp. atropurpurea</i>	Pexca1	Estrada para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 32.43228"S 53 33' 19.79975"W	11	H1, H2, H3 e H5
		Pexca2	Rodovia BR 293, sentido Dom Pedrito-Bagé. Bagé - Rio Grande do Sul	31 18' 02.27867"S 54 02' 41.88645"W	3
	Pexca3	Estrada de terra próxima a Rodovia RS265, a cerca de 5k de Canguçu. Canguçu - Rio Grande do Sul	31 20' 35.22"S 52 40'47.08"W	3	H6
	Pexca4	Rodovia RS241, entre São Vicente do Sul e Loreto. São Vicente do Sul - Rio Grande do Sul	29 43' 20.27086"S 54 50' 25.99946"W	5	H8
<i>Calibrachoa excellens</i> <i>subsp. excellens</i>	Pexce1	Estrada para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 58.00215"S 53 32' 32.25504"W	7	H1, H9, H10, H11, H12 e H13
	Pexce2	Rodovia BR471 entre Rio Pardo e Encruzilhada do Sul, a cerca de 20km de Encruzilhada do Sul - Rio Grande do Sul	30 22' 08.90669"S 52 25' 47.22034"W	2	H1
	Pexce3	Rodovia SC430, entre Urubici e São Joaquim, a cerca de 25km de Urubici. Urubici - Santa Catarina	28 08' 55.96694"S 49 42' 59.81104"W	9	H16 e H17
	Pexce4	Paleodunas próximas à BR 101. Imbituba - Santa Catarina	28 18' 37.83"S 48 43' 04.69"W	3	H14 e H15
	Pexce5	Rodovia PR170, sentido Guarapuava-Colônia Socorro, a cerca de 10km de Guarapuava. Guarapuava - Paraná	25 28' 49.79847" S 51 32' 17.70033" W	7	H18 e H19
	Pexce6	Rodovia PR170, sentido Pinhão-Faxinal do Céu, a cerca de 3km de Pinhão. Pinhão - Paraná	25 44' 10.11846" S 51 37' 15.16975" W	14	H20 e H21
	Pexce7	Rodovia PR170, Entre Faxinal do Céu e Bituruna. Pinhão - Paraná	25 56' 56.33881"S 51 36' 39.99251"W	9	H21
	Pexce8	Caminho para o observatório, Morro Santana. Porto Alegre - Rio Grande do Sul	30 02' 34.70063"S 51 06' 46.82451"W	8	H8, H22, H23, H24 e H25
	Pexce9	Estrada de terra próxima a Balsa Nova. Lapa - Paraná	25 35' 48.70688"S 49 38' 39.03514"W	14	H26 e H27
	Pexce10	Área urbana próxima a BR282. Município de Xaxim - Santa Catarina	26 57' 08.30443"S 52 30' 42.78935"W	6	H28 e H29
	Pexce11	Parque Estadual de Itapuã. Viamão - Rio Grande do Sul	30 21' 54.97225"S 51 01' 35.14032"W	2	H7

Continuação da Tabela 16. Informações sobre as populações de *Calibrachoa excellens*, *Calibrachoa linoides*, da população híbrida entre *C. excellens* e *C. linoides*, *C. parviflora* e *C. pygmaea* utilizadas para construção do *network* de haplótipos da Figura 37.

<i>Calibrachoa linoides</i>	Plino1	Rodovia SC301, entre São Bento do Sul e Campo Alegre, a cerca de 4 km de Campo Alegre. Campo Alegre - Santa Catarina	26 12' 29.03864"S 49 18' 23.65972"W	2	H32 e H33
	Plino2	Rodovia BR 470 entre Rio do Sul e Curitibanos, a cerca de 20 km de Curitibanos. São Cristóvão do Sul - Santa Catarina	27 18' 44.36680"S 50 23' 15.17060"W	6	H34, H35, H36 e H37
	Plino3	Estrada entre Otacilio Costa e Petrolândia, a cerca de 20km de Otacilio Costa. Otacilio Costa - Santa Catarina	27 34' 37.22102"S 50 00' 04.19263"W	5	H38, H44, H45 e H46
	Plino4	Estrada de terra a partir da BR282, sentido Urubici-Bom Retiro a cerca de 10km de bom Retiro. Bom Retiro - Santa Catarina	27 50' 46.67382"S 49 31' 31.53716"W	3	H39, H40 e H42
	Plino5	Estrada de acesso para a Cascata do Avenal. Urubici - Santa Catarina	28 02' 55.06124"S 49 36' 56.62954"W	7	H41
	Plino6	Rodovia PR170, a cerca de 3 km da cidade de Bituruna. Bituruna - Paraná	26 10' 11.41205"S 51 35' 59.44898"W	9	H42
	Plino7	Rodovia SC302, entre General Carneiro e Matos Costa, a cerca de 10km de Matos Costa. Matos Costa - Santa Catarina	26 28' 08.12045"S 51 10' 47.08482"W	5	H43
	Plino8	Reserva Biológica Mata Viva, Centro Politécnico, UFPR. Curitiba - Paraná	25 26' 47.81875"S 49 14' 04.24471"W	4	H47
	Plino9	Estrada de acesso a Monte Verde, a cerca de 1km da zona urbana. Monte Verde - Minas Gerais	22 51' 59.52392"S 46 02' 53.34103"W	2	H48
	População híbrida <i>C. linoides</i> x <i>C. excellens</i>	Rodovia BR 470, entre o trevo da BR 116, km 277. São Cristóvão do Sul - Santa Catarina	27 19' 38.87556"S 50 21' 47.94054"W	24	H28, H30 e H31
<i>Calibrachoa parviflora</i>		Área urbana de Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 30' 31.82008"S 53 29' 27.77868"W	1	H49
		Calçada próxima ao edifício do Departamento de Genética, Campus do Vale, UFRGS. Porto Alegre - Rio Grande do Sul	30 04' 12.12"S 51 07' 10.02"W	1	H49
<i>Calibrachoa pygmaea</i>		Rodovia BR290 km649 sentido Alegrete-Uruguaiana, a cerca de 1 km do trevo para Quaraí. Uruguaiana - Rio Grande do Sul	30 01' 10.48805"S 56 24' 51.27712"W	1	H50
		Rodovia BR293, entre Quaraí e Santana do Livramento, a cerca de 35km de Quaraí. Santana do Livramento - Rio Grande do Sul	30 32' 57.73208"S 56 07' 06.22586"W	1	H50

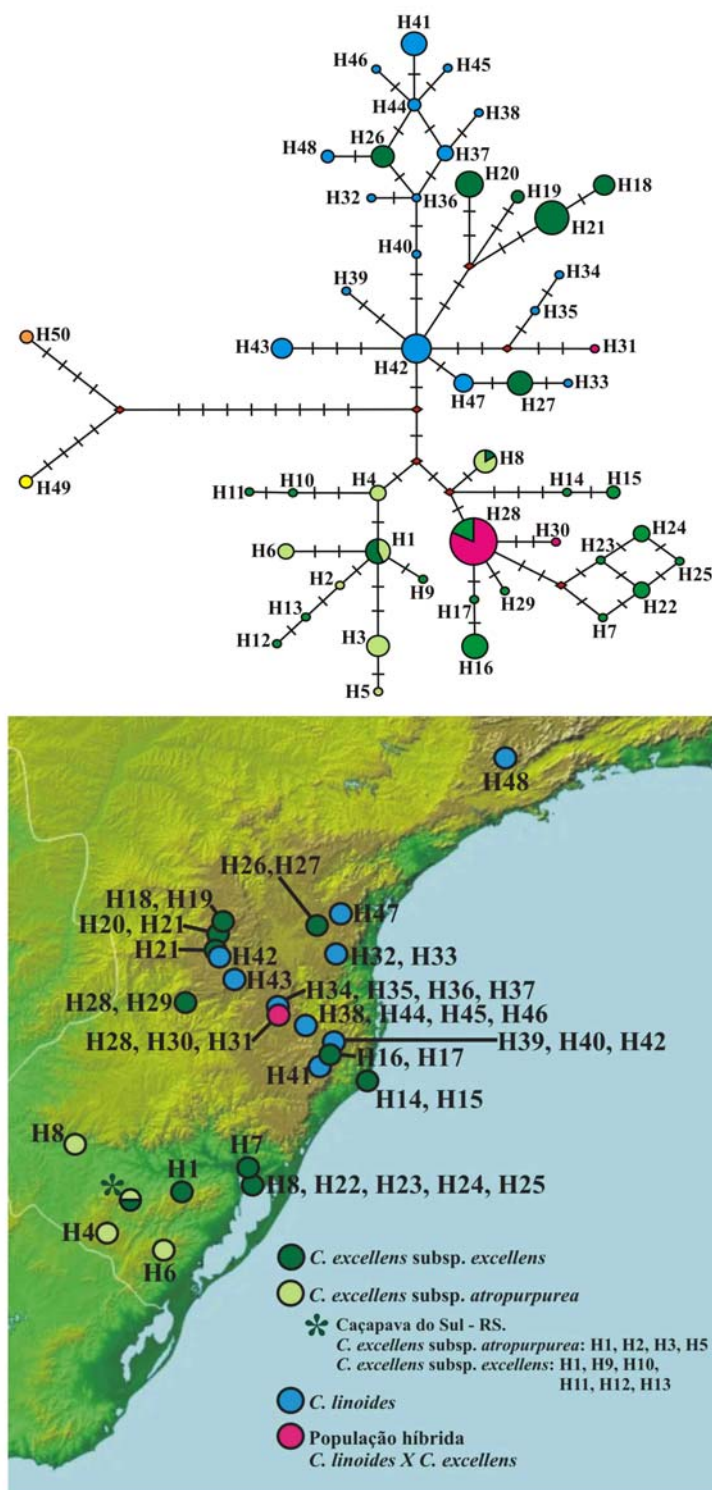


Figura 37. Network de relacionamento dos haplótipos encontrados em *C. excellens* subsp. *excellens* (em verde escuro), *C. excellens* subsp. *atropurpurea* (em verde claro), *C. linoides* (em azul) e da população híbrida entre *C. excellens* e *C. linoides* (em rosa). A localização das amostras de cada espécie ou população, bem como os haplótipos encontrados em cada uma delas, estão indicados no mapa, sendo que as cores dos locais correspondem às mesmas cores das espécies e populações. Os haplótipos H49 e H50, que não estão indicados pelas cores, correspondem, respectivamente, às espécies *C. parviflora* e *C. pygmaea*. Mais detalhes são fornecidos no texto.

Além do H26, todos os haplótipos presentes nas populações de *C. excellens* do Paraná (H18, H19, H20, H21, e H27, na Figura 37) pertencem ao clado Terras Altas (grupo destacado em vermelho, mostrado anteriormente no *network* da Figura 35), e são relacionados a haplótipos de populações de *C. linoides* próximas geograficamente. O haplótipo H27 da Figura 37 (também presente na população de Lapa) está conectado a haplótipos de *C. linoides* encontrados em Curitiba-PR, e em Campo Alegre-SC, localidades muito próximas (conforme observado na Figura 37). Os haplótipos H18, H19, H20 e H21, presentes em populações de *C. excellens* de Guarapuava e Pinhão, se relacionam ao H42, presente em uma população muito próxima de *C. linoides*, no município de Bituruna (Figura 37).

Os resultados descritos no parágrafo anterior já seriam indícios de possível hibridação entre as duas espécies, pela presença de cloroplastos relacionados a *C. linoides* em populações com morfologia típica de *C. excellens*. Porém, esta condição polifilética de *C. excellens* (introduzida na seção 4.2, e discutida ao longo do trabalho) também poderia ser explicada pela falta de caracteres diagnósticos constantes utilizados para distinguir as espécies. Neste caso, as características observadas nas populações de *C. excellens* descritas no parágrafo anterior teriam se modificado a partir do estado original observado nas populações de *C. linoides*. Esta modificação morfológica poderia ser causada pela presença de populações de ambas as espécies em locais com características ambientais similares, causando alterações morfológicas por seleção natural, ou mesmo por plasticidade fenotípica, levando a homoplasia.

Entretanto, a proximidade geográfica de populações das duas espécies com morfologias distintas não apóiam tal cenário, já que o ambiente no qual estas populações foram encontradas é o mesmo. Além disso, a distinção morfológica entre estas espécies é apoiada por características florais, que inclusive possibilitaram a identificação precisa da população híbrida encontrada.

Calibrachoa linoides possui estigma capitado, globoso ou discóideo, e a corola com fauce amarela, enquanto *C. excellens* possui estigma transversalmente lobado e corola com fauce em geral esbranquiçada. A população híbrida continha indivíduos que exibiram flores de coloração variável e estigmas de formatos intermediários, além de três indivíduos que apresentaram baixo vigor em comparação aos demais, e flores bem alteradas e esbranquiçadas (Figura 38). Foram coletados 63 indivíduos neste local, dos quais 24 foram

analisados, sendo que um deles é o indivíduo exibido na Figura 38.



Figura 38. Indivíduo coletado na população híbrida entre *C. excellens* e *C. linoides*, que apresenta flores esbranquiçadas e pouco vigor (A). Como comparação, flores típicas de *C. excellens* subsp. *excellens* (B) e *C. linoides* (C). Fotos: Jéferson N. Fregonezi.

Nesta população, foram encontrados três haplótipos. Dentre eles, o H28 foi o mais frequente, aparecendo em 22 indivíduos (inclusive no exibido na Figura 38), enquanto os indivíduos restantes exibiram os haplótipos H30 e H31 (Figura 37 e Tabela 17). Os haplótipos H28 e H30 são geneticamente próximos à população de *C. excellens* localizada no município de Xaxim-SC. O haplótipo H31 se relaciona à população de *C. linoides* encontrada em Bituruna-PR (H42) e em São Cristóvão do Sul-SC (H35 e H34)(Figura 37 e Tabela 17). Desta forma a população híbrida mostra uma composição genética bem divergente, com cloroplastos provenientes dos clados Terras Baixas e Terras Altas, tendo como parentais populações provenientes de ambas as espécies. A alta frequência de haplótipos de *C. excellens* nestes indivíduos indica também que a população que habitava o local antes do evento de hibridação era provavelmente de *C. excellens*, pois a herança plastidial em espécies de *Calibrachoa* se dá através das sementes (Derepas e Dulieu, 1992), e sua dispersão é muito limitada, pois as sementes são liberadas diretamente no solo

por ação da gravidade (Stehmann, 1999).

A constatação da existência de uma população híbrida natural entre estas espécies confirma as suspeitas baseadas na distribuição geográfica das mesmas, que possuem uma ampla área com possíveis contatos em toda a região central dos estados de Santa Catarina e do Paraná, sugerindo assim que eventos deste tipo possam ter ocorrido em outros locais. Assim, as amostras de *C. excellens* do estado do Paraná que possuem haplótipos geneticamente relacionados a *C. linooides* podem também ter sido resultado de hibridação entre estas espécies.

Como estas populações exibem morfologias típicas, a captura do cloroplasto de *C. linooides* por populações de *C. excellens* parece ser uma possibilidade plausível. O cenário hipotético seria que em um período inicial, populações de *C. linooides* dominavam a região. Em um segundo momento, o contato entre populações de *C. excellens* ocorreu, resultando nos primeiros eventos de hibridação. As populações de *C. excellens* tornaram-se mais abundantes na região, e o cruzamento dos descendentes híbridos se tornou mais frequente entre estas populações, pois o fluxo gênico através do pólen era proveniente em sua maioria de populações de *C. excellens*. No decorrer do tempo, o genoma nuclear híbrido foi substituído por genes de *C. excellens*, e a morfologia típica da espécie foi reestabelecida.

Em populações de plantas, a fixação do genoma plastidial entre diferentes espécies é facilitada pelo modo de herança deste genoma, e pela capacidade de dispersão do mesmo. Como dito anteriormente, a transmissão do cloroplasto no gênero *Calibrachoa* é através da semente, e a capacidade de dispersão das sementes é muito limitada, tornando a dispersão a longas distâncias improvável e favorecendo a manutenção do cloroplasto por um número muito grande de gerações. Assim, os eventos de hibridação não precisam ser recorrentes.

A alta estruturação populacional é comprovada quando se observam os índices de fixação Φ_{ST} calculados pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) a partir das sequências plastidiais obtidas para as amostras das espécies estudadas. Em *C. excellens*, o valor de Φ_{ST} foi de 0.79399, e para *C. linooides* o valor encontrado foi de 0.75190. Espécies relacionadas, que apresentam o mesmo padrão de herança plastidial e mecanismo de dispersão, também apresentaram valores de fixação similares, como *C. heterophylla* ($\Phi_{ST} = 0,85067$)(G. Mäder *et al.*, comunicação pessoal), *Petunia altiplana* ($\Phi_{ST}=0.72$), *P. bonjardinensis* ($\Phi_{ST}=0.77$) e *P. guarapuavensis* ($\Phi_{ST}=0.96$)(A. P. Lorenz-Lemke *et. al.*,

comunicação pessoal).

Todas as evidências discutidas nesta seção apóiam a hipótese de que eventos de hibridação independentes em períodos de tempo distintos tenham ocorrido entre espécies de *C. excellens* e *C. linoides*, levando inclusive à captura do cloroplasto de *C. linoides* por *C. excellens*. Entretanto, a confirmação destes fenômenos é realizada a partir de comparações entre filogenias de genes nucleares e plastidiais (Rieseberg e Soltis, 1991; Rieseberg *et al.*, 1996; Sang *et al.*, 1997, Okuyama *et al.*, 2004). Por este motivo, análises mais aprofundadas utilizando marcadores moleculares de diferentes genomas, em amostras mais abrangentes na região de contatos entre estas espécies tornam-se necessários para a comprovação e a análise mais detalhadas de tais eventos.

4.3.5. Variabilidade genética das espécies microendêmicas de altitude e evidências de hibridação entre espécies microendêmicas e *Calibrachoa sellowiana*

As espécies do gênero mais vulneráveis são, sem dúvida, aquelas que possuem distribuições muito restritas, encontradas em número reduzido de indivíduos e populações, habitando ambientes muito específicos. Estas espécies exibem características exclusivas, relacionadas a adaptações a estes micro-ambientes, tornando-as assim ainda mais suscetíveis (como descrito na seção 1.1.6). Nesta seção serão apresentados os resultados moleculares obtidos para algumas destas espécies, e devido ao reduzido número de amostras obtidas, muitos resultados serão meramente descritivos. Além destas descrições, evidências morfológicas e moleculares de hibridação entre duas espécies de altitude e *C. sellowiana* serão apresentados. *Calibrachoa cordifolia*, encontrada na região da Depressão Central do estado do Rio Grande do Sul não será abordada. Os três representantes coletados da espécie exibiram apenas um haplótipo, compartilhado por *C. ovalifolia*, como exposto anteriormente na seção 4.3.2.

As abordagens filogenéticas e filogeográficas no gênero mostraram que, ao contrário do encontrado para *C. cordifolia*, as espécies microendêmicas de altitude não se mostraram relacionadas aos grandes clados encontrados para as demais espécies. Um pequeno clado agrupa as espécies *C. sendtneriana* e *C. serrulata* (além de *C. spathulata*,

que embora ocorra em campos de altitude, não apresenta distribuições tão restritas), enquanto *C. eglandulata* e *C. elegans* não apresentaram relação direta com outros grupos.

Esta ausência de relacionamento com outras espécies, aliada à ocorrência em microambientes localizados em extremos de altitude, são indícios de um isolamento antigo destes grupos. Este isolamento foi resultado da fragmentação de populações antigas, que ocupavam áreas mais extensas durante os períodos glaciais, quando a formação campestre dominava a paisagem. A fragmentação destas populações em períodos interglaciais ocorreu devido ao avanço das formações florestais sobre as áreas de campo, isolando pequenas populações nas áreas mais altas, onde as formações abertas persistiram (Behling, 2002a). A localização de *C. elegans*, refugiada em alguns locais de altitude de Minas Gerais, é um bom exemplo deste isolamento, demonstrando que em algum momento do passado a distribuição geográfica dos campos, e consequentemente de populações ancestrais do gênero, atingiram a região sudeste.

Para estas espécies de altitude foram estimados índices de diversidades nucleotídica e haplotípica, baseados somente no espaçador *trnS-trnG*, para o qual um número maior de sequências foi gerado. Estes valores estão descritos na Tabela 17. Além das espécies microendêmicas, os índices também foram calculados para *C. sellowiana*.

Tabela 17. Índices de diversidades nucleotídica e haplotípica obtidos para algumas espécies de *Calibrachoa*, baseados no espaçador intergênico plastidial *trnS-trnG*. Os valores em parênteses correspondem ao desvio padrão

Espécie	Nº de indivíduos	Diversidade nucleotídica (π)	Diversidade haplotípica (Hd)
<i>C. eglandulata</i>	27	0.000198 (+/-0.000322)	0.1453 (+/-0.0898)
<i>C. elegans</i>	67	0.000040 (+/-0.000137)	0.0299 (+/-0.0287)
<i>C. sellowiana</i>	65	0.000878 (+/-0.000763)	0.5635 (+/-0.0613)
<i>C. sendtneriana</i>	40	0.000261 (+/-0.000372)	0.1897 (+/-0.0808)
<i>C. serrulata</i>	19	0.000925 (+/-0.000820)	0.6023 (+/-0.0881)

Calibrachoa elegans apresentou índices de diversidade extremamente baixos com o espaçador *trnS-trnG* em comparação às demais. Para esta espécie foram obtidas sequências de ambos os marcadores empregados nas análises filogeográficas do restante do gênero (espaçadores *trnH-psbA* e *trnS-trnG*). Em 67 sequências obtidas para a espécie (do total de 84 indivíduos coletados) foram encontrados somente dois haplótipos, que diferiram em

uma substituição na posição 134 do espaçador *trnS-trnG*, sendo que um deles foi encontrado somente em um indivíduo. Esta falta de variação observada na espécie pode indicar um recente aumento no tamanho populacional, após uma severa redução no número de indivíduos destas populações, eliminando as possíveis variações existentes. Esta espécie possui adaptações exclusivas ao clima da região, que apresenta regime de chuvas rigoroso, com quatro meses de estação seca. Estas condições ambientais severas, aliadas às oscilações no tamanho das áreas de distribuição da espécie podem ser uma das explicações para a falta de variação encontrada nestas populações.

Calibrachoa eglandulata juntamente com *C. sendtneriana* também apresentaram índices de diversidade baixos, quando comparadas às demais espécies, mas bem maiores que os apresentados por *C. elegans*. Estes valores poderiam ser interpretados como resultado de oscilações no tamanho populacional, o que seria esperado, por se tratar de espécies de distribuição restrita. Já *C. serrulata* apresentou os maiores níveis de diversidade entre as espécies comparadas, mesmo entre *C. sellowiana*, que não é considerada uma espécie microendêmica. Considerando que este número amostrado seja representativo, estes valores sugerem que, entre as quatro espécies microendêmicas analisadas, *C. serrulata* seja a que apresentou uma maior estabilidade populacional ao longo do tempo. Porém, estes valores elevados podem ser resultado do baixo número de sequências analisadas, ou mesmo resultado de efeitos estocásticos, e não reflita necessariamente processos históricos sofridos pela espécie, mesmo que tenham sido incluídas todas as amostras conhecidas até o momento para esta espécie, a mais rara do gênero.

Além da condição microendêmica apresentada por esta espécie, *C. serrulata* juntamente com *C. sendtneriana* são as únicas espécies do gênero que são polinizadas por beija-flores, ocorrendo em simpatria em microambientes na borda do Planalto Catarinense. Como exposto pelas análises filogenéticas e filogeográficas, estas duas espécies mostram-se intimamente relacionadas. As amostras utilizadas na construção do *network* do gênero revelaram que *C. serrulata* não possui haplótipos exclusivos, sendo que os dois haplótipos encontrados na espécie são compartilhados com *C. sendtneriana* e *C. sellowiana*.

O compartilhamento de haplótipos entre *C. sendtneriana* e *C. serrulata* seria explicado por retenção de polimorfismos ancestrais, evidenciado pela proximidade

genética entre estes haplótipos, pelas características morfológicas compartilhadas entre as duas espécies e distribuição simpátrica em locais restritos de altitude. A distinção entre elas, além das cores divergentes exibidas pelas flores (como pode ser visto na Figura 5, seção 1.1.5), é basicamente a ocupação de microhabitats bem diferentes nas áreas da borda do planalto. *Calibrachoa sendtneriana* é encontrada associada às matas nebulares e cursos d'água, enquanto *C. serrulata* ocupa exclusivamente os paredões rochosos do limite dos aparados. Desta forma, a síndrome ornitófila parece ser um caráter presente no ancestral das duas espécies e agora compartilhado, sendo que a diferença entre os substratos habitados por elas garante o seu isolamento.

Porém, o compartilhamento de haplótipos encontrados entre estas espécies e *C. sellowiana* parece ser resultado de hibridação entre estas três espécies. As informações sobre os locais de coleta, indivíduos analisados e haplótipos encontrados em cada local estão na Tabela 18. O *network* exibindo a relação dos haplótipos encontrados entre estas espécies e a localização geográfica das amostras são mostrados na Figura 39.

A área de hibridação das três espécies está restrita a uma pequena faixa de cerca de 5 km de distância, no Cânion da Serra do Rastro, em Bom Jardim da Serra-SC. O haplótipo H2, relacionado à espécie *C. sellowiana* e encontrado nas duas populações mais próximas desta área (Sell4 e Sell5, na Figura 39) foi encontrado também em três indivíduos de *C. sendtneriana* (no local denominado Send1 na Figura 39) e em um indivíduo de *C. serrulata* (identificado como Serr2 na Figura 39). Haplótipos relacionados à *C. sendtneriana* (H4 e H5) encontrados nesta espécie em indivíduos do Cânion do Funil (denominados Send 4 e Send5 na Figura 39) foram também encontrados em quatro indivíduos de *C. sellowiana* (população Sell5 na Figura 39).

Nesta pequena área, a hibridação entre estas espécies resultou na transferência dos haplótipos em diferentes direções (como mostrado pelos traços da Figura 39), indicando que não há como saber quais vetores de polinização (abelhas ou beija-flores) não discriminaram as flores das espécies. A visitação indiscriminada de qualquer um deles (ou dos dois) poderia causar tais eventos.

Tabela 18. Informações sobre os locais de coleta das amostras de *Calibrachoa sellowiana*, *C. sendtneriana* e *C. serrulata* utilizadas na construção do *network* de haplótipos da Figura 39

Espécie	Nome da localidade	Local de Coleta	Coordenadas Geográficas	Indivíduos analisados	Haplótipos Encontrados
<i>Calibrachoa sellowiana</i>	Sell1	Estrada secundária a partir da rodovia RS020, cerca de 7km ao sul de Cambará do Sul. Cambará do Sul - Rio Grande do Sul	29 05' 32.79583"S 50 11' 18.57672"W	1	H1
	Sell2	Rodovia BR 116 entre Monte Castelo e Santa Cecília, a cerca de 20km de Santa Cecília. Santa Cecília - Santa Catarina	26 49' 16.30910"S 50 21' 20.68088"W	1	H1
	Sell3	Rodovia BR 116 entre Santa Cecília e Ponte Alta do Norte, na saída da cidade de Santa Cecília. Santa Cecília - Santa Catarina	26 58' 12.63631"S 50 24' 24.12134"W	1	H1
	Sell4	Estrada Urubici-São Joaquim, km 67 a 5km do trevo para São Joaquim. São Joaquim - Santa Catarina	28 12' 53.52450"S 49 47' 29.33191"W	3	H2
	Sell5	Borda Norte do Cânion da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 23' 06.97198"S 49 32' 38.48550"W	12	H2, H3, H4, H5
<i>Calibrachoa sendtneriana</i>	Send1	Mata nebulosa a cerca de 3km ao sul da estrada da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 24' 47.85255"S 49 33' 50.56145"W	3	H2
	Send2	Estrada Serra do Rio do Rastro-Bom Jardim da Serra. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 22' 31.19970"S 49 33' 38.09984"W	2	H6, H7
	Send3	Curso d'água com afloramentos rochosos, próximo ao Cânion do Funil. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 21' 13.78822"S 49 34' 25.06003"W	12	H8, H9
	Send4	Afloramento rochoso no caminho para o cânion do Funil. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 20' 48.23857"S 49 33' 33.61311"W	3	H5, H10
	Send5	Borda sul no início do Cânion do Funil. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 20' 47.09917"S 49 32' 51.91871"W	3	H5
<i>Calibrachoa serrulata</i>	Serr1	Borda Norte do Cânion da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 23' 09.40649"S 49 32' 41.28241"W	1	H7
	Serr2	Borda Norte do Cânion da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 23' 16.02203"S 49 32' 38.27790"W	1	H2
	Serr3	Paredão rochoso no aparado próximo ao pico do cabo aéreo. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 21' 46.52190"S 49 33' 05.22461"W	1	H7

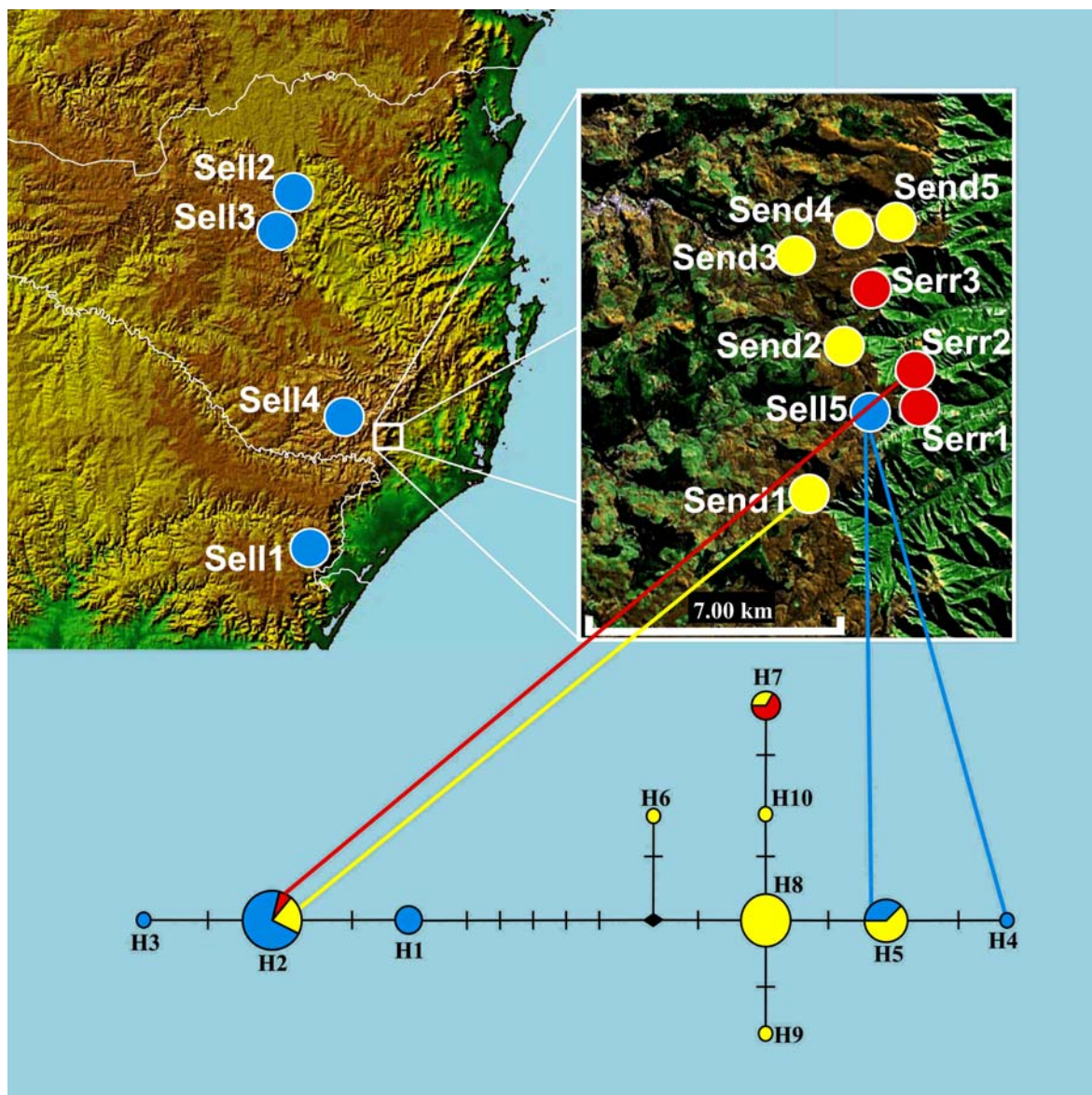


Figura 39. Localização geográfica das amostras de *C. sellowiana* (círculos em azul), *C. sendtneriana* (círculos em amarelo) e *C. serrulata* (círculos em vermelho), e o *network* de relacionamento de haplótipos obtido para estas amostras. No *network*, as cores encontradas nos círculos (haplótipos) correspondem às espécies de mesma cor no mapa. Círculos preenchidos por mais de uma cor indicam que estes haplótipos são compartilhados entre as espécies, sendo que a proporção que as cores ocupam são relativas à frequência de ocorrência do haplótipo em cada uma das espécies. Os traços ligam os haplótipos compartilhados aos locais onde os indivíduos foram encontrados.

Como discutido em diferentes seções ao longo do trabalho, estes haplótipos compartilhados são muito divergentes entre si, pois *C. sellowiana* se relaciona geneticamente ao clado Terras Baixas. Sua distribuição no Planalto Catarinense parece ter sido resultado de expansões recentes de populações ancestrais deste clado para as regiões de altitude de Santa Catarina, sendo que a espécie é muito abundante em praticamente toda a extensão do Planalto.

Os índices de diversidade encontrados em *C. sellowiana* (Tabela 18) parecem indicar uma expansão populacional recente. Valores relativamente altos de diversidade haplotípica, acompanhados de valores de diversidade nucleotídica baixos, podem ser interpretados como uma expansão populacional recente a partir de uma população pequena, já que houve tempo para formação de novos haplótipos, mas não o suficiente para o acúmulo de muitas diferenças nas seqüências (Avise, 2000). Índices de neutralidade foram calculados nesta espécie, na tentativa de detectar possíveis eventos de expansão populacional, mas os resultados dos testes não foram significativos.

Além do compartilhamento de haplótipos, alguns indivíduos de morfologia híbrida entre as três espécies foram encontrados em alguns pontos ao longo da área de distribuição das espécies, como pode ser visto na Figura 40. Estes indivíduos, entretanto, não fizeram parte da análise mostrada anteriormente.

Estes eventos de hibridação, se confirmados, podem ser considerados um risco à integridade das espécies microendêmicas envolvidas, já que o número de indivíduos e populações de *C. sellowiana* presentes na região é muito maior que o das espécies microendêmicas. Como exposto na seção 1.3.4, as duas principais consequências genéticas para as espécies microendêmicas seriam assimilação genética (se os híbridos formados forem viáveis, possibilitando a introgressão de genomas nucleares), ou depressão exogâmica (caso a progênie híbrida seja estéril ou tiver o vigor reduzido) (Ellstrand e Elam, 1993; Levin, 1996).

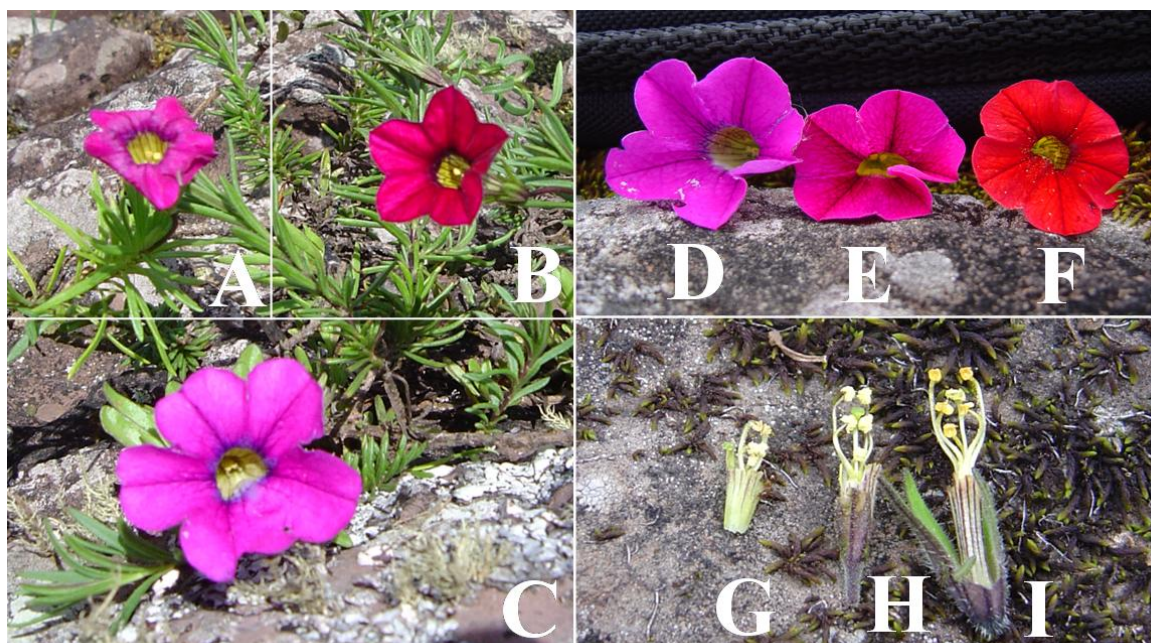


Figura 40. Flores de indivíduos híbridos entre espécies de *Calibrachoa* que ocorrem na borda do Planalto Catarinense. (A) Híbrido entre as espécies *C. serrulata* (B) e *C. sellowiana* (C). As letras E e H mostram, respectivamente, a coloração e a morfologia dos estames apresentados pelo híbrido entre as espécies. *C. sellowiana* (em D e G) e *C. sendtneriana* (F e I). Fotos: Jéferson N. Fregonezi.

4.4. Datação dos principais clados encontrados

A taxa de substituição nucleotídica que foi utilizada, baseada na divergência da linhagem de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* ($2,8 \times 10^{-9}$ substituição/sítio/ano, equivalente a 0,56% de divergência das sequências por milhão de anos) (A. P. Lorenz-Lemke *et al.*, comunicação pessoal) é semelhante às taxas encontradas em outros trabalhos com grupos vegetais. Alsos *et al.* (2005) encontraram valores entre 0,26% e 0,92% de divergência nos espaçadores entre os genes plastidiais *trnL-F* e *trnS-G* na espécie *Vaccinium uliginosum*. Em um levantamento realizado por Wolfe *et al.* (1987) foram encontrados valores entre 0,22% e 0,58% de divergência para sítios considerados de evolução neutra em diferentes espécies de plantas. A árvore com as datas obtidas para os principais clados encontrados é mostrada na Figura 41. A idade calculada para o ancestral comum mais recente do gênero foi de 1,63 milhões de anos, demonstrando que se trata de um gênero extremamente recente.

A taxa de especiação encontrada para todo o gênero foi de 2,01 espécies por milhão de anos (esp/M.A). As taxas calculadas separadamente para os clados Terras Baixas e Terras Altas foram de 2,26 esp/M.A e 2,30 esp/M.A, respectivamente. Comparado a outros grupos vegetais, *Calibrachoa* parece ser um dos gêneros de diversificação mais recente, com valores maiores que os documentados para grupos vegetais de radiação em ilhas, como gêneros de Asteraceae do Havaí (0,56 esp/M.A; Baldwin e Sanderson, 1998) e espécies de *Echium* de ilhas da costa africana (Böhle *et al.*, 1996). O gênero *Hordeum*, também considerado de especiação rápida, exibiu uma taxa bem menor, 0,42 esp/M.A (Jakob e Blattner, 2006).

Entre grupos de plantas sul-americanos que também habitam regiões de altitude, valores semelhantes foram encontrados, como nos gêneros andinos *Gentianella* (1,71 – 3,20 esp/M.A; vonHagen e Kadereit, 2001) e *Valeriana* (0,8-1,34 esp/M.A; Bell e Donaghue, 2005). O gênero *Lupinus*, considerado o exemplo mais extraordinário de diversificação de espécies documentado, exibiu valores entre 2,50 e 3,72 esp/M.A (Hughes e Eastwood, 2006), que não são muito maiores que os encontrados em *Calibrachoa*.

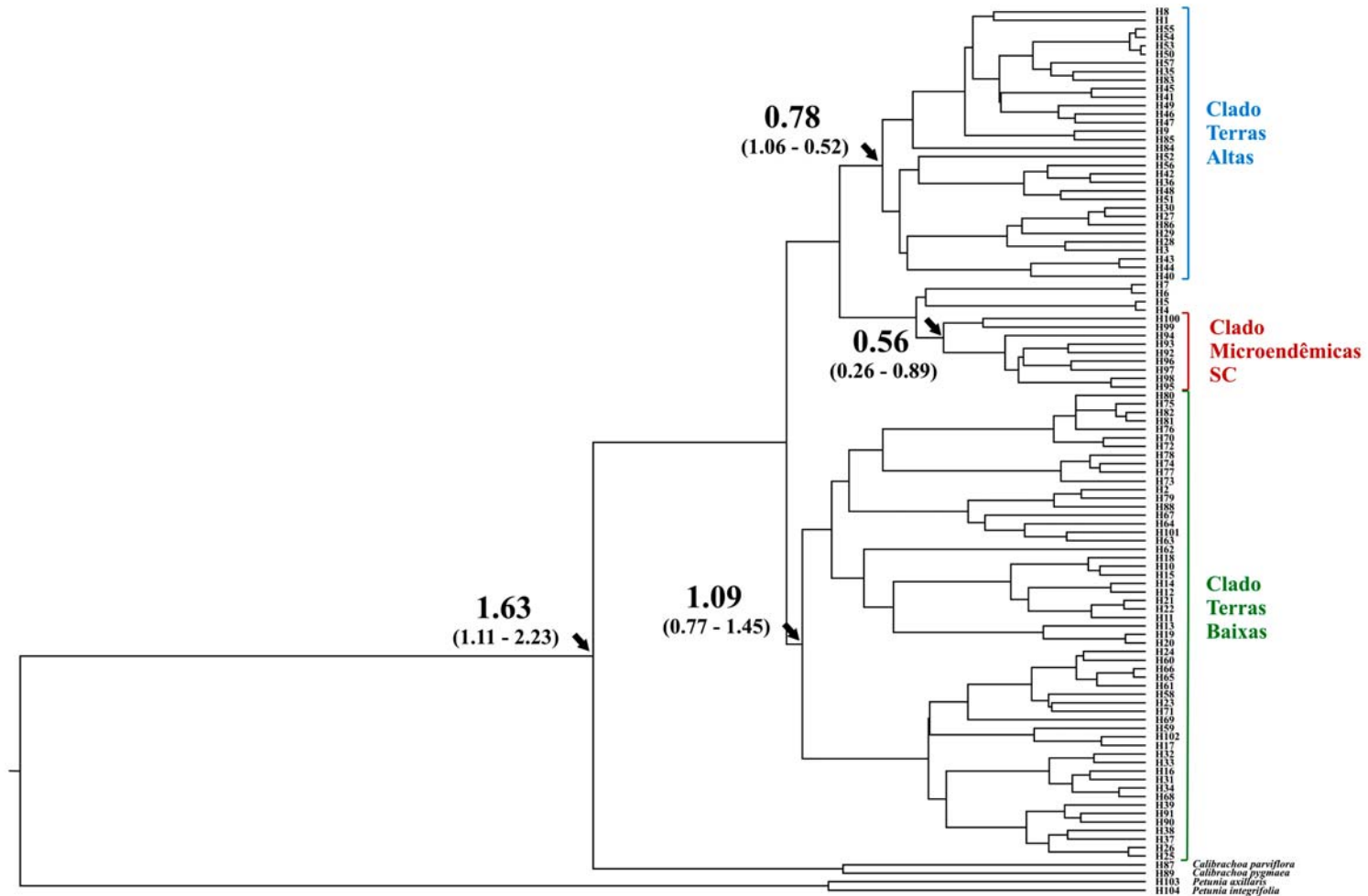


Figura 41. Árvore alvo (*target tree*) do tipo máxima credibilidade de clados (*Maximum clade credibility*), com as idades dos ancestrais comuns mais recentes (t_{MRCAs}) do clado formado pelas espécies amostradas do gênero *Calibrachoa*, bem como para os Clados Terras Baixas, Terras Altas e Microendêmicas SC. O nomes dos terminais indicam os haplótipos utilizados na construção dos *networks* apresentados. Os valores indicados são expressos em milhões de anos. Valores entre parênteses indicam os limites de idade dentro do intervalo de confiança de 95%.

As análises filogenéticas e filogeográficas também revelaram a rápida divergência morfológica exibida pelas espécies do gênero, apesar da pequena variação encontrada nos marcadores utilizados. As árvores filogenéticas apresentaram ramos curtos e baixos valores de suporte, mesmo utilizando marcadores que exibiram grande variação em outros grupos, sendo utilizados inclusive em análises populacionais (Hamilton *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Bettin *et al.*, 2007), como o espaçador *trnH-psbA*, considerado o mais variável entre os segmentos plastidiais utilizados em diferentes trabalhos (Sang *et al.*, 1997; Kress *et al.*, 2005). A ausência de variação do íntron b/c do gene mitocondrial *nad1*, e do espaçador nuclear ITS, amplamente utilizados em estudos filogenéticos no nível genérico (Marshall *et al.*, 2001) e em gêneros próximos, como *Nierembergia* (Tate *et al.*, 2009), também confirmam a rápida radiação em *Calibrachoa*.

Nas abordagens filogeográficas foi constatado um grande número de haplótipos compartilhados entre espécies dos clados, além da presença de haplótipos divergentes entre elas, demonstrando que genomas plastidiais ancestrais estavam presentes em diferentes espécies. Considerando a idade dos clados, esta manutenção de polimorfismos ancestrais é esperada, pois como relatado no gênero *Hordeum*, haplótipos ancestrais persistiram entre grupos por até quatro milhões de anos (Jakob e Blattner, 2006). Para o gênero *Senecio* foram estimados tempos de sobrevivência de haplótipos de 440 mil anos (Comes e Abbott, 2001). Grandes alterações nos ambientes ocupados pelas espécies de *Calibrachoa* em períodos geológicos recentes podem explicar esta rápida divergência encontrada no grupo, como descrito a seguir.

4.5. O contexto biogeográfico

O gênero *Calibrachoa*, assim como o grupo-irmão *Petunia*, pertence à tribo Nicotianeae, que possui ainda outros sete gêneros distribuídos pelo Continente Americano. Considerando a proximidade entre estes gêneros e a distribuição geográfica dos mesmos pela América do Sul, podemos considerar que *Calibrachoa*, assim como *Petunia*, possui ancestrais de origem andina. Dos nove gêneros pertencentes à tribo, o gênero *Nicotiana* ocorre na América do Sul, América do Norte e Austrália, sendo que somente uma seção, *Nicotiana* sect. *Alatae* ocorre no pampa e nos planaltos do sul e sudeste do Brasil.

Bouchetia é encontrada na América do Sul e na América do Norte. Outros cinco gêneros são andinos (*Benthamiela*, *Combera*, *Fabiana*, *Latua* e *Pantacantha* Speg.), e *Nierembergia* ocorre exclusivamente no pampa (D'Arcy, 1991).

Outras evidências desta origem andina são trabalhos fitogeográficos que mostram conexões entre as floras destes locais, principalmente nas regiões de altitude do sul e sudeste do Brasil. Rambo (1951, 1953, 1956) observou muitas características andinas nas terras altas do sul do Brasil. Safford (2007), em uma comparação florística de diferentes locais da América do Sul, encontrou grande similaridade entre gêneros dos Aparados da Serra de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e dos Campos de Altitude do Sudeste, com gêneros de origem temperada. A possível rota de colonização a partir dos Andes pode ter incluído as regiões do Paraguai e da bacia do rio Paraná. Spichiger *et al.* (2004) encontrou conexões entre muitas espécies na Colômbia e na bacia do rio Paraná, indicando que uma possível “ponte” que já existiu ou ainda existe entre estes locais.

Outra evidência que poderia ser considerada é a distribuição geográfica de *C. parviflora* e *C. pygmaea* (inseridas em um clado bem divergente das demais espécies do gênero) em regiões mais ao sul, enquanto que as demais espécies, de divergência mais recente, se distribuem em regiões subtropicais, atingindo inclusive a região sudeste do Brasil.

As duas espécies citadas anteriormente são bem distintas do restante do gênero. As idades apresentadas para os clados evidenciam que estas espécies divergiram das demais há cerca de 500.000 anos, um intervalo de tempo considerável se comparado à idade do gênero (1,63 milhões de anos). Este tempo parece ter sido suficiente para o isolamento total entre estes grupos, como confirmado por experimentos de cruzamento (Watanabe *et al.*, 1997).

Muitas outras características diferenciam substancialmente *C. parviflora* e *C. pygmaea* das demais, como a morfologia das sementes (Watanabe *et al.*, 1999), o conteúdo de DNA nuclear (Mishiba *et al.*, 2000) e aspectos da anatomia foliar (Reis *et al.*, 2002) que foram detalhados na seção 1.1.3. Algumas destas diferenças podem ter sido acentuadas pelo longo período de isolamento, aliadas a adaptações associadas com as estratégias reprodutivas, relacionadas ao ciclo de vida anual. Em *C. parviflora*, o genoma nuclear significativamente menor, o pequeno tamanho das sementes e o hábito herbáceo podem ser adaptações à condição autógama desta espécie, que possui uma maior capacidade de

dispersão de sementes e, assim, a maior e mais discrepante distribuição geográfica do gênero.

Calibrachoa pygmaea é distinta das demais por apresentar polinização por mariposas, além das características compartilhadas com *C. parviflora* e apresentadas acima. Todas estas diferenças, juntamente com as informações moleculares podem sugerir que as duas espécies devam ser tratadas como um grupo taxonomicamente distinto. Stehmann (1999) já havia proposto a criação de um gênero para *C. pygmaea*, baseado no tipo de prefloração, que é um caráter importante neste grupo. A separação entre os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* é apoiada principalmente pela diferença na prefloração e o número cromossômico, entre outros caracteres morfológicos secundários. Entretanto, uma inconsistência na classificação entre possíveis gêneros será criada se ambas as espécies forem consideradas como pertencentes a um gênero distinto (caso seja atribuído o mesmo peso a estes caracteres diagnósticos). *Calibrachoa parviflora* possui número cromossômico e prefloração iguais às demais espécies de *Calibrachoa*, enquanto *C. pygmaea* possui prefloração imbricada (como *Petunia*) e número cromossômico de *Calibrachoa*. Desta forma, a sugestão seria recombinar estas espécies para um subgênero em *Calibrachoa*, atribuindo um peso maior às diferenças cromossômicas (além daquelas citadas acima) e às evidências moleculares.

Com relação às espécies restantes, a grande divergência morfológica encontrada parece ter sido direcionada principalmente pelo isolamento de populações em diferentes ambientes, influenciado por alterações climáticas que modificaram a composição da paisagem natural, alterando também a distribuição dos organismos presentes. Estas alterações foram influenciadas pelos ciclos glaciais e interglaciais ocorridos em períodos geológicos recentes. Considerando as idades estimadas para os grandes clados (0.78 milhões de anos para o clado Terras Altas e 1.09 milhões de anos para o clado Terras Baixas) pode-se supor que pelo menos nove períodos glaciais e interglaciais alternados influenciaram na diversificação do grupo (Augustin *et al.*, 2004).

Durante os períodos glaciais, caracterizados por climas frios e secos na América do Sul, grandes áreas, que atualmente são ocupadas por Floresta Semidecidual no sul e sudeste do Brasil, eram cobertas por campos, que se estenderam ao menos 750 km ao norte, a partir do limite entre campos e florestas encontrado atualmente. Os remanescentes de Floresta Ombrófila Mista encontrados atualmente na região sudeste indicam a

ocorrência de um clima mais frio no passado, quando provavelmente as araucárias ocupavam os vales ao longo dos cursos d'água. Nos planaltos do sul, onde hoje existem grandes áreas de Floresta Ombrófila Mista, a vegetação de campos era dominante. Nos períodos interglaciais, entretanto, a distribuição dos tipos de vegetação era semelhante à encontrada nos dias de hoje, onde o aquecimento gradual possibilitou a expansão da floresta sobre as vegetações campestres, restringindo-as às regiões mais altas onde o clima frio ainda persiste. Desta forma, a paisagem das regiões tropical e subtropical foi dominada por florestas, onde áreas cada vez mais restritas de campo formaram refúgios de vegetação aberta, como observado atualmente em regiões de altitude do sul e sudeste do Brasil (Behling, 1995; Behling, 1997b; Behling, 2002a,b; Behling e Lichte, 1997; Behling e Pillar, 2007).

Já nas terras baixas do Rio Grande do Sul, a cobertura de campos existiu durante períodos glaciais e interglaciais, e as modificações observadas ocorreram entre a composição dos organismos que ocupam estas áreas. As florestas de galeria encontradas atualmente apareceram no registro palinológico somente há cerca de 5000 anos (Behling *et al.*, 2005; Behling e Pillar, 2007).

Desta forma, os campos eram abundantes durante os períodos mais frios, ficando restritos às regiões mais altas durante os períodos interglaciais. Estes ciclos de expansão e retração das formações de campo e floresta acabaram também alterando várias vezes a distribuição das populações de *Calibrachoa*. Populações que possuíam uma distribuição maior em climas frios acabaram se fragmentando em períodos mais quentes, sendo que pequenas diferenças ambientais encontradas nos locais mais restritos levaram a alterações adaptativas, produzindo pequenas diferenças entre os conjuntos de indivíduos que se isolaram. Nas áreas de extrema altitude, onde a vegetação de campo é permanente, podem ter ocorrido eventos subsequentes de conexão e interrupção das regiões abertas entre sucessivas fases glaciais e interglacias. Como resultado estas ilhas de campo, com habitats úmidos estáveis, podem ter abrigado espécies mais antigas, como as espécies de *Calibrachoa* microendêmicas, que permaneceram ali desde períodos anteriores, além de linhagens novas que conseguiram atingir estas áreas em fases mais recentes, como pode ser o caso de *C. sellowiana*.

Nas regiões montanhosas, estes efeitos podem ter sido mais acentuados que nas regiões mais planas. Durante os períodos interglaciais, mais quentes e úmidos, a variação na topografia forneceu uma infinidade de microambientes ao longo dos mosaicos de vegetação florestal e campestre, e as populações originadas de subdivisões entre espécies podem ter evoluído independentemente, influenciadas por microhabitats distintos (Hewitt, 2000).

Todos estes episódios, ocorridos sucessivamente, pelo menos nove vezes ao longo do último milhão de anos, resultou na diversificação observada atualmente nas espécies do gênero *Calibrachoa*. A presença de espécies microendêmicas não relacionadas às demais espécies do gênero nas regiões de altitudes extremas da região sul e sudeste confirmam a permanência de refúgios isolados por períodos de tempos relativamente longos, contendo diferentes microhabitats, mesmo em regiões relativamente próximas, como no caso das terras altas de Santa Catarina. No caso de *C. elegans*, o sistema planta-polinizador está isolado, já que outras populações de *Hexanthera missionica* só são encontradas na região sul. A presença de autapomorfias na maioria das espécies microendêmicas indica que, além do isolamento, os microambientes singulares levaram a adaptações bem diferentes das encontradas no restante do gênero. A ausência de tricomas glandulares e a tolerância à sombra em *C. eglandulata*, e a síndrome de polinização ornitófila em *C. sendtneriana* e *C. serrulata* são exemplos de adaptações exclusivas desenvolvidas nestas espécies. *Calibrachoa elegans* também possui diversas adaptações ao regime de chuvas rigoroso que é encontrado na região de ocorrência da espécie.

As outras espécies também apresentam adaptações relacionadas aos ambientes em que ocorrem, porém estas são menos pronunciadas. Nos campos gerais do Paraná, por exemplo, a espécie *C. duseinii*, também restrita a uma pequena área isolada originalmente por Floresta Ombrófila Mista, não apresenta grandes modificações morfológicas em comparação com outras espécies que ocorrem na região, como *C. linoides*. As características que a distinguem das demais parecem ter evoluído de uma maneira mais aleatória, e não por pressões seletivas muito pronunciadas. Entretanto, outra possibilidade para esta relativa ausência de diferenciação pode ser o isolamento recente destas populações. Inclusive, a floresta ainda continuou se expandindo nos últimos 1000 anos, reduzindo cada vez mais as áreas de vegetação de campos (Behling, 2002a; Behling e Pillar, 2007).

A região de baixa altitude do Rio Grande do Sul e Argentina não foi afetada tão intensamente pelas expansões das formações florestais sobre os campos, mas também apresenta um grande número de espécies. Nesse caso a grande diversificação pode estar associada aos tipos de substrato e a um número maior de polinizadores, pois se observa uma grande diferenciação das cores das flores associada às regiões em que as espécies ocorrem. Espécies são encontradas habitando preferencialmente solos arenosos (como *C. heterophylla*, *C. thymifolia* e *C. linearis*), solos alagados ou úmidos (como *C. pygmaea*) ou latossolos (*C. excellens*), sendo que a maioria pode ser encontrada em afloramentos rochosos. Observa-se que enquanto a maioria das espécies adaptadas à polinização por abelhas possui flores de cores magenta ou púrpura, na região que compreende desde a Serra do Sudeste até o extremo oeste do estado do Rio Grande do Sul, flores claras (brancas ou rosadas) e flores com um anel purpúreo são observadas, sugerindo que diferentes polinizadores existam na região, o que pode ser um fator de isolamento entre as espécies.

Alguns eventos de expansão observados entre algumas espécies parecem ter ocorrido em diferentes momentos da história do gênero. O estabelecimento de populações de *C. linoides* na região sudeste parece não ter ocorrido ao mesmo tempo em que *C. elegans* se estabeleceu. A espécie microendêmica não exibe uma relação genética próxima com outras espécies, assim como as demais espécies microendêmicas de altitude. Já a população de *C. linoides* exibe haplótipos muito próximos geneticamente aos encontrados em populações do sul.

Outra expansão recente, ocorrida provavelmente após o estabelecimento de muitas espécies, foi a de populações do denominado clado Terras Baixas até as regiões de Santa Catarina, a partir de populações ancestrais relacionadas à espécie *C. excellens*. Este evento, que resultou na provável divergência e especiação de *C. sellowiana*, pode ser uma explicação para esta exceção observada entre a relação de clados e regiões geográficas, estabelecida a partir das análises filogenéticas. A hibridação entre espécies deste clado e espécies de altitude de Santa Catarina também parece ser um evento relacionado à expansão destas populações para as regiões de altitude. A própria hibridação entre estas espécies sugere que estes eventos sejam relativamente recentes, pois embora estas hibridações entre populações naturais de *Calibrachoa* sejam possíveis, sua frequência em populações naturais até então era pouco documentada. A expansão recente, neste caso,

pode ter quebrado possíveis barreiras de isolamento, que já estavam estabelecidas entre as espécies que habitavam a região anteriormente. Testes para confirmar esta expansão, como cálculo de índices de diversidade, inferências sobre o tamanho efetivo populacional ao longo do tempo (utilizando abordagem Bayesiana) foram realizados, porém os resultados obtidos não apresentaram suporte estatístico.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Este foi o primeiro trabalho que utilizou dados de sequência de DNA na investigação das relações evolutivas entre espécies do gênero. Os resultados revelaram uma extrema divergência morfológica com baixa diferenciação genética, sendo que a taxa de especiação encontrada é comparável a grupos de rápida radiação em ilhas. Os marcadores empregados nas análises filogenéticas, amplamente utilizados em estudos similares com outros organismos, não mostrou variação suficiente para resolver relacionamentos entre espécies próximas. Assim, uma abordagem filogeográfica foi realizada, para acessar o relacionamento entre espécies do grupo através de *networks* de haplótipos. Este tipo de metodologia foi desenvolvido para investigar relações intra-específicas, mas já foi utilizado em outros trabalhos com espécies que apresentam baixa divergência genética, onde o número elevado de mutações recentes gera pouca resolução nas filogenias.

A grande diversidade morfológica provavelmente foi resultado da alteração das áreas de distribuição das espécies, influenciadas pelas mudanças climáticas ocorridas ao longo dos ciclos glaciais e interglaciais do último milhão de anos. O emprego de marcadores moleculares de evolução mais rápida (incluindo outros genomas) e investigações no nível populacional podem trazer informações mais detalhadas sobre os mecanismos que deram origem a esta grande variação morfológica em um intervalo de tempo extremamente curto. O possível estudo de genes responsáveis pela diferenciação floral, aliado a observações de campo, seria uma contribuição valiosa ao entendimento destes processos.

Este estudo também revelou que a mudança recorrente na área de distribuição resultou em áreas de simpatria entre espécies já estabelecidas e espécies mais recentes, criando zonas potenciais de hibridação, que foram detectadas pelas análises. Conforme discutido anteriormente, estes eventos envolvem inclusive espécies microendêmicas de altitude, que podem estar geneticamente ameaçadas, caso haja a comprovação desta perda de isolamento reprodutivo. Os marcadores utilizados, de herança uniparental, não são adequados para investigar tais fenômenos, mas forneceram as evidências que servirão de ponto de partida para estudos posteriores, com moléculas que exibam variação suficiente e possam definir os parentais envolvidos nestes processos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E 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.
- Almeida FFM, Neves BBB e Carneiro CDR (2000) The origin and evolution of the South American Platform. *Earth Sci Rev* 50:77-111.
- Alsos IG, Engelskjøn T, Gielly L, Taberlet P e Brochmann C (2005) Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species. *Mol Ecol* 14:2739-2753.
- Ando T e Hashimoto G (1993) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 111: 265-280.
- Ando T e Hashimoto G (1994) A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from the Serra da Mantiqueira. *Brittonia* 46: 340-343.
- Ando T e Hashimoto G (1995) *Petunia guarapuavensis* (Solanaceae): a new species from planalto of Parana and Santa Catarina, Brazil. *Brittonia* 47: 328-334.
- Ando T e 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, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E e Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96: 289-297
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watanabe H, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E e Kitching IJ (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88: 403-413.
- Ando T, Ueda Y e Hashimoto G (1992) Historical survey and present status of systematics in the genus *Petunia* Jussieu (Solanaceae). *Tech Bull Fac Hort Chiba Univ* 45:17-26.
- Anne C (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127:101-120.

- APG (1998) An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann Mo Bot Gard* 85: 531–553.
- APG II (2003) An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc* 141: 399-436.
- Augustin L, Barbante CE e Barnes PRF (2004) Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature* 429: 623-628.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, London, 447 pp.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel, JE, Reeb CA e Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18:489-522.
- Bakker FT, Culham A, Gomez-Martinez R, Carvalho J, Compton J, Dawtre R e Gibby W (2000) Patterns of nucleotide substitution in angiosperm cpDNA *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) regions. *Mol Biol Evol* 17: 1146-1155.
- Baldwin BG e Sanderson MJ (1998) Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance (Compositae). *PNAS* 95: 9402-9406.
- Bandelt HJ, Forster P e Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Bayer RJ and Starr JR (1998) Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacer. *Ann Mo Bot Gard* 85: 242-256.
- Behling H (1995) Investigations into the Late Pleistocene and Holocene history of vegetation and climate in Santa Catarina (S Brazil). *Veg Hist Archaeobot* 4:127-152.
- Behling H (1997a) Late Quaternary vegetation, climate and fire history from the tropical mountain region of Morro de Itapeva, SE Brazil. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 129: 407-422.
- Behling H (1997b) Late Quaternary vegetation, climate and fire history in the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais (Paraná) S. Brazil. *Rev Palaeobot Palynol* 97: 109-121.

- Behling H (2002a) Carbon storage increases by major forest ecosystems in tropical South America since the Last Glacial Maximum and the early Holocene. *Glob Planet Change* 33:107-116.
- Behling H (2002b) South and southeast Brazilian grasslands during late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177: 19-27.
- Behling H e Lichte M (1997) Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical Southeastern Brazil. *Quat Res* 48: 348-358.
- Behling H e Negelle RRB (2001) Late Quaternary tropical rain forest and climate dynamics from the Atlantic lowland in southern Brazil. *Quat Res* 56: 383-389.
- Behling H e Pillar VD (2007) Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the southern Brazilian highland and their implication for conservation and management of modern Araucaria forest and grassland ecosystems. *Phil Trans R Soc B* 362: 243-251.
- Behling H, Bauermann SG e Neves PC (2001) Holocene environmental changes from the São Francisco de Paula region, southern Brazil. *J South Am Earth Sci* 14: 631-639.
- Behling H, Pillar V, Orlóci L e Bauermann SG (2004) Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 203: 277-297.
- Behling H, Pillar VD e Bauermann SG (2005) Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil) *Rev Palaeobot Palynol* 133: 235-248.
- Bell CD e Donoghue MJ (2005) Phylogeny and biogeography of *Valerianaceae* (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Org Div Evol* 5:147-159.
- Berger A (1988) Milankovitch theory and climate. *Rev Geophys* 26: 624-657.
- Bettin O, Cornejo C, Edwards PJ e 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.
- Böhle UR, Hilger H, Cerff R e Martin WF (1994) Non-coding chloroplast DNA for plant molecular systematics at the infrageneric level. *Mol Ecol Evol* 6:391-403.
- Böhle U-T, Hilger HH e Martin WF (1996) Island colonization and evolution of the insular woody habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *PNAS* 93:11740-11745.
- Bohs L (2004) A chloroplast DNA phylogeny of *Solanum* Section *Lasiocarpa*. *Syst Bot* 29: 177-187.
- Bolzon RT e Marchiori JNC (2002) A vegetação no sul da América: perspectiva paleoflorística. *Ciência & Ambiente* 24: 5-24
- Brown JH e Lomolino MV (2006) Biogeografia. Ribeirão Preto, Funpec Editora. 2ª ed. 692 pp.
- Brummitt (1989) Report of the Committee for Spermatophyta: 36. *Taxon* 38: 301.
- Byrne M (2003). Phylogenetics and the conservation of a diverse and ancient flora. *Comptes Rendus Biologies* 326: S73–S79.
- Byrne M, Macdonald B e Coates D (2002) Phylogeographical patterns in chloroplast DNA variation within the *Acacia acuminata* (Leguminosae: Mimosoideae) complex in Western Australia. *J Evol Biol* 15: 576-587.
- Cabrera AL e Willink A (1980) Biogeografia de America Latina. 2nd ed. Secretaria General de la OEA, Washington, 122pp.
- Carnaval AC e Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J Biog* 35: 1187-1201.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu YL, Kron KA, Rettig JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Systma KJ, Michaels HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Hedren M, Gaut BS, Jansen RK, Kim KJ, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GR, Strauss SH, Xiang QY, Plunkett GM, Soltis PS, Swensen SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LE, Golenberg E, Learn GH, Graham SW, Barret SCH, Dayanandan S e Albert VA (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Mo Bot Gard* 80: 528-580.

- 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 e Wilkinson M (2007) A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295-299
- Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L e Ando T (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (Solanaceae) based on the sequence of the *HFI* gene. *J Plant Res* 120: 385-397.
- Clapperton CM (1993) Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 101:189-208.
- Clarkson JJ, Knapp S, Garcia VF, Olmstead RC, Leitch AR e Chase MW (2004) Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Mol Phyl Evol* 33: 75-90.
- Clegg MT (1993) Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *PNAS* 90: 363-367.
- Comes HP e Abbott RJ (2001) Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae). *Evolution* 55:1943-1962.
- COPAM (1997) Deliberação COPAM n 85, 30 de outubro de 1997. Conselho Estadual de Política Ambiental, Belo Horizonte, caderno 1, pp.10-12.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM e Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *TREE* 15: 290-295.
- Cronquist A (1988) The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, New York, 555 pp.
- D’Arcy WG (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M e Estrada N (eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp 75-137.
- Derepas A e Dulieu H (1992) Inheritance of the capacity to transfer plastids by pollen parent in *Petunia hybrida* Hort. *J Heredity* 83:6-10.

- Després L, Gielly L, Redoutet B e Taberlet P (2003) Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Mol Phyl Evol* 27:185-196.
- 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.
- Dobes CH, Mitchell-Olds T e Koch MA (2004) Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabis drummondii*, *A. x divacarpa*, and *A. holboellii* (Brassicaceae). *Mol Ecol* 13: 349-370.
- Drinnan AN, Crane PR e Hoot SB (1994) Patterns of floral evolution in the early diversification of non-magnoliid dicotyledons (eudicots). *Plant Sys Evol Suppl* 8: 93-122.
- Drummond AJ e Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ e Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4: 699-710.
- Dunn IS e Blattner FR (1987) Sharons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res* 15: 2677-2698.
- Ellstrand NC e Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217-242.
- Excoffier LGL, Smouse PE e 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, Laval G e Schneider SS (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1: 47-50.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein J (2004) *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, 580 pp.

- Fineschi S, Turchini D, Grossoni P, Petit RJ e Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy. *Forest Ecol Manag* 156: 103-114.
- Fu Y (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Fundação SOS Mata Atlântica (1998) Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no Domínio da Mata Atlântica no período de 1990-1995, São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica.
- Futuyma D (1998) *Evolutionary Biology*. 3rd edition. Sinauer, Sunderland, 763 pp.
- Gaut BS, Muse SV e Clegg MT (1993) Relative rates of nucleotide substitution in the chloroplast genome. *Mol Phyl Evol* 2:89-96.
- Gorab E (2001) Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 64-69.
- Green DG (1989) Simulated effects of fire, dispersal and spatial pattern on competition within forest mosaics. *Vegetatio* 82: 139-153.
- Gregory-Wodzicki KM (2000) Uplift of the Central and Northern Andes: A review. *GSA Bulletin* 112: 1091-1105.
- Guindon S e Gascuel O (2003) PhyML – A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Haffer J e Prance GT (2002) Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. *Estudos Avançados* 16: 175-206.
- Haig SM (1998) Molecular contributions for conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Hamilton MB (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol Ecol* 8: 513-525.
- Hamilton MB, Braverman JM e Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. *Mol Biol Evol* 20:1710-1721.

- Hawkes JG (1999) The economic importance of the family Solanaceae. *In*: Nee M, Symon DE, Lester RN e Jessop JP (eds) Solanaceae IV: Advances in Botany and utilization. The Royal Botanic Garden, Kew, pp 1-8.
- Hawkes JG, Lester RN, Nee M e Estrada N (1991) Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, 464 pp.
- Heringer I e Jacques AVA (2001) Adaptação das plantas ao fogo: enfoque na transição floresta-campo. *Ciência Rural* 31: 1085-1090.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG e Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climat* 25: 1965-1978
- Hillis DM e Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42:182-192.
- Holz M (2003) Do mar ao deserto: A evolução do Rio Grande do Sul no tempo geológico. 2ª ed, Editora UFRGS, Porto Alegre, 142 pp.
- Hughes C e Eastwood R (2006) Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *PNAS* 103: 10334-10339.
- Hunziker AT (1979) South American Solanaceae: a synoptic survey. *In*: Hawkes JG, Lester RN e Skelding AD (eds) The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, Londres, pp 49-85.
- Hwang S, Lin T, Ma C, Lin C, Chung J e Yang J (2003) Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Mol Ecol* 12: 2689-2695.
- Ickert-Bond SM e Wen J (2006) Phylogeny and biogeography of Altiaceae: evidence from combined analysis of five non-coding chloroplast regions. *Mol Phyl Evol* 39: 512-528.
- Jakob SS e 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.

- Kearns CA, Inouye DW e Waser NM (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annu Rev Ecol Syst* 29: 83-112.
- Kelchner SA (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann Mo Bot Gard* 87: 482-498.
- Kelchner SA e Thomas MA (2007) Model use in phylogenetics: nine key questions. *TREE* 22: 87-94.
- Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217:624-626.
- Knowles LL e Carstens BC (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Syst Biol* 56:887-895.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA e Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS* 102: 8369-8374.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e Freitas LB (2005) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126: 1-12.
- Larena BG, Aguilar JF e Feliner GN (2002) Glacial-induced altitudinal migrations in *Armenia* (Plumbaginaceae) inferred from patterns of chloroplast DNA haplotype sharing. *Mol Ecol* 11: 1965-1974.
- Leite PF (2002) Contribuição ao conhecimento fitoecológico do Sul do Brasil. *Ciência & Ambiente* 24: 51-73.
- Levin DA, Francisco-Ortega J e Jansen RK (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Cons Biol* 10: 10-16.
- Li WH (1997) *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, 432pp.
- Li WH e Graur D (1991) *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, 284 pp.
- Longo D (2005) Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Lorenz-Lemke (2006) Especiação de plantas no Sul do Brasil: os casos de *Passiflora* e *Petunia*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e 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). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Marshall JA, Knapp S, Davey MR, Power JB, Cocking EC, Bennet MD e Cox AV (2001) Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicum* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. *Theor Appl Genet* 103: 1216-1222.
- Mason-Gamer RJ, Weil CF e Kellogg E (1998) Granule-bond starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Mol Biol Evol* 15: 1658-1673.
- Melo MS (2006) Formas rochosas do Parque Estadual de Vila Velha. Editora UEPG, Ponta Grossa, 154pp.
- Menegat R, Fernandes LAD, Koester E 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.
- Michaels SD, John MC e Amasino RA (1994) Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *BioTechniques* 17: 274-276.
- Mishiba K, Ando T, Mii M, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G e Marchesi E (2000) Nuclear DNA content as a index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 85: 665-673.
- Mitton JB, Kreiser BR e Latta RG (2000) glacial refugia of limber pine (*Pinus flexilis* James) inferred from the population structure of mitochondrial DNA. *Mol Ecol* 9: 91-97.
- Miyaky CY, Russo CAM and Pereira SL (2001) Reconstrução filogenética. Introdução ao método da máxima parcimônia. *In*: Mاتيoli SR (ed) Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 97-107.
- Mondin CA e Baptista LRM (1996) Relações biogeográficas da tribo Mutisieae Cass. (Asteraceae), sensu Cabrera, no Rio Grande do Sul. *Comum Mus Cienc Tecnol PUCRS*

- 2: 49-152.
- Moritz C (1994) Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *TREE* 9: 373-375
- Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Phil Trans R Soc Lond B* 349: 113-118.
- Moritz C e Faith DP (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol Ecol* 7: 419-429.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University, 512 pp.
- Nei M e Takahata N (1993) Effective population size, genetic diversity, and coalescence time in subdivided populations. *J Mol Evol* 37:240-244.:
- Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ e Ennos RA (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *TREE* 14: 140-145
- Nicholas KB, Nicholas HB e Deerfield DW (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EmbnetNews* 4: 1-4.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Center, Uppsala University. <http://www.abc.se/~nylander/>
- Oh T, Kajita T e 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.
- Okuyama Y, Fujii N, Wakabayashi M, Kawakita A, Ito M, Watanabe M, Murakami N e Kato M (2004) Nonuniform concerted evolution and chloroplast capture: heterogeneity of observed introgression patterns in three molecular data partition phylogenies of asian *Mitella* (Saxifragaceae) *Mol Biol Evol* 22:285-296.
- Oliveira PE, Behling H, Ledru MP, Barberi M, Bush M, Salgado-Labouriau ML, Garcia MJ, Medeanic S, Barth OM, Barros MA e Scheel-Ybert R (2005) Paleovegetação e Paleoclimas do Quaternário do Brasil. *In*: Souza CRG, Suguio K, Oliveira MAS e Oliveira PE (eds) Quaternário do Brasil. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 52-74.

- Olmstead R e Palmer JD (1991) Chloroplast DNA and systematics of the Solanaceae. *In*: Hawkes JG, Lester RN, Nee M. e Estrada N (eds) Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp 161-168.
- Olmstead RG, Sweere J.A, Spangler RE e Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. *In*: Nee M, Lester RN e Hawkes JG (Eds.) Solanaceae IV. Royal Botanical Garden, Kew, pp 111-137.
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF e Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57:1159-1181.
- 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 e Lascoux M (2003) Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. *Mol Ecol* 12: 201-212.
- Pereira SL, Miyaki CY e Russo CAM (2001) Reconstrução filogenética: Métodos probabilísticos. *In*: Mاتيoli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 117-129.
- Petit RJ, El Mousadik A e Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Cons Biol* 12: 844-855.
- Porto ML (2002) Os campos sulinos: sustentabilidade e manejo. *Ciência & Ambiente* 24: 120-138.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.
- Posada D e Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 53: 793-808
- Posada D e Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *TREE* 16: 37-45.
- Quadros FLF e Pillar VD (2002) Transições floresta-campo no Rio Grande do Sul. *Ciência*

- & Ambiente 24: 109-118.
- Rambo B (1951) O elemento andino no pinhal rio-grandense. Anais Botânicos do Herbário “Barbosa Rodrigues”, Sellowia, Itajaí 3: 7-39.
- Rambo B (1953) História da flora do Planalto Rio-Grandense. Anais Botânico do Herbário “Barbosa Rodrigues”, Sellowia, Itajaí, 5:1-50.
- Rambo B (1956) A fisionomia do Rio Grande do Sul. Ensaio de monografia natural. 2ª ed, Selbach, Porto Alegre, 456 pp.
- Ramos AMC (2008) História Evolutiva de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Reis C, Sajo MG e Stehmann JR (2002) Leaf structure and taxonomy of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae). Braz Arch Biol Techn 45: 59-66.
- Richardson JE, Pennington RT, Pennington TD e Hollingsworth PM (2001) Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. Science 293:2242-2245.
- Ridley M (2006) Evolução. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, 752 pp.
- Rieseberg LH e Soltis DE (1991) Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. Evol Trend Plant 5:65-84.
- Rieseberg LH e Ellstrand NC (1993) What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? Crit Rev Plant Sci 12: 213-241.
- Rieseberg LH, Whitton J e Linder CR (1996) Molecular markers incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. Act Bot Neerl 45:243-262.
- Roderjan CV, Galvão F, Kuniyoshi YS e Hatschbach GG (2002) As unidades fitogeográficas do estado do Paraná. Ciência & Ambiente 24: 75-92.
- Rogers AR e Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Mol Biol Evol 9: 552-569.
- Ronquist F e Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: phylogenetic inference under mixed models. Bioinf 19: 1572-1574.

- Rossetto M, McNally J, Henry RJ, Hunter J e Matthes M (2000) Conservation genetics of an endangered rainforest tree (*Fontainea oraria* – Euphorbiaceae) and implications for closely related species. *Cons Gen* 1: 217-229.
- Roy A, Frascaria N, MacKay J e 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 e Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinf* 19: 2496-2497.
- Russo CAM, Miyaki CY e Pereira SL (2001) Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. *In*: Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 108-116.
- Safford HD (1999a) Brazilian paramos I: Introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *J Biogeogr* 26: 693-712.
- Safford HD (1999b) Brazilian paramos II: Macro- and meso-climate of the campos de altitude and affinities with high mountain climates of the tropical Andes and Costa Rica. *J Biogeogr* 26: 713-737.
- Safford HD (2001) Brazilian paramos III. Patterns and rates of postfire regeneration in the campos de altitude. *Biotropica* 33: 282-302.
- Safford HD (2007) Brazilian paramos IV: Phytogeography of the campos de altitude. *J Biogeogr* 34:1701-1722.
- Saitou N e Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 9: 945-967.
- Sang T, Crawford DJ e 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 e Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7: 465-474.
- Schemske DW, Husband BC, Ruckelshaus MH, Goodwillie C, Parker IM e Bishop JG (2004) Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology* 75: 584-606.

- Shaw KL (1999) A nested analysis of song groups and species boundaries in the hawaiian cricket genus *Laupala* Mol Phyl Evol 11:332-341:
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE e Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. Am J Bot 92: 142-166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE e Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. Am J Bot 94: 275-288.
- Shrestha MK, Golan-Goldhirsh A e 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). Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Simmons MP, Ochoterena H e Carr TG (2001) Incorporation, relative homoplasy, and effect of gap characters in sequence-based phylogenetic analysis. Syst Biol 50: 454-462.
- Smith LB e Downs RJ (1966) Solanaceae. In: Reitz PR (ed) Flora Ilustrada Catarinense. Biblioteca Superior de Cultura, Itajaí, 321 pp.
- Soltis DE, Soltis PS, Nickrent DL, Johnson LA, Hahn WJ, Hoot SB, Sweere JA, Kuzoff RK, Kron KA, Chase MW, Swensen SM, Zimmer EA, Chaw S M, Gillespie LJ, Kress WJ e Sytsma KJ (1997) Angiosperm phylogeny inferred from 18s ribosomal DNA sequences. Ann Mo Bot Gard 84: 1-49.
- Soltis DE, Soltis PS, Chase MW, Mort ME, Albach DC, Zanis M, Savolainen V, Hahn WH, Hoop SB, Fay MF, Axtell M, Swensen SM, Prince LM, Kress WJ, Nison KC e Farris JS (2000) Angiosperm phylogeny inferred from a combined data set of 18S rDNA, *rbcL* and *atpB* sequences. Bot J Linn Soc 133: 381-461.
- Soltis DE, Soltis PS, Endress PK e Chase MW (2005) Phylogeny and evolution of

- Angiosperms. Sinauer Associates, Sunderland, 370 pp.
- Spichiger R, Calenge C e Bise B (2004) Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Paraná Basin. *J Biogeogr* 31:1489-1501.
- Spooner DM, Anderson GJ e Jansen R (1993) Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *Am J Bot* 80: 676-688.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave and Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann and Semir. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Stehmann JR e Bohs L (2007) Nuevas combinaciones em Solanaceae. In: Zuloaga FO, Morrone O e Belgrano MJ (eds.) Novedades taxonómicas y nomenclaturales para la flora vascular del cono sur de sudamérica. *Darwiniana* 45: 236-241.
- Stehmann JR e Semir J (1997) A new species and new combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon* 7: 417-419.
- Stehmann JR e Semir J (2001) Biologia reprodutiva de *Calibrachoa elegans* (Miers) Stehmann & Semir (Solanaceae). *Rev Bras Bot* 24: 43-49.
- Stehmann JR e Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. In: Keating RC, Hollowel V e Croat TB (eds) A Festschrift for Willian G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist. (Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden 104). Missouri Botanical Garden, St. Louis, pp 341-348.
- Suzuki Y, Glzko GV e Nei M (2002) Overcredibility of molecular phylogenies obtained by bayesian phylogenetics. *PNAS* 99: 16138-16143.
- Swofford DL (1998) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and others methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderlan, 554 pp.
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell, PJ e Hillis DM (1996) Phylogenetic Inference. In: Hillis DM, Moritz C e Mable BK (eds) Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, pp 407-514.

- Taberlet P (1998) Biodiversity at the intraspecific level: The comparative phylogeographic approach. *J Biotech* 64: 91-100.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G e Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17: 1105-1109.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Dudley J, Nei M e Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tate JA, Acosta MC, McDill J, Moscone EA, Simpson BB, Cocucci AA e Smith JF (2009) Phylogeny and Character Evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): Molecular, Morphological, and Cytogenetic Evidence. *Syst Bot* 34: 198-206.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, Hashimoto G, Marchesi E e Kao T (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phyt Geob* 49: 115-133.
- Tsukamoto T, Ando T, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G, Sakazaki U, Suárez E, Marchesi E, Oyama K e Kao T (2002) Differentiation in the status of self-compatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). *J Plant Res* 115: 185-193.
- Tucker SC (1984) Unidirectional organ initiation in leguminous flowers. *Am J Bot* 71: 1139-1148.
- Vanzolini PE e Williams EE (1981) The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. *Pap Av Zool S Paulo* 34: 251-255.
- Villwock JA e Tomazelli LJ (1995) Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1-45.
- von Hagen KB, Kadereit JW (2001) The phylogeny of *Gentianella* (Gentianaceae) and its colonization of the southern hemisphere as revealed by nuclear and chloroplast DNA sequence variation. *Org Div Evol* 1: 61-79.

- Walsh BM e Hoot SB (2001) Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. *Int J Plant Sci* 162: 1409–1418
- Watanabe H, Ando T, Iida SI, Suzuki A, Buto KI, Tsukamoto T, Hashimoto G e Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *J Jap Soc Hort Sci* 65: 625-634.
- Watanabe H, Ando T, Iida SI, Suzuki A, Buto KI, Tsukamoto T, Kokubun H, Hashimoto G e Marchesi E (1997) Cross compatibility of *Petunia pubescens* and *P. pygmaea* with native taxa of *Petunia*. *J Jap Soc Hort Sci* 66: 607-612.
- Watanabe H, Ando T, Nishino E, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G e Marchesi E (1999) Three groups of species in *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) inferred from the intact seed morphology. *Am J Bot* 86: 302-305.
- Watanabe H, Ando T, Tsukamoto T, Hashimoto G e Marchesi E (2001) Cross-compatibility of *Petunia exserta* with other *Petunia* taxa. *J Jap Soc Hort Sci* 70: 33-40.
- Webb SD (1991) Ecogeography and the great American interchange. *Paleobiology* 17: 226-280.
- Weese TL e Bohs L (2007) A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). *Syst Bot* 32: 445-463
- Weschenfelder J (2005) Processos sedimentares e variação do nível do mar na região costeira do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Wijnands DO e Bos JJ (1986) Proposal to conserve 7436 *Petunia* with *P. nyctaginiflora* as *Typ. Cons.* (Solanaceae). *Taxon* 35: 748-749.
- Wijsman HJW (1982) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Bot Neerl* 31: 477-490
- Wijsman HJW (1983) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. II. Experimental data: crosses between different taxa. *Acta Bot Neerl* 32: 97-107.
- Wijsman HJW (1990) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae).

- Acta Bot Neerl 39: 101-102.
- Wijsman HJW e Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. IV. Hybridization and nomenclatural consequences in the *Petunia* group. Acta Bot Neerl 34: 337-349.
- Wittmann D, Radtke R, Cure JR e Schifino-Wittmann MT (1990) Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* (Apoidea, andrenidae) and three purple flowered *Petunia* species (Solanaceae) in southern Brazil. Z Zool Syst Evolforsch 28: 157-165.
- Wolfe KH, Li W-H e Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. PNAS 84: 9054-5058.
- Wortley AH, Rudall PJ, Harris DJ e Scotland RW (2005) How much data are needed to resolve a difficult phylogeny? Case study in Lamiales. Syst Biol 54:697-709.
- Xu DH, Sakai AJ, Kanazawa M, Shimamoto A e 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.
- Young ND e Healy J (2003) GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. BMC Bioinf 4:6.
- Zawko G, Krauss SL, Dixon KW e Sivasithamparam K (2001) Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). Mol Ecol 10: 2389-2396.
- Zhang LB, Comes HP e Kadereit JW (2001) Phylogeny and quaternary history of the European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and AFLP variation. Am J Bot 88:2331-2345.

ANEXO

Tabela 1. Informações sobre locais de coleta e número de indivíduos utilizados na construção do *network* entre 25 espécies do gênero *Calibrachoa*, a partir das sequências dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. A numeração dos haplótipos descritos para cada local é a mesma utilizada nos *networks* mostrados para o gênero ao longo do trabalho, exceto para aqueles com haplótipos descritos em tabelas separadas.

Espécie	Locais de Coleta	Coordenadas Geográficas	Indivíduos coletados	Indivíduos analisados	Haplótipos Correspondentes ao <i>network</i> do gênero
<i>Calibrachoa caesia</i>	Rodovia SC301, entre São Bento do Sul e Campo Alegre, a cerca de 4 km da cidade de Campo Alegre - Santa Catarina.	26 12' 26.87299"S 49 18' 31.01876"W	1	1	H1
<i>Calibrachoa cordifolia</i>	Barragem Rodolfo da Costa e Silva. Itaara - Rio Grande do Sul.	29 30' 39.66756"S 53 45' 15.67637"W	3	3	H2
	Área militar da 13ª CIA Divisão de Armamento e Munição do Exército. Itaara - Rio Grande do Sul.	29 32' 55.63665"S 53 47' 48.89371"W	1	1	H2
<i>Calibrachoa dusenii</i>	Fazenda São Roque. Porto Amazonas - Paraná	25 28' 56.84430"S 49 47' 29.05882"W	32	15	H3
<i>Calibrachoa eglanulata</i>	Estrada Urubici-Serra do Corvo Branco. Urubici - Santa Catarina	28 02' 34.75477"S 49 24' 30.69243"W	34	3	H4, H5
<i>Calibrachoa elegans</i>	Serra da Calçada. Brumadinho - Minas Gerais	20 05' 35"S 43 59' 01"W	16	9	H6, H7
	Estrada para Adrelândia. Santana do Garabêu - Minas Gerais	21 36' 39.41"S 44 07' 34.33"W	21	18	H6
	Morro do Chapêu. Nova Lima - Minas Gerais	20 05' 55.45"S 43 55' 54.10"W	15	15	H6
	Retiro das Pedras. Brumadinho - Minas Gerais	20 06' 09.83"S 43 59' 15.78"W	29	25	H6
<i>Calibrachoa ericifolia</i>	Passo do Pupo, a 7 km da BR 376. Ponta Grossa - Paraná	25 08' 48.86654"S 49 57' 17.38877"W	14	1	H8
	Rodovia PR 151, Sentido Palmeira-Ponta Grossa. Ponta Grossa - Paraná	25 15' 21.51016"S 50 09' 05.04878"W	50	4	H8
	Rodovia PR 340, sentido Castro-Tibagi, a 16 km Castro. Castro -Paraná	24 45' 56.75389"S 50 09' 28.10448"W	27	2	H8
	Rodovia PR 340, sentido Castro-Tibagi, a cerca de 42km de Castro. Tibagi - Paraná	24 39' 00.24468"S 50 13' 29.22658"W	15	4	H8, H9
	Estrada para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 32.43228"S 53 33' 19.79975"W	18	11	H10, H11, H12, H14
<i>Calibrachoa excellens subsp. atropurpurea</i>	Rodovia BR 293, sentido Dom Pedrito-Bagé. Bagé - Rio Grande do Sul	31 18' 02.27867"S 54 02' 41.88645"W	5	3	H13
	Estrada de terra próxima a Rodovia RS265, a cerca de 5k de Canguçu. Canguçu - Rio Grande do Sul	31 20' 35.22"S 52 40'47.08"W	4	3	H15
	Rodovia RS241, entre São Vicente do Sul e Loreto. São Vicente do Sul - Rio Grande do Sul	29 43' 20.27086"S 54 50' 25.99946"W	6	5	H17
	Estrada para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 58.00215"S 53 32' 32.25504"W	8	7	H10, H18, H19, H20, H21, H22
<i>Calibrachoa excellens subsp. excellens</i>	Rodovia BR471 entre Rio Pardo e Encruzilhada do Sul, a cerca de 20km de Encruzilhada do Sul. Encruzilhada do Sul - Rio Grande do Sul	30 22' 08.90669"S 52 25' 47.22034"W	3	2	H10
	Rodovia SC430, entre Urubici e São Joaquim, a cerca de 25km de Urubici. Urubici - Santa Catarina	28 08' 55.96694"S 49 42' 59.81104"W	12	9	H25, H26
	Paleodunas próximas à BR 101. Imbituba - Santa Catarina	28 18' 37.83"S 48 43' 04.69"W	4	3	H23, H24
	Rodovia PR170, sentido Guarapuava-Colônia Socorro, a cerca de 10km de Guarapuava. Guarapuava - Paraná	25 28' 49.79847" S 51 32' 17.70033" W	31	7	H27, H28
	Rodovia PR170, sentido Pinhão-Faxinal do Céu, a cerca de 3km de Pinhão. Pinhão - Paraná	25 44' 10.11846" S 51 37' 15.16975" W	31	14	H29, H30
	Rodovia PR170, Entre Faxinal do Céu e Bituruna. Pinhão - Paraná	25 56' 56.33881"S 51 36' 39.99251"W	13	9	H30
	Caminho para o observatório, Morro Santana. Porto Alegre - Rio Grande do Sul	30 02' 34.70063"S 51 06' 46.82451"W	54	8	H17, H31, H32, H33, H34
	Estrada de terra próxima a Balsa Nova. Lapa - Paraná	25 35' 48.70688"S 49 38' 39.03514"W	35	14	H35, H36
	Área urbana próxima a BR282. Município de Xaxim - Santa Catarina	26 57' 08.30443"S 52 30' 42.78935"W	17	6	H37, H38
	Parque Estadual de Itapuã. Viamão - Rio Grande do Sul	30 21' 54.97225"S 51 01' 35.14032"W	5	2	H16, H31

Continuação Tabela 1. Informações sobre locais de coleta e número de indivíduos utilizados na construção do *network* entre 25 espécies do gênero *Calibrachoa*, a partir das sequências dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. A numeração dos haplótipos descritos para cada local é a mesma utilizada nos *networks* mostrados para o gênero ao longo do trabalho, exceto para aqueles com haplótipos descritos em tabelas separadas.

Espécie	Locais de Coleta	Coordenadas Geográficas	Indivíduos coletados	Indivíduos analisados	Haplótipos Correspondentes ao <i>network</i> do gênero	
<i>Calibrachoa heterophylla</i>	Estrada para o camping Itapeva. Torres - Rio Grande do Sul	29 34' 59"S 55 06' 03"W	1	1	H58	
	Praia de Arambaré. Arambaré - Rio Grande do Sul	30 55' 9"S 51 29' 46"W	1	1	H59	
	Estrada de chão próxima à rodovia Interpraias. Torres - Rio Grande do Sul	29 25' 56.16035"S 49 47' 53.10728"W	23	23	H60, H61	
	Rodovia RST377 entre São Francisco de Assis e Rivadávia Rodrigues. São Francisco de Assis - Rio Grande do Sul	29 34' 59.05904"S 55 06' 02.76384"W	4	4	H17	
	Estrada de terra a partir da BR 101 para o litoral, entre Bacopari e Solidão. Mostardas - Rio Grande do Sul	30 56' 14.86150"S 50 44' 21.62511"W	4	3	H62	
	Estrada de acesso ao Balneário Mostardense. Mostardas - Rio Grande do Sul	31 06' 32.73443"S 50 54' 04.04923"W	14	13	H63, H101	
	Estrada em direção ao litoral a partir da RS471, próximo a Lagoa das Flores. Rio Grande - Rio Grande do Sul	32 31' 26.26021"S 52 32' 47.80889"W	36	26	H64, H101	
	Margem da Lagoa dos Barros. Santo Antônio da Patrulha - Rio Grande do Sul	29 53' 34.48479"S 50 25' 45.70479"W	39	24	H65, H66	
	Estrada de acesso ao balneário, a 2km do mar, próximo a Bojuru. São José do Norte - Rio Grande do Sul	31 40' 00.24527"S 51 25' 32.75352"W	54	49	H67	
	Margem da Lagoa Mangueira, próxima a Curral Alto. Santa Vitória do Palmar - Rio Grande do Sul	32 59' 15.52665"S 52 43' 56.28112"W	48	19	H31, H68, H69	
	Ilha do Barba Negra. Barra do Ribeiro - Rio Grande do Sul	30 28' 24.58963"S 51 08' 40.42619"W	124	26	H70	
	Horto Florestal da Aracruz. Barra do Ribeiro - Rio Grande do Sul	30 24' 27.13160"S 51 12' 09.19728"W	138	30	H71, H72	
	Margem do Rio Ibicui ao lado da ponte da estrada Uruguaiana-Itaqui. Uruguaiana - Rio Grande do Sul	29 25' 05.80637"S 56 41' 38.75415"W	6	1	H73	
	Tres Cerros, a 25km de RN14, Departamento de San Martin. Provincia de Corrientes, Argentina	29° 06' 71"S 56° 55' 02"W	3	1	H74	
	Rodovia BR293, de Santana do Livramento para Bagé. Santana do Livramento - Rio Grande do Sul	30 50' 40.20640"S 55 26' 45.63036"W	24	1	H76	
	<i>Calibrachoa linearis</i>	Área urbana de Concordia, em frente ao parque industrial. Departamento de Concordia, Provincia de entre-Rios. Argentina	31 24'S 58 05'W	1	1	H77
		Balneário San Jose, Departamento de Colon. Provincia de entre-Rios. Argentina	32° 11'S 58° 10'W	1	1	H78
	<i>Calibrachoa linoides</i>	Rodovia SC301, entre São Bento do Sul e Campo Alegre, a cerca de 4 km de Campo Alegre. Campo Alegre - Santa Catarina	26 12' 29.03864"S 49 18' 23.65972"W	10	2	H41, H42
		Rodovia BR 470 entre Rio do Sul e Curitiba, a cerca de 20 km de Curitiba. São Cristóvão do Sul - Santa Catarina	27 18' 44.36680"S 50 23' 15.17060"W	9	6	H43, H44, H45, H46
		Estrada entre Otacilio Costa e Petrolândia, a cerca de 20km de Otacilio Costa. Otacilio Costa - Santa Catarina	27 34' 37.22102"S 50 00' 04.19263"W	22	5	H47, H53, H54, H55
Estrada de terra a partir da BR282, sentido Urubici-Bom Retiro a cerca de 10km de bom Retiro. Bom Retiro - Santa Catarina		27 50' 46.67382"S 49 31' 31.53716"W	29	3	H48, H49, H51	
Estrada de acesso para a Cascata do Avencal. Urubici - Santa Catarina		28 02' 55.06124"S 49 36' 56.62954"W	21	7	H50	
Rodovia PR170, a cerca de 3 km da cidade de Bituruna. Bituruna - Paraná		26 10' 11.41205"S 51 35' 59.44898"W	18	9	H51	
Rodovia SC302, entre General Carneiro e Matos Costa, a cerca de 10km de Matos Costa. Matos Costa - Santa Catarina		26 28' 08.12045"S 51 10' 47.08482"W	17	5	H52	
Reserva Biológica Mata Viva, Centro Politécnico, UFPR. Curitiba - Paraná		25 26' 47.81875"S 49 14' 04.24471"W	30	4	H56	
Estrada de acesso a Monte Verde, a cerca de 1km da zona urbana. Monte Verde - Minas Gerais		22 51' 59.52392"S 46 02' 53.34103"W	33	2	H57	
Rodovia BR 470, entre o trevo da BR 116, km 277. São Cristóvão do Sul - Santa Catarina		27 19' 38.87556"S 50 21' 47.94054"W	63	24	H37, H39, H40	
<i>População híbrida C. linoides x C. excellens</i>						

Continuação Tabela 1. Informações sobre locais de coleta e número de indivíduos utilizados na construção do *network* entre 25 espécies do gênero *Calibrachoa*, a partir das sequências dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. A numeração dos haplótipos descritos para cada local é a mesma utilizada nos *networks* mostrados para o gênero ao longo do trabalho, exceto para aqueles com haplótipos descritos em tabelas separadas.

Espécie	Locais de Coleta	Coordenadas Geográficas	Indivíduos coletados	Indivíduos analisados	Haplótipos Correspondentes ao <i>network</i> do gênero
<i>Calibrachoa micrantha</i>	Fazenda São Nicolau. Bom Sucesso de Itararé - São Paulo	24 19' 04.08"S 49 08' 38.04"W	5	1	H45
<i>Calibrachoa missionica</i>	Afloramento rochoso próximo a estrada entre Santo Cristo e Porto Vera Cruz. Porto Vera Cruz - Rio Grande do Sul	27 45' 07.03233"S 54 50' 39.88593"W	33	3	H79
<i>Calibrachoa ovalifolia</i>	Rodovia RP4, km28, Departamento de San Javier, Provincia de Misiones, Argentina	27 29' 00"S 55 44' 57"W	1	1	H80
	Caminho para a Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 31' 54.79217"S 53 33' 05.07502"W	10	1	H75
	Rodovia BR293, sentido Santana do Livramento-Quaraí, a cerca de 5 km de Santana do Livramento. Santana do Livramento - Rio Grande do Sul	30 48' 22.32845"S 55 37' 04.85754"W	7	1	H81
	Campo próximo a estrada de acesso à Pedra do Segredo. Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 32' 32.43228"S 53 33' 19.79975"W	7	1	H75
	Parque Estadual de Itapuã. Viamão - Rio Grande do Sul	30 22' 03.45561"S 51 01' 39.63879"W	6	1	H31
	Rodovia BR158 entre Júlio de Castilhos e São Martinho da Serra, a cerca de 12km de Júlio de Castilhos. Júlio de Castilhos - Rio Grande do Sul	29 19' 21.76116"S 53 40' 41.80912"W	11	1	H2
<i>Calibrachoa paranensis</i>	Rodovia RN040, a 6km da RP14, Departamento de Santo Tomé, Provincia de Corrientes. Argentina	28 22'S 56 09'W	1	1	H82
	Passo do Pupo, a 7Km da BR 376. Município de Ponta Grossa - PR	25 08' 48.86654"S 49 57' 17.38877"W	27	1	H83
	Rodovia BR277, entre Campo Largo e Ponta Grossa, Serra de São Luis do Purunã. Campo largo - Paraná	25 27' 34.33449"S 49 38' 44.18660"W	27	10	H83
	Estrada antiga da Serra de São Luis do Purunã, a cerca de 200m da BR 277.	25 28' 05.20155"S 49 39' 21.52677"W	45	11	H83, H84
	Balsa Nova - Paraná	25 27' 56.94752"S 49 43' 16.35289"W	25	1	H84
	Estrada secundária da BR277. Serra de São Luis do Purunã. Balsa Nova - Paraná	25 27' 56.94752"S 49 43' 16.35289"W	25	1	H84
<i>Calibrachoa parviflora</i>	Reserva Natural Buraco do Padre. Ponta Grossa - Paraná	25 10' 18.04831"S 49 58' 05.21379"W	33	1	H85
	Estrada Guarapuava-Laranjeiras do Sul. Guarapuava/PR	25 25' 04.59812"S 51 40' 17.12380"W	19	1	H86
	Área urbana de Caçapava do Sul - Rio Grande do Sul	30 30' 31.82008"S 53 29' 27.77868"W	2	1	H87
	Calçada próxima ao edifício do Departamento de Genética, Campus do Vale, UFRGS. Porto Alegre - Rio Grande do Sul	30 04' 12.12"S 51 07' 10.02"W	7	1	H87
<i>Calibrachoa pubescens</i>	Rodovia RS165 entre São Luiz Gonzaga e Serrinha, a cerca de 10km de São Luiz Gonzaga. São Luiz Gonzaga - Rio Grande do Sul	28 22' 09.42643"S 54 52' 38.67255"W	7	1	H88

Continuação Tabela 1. Informações sobre locais de coleta e número de indivíduos utilizados na construção do *network* entre 25 espécies do gênero *Calibrachoa*, a partir das sequências dos espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. A numeração dos haplótipos descritos para cada local é a mesma utilizada nos *networks* mostrados para o gênero ao longo do trabalho, exceto para aqueles com haplótipos descritos em tabelas separadas.

Espécie	Locais de Coleta	Coordenadas Geográficas	Indivíduos coletados	Indivíduos analisados	Haplótipos Correspondentes ao <i>network</i> do gênero
<i>Calibrachoa pygmaea</i>	Rodovia BR290 km649 sentido Alegrete-Uruguaiana, a cerca de 1 km do trevo para Quaraí. Uruguaiana - Rio Grande do Sul	30 01' 10.48805"S 56 24' 51.27712"W	28	1	H89
	Rodovia BR293, entre Quaraí e Santana do Livramento, a cerca de 35km de Quaraí. Santana do Livramento - Rio Grande do Sul	30 32' 57.73208"S 56 07' 06.22586"W	25	1	H89
<i>Calibrachoa sellowiana</i>	Estrada secundária a partir da rodovia RS020, cerca de 7km ao sul de Cambará do Sul. Cambará do Sul - Rio Grande do Sul	29 05' 32.79583"S 50 11' 18.57672"W	7	1	H37
	Rodovia BR 116 entre Monte Castelo e Santa Cecília, a cerca de 20km de Santa Cecília. Santa Cecília - Santa Catarina	26 49' 16.30910"S 50 21' 20.68088"W	4	1	H37
	Rodovia BR 116 entre Santa Cecília e Ponte Alta do Norte, na saída da cidade de Santa Cecília. Santa Cecília - Santa Catarina	26 58' 12.63631"S 50 24' 24.12134"W	19	1	H37
	Estrada Urubici-São Joaquim, km 67 a 5km do trevo para São Joaquim. São Joaquim - Santa Catarina	28 12' 53.52450"S 49 47' 29.33191"W	10	3	H90
<i>Calibrachoa sendtneriana</i>	Borda Norte do Cânion da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 23' 06.97198"S 49 32' 38.48550"W	101	12	H90, H91, H92, H93,
	Mata nebulosa a cerca de 3km ao sul da estrada da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 24' 47.85255"S 49 33' 50.56145"W	8	3	H90
	Estrada Serra do Rio do Rastro-Bom Jardim da Serra. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 22' 31.19970"S 49 33' 38.09984"W	2	2	H94
	Curso d'água com afloramentos rochosos, próximo ao Cânion do Funil. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 21' 13.78822"S 49 34' 25.06003"W	28	12	H96, H97
	Afloramento rochoso no caminho para o cânion do Funil. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 20' 48.23857"S 49 33' 33.61311"W	7	3	H93, H98
	Borda sul no início do Cânion do Funil. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 20' 47.09917"S 49 32' 51.91871"W	5	3	H93
	Borda Norte do Cânion da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 23' 09.40649"S 49 32' 41.28241"W	2	1	H90
<i>Calibrachoa serrulata</i>	Borda Norte do Cânion da Serra do Rio do Rastro. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 23' 16.02203"S 49 32' 38.27790"W	9	1	H95
	Paredão rochoso no aparado próximo ao pico do cabo aéreo. Bom Jardim da Serra - Santa Catarina	28 21' 46.52190"S 49 33' 05.22461"W	8	1	H95
	Estrada entre São Pedro do Sul e Mata. São Pedro do Sul - Rio Grande do Sul	29 38' 18.44812"S 54 18' 16.65114"W	57	1	H75
	Rodovia RN94 sentido Azara, Departamento de Santo Tome, Província de Corrientes. Argentina	29 39'S 56 09'W	1	1	H74
<i>Calibrachoa spathulata</i>	Rodovia PR170, entre Bituruna e General Carneiro, a cerca de 20km de Bituruna. Bituruna - Paraná	26 17' 11.68496"S 51 29' 23.87539"W	25	1	H99
	Rodovia SC302, entre General Carneiro e Matos Costa, a cerca de 10km de Matos Costa. Matos Costa - Santa Catarina	26 25' 52.63929"S 51 14' 10.59036"W	37	1	H100
<i>Calibrachoa thymifolia</i>	Estrada secundária a direita da rodovia BR101, sentido São José do Norte-Estremo. São José do Norte - Rio Grande do Sul	31 57' 36.87472"S 51 59' 02.33134"W	33	3	H60, H101, H102