

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

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA  
DE *PETUNIA AXILLARIS* (LAM.) BRITTON, STERNS & POGGENB  
(SOLANACEAE)**



**CAROLINE TURCHETTO**

Orientação: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Co-Orientação: Dr. Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Dissertação de mestrado

Porto Alegre, março de 2010

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

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA  
DE *PETUNIA AXILLARIS* (LAM.) BRITTON, STERNS & POGGENB  
(SOLANACEAE).**

**Caroline Turchetto**

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

Orientação: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Co-Orientação: Dr. Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Porto Alegre, março de 2010

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

- ✓ Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS;
- ✓ Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS;
- ✓ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- ✓ Programa Especial em Taxonomia – PROTAX (MCT/CNPq/CAPES);
- ✓ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- ✓ Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS);
- ✓ Programa Sul-Americano de Apoio às Atividades de Cooperação em Ciência e Tecnologia (PROSUL-CNPq).

## AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a todas as pessoas e instituições que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora **Loreta Brandão de Freitas** por ter me aceito em seu laboratório e acreditado no meu trabalho. Pelo seu exemplo profissional e excelente orientação, o que permitiu meu crescimento, e por ter oferecido todas as condições para o bom desenvolvimento deste trabalho, e principalmente pela amizade que foi fundamental em muitos momentos e tropeços no caminho.

Ao meu co-orientador **Nelson Jurandi Rosa Fagundes** por sua dedicação, paciência, pelo apoio, pelos ensinamentos e acima de tudo pelo carinho e amizade. Posso dizer que o crescimento profissional que obtive nesses dois anos deve grande parte a você, que para mim é um grande exemplo tanto profissional como pessoal. Obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio nas coletas, análise dos dados, enfim obrigada por tudo.

Aos professores do Departamento de Genética da UFRGS, que contribuíram para minha formação.

Aos meus colegas do Laboratório de Evolução Molecular pela amizade no dia-a-dia, auxílio nas coletas e atividades de laboratório, pelas discussões científicas e muitos outros assuntos que tornaram cada dia de trabalho muito agradável: **Aline R., Ana Lúcia, Ana Luiza, Clênio, Geraldo, Jéferson, Nelson, Pakisa, Priscilla, Raquel, Rosana e Verônica**. Em especial gostaria de agradecer a minha colega e grande amiga **Ana Lúcia Segatto**, obrigada por sempre ter estado ao meu lado, pelo apoio e ajuda em todos os momentos que precisei, e sempre me dizer “você vai conseguir Carol”, obrigada pela amizade e carinho, te admiro muito.

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

Aos pesquisadores **Pablo Speranza, Viviana G. Solís Neffa e J. Guillermo Seijo** pelas coletas e envio de amostras.

Agradeço com muito carinho ao **Elmo** e à **Ellen**, pela dedicação e eficiência com que fazem seu trabalho. Pela recepção sempre cordial e pronta para ajudar.

À minha grande amiga **Rosi Maria Prestes**, uma pessoa muito especial e querida, pela sua amizade e carinho. Pelos nossos papos e pelo apoio que sempre me deste. Obrigada amiga!

À minha incomparável irmã **Andreia Turchetto Zolet**, pelo seu amor, carinho e compreensão, pelo apoio em todas as horas que precisei, desde análises até discussões sobre o trabalho. Principalmente por acreditar em mim e ter estado ao meu lado. Ao meu cunhado **Renato Michelin Zolet** (meu irmão) pelo apoio, principalmente em questões de informática, e acima de tudo pelo carinho. Obrigada a vocês dois que foram fundamentais para eu conseguir passar por todos os obstáculos.

Aos meus amáveis pais **Vera** e **Alcides** por terem me ensinado os valores da vida, pelo amor, carinho, compreensão, que mesmo distantes se fizeram presentes em cada momento de minha vida, suas palavras me deram suporte para prosseguir.

Ao **Leo**, pelo companheirismo e apoio durante essa caminhada.

Obrigada a todos!!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	12
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
1.INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Caracterização do grupo de estudo.....	16
1.1.1 O Gênero <i>Petunia</i> .....	16
1.1.2 <i>Petunia axillaris</i> .....	18
1.2 O Pampa .....	23
1.3 Filogeografia.....	27
1.4 Marcadores Moleculares, Morfológicos e Especiação.....	29
1.5 Genética e conservação: contribuição para a preservação de espécies e ambientes .	32
2.OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo Geral .....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Coletas .....	36
3.2 Análises dos Dados Ecológicos.....	41
3.3 Dados Morfológicos .....	43
3.3.1 Caracteres Florais .....	43
3.3.2 Análise estatística dos dados .....	44
3.4 Dados Genéticos .....	45
3.4.1 Extração de DNA .....	45

3.4.2 Amplificação e sequenciamento .....	46
3.4.3 Análise das sequências .....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4.1 Dados Ecológicos e Morfológicos.....	50
4.1.1 Divergência de Nicho Fundamental .....	50
4.1.2 PCA da morfologia de <i>P. axillaris</i> : delimitando <i>taxa</i> intraespecífico.....	54
4.1.3 Análise de Barreiras Biogeográficas .....	56
4.1.4 Análise <i>K-means</i> clustering.....	59
4.1.5 Variabilidade morfológica em <i>P. axillaris</i> .....	64
4.2 Dados moleculares.....	71
4.2.1 Caracterização das sequências obtidas .....	71
4.2.2 Variação Genética em <i>Petunia axillaris</i> .....	74
4.2.3 Detecção de Barreiras Biogeográficas.....	83
4.2.4 Dinâmica Populacional.....	86
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	89
5.1 Implicações Biogeográficas.....	89
5.2 Delimitação de <i>taxa</i> intraespecíficos para o complexo <i>P. axillaris</i> .....	90
5.3 Implicações para a Conservação.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta de *Petunia axillaris* e esfingídeos, seu polinizador efetivo: (a) *Manduca sexta* (polinizador preferencial); (b) *Manduca diffissa*; (c) *Eumorpha vitis*; (d) *Eumorpha labruscae* (Imagens retiradas de Venail *et al.*, 2010, com permissão dos autores). ..... 19

Figura 2: Morfologia floral típica de (1) *Petunia axillaris* ssp. *axillaris*; (2) *Petunia axillaris* ssp. *parodii*, e (3) *Petunia axillaris* ssp. *subandina*. Note-se a diferença no tamanho do tubo da corola, mais curto em (1), os estames didínamos, ausentes em (2), e o formato dos lobos da corola, diferente para as três subespécies (Adaptado de Ando, 1996). ..... 20

Figura 3: Mapa da distribuição de *Petunia axillaris* no Uruguai (adaptado de Ando, 1995), na Argentina (adaptado de Ando, 1996) e Sul do Brasil (pontos de coletados por nosso grupo de pesquisa LEM-UFRGS). ..... 22

Figura 4: (A) Mapa representando a região de abrangência do Pampa, tom de verde escuro ([http://br.geocities.com/biomapampa/mapa\\_bioma\\_pampa.jpg](http://br.geocities.com/biomapampa/mapa_bioma_pampa.jpg)); (B) Bioma Pampa Brasileiro, restrito ao estado do Rio Grande do Sul, em amarelo (IBGE, 2004). .... 23

Figura 5: Esquema geológico do Uruguai e Rio Grande do Sul. Podem-se perceber áreas de similaridade de ambos. Região em cinza que forma um arco é a chamada Depressão Central Gaúcha, que se estende pelo território do país vizinho (modificado de Grela, 2004). ..... 24

Figura 6: (A) Mapa com os pontos de coleta das 102 populações de *Petunia axillaris*, as cores representam a altitude da localidade em metros. (B) Círculos em detalhe representam (1) pontos da Casa de Pedra/RS e (2) Guaritas/RS, as quais ocorrem em torres rochosas próximas umas das outras, localizadas no município de Bagé/RS e Caçapava do Sul/RS, respectivamente, ambas pertencentes à região da Serra do Sudeste. .... 39

Figura 7: Mapa dos pontos de coleta de *Petunia axillaris* agrupados segundo distância geográfica, subespécie e unidade de paisagem. .... 40

Figura 8: Representação esquemática das medidas dos caracteres morfológicos utilizadas na análise das subespécies de <i>Petunia axillaris</i> .....	43
Figura 9: Análise de Componentes Principais mostrando a extensão da separação ecológica de <i>Petunia axillaris</i> para as três subespécies com base na variação climática. Os pontos correspondem a cada população de <i>P. axillaris</i> estudada.....	50
Figura 10: (A) Grupos geográficos de <i>Petunia axillaris</i> sugeridos pela Análise de Componentes Principais de 19 variáveis climáticas e altitude. Cada ponto representa uma população amostrada, as cores dos pontos estão de acordo com as subespécies. (B) Imagens de populações de <i>P. axillaris</i> no seu habitat natural de cada grupo filogeográfico, os números nas imagens correspondem ao número do grupo que pertencem. Fotos obtidas durante expedições de campo.....	53
Figura 11: Análise de Componentes Principais dos caracteres florais de 790 indivíduos de 79 populações de <i>Petunia axillaris</i> , revelando a separação das subespécies <i>parodii</i> e <i>axillaris</i> , e a sobreposição da ssp. <i>subandina</i> com ssp. <i>axillaris</i> .....	54
Figura 12: Mapa mostrando a posição das três barreiras inferidas através do algoritmo de Monmonier para os dados morfológicos de <i>Petunia axillaris</i> .....	57
Figura 13: Mapa mostrando a posição de quatro barreiras inferidas através do algoritmo de Monmonier para os dados morfológicos dos grupos <i>Petunia axillaris</i> .....	59
Figura 14: Análise <i>K-means</i> para os escores dos PCAs dos dados morfológicos de 790 indivíduos de <i>Petunia axillaris</i> . Os nomes de cada grupos estão de acordo com a Tabela 2. As cores amarelo e azul representam a morfologia das subespécies <i>axillaris</i> e <i>parodii</i> , respectivamente. Para K=3, o terceiro grupo em vermelho sugere um subconjunto da subespécie <i>axillaris</i> . A subespécie. <i>subandina</i> apresenta-se com morfologia da subespécie <i>axillaris</i> .....	61
Figura 15: Análise <i>K-means</i> para os escores dos PCAs dos dados morfológicos de 1689 flores de <i>Petunia axillaris</i> . Os nomes de cada grupo estão de acordo com a Tabela 2. As cores amarelo e azul representam as características morfológicas típicas das subespécies <i>axillaris</i> e <i>parodii</i> , respectivamente. Para K=3, o terceiro grupo, em vermelho, sugere um subconjunto da ssp. <i>axillaris</i> . A ssp. <i>subandina</i> apresenta morfologia da ssp. <i>axillaris</i> .....	63

Figura 16: Imagens da variação do habitat e caracteres morfológicos para <i>Petunia axillaris</i> ssp. <i>parodii</i> .....	65
Figura 17: Imagens da variação do habitat e caracteres morfológicos para <i>Petunia axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i> . (A) localizadas no Uruguai na parte continental; (B) localizadas no Uruguai no litoral; (C) localizadas na Serra do Sudeste / RS; e (D) medidas morfológicas da ssp. <i>axillaris</i> .....	66
Figura 18: Imagens de características morfológicas encontradas em populações naturais de <i>Petunia axillaris</i> . (A) espessura dos caules; (B) diferenças de tamanho de indivíduos da mesma população; (C) ramos secos e brotos em indivíduos; (D) estigma exserto e corola rosada. ....	68
Figura 19: Análise de componentes principais dos caracteres florais de <i>Petunia axillaris</i> ssp. <i>axillaris</i> e <i>P. axillaris</i> ssp. <i>parodii</i> . Cada elipse representa um grupo geográfico de populações, destacando a variação regional de <i>P. axillaris</i> .....	69
Figura 20: Flores de <i>Petunia axillaris</i> mostrando os diferentes visitantes observados no campo. (A) e (B) Plantas de populações do Uruguai visitadas por beija-flores. (C) Plantas de uma população das Guaritas/RS visitadas por abelhas. (D) População do Uruguai na região de Colônia em que uma abelha mamangava pilhava néctar. ....	70
Figura 21: <i>Network</i> mostrando o relacionamento evolutivo entre os 35 haplótipos das populações de <i>Petunia axillaris</i> (combinação das sequências dos espaçadores <i>trnS-trnG</i> e <i>trnH-psbA</i> ). Cada uma das cores representa uma das três subespécies de acordo com a classificação da Tabela 1. A área dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. As barras perpendiculares indicam o número de passos evolutivos que separam os haplótipos. ....	74
Figura 22: (A) Mapa da variabilidade genética nas populações de <i>Petunia axillaris</i> estudadas. Cores conforme a rede de haplótipos apresentada em B. (B) <i>Network</i> mostrando o relacionamento entre os 35 haplótipos nas populações de <i>P. axillaris</i> (combinação das sequências dos espaçadores <i>trnS-trnG</i> e <i>trnH-psbA</i> ). Os detalhes 1 e 2 correspondem às populações amostradas nas Guaritas e Casa de Pedra, respectivamente.....	80

Figura 23: Análise de Autocorrelação Espacial para <i>Petunia axillaris</i> . $A_y$ = média da distância genética entre os pares de indivíduos. A linha pontilhada paralela ao eixo “x” indica o valor médio de $A_y$ para o conjunto de dados ( $2,16 \times 10^{-3}$ ).....	82
Figura 24: Localização da barreira biogeográfica inferida pelo programa SAMOVA 1.0 para os dados de cpDNA de <i>Petunia axillaris</i> . .....	84
Figura 25: Barreiras inferidas pelo programa Barrier 2.2 para os dados de cpDNA de <i>Petunia axillaris</i> .....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações dos pontos de coleta de <i>Petunia axillaris</i> .....	36
Tabela 2: Grupos de <i>Petunia axillaris</i> segundo distância geográfica e habitat, e seus respectivos pontos de coleta. ....	41
Tabela 3: Variáveis climáticas do BIOCLIM usadas para análise de PCA dos pontos de coleta de <i>Petunia axillaris</i> estudados.....	42
Tabela 4: Protocolo para amplificação e sequência dos <i>primers</i> do espaçador <i>trnH-psbA</i> .. ....	47
Tabela 5: Protocolo para amplificação e sequência dos <i>primers</i> do espaçador <i>trnS-trnG</i> .....	47
Tabela 6: Condições das reações de PCR para sequenciamento.....	48
Tabela 7: Contribuição de cada variável climática para os PCA1 e PCA2.....	51
Tabela 8: Diversidade nucleotídica e haplotípica dos 21 grupos de <i>Petunia axillaris</i> . (*) correspondem aos grupos com maior diversidade.....	73
Tabela 9: Descrição dos haplótipos encontrados na análise do cpDNA de <i>Petunia axillaris</i> , com destaque para os sítios .....	75
Tabela 10: Resultado da Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) em populações de <i>Petunia axillaris</i> . Na composição do grupo estão representadas entre parênteses as populações de cada grupo, cujas informações estão indicadas na Tabela 1. <i>K</i> refere-se ao número de grupos predefinidos na análise. Todos os testes para diferenciação são significativos para $P < 0,001$ . ....	83
Tabela 11: Índices de neutralidade calculados para os grupos de populações de <i>Petunia axillaris</i> estudadas.....	88

## RESUMO

O Bioma Pampa é um dos seis grandes biomas brasileiros, estendendo-se também para a Argentina e o Uruguai. Em termos geomorfológicos, é uma região complexa, pois inclui diversas unidades geradas em contextos tectônicos e paleogeográficos distintos, sendo que é bem conhecida a continuidade geológica entre o Uruguai e RS. A conservação dos campos tem sido negligenciada; ameaçada pelo aumento das áreas com agricultura e silvicultura (pinus e eucalipto), e por uma aplicação leniente da legislação ambiental, como se tais formações naturais abertas não tivessem a mesma importância das florestas. O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) tem uma longa história de cruzamentos artificiais, sendo os híbridos de *P. axillaris* e *P. integrifolia* mundialmente disseminados como plantas ornamentais conhecidos como petúnias de jardim. *P. axillaris* possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todo Bioma Pampa, geralmente em afloramentos rochosos em beira de estrada. Através de caracteres morfológicos da flor, a espécie é dividida em três subespécies: *P. axillaris* ssp. *axillaris*, *P. axillaris* ssp. *parodii* e *P. axillaris* ssp. *subandina*. Nesse trabalho foram realizadas análises moleculares, morfológicas e ecológicas, através do sequenciamento dos espaçadores plastidiais *trnS-trnG* e *trnH-psbA*, da medida dos caracteres florais e da utilização de dados climáticos. O trabalho foi realizado com populações naturais abrangendo a área de distribuição da espécie. Os limites geográficos das subespécies são amplamente equivalentes entre os critérios morfológicos e ecológicos; para as subespécies *axillaris* e *parodii*, os dados suportam os dois grupos, já em relação às subespécies *axillaris* e *subandina*, esta separação é fraca, porque apesar de serem ecologicamente distintas, essas populações não são morfologicamente distintas uma da outra. Os dados de cpDNA não suportam os diferentes grupos, visto que as subespécies compartilham haplótipos, o que sugere divergência recente e retenção de polimorfismo ancestral. Apesar da falta de resolução genealógica e de apresentar estruturação geográfica pouco definida, os dados de cpDNA fornecem informações relevantes em relação à biogeografia da espécie, a qual teria tomado uma vasta proporção geográfica durante os períodos frio e seco do Quaternário, período de expansão dos campos. Os padrões de variação em *P. axillaris*, principalmente em relação à morfológica, são congruentes com a continuidade geológica entre RS e Uruguai. Mais estudos, com outras espécies, serão

relevantes para determinar se existe um padrão geográfico de distribuição das espécies nessa região.

## ABSTRACT

The Pampa is one of the six major Brazilian Biome, covering also the Argentina and Uruguay Countries. Concerning to geomorphology, it is a complex region because includes several units generated in different tectonic and paleogeographic contexts and the geological continuity between Uruguay and Rio Grande do Sul (RS) State is very well known. This Biome is endangered because the increase of agriculture and forestry areas and its conservations has been neglected. There is lax enforcement of environmental legislation and has been given less importance than the rain forests. The genus *Petunia* Juss. (Solanaceae) has a long history of artificial breeding being the hybrids of the *P. axillaris* e *P. integrifolia* worldwide disseminated as ornamental plants and are known as *P. X hybrida* or garden petunia. *P. axillaris* has a wide geographic distribution, occurring throughout the Pampa Biome, usually in outcrops and in roadside. Based on morphological characters of the flowers, this species is separated in three subspecies: *P. axillaris* ssp. *axillaris*, *P. axillaris* ssp. *parodii* e *P. axillaris* ssp. *subandina*. In this work were carried out molecular, morphological and ecological analysis by sequencing of cpDNA *trnS-trnG* e *trnH-psbA* intergenic spacers, measurement of the floral traits and use of climate data. Natural populations were studied in the whole area of species distribution. The geographical limits of the subspecies are in agreement with morphological and ecological criteria and for ssp. *axillaris* e ssp. *parodii*, the data support the two groups. The separation between the ssp. *axillaris* e ssp. *subandina* is weak because although they are ecologically distinct, they are not morphologically different. The cpDNA data do not support the exclusivity of these groups since haplotypes were sharing among the three groups, suggesting recent divergence and ancestral polymorphism retention. Despite the lack of genealogical resolution and unclear geographical structure, the cpDNA data provide relevant information about the biogeographic history of this species, which would have occupied a large geographical area during the cold and dry in Quaternary when there was grassland expansion. The patterns of variation in *P. axillaris*, especially morphological variations, are consistent with the geological continuity between RS and Uruguay. Further studies including others species will be important to determine the existence of a geographic pattern of the species distribution in this region.

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 Caracterização do grupo de estudo

### 1.1.1 O Gênero *Petunia*

A família Solanaceae L. compreende 2930 espécies distribuídas em 147 gêneros. Esta família é composta por espécies que podem ser ervas, arbustos, árvores, trepadeiras ou epífitas, geralmente caracterizadas por flores actinomorfas com cinco estames, cinco pétalas e cinco sépalas concrecidas. Muitos membros desta família são venenosos devido à presença de alcalóides, outros são fontes de drogas farmacêuticas ou narcóticas como, por exemplo, *Nicotiana* (tabaco), *Atropa* (beladona) e *Datura* (estramônio). A família Solanaceae também abriga diversas espécies usadas na alimentação humana, incluídas nos gêneros *Solanum* (tomate, batata, etc.) e *Capisicum* (pimenta), além de incluir diversas espécies de interesse ornamental em gêneros como *Browallia*, *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Salpiglossis*, *Solandra* e *Petunia* (Judd *et al.*, 1999).

O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) apresenta 14 espécies exclusivamente sul-americanas, sendo a maioria delas encontradas no Sul e Sudeste do Brasil (Stehmann *et al.*, 2009). A denominação “petúnia” é derivada de “petum, betum”, nome indígena do tabaco (*Nicotiana tabacum*) que é muito semelhante a *Petunia nyctaginiflora* (= *Petunia axillaris*), uma das primeiras espécies descritas para o gênero (Stehmann, 1999).

Embora a metade das espécies do gênero seja endêmica de regiões muito restritas, com algumas delas associadas a regiões fitoecológicas específicas, *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns and Poggenb e *Petunia integrifolia* (Hook.) apresentam uma distribuição ampla (Stehmann, 1999). Conhecidas popularmente como petúnias-de-jardim, este gênero tem uma longa história de cruzamentos artificiais, sendo os híbridos entre *P. axillaris* e *P. integrifolia* mundialmente disseminados como plantas ornamentais (*Petunia X hybrida*). Híbridos artificiais entre *P. axillaris* (esfingófila) e *P. integrifolia* (melitófila) também tem sido utilizados para investigar a arquitetura genética das diferentes síndromes de

polinização, onde foram encontrados de um a cinco *loci* envolvidos na determinação de características quantitativas (QTLs) distintivas entre as espécies (Stuurman *et al.*, 2004).

Como não há barreiras intrínsecas ao cruzamento entre diferentes espécies de *Petunia* (Watanabe *et al.*, 1996), os principais mecanismos de isolamento reprodutivo encontrados no gênero são ecológicos (segregação floral e de habitat) e geográficos. As espécies de *Petunia* florescem geralmente no mesmo período, não havendo isolamento sazonal (Stehmann, 1999). A síndrome floral mais comum, e provavelmente ancestral, no gênero *Petunia* é a melitofilia (conjunto de caracteres florais adaptados à polinização por abelhas), enquanto a ornitofilia (polinização por beija-flores) e a esfingofilia (polinização por mariposas) são consideradas síndromes derivadas (Stehmann, 1999). Em geral as espécies melitófilas são autoincompatíveis (Tsukamoto *et al.*, 1998) sendo a polinização preferencialmente realizada por abelhas especializadas, num provável processo de coevolução, uma etapa fundamental para sua manutenção (Stehmann, 1999). *Petunia exserta* Stehmann (1999), *P. secreta* Stehmann & Semir (2005) e algumas linhagens de *P. axillaris* são autocompatíveis (Stehmann, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2003). Todas as espécies apresentam frutos capsulares, secos quando maduros, que contem uma grande quantidade de sementes pequenas que se depositam no solo próximo à planta mãe (autocoria), sem um sistema especializado de dispersão a longas distâncias. O vento pode auxiliar no processo de dispersão (Stehmann, 1999).

A baixa incidência de hibridação natural, apesar de exceções relatadas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006) sugere a existência de mecanismos eficientes de prevenção ao fluxo gênico interespecífico. Mecanismos de isolamento reprodutivos estabelecidos por adaptação a diferentes polinizadores parecem ser importantes na manutenção da integridade genética entre espécies de *Petunia* (Stehmann, 1999). As diferentes síndromes florais, aliadas à baixa diferenciação genética entre as espécies, sugerem a ocorrência de uma radiação adaptativa na evolução do gênero (Kulcheski *et al.*, 2006). Tal fenômeno é definido como a evolução divergente de numerosas linhagens em um curto espaço de tempo, acontecendo quando a evolução dessas linhagens divergentes envolve adaptação a diferentes modos de vida (Futuyma, 1998).

### 1.1.2 *Petunia axillaris*

*Petunia axillaris* é uma das espécies parentais das petúnias de jardim, foi inicialmente encontrada em Montevideo (Uruguai) pelo botânico francês Philibert Commerson e foi descrita como *Nicotiana axillaris* por Lamarck (1793). Mais tarde o gênero *Petunia* foi estabelecido por Jussieu (1803), e esta espécie foi tratada como típica deste gênero. *P. axillaris* possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil, Uruguai, Argentina e Bolívia, em afloramentos rochosos e locais alterados como beiras de estradas. No Brasil é encontrada apenas na metade sul do Rio Grande do Sul (Ando, 1996), em regiões da Depressão Central, Serra do Sudeste e Campanha que compõem o Bioma Pampa. No Uruguai ocorre em quase todos os Departamentos. Na Argentina habita a planície pampeana, bem como as serras da encosta subandina em altitudes de até 3000 metros. Na Bolívia, ocorre no sul na região subandina fronteira às províncias de Jujuy e Salta da Argentina, em altitudes inferiores a 2700 metros (Stehmann, 1999).

*Petunia axillaris* floresce intensamente durante a primavera e completa seu ciclo em um período de três a cinco meses (Figura 1). Esta espécie possui flores brancas, com corola de tamanho variável, com 3 a 7 cm de comprimento (Stehmann, 1999). As flores apresentam néctar com volume e concentração relativamente constantes durante os dois dias que duram e liberam um forte perfume ao entardecer. Esfingídeos (mariposas noturnas) são os polinizadores efetivos, sendo observadas também visitas de *Xylocopa augusti* (Hymenoptera, Apoidea) pilhando néctar nas flores (Ando *et al.*, 1995a ; Ando *et al.*, 1995b; Venail *et al.*, 2010).

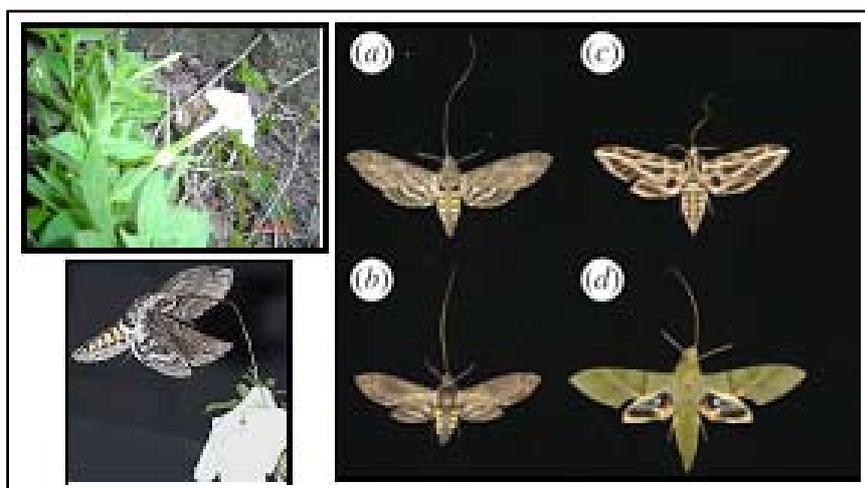


Figura 1: Planta de *Petunia axillaris* e esfingídeos, seu polinizador efetivo: (a) *Manduca sexta* (polinizador preferencial); (b) *Manduca diffissa*; (c) *Eumorpha vitis*; (d) *Eumorpha labruscae* (Imagens retiradas de Venail *et al.*, 2010, com permissão dos autores).

Morfológicamente, *P. axillaris* apresenta o tubo da corola longo e hipocrateriforme, pólen amarelo, folhas basais e apicais com tamanhos e formas diferentes (heterofilia), pedúnculos frutíferos eretos com cápsulas grandes (mais de 9 mm de comprimento) e sementes pequenas (com menos de 0,5 mm de comprimento), o ovário ovóide possui placentação axilar com numerosos óvulos, o estilete é reto e levemente curvado no ápice. O hábito das plantas é ereto ou ascendente (Stehmann, 1999).

O reconhecimento de taxa intraespecífico de *P. axillaris* através de observações de campo promoveu uma longa história de confusão dentro da espécie (Steere, 1931). Entretanto, a atual análise de caracteres florais em espécimes de herbário (Cabrera, 1977; Wijsman, 1982) e medidas de caracteres florais e vegetativos de populações cultivadas em casa de vegetação a partir de sementes de populações naturais (Ando *et al.*, 1994; Ando *et al.*, 1995a; Ando *et al.*, 1995b) possibilitou dividir a espécie em três subespécies: *P. axillaris* ssp. *axillaris*, *P. axillaris* ssp. *parodii* e *P. axillaris* ssp. *subandina* (Ando, 1996). A subespécie *parodii* foi inicialmente descrita para exemplares encontrados na Província de Formosa na Argentina pelo Agrônomo Argentino Lorenzo R. Parodi, e foi descrita como uma espécie independente por Steere (1931) e mais tarde tratada como uma subespécie de *P. axillaris* por Cabrera (1977) (Ando, 1996). A subespécie *subandina* foi descrita em 1996 pelo japonês Toshio Ando, através de observação de espécimes de

herbário e de seu habitat, segundo ele esses exemplares de herbário estavam mal identificados como sendo pertencentes à subespécie *parodii*.

Segundo Ando (1996), três caracteres florais são capazes de distinguir as subespécies, sendo *P. axillaris axillaris* e *P. axillaris parodii* facilmente identificadas por diferenças na posição dos estames e na forma da corola: a subespécie *axillaris* tem estames didínamos (dois estames longos, dois médios e um curto), corola com tubo curto (até 46 mm) e lobos arredondados nos ápices, enquanto a subespécie *parodii* tem quatro estames de igual comprimento (longos) e um curto, corola com tubo delgado e longo (mais de 46 mm) e lobos agudos nos ápices; por sua vez, a subespécie *subandina* apresenta estames fortemente didínamos (diferença dos estames médios e longos varia de 2-3 mm), tubo longo semelhante à ssp. *parodii* e lobos da corola assimétricos, sendo os três superiores mais agudos e os dois inferiores mais arredondados (Figura 2).

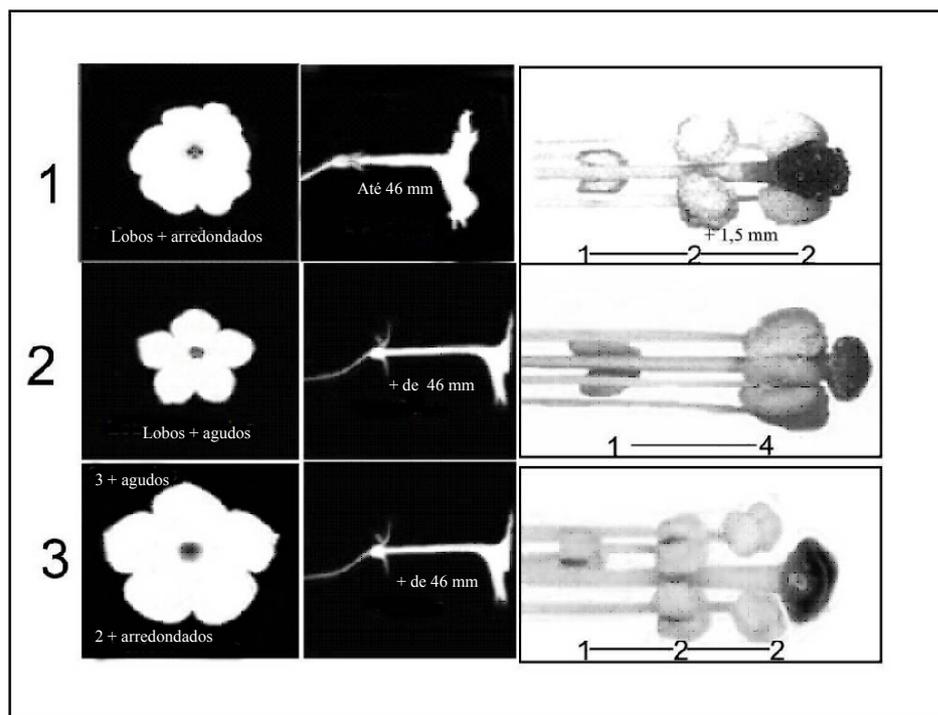


Figura 2: Morfologia floral típica de (1) *Petunia axillaris* ssp. *axillaris*; (2) *Petunia axillaris* ssp. *parodii*, e (3) *Petunia axillaris* ssp. *subandina*. Note-se a diferença no tamanho do tubo da corola, mais curto em (1), os estames didínamos, ausentes em (2), e o formato dos lobos da corola, diferente para as três subespécies (Adaptado de Ando, 1996).

As três subespécies têm distribuição disjunta, ou seja, são alopátricas (Ando *et al.*, 1995a; Ando, 1996), como representado no mapa da Figura 3. No Uruguai ocorrem duas das três subespécies: *ssp. axillaris* e *ssp. parodii* que apresentam distribuição disjunta coincidindo o limite de distribuição com o Rio Negro: a *ssp. parodii* ocorre ao norte enquanto a *ssp. axillaris* ocorre ao sul deste rio (Ando *et al.*, 1994; Ando *et al.*, 1995a; Ando *et al.*, 1995b). Entretanto, Kokubun *et al.* (1997), descrevem formas intermediárias entre as duas subespécies no Uruguai, ao longo do Rio Negro e do Rio da Prata, além de outras populações localizadas nos Departamentos de Tacuarembó, Paysandú, Durazno, Soriano e Treinta y Tres, sugerindo uma introgressão dos caracteres morfológicos por contato secundário das duas subespécies. Apesar disso, os trabalhos que estudaram os caracteres distinguíveis das subespécies (Ando, 1994, 1996; Kokubun *et al.*, 2006) não levaram em conta o grau de variabilidade intrapopulacional ou dentro das subespécies, tendo sido feitas apenas análises usando a média das medidas por população.

Na Argentina ocorrem as três subespécies: *ssp. axillaris*, encontrada somente nas províncias centrais, Buenos Aires e La Pampa, região plana, campestre e com um número limitado de planaltos. Essa subespécie parece estar restrita a tais planaltos ou à região costeira de grandes rios (como o Rio da Prata, em Buenos Aires); *ssp. parodii*, que é amplamente distribuída à nordeste da província de Entre Ríos, nas províncias de Santa Fé, Corrientes, Chaco, Formosa, borda norte de Buenos Aires e na parte oriental de Córdoba. Esta é a região ao norte do Pampa, chamada de Chaco, que se caracteriza por uma vasta planície arborizada; *ssp. subandina*, ocorre em regiões montanhosas do norte das províncias de La Pampa, San Luis, Mendoza, norte de Salta e Jujuy e na porção oeste de Córdoba. A distribuição desta subespécie não é na Cordilheira dos Andes em si, mas no sistema montanhoso entre os Andes e a Planície Central, sendo que nas províncias de Salta, Jujuy e Tucumán, essas regiões são chamadas de Sierras Subandinas, enquanto que a região mais ao sul é chamada de Sierras Pampeanas (Ando, 1996, citando Muscolo, 1970).

Em estudos posteriores, Kokubun *et al.* (2006) descrevem que no Rio Grande do Sul ocorrem duas subespécies, também de forma disjunta: *ssp. axillaris* (Depressão Central e Serra do Sudeste) e *ssp. parodii* (Região da Campanha). Neste mesmo trabalho, através de observações de campo, os autores descrevem que a morfologia floral da *ssp. axillaris* do Rio Grande do Sul é diferente da encontrada em outros locais de distribuição desta subespécie, sugerindo ser uma forma intermediária entre as subespécies *axillaris* e *parodii*.

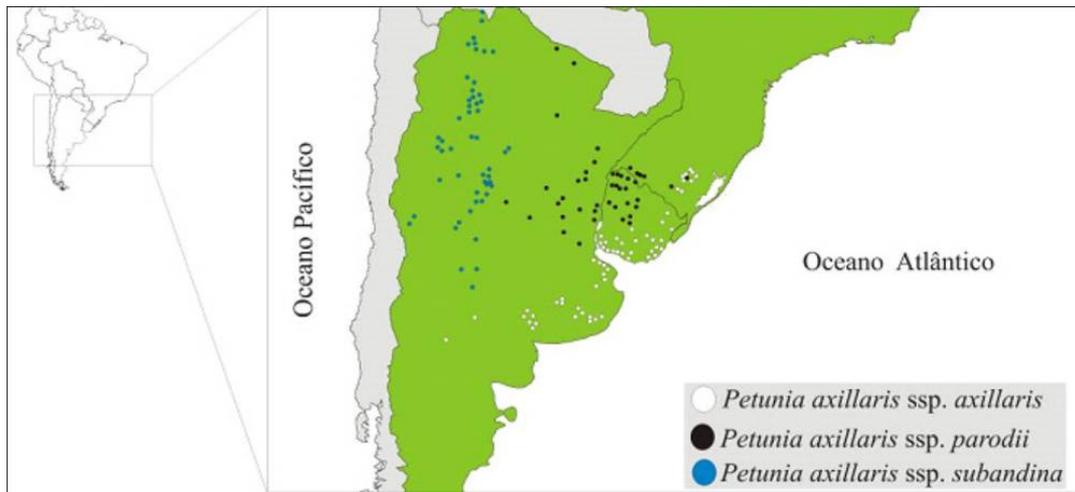


Figura 3: Mapa da distribuição de *Petunia axillaris* no Uruguai (adaptado de Ando, 1995), na Argentina (adaptado de Ando, 1996) e Sul do Brasil (pontos coletados por nosso grupo de pesquisa LEM-UFRGS).

Lorenz-Lemke *et al.* (2006) estudaram algumas populações de diferentes espécies de *Petunia* do Pampa Gaúcho e encontraram plantas com características morfológicas intermediárias entre *P. axillaris* ssp. *axillaris* e *P. exserta*, que é uma espécie endêmica de formações rochosas da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul. Esses resultados sugerem que as diferenças florais e a ocupação de habitats específicos podem não constituir barreiras reprodutivas eficientes entre estas duas espécies atualmente. Os híbridos putativos foram encontrados dentro de reentrâncias rochosas (abrigo) em torres areníticas, juntamente com populações de *P. exserta*. Próximos a estes locais, mas em áreas ensolaradas, foram encontradas plantas com morfologia típica de *P. axillaris* ssp. *axillaris*. Os marcadores plastidiais (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*) revelaram um padrão espacial de ocorrência, no qual praticamente todas as plantas presentes no mesmo abrigo, independentemente do fenótipo, apresentavam o mesmo haplótipo. A impossibilidade de distinguir as populações simpátricas de *P. axillaris* ssp. *axillaris* e *P. exserta* através das linhagens de cpDNA indicou que, além das plantas com morfologia intermediária, plantas com fenótipo parental também podem representar híbridos interespecíficos.

Diante disso, são necessários mais estudos para avaliar a variação dos caracteres morfológicos florais que distinguem as três subespécies de *P. axillaris* ao longo de sua

distribuição, associando com análises de DNA para uma melhor compreensão da história evolutiva dessa espécie.

## 1.2 O Pampa

O Pampa abrange regiões pastoris em planícies de três países da América do Sul, cerca de dois terços do estado brasileiro Rio Grande do Sul, as províncias argentinas de Buenos Aires, La Pampa, Santa Fé, Entre Rios e Corrientes e a República Oriental do Uruguai. Está localizado entre 30° e 34° latitude sul e 57° e 63° latitude oeste (Figura 4). No Brasil, só existe no Rio Grande do Sul e ocupa 63% do território do estado. O Pampa, como bioma (IBGE, 2004), é a reunião de formações ecológicas que se inter cruzam em uma formação ecopaisagística única, com intenso tráfego de matéria, energia e vida entre os campos, matas ciliares (de galeria), capões de mato e matas de encostas, suas principais formações. Abrange uma área de 176.496 km<sup>2</sup>, 2,07% da parcela do território brasileiro (Suertegaray & Silva, 2009).

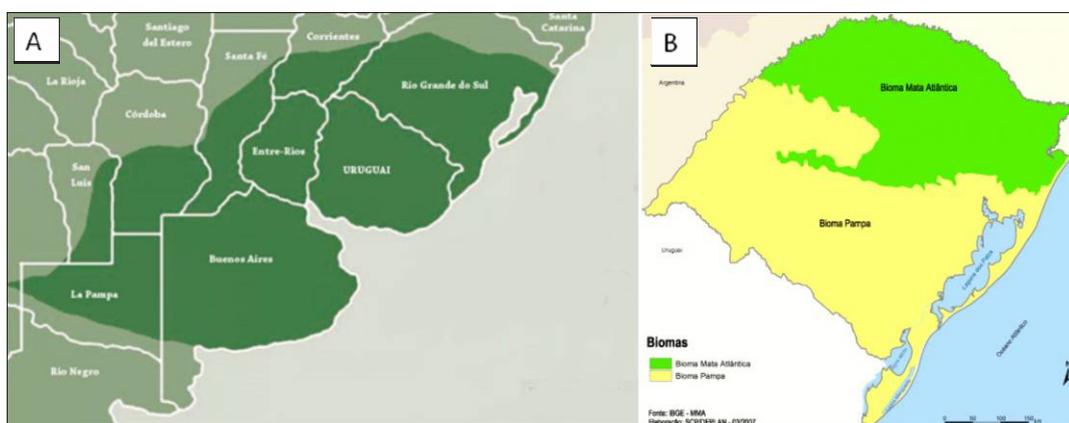


Figura 4: (A) Mapa representando a região de abrangência do Pampa, tom de verde escuro ([http://br.geocities.com/biomapampa/mapa\\_bioma\\_pampa.jpg](http://br.geocities.com/biomapampa/mapa_bioma_pampa.jpg)); (B) Bioma Pampa Brasileiro, restrito ao estado do Rio Grande do Sul, em amarelo (IBGE, 2004).

Em termos geomorfológicos, o Pampa é uma região complexa, pois inclui diversas unidades geradas em contextos tectônicos e paleogeográficos distintos (Paim *et al.*, 2000), incluindo desde elementos magmáticos intrusivos (granitos) do Proterozóico

médio, até sedimentos Holocênicos do litoral, em uma faixa que inclui também rochas basálticas do Mesozóico, além de uma série de elementos sedimentares (IBGE, 1997b). O mapa apresentado na Figura 5 mostra uma grande área de relações geológicas do Uruguai com o Sul do Brasil, relações essas que obviamente afetam a distribuição das espécies vegetais (Grela, 2004).

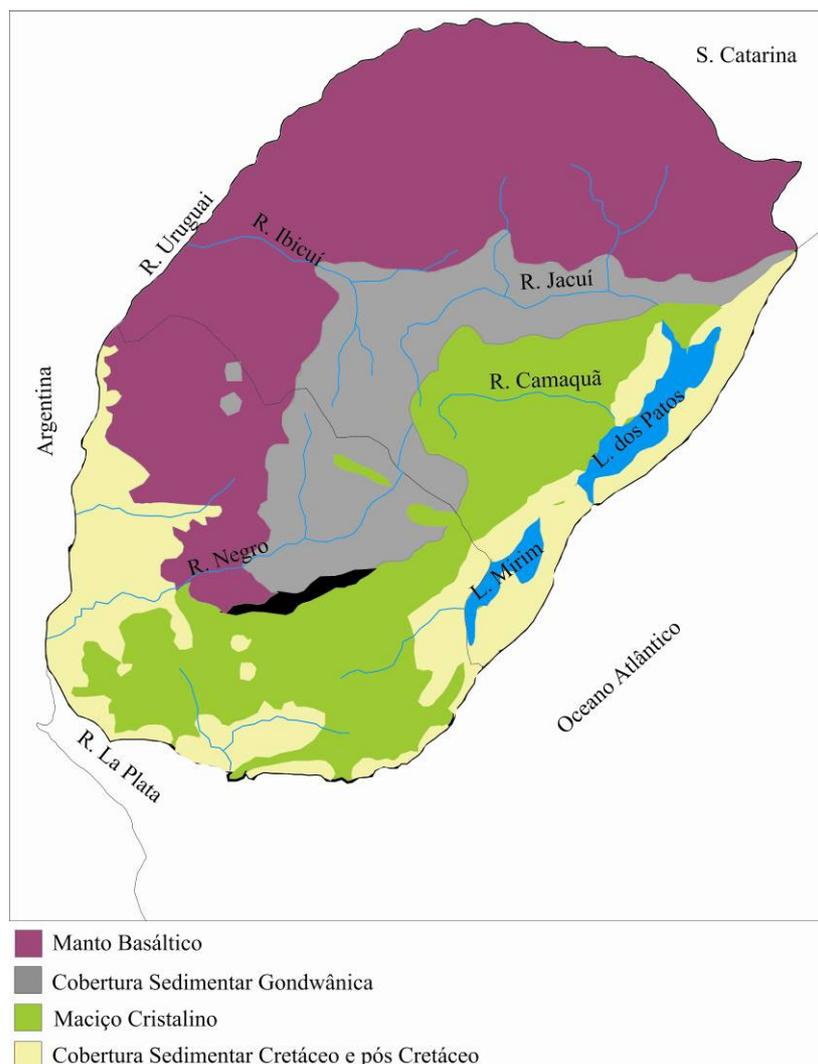


Figura 5: Esquema geológico do Uruguai e Rio Grande do Sul. Podem-se perceber áreas de similaridade de ambos. Região em cinza que forma um arco é a chamada Depressão Central Gaúcha, que se estende pelo território do país vizinho (modificado de Grela, 2004).

Essa continuidade geológica entre o Sul do Brasil e o Uruguai é bem conhecida e se manifesta nas características geomorfológicas, fisiográficas e edáficas. Particularmente o conjunto de “quebradas” no extremo noroeste de Tacuarembó e Rivera é o fim de um vasto e complicado sistema produzido a partir de contato entre arenitos do Triássico e Jurássico e basaltos do Cretáceo, que abrange geograficamente desde o norte do estado de São Paulo até atingir seu limite sul entre Torres, na fronteira entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, a leste, e regiões dos Departamentos de Río Negro e Durazno, no Uruguai, mais a oeste. O arco formado entre Torres e o noroeste do Uruguai, em tom de cinza no mapa da Figura 5, é a chamada Depressão Central Gaúcha, que possibilita uma conexão entre os diferentes tipos de Flora do sul do Brasil com o Uruguai (Fambrini *et al.*, 2005).

Já o Planalto Sul-Riograndense, representado em de verde no mapa da Figura 5, representa uma continuidade geomorfológica, a sudeste, entre grande parte da metade sul do Rio Grande do Sul (a sul do Rio Jacuí) e sul e leste do Uruguai, através de um conjunto de serras que se estende desde a Serra do Sudeste, no RS, até Punta Ballena e a Sierra de Las Ánimas, no Departamento de Maldonado, passando por Aceguá e Centurión (no nordeste do Departamento de Cerro Largo). Geologicamente, trata-se de afloramentos de rochas ígneas efusivas e intrusivas e/ou metamórficas do Proterozóico Superior que proporcionam um relevo relativamente acidentado com alturas que podem alcançar de 500 m ao nível do mar (IBGE, 1997a; Bossi *et al.*, 1998).

Na Argentina, a planície pampeana é delimitada pelos afloramentos rochosos de Tandil (Proterozóico) e La Ventana (Paleozóico), a sul, e pelas Serras Pampeanas de Córdoba e San Luís, a oeste (Crisci *et al.*, 2001). A noroeste, as planícies e depressões continuam até chegar à região geográfica do Chaco, que inclui o centro norte da Argentina, oeste do Paraguai e sudoeste da Bolívia, totalmente desprovida de afloramentos rochosos e coberta por sedimentos Devonianos.

Grela (2004) citando Chebataroff (1960) ressaltou as óbvias diferenças físicas entre o Uruguai e a área de “Pampas” no território Argentino. As mais relevantes são: o subsolo do Uruguai é extremamente variável, com afloramentos rochosos que possuem idade desde o Proterozóico até o Quaternário. Este, por sua vez, determina uma grande variabilidade de tipos de solo (derivados de rochas basálticas, graníticas, areníticas, silte,

etc.), e de formas de relevo. Assim, a oeste do Uruguai tem uma importante descontinuidade geológica, o que implica uma mudança nas condições fisiográficas e de solo, embora isso não necessariamente implique na existência de uma barreira à distribuição de espécies (Grela, 2004).

A variação no substrato geológico e na altitude contribui para a diversidade de tipos vegetacionais da região (Suertegaray & Silva, 2009). O tipo de vegetação predominante do Bioma Pampa recebe vários nomes, alguns de origem local como "pampas" ou "campos", e outros atribuídos pela sua semelhança com outros tipos de vegetação como "estepes", "savana", "pradaria", "pastagens", etc. No entanto, esta região de dominância de formações herbáceas está longe de ser homogênea em sua fisionomia (vegetação), onde a ausência de barreiras significativas (com exceção do Rio da Prata, talvez da Lagoa Mirim, e a Laguna dos Patos) é um fator que, sem dúvida, desempenha um papel importante na definição dos limites fitogeográficos, que determinam uma mudança gradual na composição florística de toda a região. Assim, também é razoável que se conceba a mesma como uma grande área de transição (Grela, 2004).

No território brasileiro, a maior parte da vegetação que compõe esse bioma é classificada como savana parque, que se caracteriza por apresentar um extrato herbáceo contínuo, com árvores espalhadas ou agrupadas, e por matas de galeria. Esta formação recobre relevos fortemente ondulados até montanhosos, solos pouco profundos e com afloramentos rochosos. A savana ocupa vasta distribuição geográfica no Planalto Sul-Rio-Grandense, razão pela qual faz limite com quase todos os tipos de vegetação existentes no Estado (Teixeira *et al.*, 1986). A natureza de mosaico do Pampa e suas conexões com outros biomas também se expressa na aparição de diversos elementos de distintas floras sul-americanas em sua composição (Grela, 2004).

O cenário das paisagens pampeanas está ambientado sob a influência de um clima temperado, classificado como mesotérmico brando e superúmido, com visitas periódicas das frentes frias no inverno (junho-setembro), quando é comum as temperaturas baixarem a 0°C. Os verões são quentes, tendo uma variação média de 22°C a mais de 34°C de temperatura entre dezembro e março. Precipitações anuais variam entre 1.250 e 1.500 mm, não se observando a configuração de uma estação seca. Um clima significativamente umidificado que privilegia a expansão de plantas de crescimento secundário (lenhosas de

porte arbóreo e arbustivo, como as espécies de matas de galerias e ciliares) sobre o tapete campestre, onde as condições hídricas e edáficas são favoráveis, como os vales fluviais e as encostas rebaixadas e úmidas (Suertegaray & Silva, 2009).

A origem dos campos neste bioma é incerta. Segundo Rambo (1954), o fator determinante seria o controle exercido pelo solo, sendo o clima geral propício ao desenvolvimento de florestas subtropicais. Embora a região do Pampa já fosse dominada por campos quando da chegada dos seus primeiros habitantes no final do Pleistoceno (Behling, 2002b), foi a partir de 1800, com a intensa colonização dessa região por colonos europeus, que houve uma alteração mais significativa da composição vegetal da região, principalmente devida ao pastoreio e à implantação de cultivos agrícolas. Atualmente, a introdução de espécies exóticas e a implantação da indústria de reflorestamento representam ameaças consideráveis à biota do Pampa (Pillar, 2006). O Bioma Pampa está pouco representado em áreas protegidas e um maior conhecimento sobre sua história e diversidade é fundamental para auxiliar os esforços de conservação nessa região (Martino, 2004).

### **1.3 Filogeografia**

A filogeografia é o campo de estudos envolvidos com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genéticas, especialmente aqueles dentro e entre espécies (Avice, 2000). Inferências filogeográficas podem contribuir para um amplo estudo de ecologia e evolução em vários aspectos, tal como a identificação de regiões evolutivamente independentes. Tais abordagens ainda podem fornecer um contexto evolutivo e geográfico para as espécies e populações, compreendendo as comunidades ecológicas e assim permitindo a determinação das influências históricas e espaciais nas amostras de riqueza de espécies (Ricklefs & Schluter, 1993; Young, 1996; Bermingham & Moritz, 1998). Outro potencial dos estudos filogeográficos é o de permitir o entendimento e a identificação da história de áreas isoladas evolutivamente, podendo assim orientar estratégias e prioridades para a conservação das mesmas (Bermingham & Moritz, 1998; Moritz, 2002). Estudos filogeográficos de diversas espécies têm revelado muito sobre a natureza demográfica e histórica da evolução intraespecífica (Avice, 2009).

Vários são os exemplos de estudos filogeográficos em plantas que discutem um panorama evolutivo de grandes áreas, sendo a maioria deles relacionada a regiões temperadas (Aoki *et al.*, 2006; Bauert *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Fujii, 2007; Chen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; ; Ortiz *et al.*, 2008; Latch *et al.*, 2009). Por outro lado, um número limitado de estudos abordam padrões filogeográficos de espécies de plantas presentes em regiões neotropicais (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; 2006; Miller *et al.*, 2008; Colevatti *et al.*, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Turchetto-Zolet, 2009; Arana *et al.*, 2010; Novaes *et al.*, 2010), e menos ainda nas planícies sul americanas (Speranza *et al.*, 2007).

Embora muitas espécies mostrem estrutura filogeográfica significativa, exceções existem e estas podem ser altamente informativas sobre muitos princípios filogeográficos (Avice, 2009). Processos geológicos juntamente com episódios climáticos do Quaternário são considerados por muitos autores como tendo desempenhado o maior papel na atual distribuição e evolução de plantas (Hewitt, 1996; Hewitt, 2000; Vargas, 2003; Pielou, 2008). Oscilações climáticas afetam diferentes partes do globo de maneira diversa, dependendo da distância em que se encontram em relação ao Equador, da massa continental, e da presença ou ausência de cadeias de montanhas. Durante o Último Máximo Glacial a maior parte do Hemisfério Norte foi coberta por gelo (Hewitt, 1996), já o Hemisfério Sul, no entanto, não foi submetido a extensivas glaciações embora seu clima tenha sido consideravelmente modificado (Clapperton, 1993).

As consequências bióticas das mudanças climáticas no sul do Continente Americano tem sido discutidas em relação à contração e expansão da flora Andina (Simpson & Todzia, 1990; Premoli *et al.*, 2000; Pastorino & Gallo, 2002; Pastorino *et al.*, 2004; Muellner *et al.*, 2005; Serrano-Serrano *et al.*, 2010), da contração da floresta Amazônica para ilhas ou refúgios (Ledru, 1993; Colinvaux *et al.*, 1996; Prance, 1996; Miles *et al.*, 2004;), da formação de refúgios da floresta Atlântica (Carnaval & Moritz, 2008; Carnaval *et al.*, 2009), da expansão de formações abertas tropicais e subtropicais (Behling, 1995, 1997, 2002a; Behling & Pillar, 2007; Behling *et al.*, 2007; Behling, 2002c) e da expansão de floresta sazonalmente seca (Pennington *et al.*, 2000; Pennington *et al.*, 2004). Porém, existem poucos trabalhos estudando a biogeografia de plantas, neste contexto, nas planícies tropicais e temperadas do sul da América do Sul (Speranza *et al.*, 2007).

Nas planícies baixas do Sul da América do Sul, os numerosos episódios de mudanças climáticas e geomorfológicas do Quaternário tem sido crítico na formação do atual padrão de distribuição das espécies (Ab'Sáber, 1977; Burnham & Graham, 1999). Entretanto, os mecanismos de expansão e retração da vegetação nessas áreas, bem como muitas das informações sobre as mudanças paleoambientais durante o Pleistoceno e Holoceno, vem de estudos geomorfológicos e estratigráficos, incluindo fósseis de madeira e vertebrados (Tonni & Fidalgo, 1978; Iriondo, 1981; Iriondo, 1992; Iriondo & Garcia, 1993; Prieto, 1996; Zucol *et al.*, 2005; Iriarte, 2006; De Francesco *et al.*, 2007). Muitos desses estudos suportam a idéia de que o elemento subtropical tem expandido e contraído repetidamente na direção sudoeste/nordeste. Conseqüentemente, eventos do Quaternário perturbaram as espécies, causando a extinção de populações locais e mudando a pressão seletiva, produzindo uma considerável reorganização genética que pode ser refletido no conjunto gênico de cada uma das espécies modernas. Ab'Saber (1977) propôs que durante a fase seca, os elementos da flora atual, que são adaptados às condições mais úmidas, sobreviveram em refúgios de pastagens associados com encostas e planaltos. De acordo com essa hipótese, o atual padrão geográfico da variação genética dentro de um sistema biológico apropriado pode ser associado com as regiões de maior altitude na planície sulamericana. A distribuição geográfica da variabilidade genética de espécies pode ser interpretada em relação à história geomorfológica e climática da área.

#### **1. 4 Marcadores Moleculares, Morfológicos e Especiação.**

O avanço da utilização de marcadores moleculares e o enriquecimento das análises filogenéticas intraespecíficas possibilitaram a interpretação de possíveis cenários evolutivos, como o tempo e o padrão de divergência entre as populações de uma mesma espécie ou de espécies relacionadas. O isolamento através de uma barreira geográfica pode interromper o fluxo gênico entre as populações, promovendo divergência e diferenciação entre os grupos, através da deriva genética e da seleção natural (Futuyma, 2002). Espécies de origem muito recente ou que apresentam dispersão e fluxo gênico a longas distâncias podem não apresentar diferenciação geográfica, não havendo coerência entre o relacionamento genético e a distribuição das populações analisadas. Já espécies que apresentam linhagens genéticas distintas, formando grupos monofiléticos, geralmente passaram por longos períodos de barreiras ao fluxo gênico (Avise, 2000).

Dados genéticos frequentemente são usados para delimitar espécies, onde este estatus é determinado com base em um critério exclusivo, tal como monofilia recíproca. Há inúmeros exemplos empíricos de incongruências entre os limites inferidos a partir de dados genéticos em comparação com outras fontes de dados, como a morfologia, em espécies recentes (Knowles & Carstens, 2007).

O padrão da variação genética reflete o modo de especiação e o tempo de divergência de prováveis espécies irmãs, mas naturalmente, as características genéticas devem ser consideradas em um contexto ecológico, espacial e temporal, de acordo com as regiões geográficas particulares e com os eventos geológicos nelas ocorridos (Hewitt, 2001). Oscilações paleoclimáticas periódicas alteraram fortemente a disponibilidade de habitats e produziram grande impacto na distribuição e história evolutiva de muitos grupos biológicos (Knowles, 2001). Muitas discussões usam o contexto geográfico para classificar os modos de especiação. Especiação alopátrica ocorre quando uma barreira física ou a própria distância reduzem o fluxo gênico entre as populações, estas quando isoladas se diferenciam através de mutações e alteram suas frequências alélicas por deriva genética ou seleção natural, até que ocorre o isolamento reprodutivo. Especiação por vicariância ocorre quando duas populações são separadas pelo surgimento de uma barreira extrínseca, enquanto que a especiação peripátrica ocorre quando há formação, geralmente por dispersão, de uma subpopulação periférica a partir da população original e, após várias gerações, ocorre o isolamento reprodutivo. Essa segunda possibilidade é comum em eventos de colonização de ilhas a partir do continente. Já na especiação simpátrica, uma barreira biológica ao intercruzamento se origina dentro dos limites de uma população, sem nenhuma segregação espacial das espécies incipientes (Futuyma, 2002; Coyne, 2004; Butlin *et al.*, 2008). A especiação simpátrica parece ser mais comum em plantas que em animais e pode ocorrer em uma ou poucas gerações (Judd *et al.*, 1999).

Os modelos instantâneos mais aceitos são a hibridação seguida de poliploidia (alopoliploidia); a modificação do sistema reprodutivo de auto-incompatível para auto-compatível; as modificações cromossômicas estruturais, que levam à intersterilidade; e as mutações em genes de grande efeito nas estruturas reprodutivas (Judd *et al.*, 1999). Quando comparados com outros grupos, os indivíduos de uma mesma espécie são mais relacionados entre si (Conceito Filogenético de Espécie) e suas moléculas mostram um ancestral comum mais recente. Em locais onde populações distintas geneticamente se

intercruzam formam-se zonas híbridas. Por outro lado, populações em processo de especiação ou espécies próximas podem apresentar compartilhamento de linhagens genéticas ancestrais. Os estudos com marcadores genéticos podem esclarecer estes processos (Avice, 2000). A utilização de marcadores moleculares tem demonstrado ser muito útil nos estudos que envolvem questões taxonômicas. Os métodos de análises taxonômicas mais utilizados atualmente são os morfológicos e os moleculares, ambos apresentando vantagens e desvantagens próprias. Os dados moleculares são criticados, porque é possível que representem somente a evolução do marcador e, não necessariamente, das espécies (Pelser *et al.*, 2003). Por outro lado, uma das vantagens dos marcadores moleculares é que a análise do DNA pode acessar indiretamente informações sobre a morfologia. Abordagens genéticas e morfológicas se complementam e reforçam uma análise taxonômica, pois, dessa forma, geram-se mais caracteres para a análise, além deles não estarem diretamente relacionados.

Atualmente, o sequenciamento de DNA tem sido uma das técnicas mais utilizadas em estudos filogeográficos, pois permite a avaliação de vários níveis taxonômicos em diversas escalas geográficas (Avice, 2000). Entre os marcadores moleculares que estão sendo utilizados em estudos filogeográficos de plantas, pode-se destacar os espaçadores intergênicos plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. Tais regiões apresentam um grande potencial de variação para estudos populacionais e evolutivos (Okaura & Harada, 2002; Pelser *et al.*, 2003; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006), para investigações sobre a origem de espécies híbridas (Iwata & Ohno, 2000) e para identificar eventos de hibridação, que podem não ser identificada somente através da análise morfológica (Olsen & Schaal, 1999; Olsen, 2002; Bleeker, 2003; Fant *et al.*, 2003; Fant *et al.*, 2005; Tovar-Sanchez *et al.*, 2008). Os marcadores plastidiais são bastante utilizados e se caracterizam pela frequente herança uniparental, o que é uma vantagem desses marcadores para avaliação diferencial do fluxo gênico via pólen e sementes (Korpelainen, 2004).

A delimitação de espécies é notoriamente difícil quando o critério operacional suporta discordância nos limites de espécies, mas isso é esperado em radiações recentes ou adaptativas. Avaliar múltiplos critérios operacionais não só aumenta a habilidade para detectar separação recente entre as linhagens, mas também pode fornecer fortes evidências para sua separação (Leache *et al.*, 2009).

A divergência ecológica representa uma etapa importante no processo de separação de linhagens, de forma que se torna cada vez mais indispensável quantificar os dados ecológicos de populações, usando sistema de informações geográficas (GIS). Além disso, é possível integrar estes dados dentro de um quadro filogeográfico. Predizer a distribuição geográfica de linhagens pode ajudar a identificar barreiras para dispersão, que são importantes porque podem restringir o fluxo gênico e facilitar a divergência das populações num calendário evolutivo. Alternativamente, uma área de sobreposição entre populações parapátricas pode significar uma zona de contato onde o fluxo de genes está em curso (Leache *et al.*, 2009).

Devido à longa história de tentativas de classificação e busca por caracteres distinguíveis para as três subespécies de *P. axillaris*, somado aos relatos de populações intermediárias, no presente estudo foram analisadas a variabilidade genética, ecológicas e morfológica, para investigar a diversificação de linhagens desse complexo.

### **1.5 Genética e conservação: contribuição para a preservação de espécies e ambientes**

Para melhor compreender a dinâmica e os processos envolvidos na manutenção da biodiversidade, possibilitando a conservação e o manejo dos recursos genéticos existentes, é necessário o conhecimento do padrão de distribuição da diversidade genética, fluxo gênico e filogeografia das espécies que compõem um ecossistema.

A diversidade genética é de grande importância para a sustentabilidade de populações de plantas. Na conservação de uma espécie, o conhecimento da variação genética intraespecífica pode ajudar a avaliar os riscos de extinção, como o grau de endocruzamento, além do potencial evolutivo em um mundo em mudanças. A conservação efetiva de uma espécie vulnerável depende grandemente do conhecimento dos padrões de variação genética. Por exemplo, a estrutura espacial da variação genética pode providenciar informações para estratégias de amostragem para conservação *ex situ* e *in situ* (Rahimmalek *et al.*, 2009). O monitoramento de populações naturais de espécies nativas que ocupam áreas em atual processo de descaracterização ambiental é fundamental para que se possa dimensionar e evitar maiores danos aos ecossistemas. Quando estes processos ocorrem em ambientes muito dinâmicos, torna-se urgente o desenvolvimento de políticas

ambientais severas contra tais ameaças, além de incentivar a aplicação da legislação já existente.

A diversidade biológica é difícil de ser definida, mas pode ter seu sentido simplificado se a analisarmos sob uma ótica hierarquizada dos níveis de organização biológica (genes, populações, comunidades, paisagens). Rozzi *et al.* (2001) destacaram que a diversidade biológica é composta por três atributos atuantes sobre todos os níveis de organização: o atributo composicional, que define os níveis de organização biológicos; o atributo funcional que se refere à variedade de processos e interações que ocorrem entre os componentes biológicos; e o atributo estrutural que considera a disposição ou ordenamento físico dos componentes em cada nível de organização. Quanto ao dinamismo intrínseco dos sistemas biológicos naturais, pode-se dizer que este é resultado de processos ecológicos e evolutivos que atuam em diferentes escalas espaciais e, principalmente, temporais. Portanto, podemos dizer que os níveis de biodiversidade atualmente observados nos sistemas naturais são fruto do processo da evolução biológica em tempo geológico (macroevolução), acompanhado pela inerente complexidade ecológica, processos no tempo ecológico ou em poucas gerações (microevolução).

Diversos métodos para estimar a biodiversidade têm sido propostos a fim de identificar áreas prioritárias para a conservação. Recentemente, o conhecimento da biologia evolutiva dos organismos passou a ser valorizado neste contexto. Dessa forma, muitos planos de conservação tem como objetivo a manutenção da variabilidade genética, tendo em vista os processos evolutivos (Mace & Purvis, 2008). A distribuição geográfica no tempo evolutivo é um dos critérios que pode ser utilizado neste tipo de avaliação. Uma boa estratégia é priorizar a conservação de grupos que incluam a maior história evolutiva, identificando populações com maior variabilidade genética através de análises filogenéticas moleculares (Vazquez & Gittleman, 1998). Grande valor deve ser dado às regiões ricas em endemismos devido à elevada vulnerabilidade destas espécies que, além de apresentar uma distribuição geográfica restrita, muitas vezes requerem nichos ecológicos especiais (Primack & Rodrigues, 2001).

A maioria dos organismos possui uma distribuição disjunta, característica da espécie ou determinada pela descontinuidade do habitat. A frequência de alelos pode apresentar uma estrutura espacial diferente, em função dos efeitos do fluxo gênico, das

diferentes pressões seletivas entre as populações isoladas, da deriva genética e do sistema de cruzamento. Em espécies com distribuição espacial contínua, o endocruzamento está restrito a pequenas distâncias, limitado pelo alcance da dispersão. Isto é especialmente relevante em plantas, onde as sementes representam a principal forma de dispersão, a qual, na maioria dos casos, está restrita a curtas distâncias (Cain, 2000). Atualmente, a maioria das paisagens originais foi reduzida a mosaicos de habitats remanescentes, cercados por áreas desfavoráveis. Neste processo, grandes populações foram reduzidas ou subdivididas, possivelmente levando ao isolamento. A fragmentação do habitat pode levar à redução da variabilidade genética (Pillar *et al.*, 2009).

Para entender melhor a biodiversidade, muitos cientistas estão coletando informações sobre a variação genética encontrada entre os organismos. Esses dados frequentemente são usados para suplementar a variação morfológica observadas entre os *taxa*. As informações genéticas, tais como os dados de sequências, tornaram-se uma importante ferramenta para as questões sobre o relacionamento taxonômico e a classificação destes *taxa*. Além disso, são importantes para a proteção e conservação das espécies e organismos ameaçados.

Devido à falta de comunicação entre evolucionistas e os responsáveis pela determinação das áreas que serão preservadas, ou ainda pela urgência com que essas decisões tem que ser tomadas, muitos planos de manejo e conservação do meio ambiente tem sido feitos sem informações imprescindíveis. Para reduzir os obstáculos e integrar os conhecimentos dos processos evolutivos nos planos de conservação e manejo, é preciso estabelecer um vínculo direto entre cientistas e formadores de opinião, além disso, os responsáveis pelas decisões devem atuar junto com os cientistas do início ao fim do trabalho (Mace & Purvis, 2008).

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a variabilidade genética da espécie *Petunia axillaris*, comparando-a com uma análise da variação morfológica e ecológica para um melhor entendimento das relações evolutivas entre as três subespécies: *P. axillaris* ssp. *axillaris* e *P. axillaris* ssp. *parodii* e *P. axillaris* ssp. *subandina*, como parte integrante da análise filogeográfica e conhecimento da biodiversidade do Bioma Pampa.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Contribuir para o conhecimento da história evolutiva de *P. axillaris*, através do estudo filogeográfico;
- b) Avaliar a variabilidade genética dentro e entre populações de cada subespécie;
- c) Examinar a influência das variáveis ambientais e variação espacial, sobre a morfologia expressa de *P. axillaris*;
- d) Contribuir com mais subsídios para a taxonomia do grupo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coletas

O material analisado foi obtido através de coletas em campo durante o período da primavera (setembro a dezembro), época de floração da espécie, dos anos de 2008 e 2009. Algumas populações foram coletadas em cooperação com pesquisadores da Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina) e da Universidad de la República (Montevideo, Uruguai), através de convênio financiado pelo projeto PROSUL-CNPq. Foram analisados indivíduos de *Petunia axillaris* coletados de populações ao longo da distribuição da espécie. Foram obtidas as coordenadas geográficas de cada ponto de coleta através do sistema de posicionamento global (GPS) e uma exsicata de cada ponto foi confeccionada como testemunha, as quais foram depositadas no Herbário ICN do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram analisadas amostras provenientes de 102 populações, totalizando 614 indivíduos. Informações de coleta de cada população estão apresentadas na Tabela 1 e no mapa da Figura 6. Cada população foi identificada *a priori* como pertencente a uma das três subespécies de acordo com a localização geográfica da mesma, como descrito na literatura (Ando, 1995a, 1996). Para as análises genéticas foram coletadas folhas jovens, que foram armazenadas em sílica gel para total dessecação e posterior processamento.

Tabela 1: Informações dos pontos de coleta de *Petunia axillaris*.

ssp.	Populações	Nº de indivíduos	Origem	Coordenadas geográficas
<i>axillaris</i>	01 (RNegroS1)	6	Rio Negro/Uruguai	33°00'03" S/56°37'36" W
	02 (Durazno)	6	Durazno/Uruguai	33°21'57" S/56°30'33" W
	03 (Colonia1)	4	Colonia/Uruguai	34°20'09" S/57°20'05" W
	04 (R la Plata)	13	Colonia/Uruguai	34°26'06" S/57°16'27" W
	05 (Colonia2)	4	Colonia/Uruguai	34°21'24" S/57°06'10" W
	06 (R la Plata2)	7	San Jose/Uruguai	35°45'53" S/56°24'25" W
	07 (Piriápolis)	6	Maldonado/Uruguai	34°53'13" S/55°11'57" W
	08 (Ballena)	8	Maldonado/Uruguai	34°54'48" S/55°02'45" W
	09 (Maldonado)	7	Maldonado/Uruguai	34°54'35" S/54°59'59" W

10 (del Este1)	5	Maldonado/Uruguai	34°55'04" S/54°58'29" W
11 (del Este2)	9	Maldonado/Uruguai	34°52'20" S/54°45'05" W
12 (Ignácio)	8	Maldonado/Uruguai	34°46'35" S/54°40'59" W
13 (Rocha)	7	Rocha/Uruguai	34°30'57" S/54°20'43" W
14 (Polonio)	9	Rocha/Uruguai	34°24'09" S/53°47'01" W
15 (del Diablo)	6	Rocha/Uruguai	34°02'46" S/53°32'16" W
16 (Sta. Tereza)	6	Rocha/Uruguai	33°58'29" S/53°33'30" W
17 (SanMiguel)	4	Rocha/Uruguai	33°41'03" S/53°32'32" W
18 (Castillos)	5	Rocha/Uruguai	34°03'18" S/53°53'27" W
19 (Minas)	8	Lavalleja/Uruguai	34°21'46" S/55°09'50" W
20 (Minas2)	5	Lavalleja/Uruguai	34°09'04" S/54°53'39" W
21 (Rocha2)	6	Rocha/Uruguai	33°36'14" S/54°20'28" W
22(Treinta1)	6	Treinta y tres/Uruguai	32°56'10" S/54°18'23" W
23 (Treinta2)	2	Treinta y tres/Uruguai	32°54'12" S/54°17'26" W
24 (Treinta3)	1	Treinta y tres/Uruguai	32°49'25" S/54°14'39" W
25 (Melo1)	5	Cerro Largo/Uruguai	32°30'40" S/54°07'20" W
26 (Melo2)	5	Cerro Largo/Uruguai	32°22'40" S/54°19'40" W
27 (RNegro S2)	1	Cerro Largo/Uruguai	32°17'32" S/54°46'28" W
28 (Taim)	5	Rio Grande/RS	32°24'06" S/52°33'31" W
29 (Taim2)	5	Rio Grande/RS	32°09'29" S/52°23'57" W
30 (Pelotas)	5	Pelotas/RS	31°42'09" S/52°21'47" W
31 (Machado)	9	Pinheiro Machado/RS	31°41'26" S/53°01' 27" W
32 (Hulha)	5	Hulha Negra/RS	31°23'36" S/53°49'17" W
33 (Hulha2)	5	Hulha Negra/RS	31°23'28" S/53°50'08" W
34 (Bagé4)	8	Bagé/RS	31°21'50" S/53°55'36" W
35 (Bagé3)	1	Bagé/RS	31°21'15" S/53°56'24" W
36(Bagé5)	6	Bagé/RS	31°16'00" S/54°08'02" W
37 (Bagé)	4	Bagé/RS	31°13'03" S/54°16'53" W
38 (Bagé2)	6	Bagé/RS	31°09'39" S/54°21'31" W
39 (Pedrito)	6	Dom Pedrito/RS	31°05'37" S/54°27'28" W
40 (Aceguá)	6	Bagé/RS	31°27'17" S/54°08'25" W
41 (C. Pedra5)	6	Casa de Pedra, S.Sudeste/RS	30°58'38" S/53°36'19" W
42(C. Pedra)	5	Casa de Pedra, S.Sudeste/RS	30°58'35" S/53°36'19" S
43 (C. Pedra6)	6	Casa de Pedra, S.Sudeste/RS	30°58'28" S/53°36'09" W
44 (C. Pedra3)	11	Casa de Pedra, S.Sudeste/RS	30°58'22" S/53°36'19" W
45 (C. Pedra2)	5	Casa de Pedra, S.Sudeste/RS	30°58'04" S/53°35'43" W
46 (C. Pedra4 )	5	Casa de Pedra, S.Sudeste/RS	30°58'05" S/53°35'31" W
47 (C. Pedra1)	8	Casa de Pedra, S.Sudeste/RS	30°58'06" S/53°35'22" W
48 (Torre4)	10	Guaritas,S.Sudeste/RS	30°53'48" S/53°25'16" W
49 (Torre7)	6	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'32" S/53°31'24" W
50 (Torre18)	3	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'23" S/53°31'19"W
51 (Torre18A)	5	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'21" S/53°31'18" W
52 (Torre5)	5	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'11" S/53°30'34" W
53 (Torre9)	5	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'12" S/53°20'22" W

54 (Torre2)	3	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'12" S/53°30'17" W
55 (Torre16)	6	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'04" S/53°30'19" W
56 (Torre3)	2	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°49'55" S/53°30'09" W
57 (Torre14)	6	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'03" S/53°29'60" W
58 (Torre15A)	6	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'14" S/53°29'57" W
59 (Torre15)	4	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'17" S/53°30'00" W
60( Torre1)	3	Guaritas, S.Sudeste/RS	30°50'24" S/53°30'01" W
61 (Caçapava)	4	Caçapava/RS	30°34'05" S/53°23'18" W
62 (Pantano2)	7	Pantano grande/RS	30°12'55" S/52°33'55" W
63 (Pantano)	8	Pantano grande/RS	30°12'11" S/52°27'23" W
<i>parodii</i>			
64 (RNegroN)	5	Tacuarembó/Uruguai	32°39'52" S/56°28'52" W
65 (Tacuarembó2)	6	Tacuarembó/Uruguai	32°08'13" S/56°06'42" W
66 (Tacuarembó)	6	Tacuarembó/Uruguai	31°48'43" S/56°12'59" W
67 (Paysandú)	5	Paysandú/Uruguai	31°51'30" S/56°31'07" W
68 (VLunarejo)	2	Rivera/Uruguai	31°08'29" S/55°54'32" W
69 (Artigas3)	6	Artigas/Uruguai	30°41'44" S/56°20'16" W
70 (Artigas1)	6	Artigas/Uruguai	30°34'08" S/56°36'16" W
71 (Artigas2)	5	Artigas/Uruguai	30°46'32" S/56°46'37" W
72 (Salto4)	6	Salto/Uruguai	31°05'48" S/56°57'02" W
73 (Salto3)	9	Salto/Uruguai	31°18'45" S/57°05'34" W
74 (Salto2)	8	Salto/Uruguai	31°20'04" S/57°19'34" W
75 (Salto1)	7	Salto/Uruguai	31°27'21" S/57°54'19" W
76 (Livramento2)	6	Santana do Livramento/RS	30°45'07" S/55°45'10" W
77 (Livramento)	8	Santana do Livramento/RS	30°36'56" S/55°56'19" W
78 (Livramento3)	9	Santana do Livramento/RS	30°34'28" S/56°03'50" W
79 (Quaraí)	12	Quaraí/RS	30°18'41" S/56°28'43" W
80 (Alegrete2)	7	Alegrete/RS	29°51'35" S/55°56'47" W
81 (Alegrete)	12	Alegrete/RS	29°56'13" S/56°04'20" W
82 (Alegrete4)	5	Alegrete/RS	30°00'50" S/56°13'07" W
83 (Alegrete3)	5	Alegrete/RS	30°00'55" S/56°26'02" W
84 (Uruguaiana2)	6	Uruguaiana/RS	29°53'10" S/56°44'53" W
85 (Uruguaiana)	5	Uruguaiana/RS	29°50'29" S/56°56'28" W
86 (C11)	6	Corrientes/Argentina	29°33'44" S/57°30'40" W
87 (C10)	6	Entre Ríos/Argentina	30°31'38" S/58°32'59" W
88 (C1)	9	Corrientes/Argentina	30°12'08" S/58°47'21" W
89 (C9)	10	Corrientes/Argentina	30°10'45" S/59°00'46" W
90 (C3)	8	Entre Ríos/Argentina	30°23'24" S/58°42'52" W
91 (C8)	8	Corrientes/Argentina	30°19'50" S/59°14'42" W
92 (C6)	1	Corrientes/Argentina	30°19'00" S/59°21'49" W
93 (C2)	8	Corrientes/Argentina	30°13'01" S/59°23'39" W
94 (C7)	4	Corrientes/Argentina	30°12'45" S/59°29'26" W
95 (C5)	10	Corrientes/Argentina	29°48'18" S/59°23'42" W
96 (C4)	8	Corrientes/Argentina	29°39'53" S/59°21'40" W
97 (F)	6	Formosa/Argentina	25°07'25" S/59°58'05" W

<i>subandina</i>	98 (CO1)	2	Córdoba/Argentina	30°51'58" S/64°29'30" W
	99 (CO3)	6	Córdoba/Argentina	30°51'21" S/64°31'47" W
	100 (CO4)	1	Córdoba/Argentina	31°18'47" S/65°05'40" W
	101 (CO6)	11	Córdoba/Argentina	31°45'02" S/64°55'51" W
	102 (CO2)	5	Córdoba/Argentina	31°47'49" S/65°00'23" W
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>614</b>		

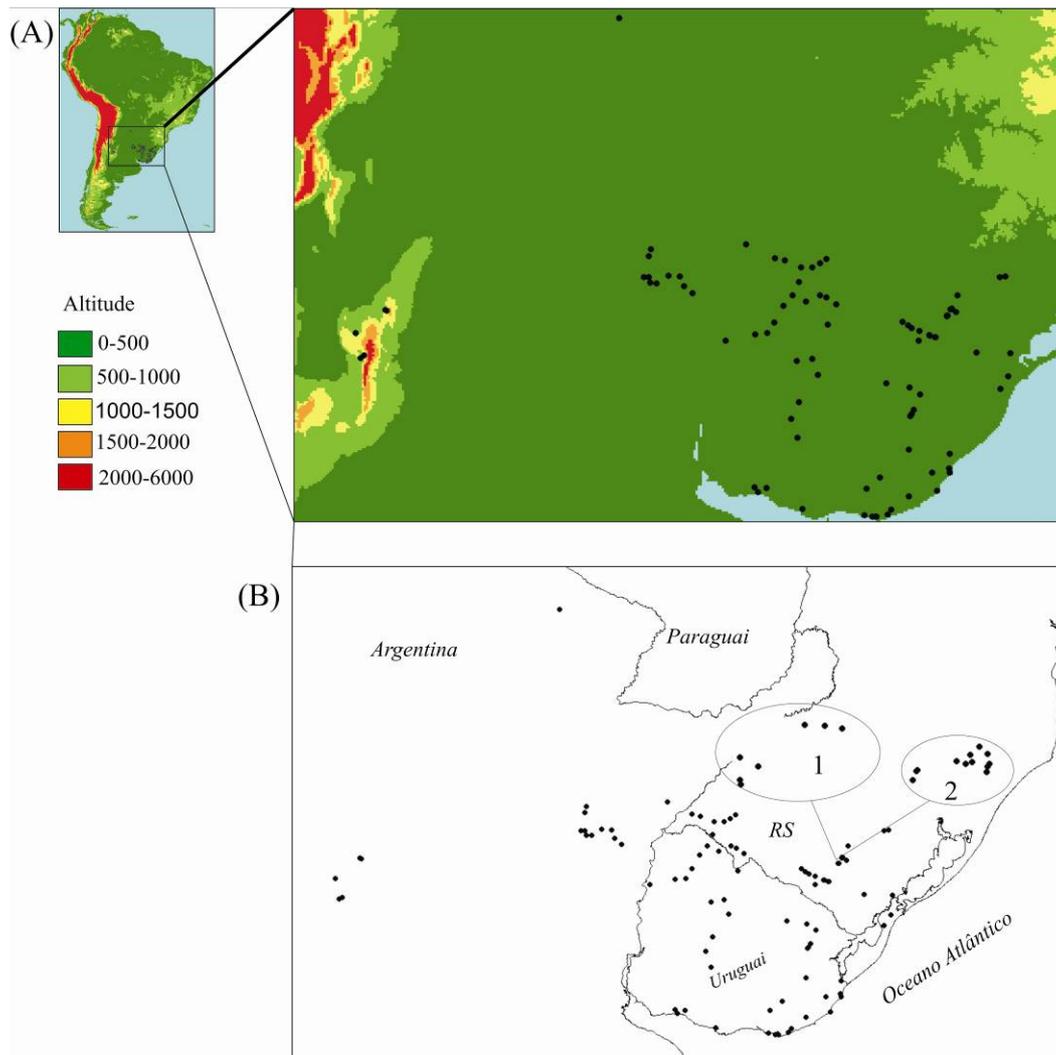


Figura 6: (A) Mapa com os pontos de coleta das 102 populações de *Petunia axillaris*, as cores representam a altitude da localidade em metros. (B) Círculos em detalhe representam (1) pontos da Casa de Pedra/RS e (2) Guaritas/RS, as quais ocorrem em torres rochosas próximas umas das outras, localizadas no município de Bagé/RS e Caçapava do Sul/RS, respectivamente, ambas pertencentes à região da Serra do Sudeste.

Com a finalidade de obter uma idéia mais regional da variação genética e morfológica, em algumas análises foram agrupadas populações próximas geograficamente, com morfologia da mesma subespécie e pertencentes a uma mesma unidade de paisagem. Também foram levadas em consideração possíveis barreiras já descritas na literatura separando as subespécies, como por exemplo, o Rio Negro, no Uruguai. Esses agrupamentos estão representados no mapa da Figura 7 e as populações pertencentes a cada grupo estão listadas na Tabela 2.

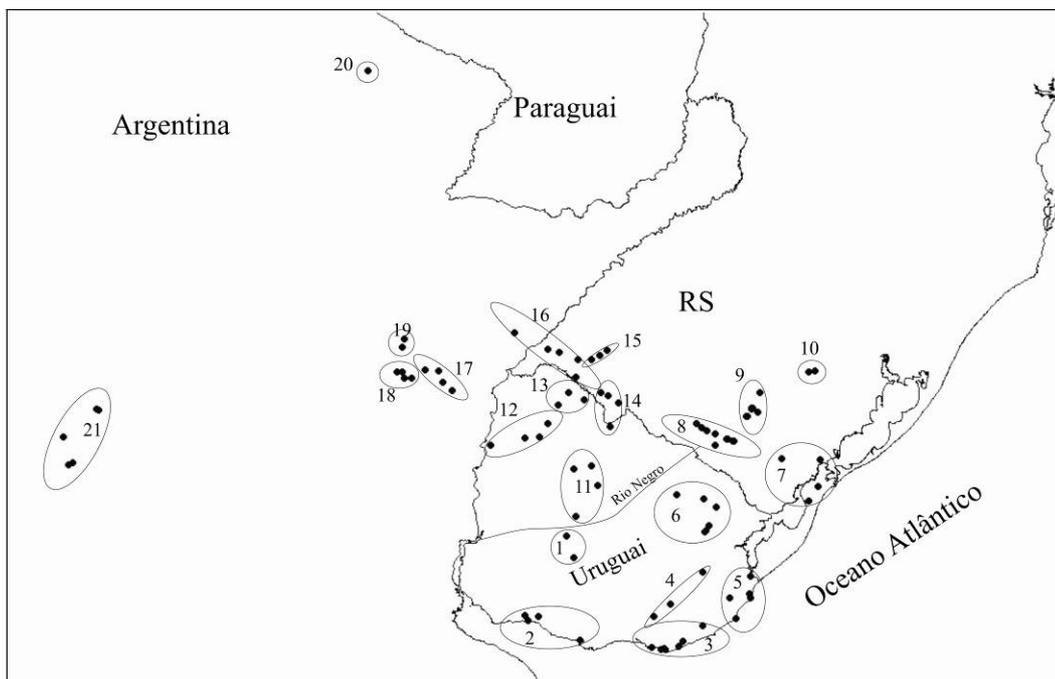


Figura 7: Mapa dos pontos de coleta de *Petunia axillaris* agrupados segundo distância geográfica, subespécie e unidade de paisagem.

Tabela 2: Grupos de *Petunia axillaris* segundo distância geográfica e habitat, e seus respectivos pontos de coleta.

<b>Grupo</b>	<b>Populações</b>
<b>1 (Durazno)</b>	Pop 1, 2
<b>2 (Colonia)</b>	Pop 3, 4, 5, 6
<b>3 (Maldonado)</b>	Pop 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
<b>4 (Minas)</b>	Pop 19, 20, 21
<b>5 (Castillos)</b>	Pop 14, 15, 16, 17, 18
<b>6 (Mello)</b>	Pop 22, 23, 24, 25, 26, 27
<b>7 (Pelotas)</b>	Pop 28, 29, 30, 31
<b>8 (Bagé)</b>	Pop 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
<b>9 (Guaritas)</b>	Pop 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 55, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61
<b>10 (Pantano Gr)</b>	Pop 62, 63
<b>11 (NRioNegro)</b>	Pop 64, 65, 66, 67
<b>12 (Salto)</b>	Pop 72, 73, 74, 75
<b>13 (Artigas)</b>	Pop 69, 70, 71
<b>14 (SLivramento)</b>	Pop 68, 76, 77, 78
<b>15 (Alegrete)</b>	Pop 80, 81, 82
<b>16 (Uruguaiiana)</b>	Pop 79, 83, 84, 85, 86
<b>17 (EntreRios)</b>	Pop 87, 88, 89, 90
<b>18 (Corrientes1)</b>	Pop 91, 92, 93, 94
<b>19 (Corrientes2)</b>	Pop 95, 96
<b>20 (Formosa)</b>	Pop 97
<b>21(Córdoba)</b>	Pop 98, 99, 100, 101, 102

### 3.2 Análises dos Dados Ecológicos

Os dados de nicho ecológico de *P. axillaris* foram acessados através das variáveis climáticas. As características do clima de uma região são o resultado da integração de situações atmosféricas que ocorrem durante todo um ano, levando em conta um período de vários anos. Essas características dependem das condições astronômicas e geográficas da região (latitude e longitude, posição geográfica em relação ao sol, topografia, distância do mar, etc.), e as características atmosféricas, tais como centros de ação de bário, a circulação atmosférica geral, as massas de ar atmosférico, as frentes frias (DNM, 2010).

Para quantificar a variação ecológica de *P. axillaris*, através das coordenadas geográficas de cada um dos 102 pontos de coleta, foram extraídos os valores de altitude e

de 19 diferentes variáveis climáticas contidos no pacote de dados do BIOCLIM, através do programa Diva GIS (disponível no sítio: <http://www.diva-gis.org/>) (Tabela 3). Essa matriz de dados foi usada em uma Análise de Componentes Principais (PCA) para categorizar as populações das subespécies geográficas descritas de acordo com seu habitat, ou seja, diferenças ecológicas, sem prévia descrição de subespécie. A PCA foi conduzida usando o valor das variáveis transformadas para logaritmo normal no programa Statistica 9.0 (disponível no sítio <http://www.statsoft.com/>). A análise foi baseada em uma matriz de correlação, a qual não intensifica a amplitude de variação. Os dois primeiros componentes principais foram plotados e a variação encontrada para cada ponto foi comparada quanto à descrição das subespécies.

Tabela 3: Variáveis climáticas do BIOCLIM usadas para análise de PCA dos pontos de coleta de *Petunia axillaris* estudados.

<b>Variáveis</b>	<b>Medida correspondente</b>
BIO 01	Temperatura média anual
BIO 02	Temperatura média mensal
BIO 03	Média diurna/ temperatura anual
BIO 04	Sazonalidade de temperatura
BIO 05	Temperatura máxima no mês mais quente
BIO 06	Temperatura mínima no mês mais frio
BIO 07	Faixa de temperatura anual
BIO 08	Temperatura média no trimestre mais chuvoso
BIO 09	Temperatura média do trimestre mais seco
BIO 10	Temperatura média do trimestre mais quente
BIO 11	Temperatura média do trimestre mais frio
BIO 12	A precipitação anual
BIO 13	Precipitação do mês mais chuvoso
BIO 14	Precipitação do mês mais seco
BIO 15	Sazonalidade Precipitação
BIO 16	Precipitação do trimestre mais chuvoso
BIO 17	Precipitação do trimestre mais seco
BIO 18	Precipitação do trimestre mais quente
BIO 19	Precipitação do trimestre mais frio

### 3.3 Dados Morfológicos

#### 3.3.1 Caracteres Florais

Para caracterizar as três subespécies de *P. axillaris* quanto à morfologia, foram realizadas medidas de caracteres morfológicos da flor (Figura 8), descritos como importantes para discriminação das subespécies por Kokubun *et al.* (2006):

X1: comprimento do tubo da corola;

X2: largura da corola;

X3: comprimento total da corola;

X4: diferença do comprimento entre as anteras dos estames médios e mais longos.

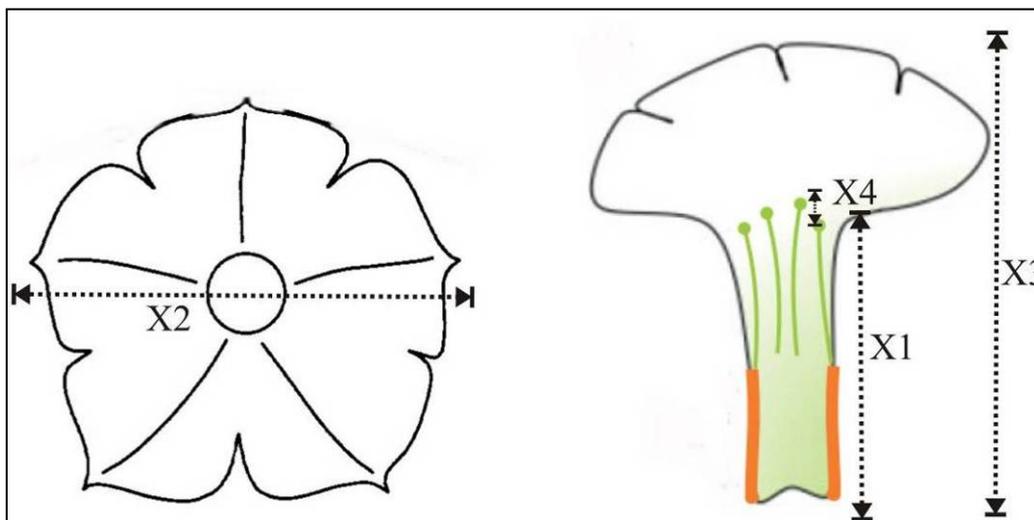


Figura 8: Representação esquemática das medidas dos caracteres morfológicos utilizadas na análise das subespécies de *Petunia axillaris*.

No total, foram medidos os quatro caracteres florais para 79 populações de *P. axillaris* e, sempre que possível, mediu-se três flores por indivíduo e dez indivíduos por população, para assim poder acessar a variabilidade intrapopulacional, totalizando 1689 flores medidas e 790 indivíduos. A morfologia floral de *P. axillaris* foi medida no campo com o auxílio de um paquímetro digital. Foram medidos os caracteres florais das populações preditas como ssp. *axillaris*, exceto para as populações Pop19, Pop38, Pop44,

Pop54 e Pop56. Para a ssp. *parodii* foram medidas para todas as populações do Uruguai e do RS, com exceção da população Pop85. Quanto à ssp. *subandina*, uma população da região de Córdoba foi medida. As medidas foram quantificadas em milímetros sem casas decimais.

### 3.3.2 Análise estatística dos dados

Com os valores das medidas dos quatro caracteres florais foi construída uma matriz de dados, a qual foi usada para Análise de Componentes Principais (PCA) no programa Statistica 9.0, baseada na matriz de correlação e usando valores transformados para logaritmo natural. Essa análise foi realizada por indivíduo e por flor. Na análise por indivíduo foi utilizada a média das flores para cada carácter morfológico. O objetivo de analisar individualmente e por flor foi acessar a variabilidade morfológica intrapopulacional e intraindividual, visto que os estudos anteriores baseados na morfologia (Ando, 1994, 1995; Kokubun *et al.*, 2006) não deram importância à variação morfológica intrapopulacional, cuja importância pode ser facilmente observada em campo. Os dois primeiros componentes principais foram plotados num gráfico. Para comparar a variação encontrada foram plotadas elipses representando 95 % da variação, por subespécie e por grupo conforme especificado nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Foi calculada a distância de Mahalanobis ao quadrado para os dados morfológicos de cada indivíduo, no programa Statistica 9.0. A matriz de distância morfológica, juntamente com os dados geográficos, foi utilizada para inferir barreiras quanto à variação morfológica encontrada em *P. axillaris*, no programa Barrier 2.2 (Manni *et al.*, 2004), que usa o algoritmo de Monmonier para identificar pares de populações vizinhas para as quais a distância é maior.

Para identificar os agrupamentos, quanto à variação morfológica, foi realizada a análise *K-means Clustering*, com 2 e 3 agrupamentos no programa Statistica 9.0, para indivíduo e flor. A matriz de dados utilizada foi o valor do PCA para cada entrada (indivíduo ou flor). A análise de *K-means* pode ser compreendida como o reverso da Análise de Variância (ANOVA) tradicional, com o número *K* de grupos definidos *a priori*. O objetivo dessa análise foi verificar o grau de discordância entre a classificação usando os

valores de PCA e os grupos taxonômicos, além de avaliar qual seria essa discordância baseando a classificação em indivíduos ou em flores individuais.

### 3.4 Dados Genéticos

#### 3.4.1 Extração de DNA

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

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

Os produtos de extração foram testados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com GelRed<sup>TM</sup> (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz

ultravioleta. Para a quantificação, os produtos foram comparados com um DNA padrão de peso molecular conhecido (Invitrogen).

### 3.4.2 Amplificação e sequenciamento

Para a quantificação da variabilidade genética das populações, os indivíduos foram caracterizados pelas diferenças encontradas em sequências plastidiais. Para a análise de sequências foram escolhidos os espaçadores intergênicos *trnH-psbA* (Tabela 4) e *trnS-trnG* (Tabela 5), os quais foram amplificados com iniciadores e protocolos descritos por Sang *et al.* (1997) e Hamilton (1999), respectivamente. Estes marcadores foram escolhidos por serem amplamente utilizados em estudos filogenéticos e filogeográficos de plantas (Dobes *et al.*, 2004; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008; Fehlberg & Ranker, 2009). Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados segundo o protocolo de Dunn & Blattner (1986). O sequenciamento do DNA foi realizado em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Health Care) utilizando o *DYEnamic<sup>TM</sup>ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente, de acordo com as especificações do fabricante. As condições da reação de sequenciamento estão descritas na Tabela 6.



Tabela 6: Condições das reações de PCR para sequenciamento.

<b>Componentes da reação</b>	<b>Volume</b>	<b>Condições de amplificação</b>
<i>DYEnamic<sup>TM</sup>ET terminator sequencing premix</i>	4 $\mu$ L	35 ciclos:
Produto de PCR purificado	40 ng	95°C por 20 s
Primer	5 $\mu$ M	50°C por 15 s
Água estéril	completar 10 $\mu$ L	60°C por 1 min

### 3.4.3 Análise das sequências

As sequências obtidas foram alinhadas manualmente com auxílio do programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997) e, quando necessário, corrigidas manualmente após verificação dos cromatogramas, com o auxílio do programa Chromas 2.33 ([www.techelysium.com.au](http://www.techelysium.com.au)). Os haplótipos foram gerados através do programa DnaSP 5.1 (Rozas *et al.*, 2003). As relações evolutivas entre as sequências foram inferidas pelo método de “median-joining network” (Bandelt *et al.*, 1999) com auxílio do programa Network 4.5 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). As redes de haplótipos podem ser preferíveis a árvores filogenéticas clássicas quando a divergência entre as linhagens é pequena (Posada & Crandall, 2001).

Análises básicas de diversidade genética como o número de sítios segregantes e as diversidades haplotípica e nucleotídica, além dos testes de neutralidade  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1996), que podem revelar se houve expansão populacional recente nas populações estudadas, foram obtidas com auxílio do programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Este programa também foi utilizado para revelar a estrutura genética através das estatísticas  $\Phi_{ST}$  e da análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Para identificar a existência de possíveis barreiras ao fluxo gênico entre as populações estudadas foi utilizado o programa SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002), onde também foram calculados os índices de fixação correspondentes. Também para inferir barreiras foi utilizado o programa Barrier 2.2, através do algoritmo de Monmonier, a partir de uma matriz de distância PhiST par a par entre as populações calculada no programa Arlequin 3.11. A correlação entre as distâncias genéticas e

geográficas, para testar a hipótese de isolamento por distância, foi realizada no programa Alleles in Space (AIS) 1.0 (Miller, 2005), através da realização do teste de Mantel (Mantel, 1967) e do teste de autocorrelação espacial.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dados Ecológicos e Morfológicos

#### 4.1.1 Divergência de Nicho Fundamental

As informações a respeito do nicho ecológico de *P. axillaris* foram acessadas através da análise de 19 variáveis climáticas e da altitude. A Análise de Componentes Principais dessas variáveis revela um alto grau de separação entre os nichos das três subespécies (Figura 9).

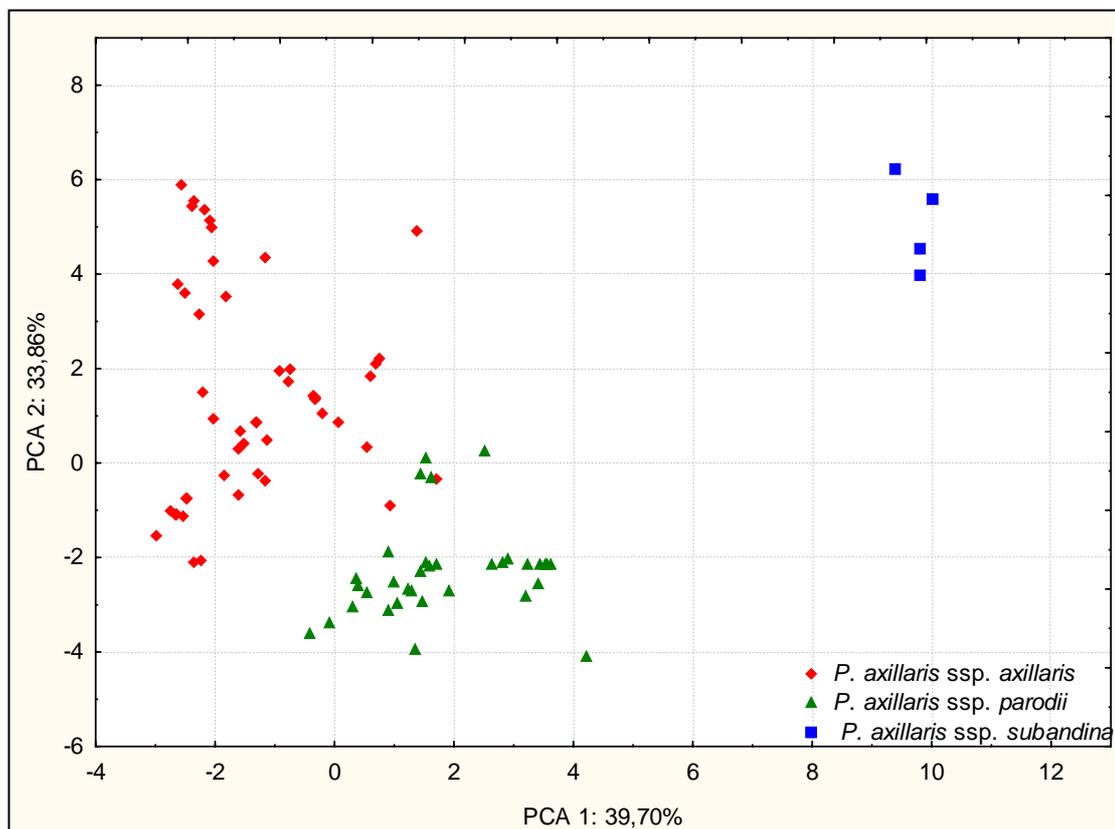


Figura 9: Análise de Componentes Principais mostrando a extensão da separação ecológica de *Petunia axillaris* para as três subespécies com base na variação climática e altitude. Os pontos correspondem a cada população de *P. axillaris* estudada.

A separação do nicho da subespécie *subandina* com relação aos demais grupos filogeográficos é evidente. Enquanto que para as subespécies *axillaris* e *parodii* há uma pequena região de sobreposição entre os nichos, que compreende a região em torno do Rio Negro no Uruguai. A análise do PCA revelou dois componentes explicando 73,56 % da variação, com o primeiro componente responsável por 39,70 % desta. A contribuição de cada variável para cada componente principal está descrita na Tabela 7. Embora haja uma pequena sobreposição dos nichos das subespécies *axillaris* e *parodii*, a qual coincide com a linha limite de distribuição de ambas, pode-se sugerir que elas apresentam nichos ecológicos diferentes.

Tabela 7: Contribuição de cada variável climática para os PCA1 e PCA2.

Variáveis	PCA 1	PCA 2
Altitude	0,006755	0,014975
Bio01	0,000109	0,120899
Bio02	0,064912	0,032800
Bio03	0,000707	0,023511
Bio04	0,075683	0,003107
Bio05	0,030386	0,099262
Bio06	0,073360	0,029749
Bio07	0,086349	0,020066
Bio08	0,054225	0,049510
Bio09	0,081582	0,000390
Bio10	0,021070	0,092356
Bio11	0,023858	0,087709
Bio12	0,070863	0,049979
Bio13	0,000032	0,135421
Bio14	0,093457	0,011397
Bio15	0,103812	0,002729
Bio16	0,007061	0,121621
Bio17	0,096326	0,010707
Bio18	0,002652	0,088651
Bio19	0,106802	0,005163

Através da análise das condições climáticas podemos sugerir que existem quatro grupos geográficos para *P. axillaris*. O primeiro grupo compreende apenas populações da ssp. *subandina*, o segundo as populações da ssp. *parodii* juntamente com duas populações

da ssp. *axillaris* (Pop1 e Pop 2, localizadas ao sul do Rio Negro, próximas das margens deste rio), e o terceiro e o quarto grupos correspondem a ssp. *axillaris*, sendo que o quarto é composto apenas pelas populações cujo habitat corresponde à região do litoral Atlântico do Uruguai (Figura 10).

Observa-se um alto grau de variabilidade de nicho para a ssp. *axillaris*. Dentro do grupo 3 também há uma tendência de separação das populações do Rio Grande do Sul, principalmente das populações das Guaritas e Casa de Pedra em relação às demais, e das populações do Uruguai. Esse alto grau de variabilidade de habitat pode ser sugerido pelo fato da grande variabilidade geomorfológica da região em que esta subespécie se encontra. O lado oeste da Planície Sulamericana é de origem sedimentar do Quaternário, enquanto que a leste do Rio Uruguai, os sedimentos variam do Devoniano ao Holoceno e são depositados sobre o Escudo Sul Brasileiro (Speranza *et al.*, 2007). O sistema orográfico da região de ocorrência da ssp. *axillaris* varia de pequenos planaltos (Serra do Sudeste) a planícies litorâneas, o que proporciona a variabilidade do clima, sendo que este é altamente influenciado pela topografia (DNM, 2010).

Há crescentes evidências de que informações ambientais são importantes para entender a variação e a diversificação das populações naturais. Levando em conta tanto a distância geográfica quanto a variação ambiental, podemos compreender melhor os fatores que resultaram na diversificação (Thomassen *et al.*, 2010).

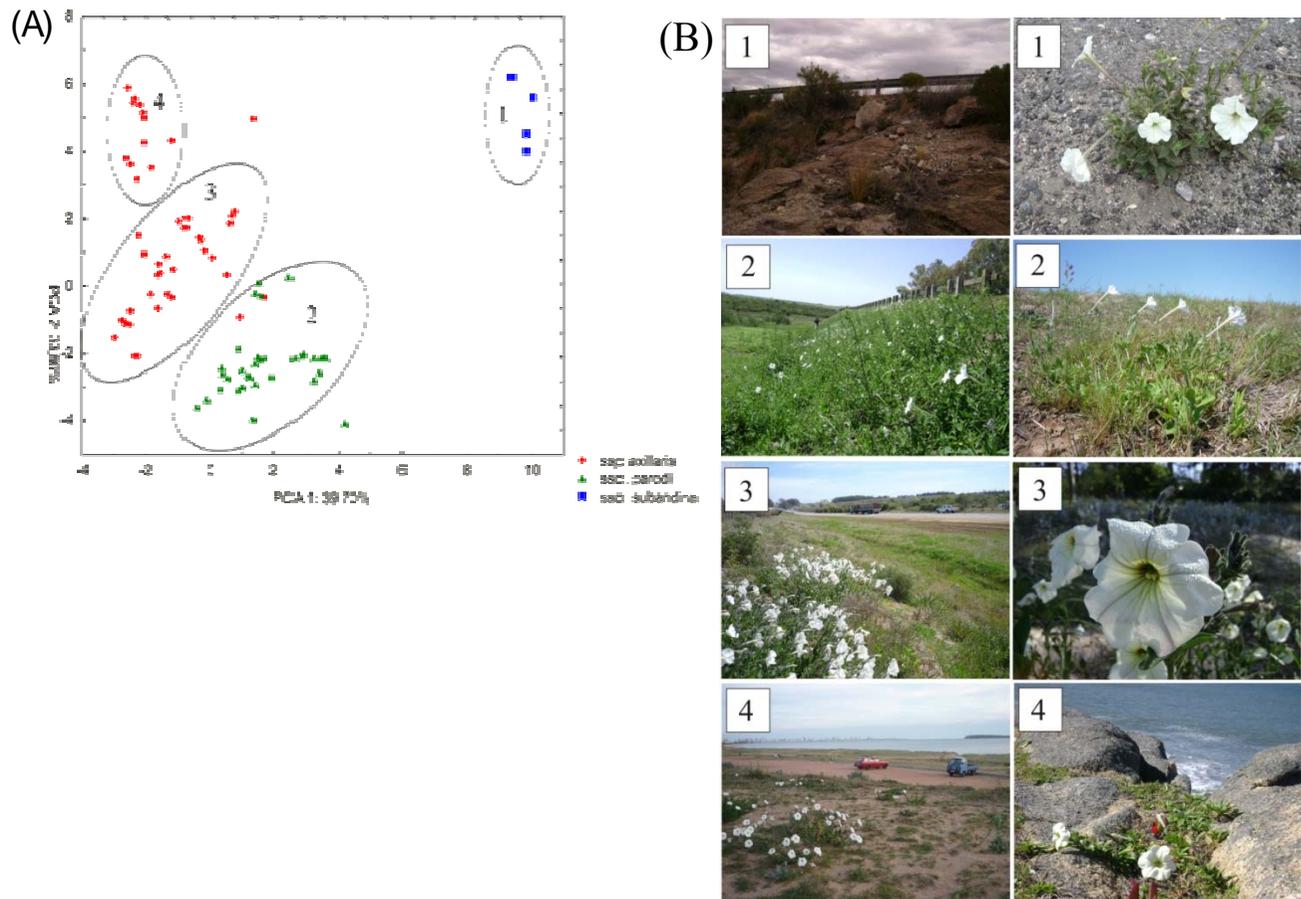


Figura 10: (A) Grupos geográficos de *Petunia axillaris* sugeridos pela Análise de Componentes Principais de 19 variáveis climáticas e altitude. Cada ponto representa uma população amostrada, as cores dos pontos estão de acordo com as subespécies. (B) Imagens de populações de *P. axillaris* no seu habitat natural de cada grupo filogeográfico, os números nas imagens correspondem ao número do grupo que pertencem. Fotos obtidas durante expedições de campo.

#### 4.1.2 PCA da morfologia de *P. axillaris*: delimitando *taxa* intraespecífico

A análise do PCA mostra uma forte separação, entre as subespécies *parodii* e *axillaris*, enquanto que *ssp. subandina* separa apenas da *ssp. parodii* mas não da *ssp. axillaris* (Figura 11). Os dois primeiros componentes principais explicam 89,89% da variação, com o primeiro vetor explicando 61,23% da variação. A elipse para cada subespécie representa 95% da variação total.

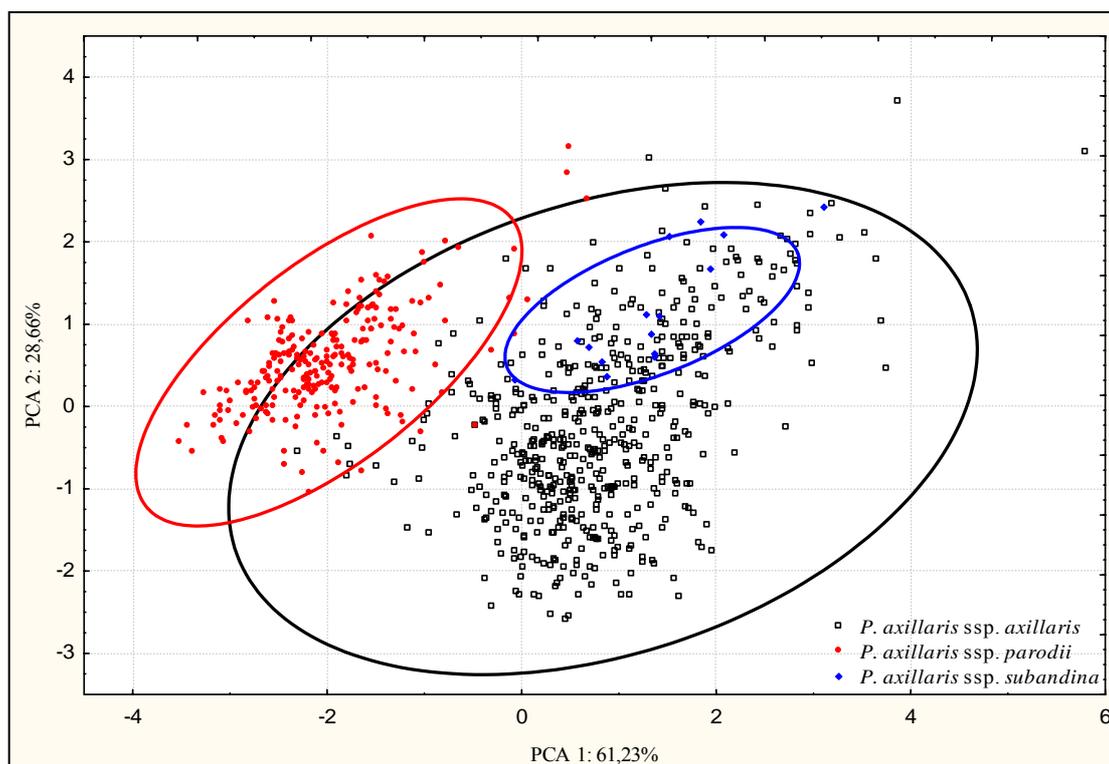


Figura 11: Análise de Componentes Principais dos caracteres florais de 790 indivíduos de 79 populações de *Petunia axillaris*, revelando a separação das subespécies *parodii* e *axillaris*, e a sobreposição da *ssp. subandina* com *ssp. axillaris*.

A variação do PCA1 corresponde em ordem crescente de peso: comprimento total da corola (37 %), comprimento do tubo da corola (35 %), diferença do comprimento em milímetros dos estames médios e longos (24 %) e diâmetro da corola (4 %). O PCA2 é dominado pela variável comprimento total da corola que representa 76 % da variação, seguida do comprimento do tubo da corola (16 %), da distância entre as anteras dos

estames médios e longos (5 %) e do diâmetro da corola (3 %). Observa-se que parte dos indivíduos considerados como da ssp. *axillaris* coletados no RS separa-se da ssp. *axillaris* do Uruguai pelo PCA 2 (praticamente todos os pontos acima de 0 no PCA2 da Figura 11 são de populações do RS), ou seja, as flores da ssp. *axillaris* do RS apresentam o comprimento total da corola maior que os indivíduos desta subespécie coletados em outras regiões. A ssp. *subandina* se separa da ssp. *parodii*, mas fica agrupada com os indivíduos da ssp. *axillaris* coletados no RS. Com esses dados, verifica-se a existência de apenas dois grupos morfológicos, um correspondente a ssp. *parodii* e o outro correspondente às duas outras subespécies, sendo que este apresenta ampla variação morfológica, enquanto que o correspondente à ssp. *parodii* é menos variável. Assim, os caracteres morfológicos tradicionalmente usados para distinguir as três subespécies de *P. axillaris* são válidos para as subespécies *axillaris* e *parodii*, mas não para a subespécie *subandina*, a qual constitui um subgrupo da variação encontrada na subespécie *axillaris*, morfológicamente semelhante aos indivíduos provenientes das populações encontradas no RS.

Os caracteres morfológicos foram altamente relacionados com os dados ecológicos de temperatura e precipitação, para as subespécies *parodii* e *axillaris*. Isso sugere que cada uma das subespécies está adaptada a nichos ecológicos diferentes. Pode-se sugerir que a ssp. *parodii* está associada a habitats mais quentes e úmidos que os de ocorrência da ssp. *axillaris*. Radiação adaptativa é um processo de diversificação de uma única forma ancestral para uma variedade de nichos ecológicos e geográficos para produzir novas formas especializadas ecologicamente (Gavrilets & Losos, 2009). A diversificação ecológica leva à divergência morfológica e outras características fenotípicas. A plasticidade fenotípica e divergência genética resultam em recursos ou polimorfismos tróficos, que podem representar os estágios incipientes da especiação (Foote *et al.*, 2009). Como observado, os grupos morfológicos de *P. axillaris* estão localizados em nichos ecológicos diferentes. Além das características climáticas, também existem as diferenças nas formações geológicas, as quais afetam as características geomorfológicas e edáficas (como representado na Figura 5). Essas diferenças de solo e variáveis climáticas na região de distribuição das subespécies poderiam explicar a variação morfológica encontrada em *P. axillaris*, visto que a forma da corola em *Petunia* é altamente influenciada pelo clima e solo (Kokubun *et al.*, 1997).

#### 4.1.3 Análise de Barreiras Biogeográficas

No programa Barrier 2.2 foram analisadas possíveis barreiras geográficas considerando-se as diferenças morfológicas encontradas nas subespécies de *P. axillaris*. Primeiramente, foi hipotetizada a existência de duas barreiras para possível separação entre as três subespécies. A primeira barreira inferida pelo programa separa os indivíduos classificados como pertencentes à ssp. *subandina* dos demais (Figura 12). Na análise morfológica, através do PCA, os indivíduos desta subespécie ficaram agrupados com os da ssp. *axillaris*., não confirmando a presença desta barreira. A posição desta barreira separando a ssp. *subandina* não é surpreendente, visto que as populações mais próximas das quais estes indivíduos diferem pertencem à ssp. *paroddi*. Tal fato pode ser devido à utilização do algoritmo de Monmonier, pois este procura identificar pares de populações vizinhas para as quais a distância morfológica é maior e aí posiciona a barreira. A segunda barreira separa as subespécies *parodii* e *axillaris* e coincide com os limites de suas distribuições no Uruguai, que é o Rio Negro. Esta barreira também coincide com o gradiente de temperatura e precipitação e com as características edáficas do Uruguai, as quais tem uma continuidade no RS segundo Grela (2004) (Figura 12). Esses resultados, mais uma vez, reforçam que a distribuição da morfologia em *P. axillaris* está relacionada com as características ecológicas da sua área de distribuição (dados climáticos e edáficos).

Devido a grande variação morfológica encontrada dentro das subespécies, principalmente da ssp. *axillaris*, foi inferido uma terceira barreira, a qual mostrou uma tendência em separar um grupo de indivíduos do RS, justamente aqueles indivíduos que se diferenciaram das populações coletadas no Uruguai pelo PCA2 (Figura 12). Esses indivíduos do RS apresentaram maior comprimento da corola em relação ao observado para as populações do Uruguai.

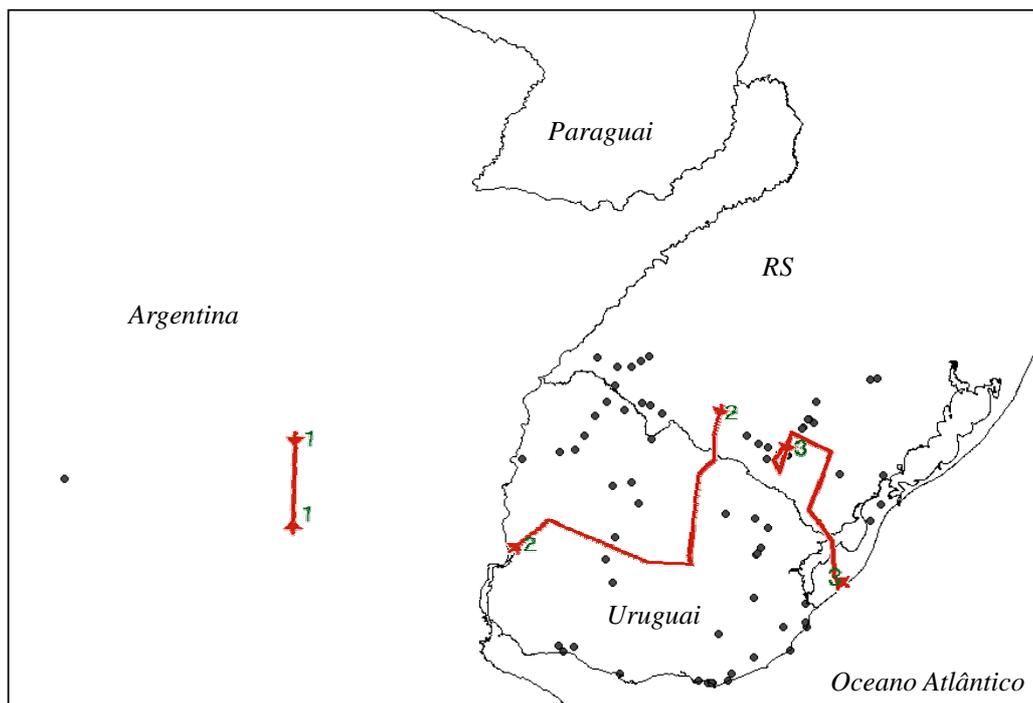


Figura 12: Mapa mostrando a posição das três barreiras inferidas através do algoritmo de Monmonier para os dados morfológicos de *Petunia axillaris*.

Para analisar a variação em nível regional, foram inferidas as barreiras para os grupos de populações descritos na Tabela 2. A primeira barreira agora se posiciona separando as subespécies *axillaris* e *parodii*, enquanto que a segunda separa a ssp. *subandina* das demais (Figura 13). A terceira barreira isola o Grupo 1 (Durazno), cujas populações já têm sido reportadas por trabalhos anteriores como formas intermediárias entre as subespécies *parodii* e *axillaris* (Kokubun *et al.*, 1997; Kokubun *et al.*, 2006). Segundo Venail *et al.* (2010), formas híbridas entre as subespécies *parodii* e *axillaris* apresentam o tubo da corola de tamanho intermediário e a superfície do limbo da corola significativamente maior. As flores dos indivíduos do Grupo 1 aqui estudadas apresentavam essas características, o que pode sugerir a ocorrência de formas híbridas entre as duas subespécies, decorrentes de contato secundário recente. A quarta barreira separa o Grupo 9 (Guaritas e Casa de Pedra), Grupo 7 (Pelotas) e Grupo 10 (PantanoGr) dos demais. É interessante ressaltar que a análise conduzida com os grupos de populações parece ser mais eficiente, especialmente na presença de indivíduos que apresentam morfologia típica de uma subespécie, mas que se localizam dentro da distribuição

geográfica de outra (*outliers*). Na análise com os grupos de populações, a barreira 1 passa a ser a barreira 2 e a barreira 3 na análise das populações equivale à barreira 4 na análise dos grupos. Estas diferenças são devidas à existência dos *outliers* que, na análise por população, são distantes morfológicamente dos outros geograficamente mais próximos, forçando que se inicie uma barreira neste local e, uma vez iniciada, a barreira continua se expandindo. Esse viés metodológico pode levar ao posicionamento de barreiras sem verdadeiro significado biológico e pode ser contornado com a abordagem aqui estabelecida (análise por grupos de populações, formados a partir da similaridade ecológica e da distribuição geográfica). Diante disso, apesar de ter uma diferença entre a morfologia de indivíduos coletados no RS, não significa que a barreira 4 separe de fato essas populações, visto que ela inicia em um ponto *outlier* (Pop27–Taim, área geográfica da ssp. *axillaris* mas cujos indivíduos apresentam morfologia de ssp. *parodii*) e termina em outro ponto *outlier*, em uma população de Bagé que também é morfológicamente mais semelhante a ssp. *parodii* (Figura 13).

Esses dados mostram mais uma vez que dentro da ssp. *axillaris* há uma grande variabilidade morfológica e que parte das populações do Uruguai parece estar num subgrupo desta variação. Enquanto que a morfologia de ssp. *parodii* é mais estável, não variando muito.

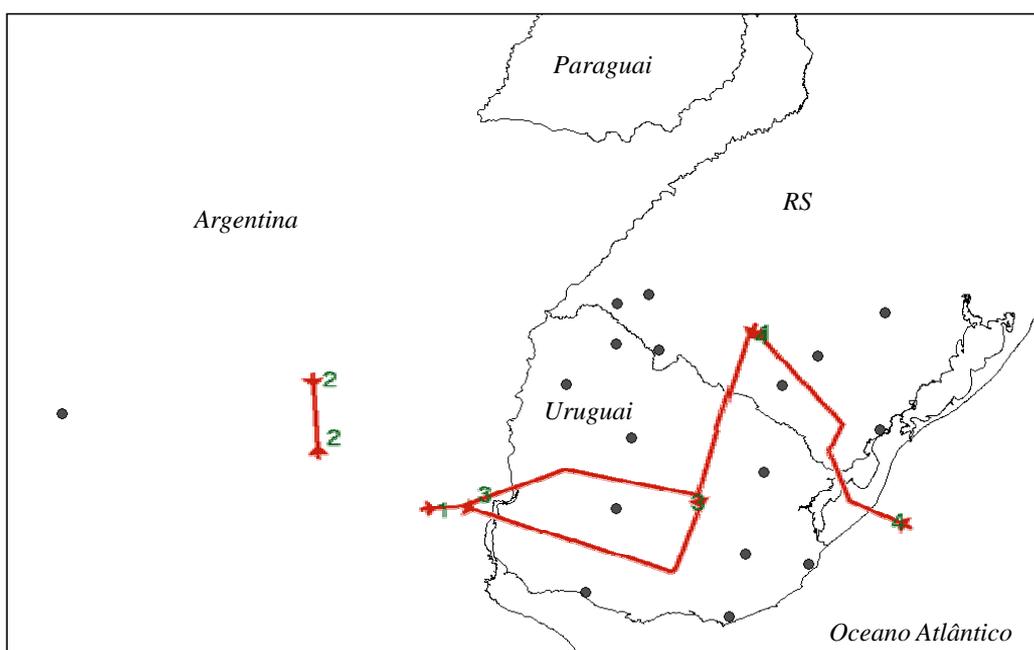


Figura 13: Mapa mostrando a posição de quatro barreiras inferidas através do algoritmo de Monmonier para os dados morfológicos dos grupos *Petunia axillaris*

#### 4.1.4 Análise *K-means* clustering

A análise do *K-means* ( $K=2$ ) para os indivíduos de *P. axillaris* (média das flores para cada indivíduo), com os escores dos PCAs da morfologia, revelou um alto grau de separação entre as subespécies *parodii* e *axillaris*, enquanto que a ssp. *subandina* ficou novamente agrupada com a ssp. *axillaris* (Figura 14). A análise foi realizada para um conjunto total de 790 indivíduos, dos quais 538 foram da ssp. *axillaris*, 236 da ssp. *parodii* e 14 da ssp. *subandina*.

Dentro do cluster da ssp. *axillaris*, apenas 4,3% dos indivíduos são classificados como ssp. *parodii*, enquanto que para a ssp. *parodii* 1,9% dos indivíduos são classificados como ssp. *axillaris*. Apesar deste pequeno percentual em relação às subespécies, quando as populações são analisadas, elevados percentuais podem ser verificados (4 de 10 indivíduos da população Pop66–Tucuaembó e 2 de 14 da população Pop78–Livramento3 na ssp. *parodii* e 9 de 11 na Pop36–Bagé5 e 4 de 10 na Pop1–NegroS1, na ssp. *axillaris*). Além dessas, algumas outras populações de ambas as subespécies apresentaram um indivíduo cuja morfologia era típica da outra subespécie. Mesmo assim, pode-se inferir a separação

das duas subespécies através dos dados morfológicos. As populações com maior grau de incongruências estão localizadas numa região limítrofe entre as duas subespécies, o que pode sugerir hibridação por contato secundário, sendo que a Pop1 faz parte do Grupo1 o qual é separado pela barreira 3, como mencionado acima.

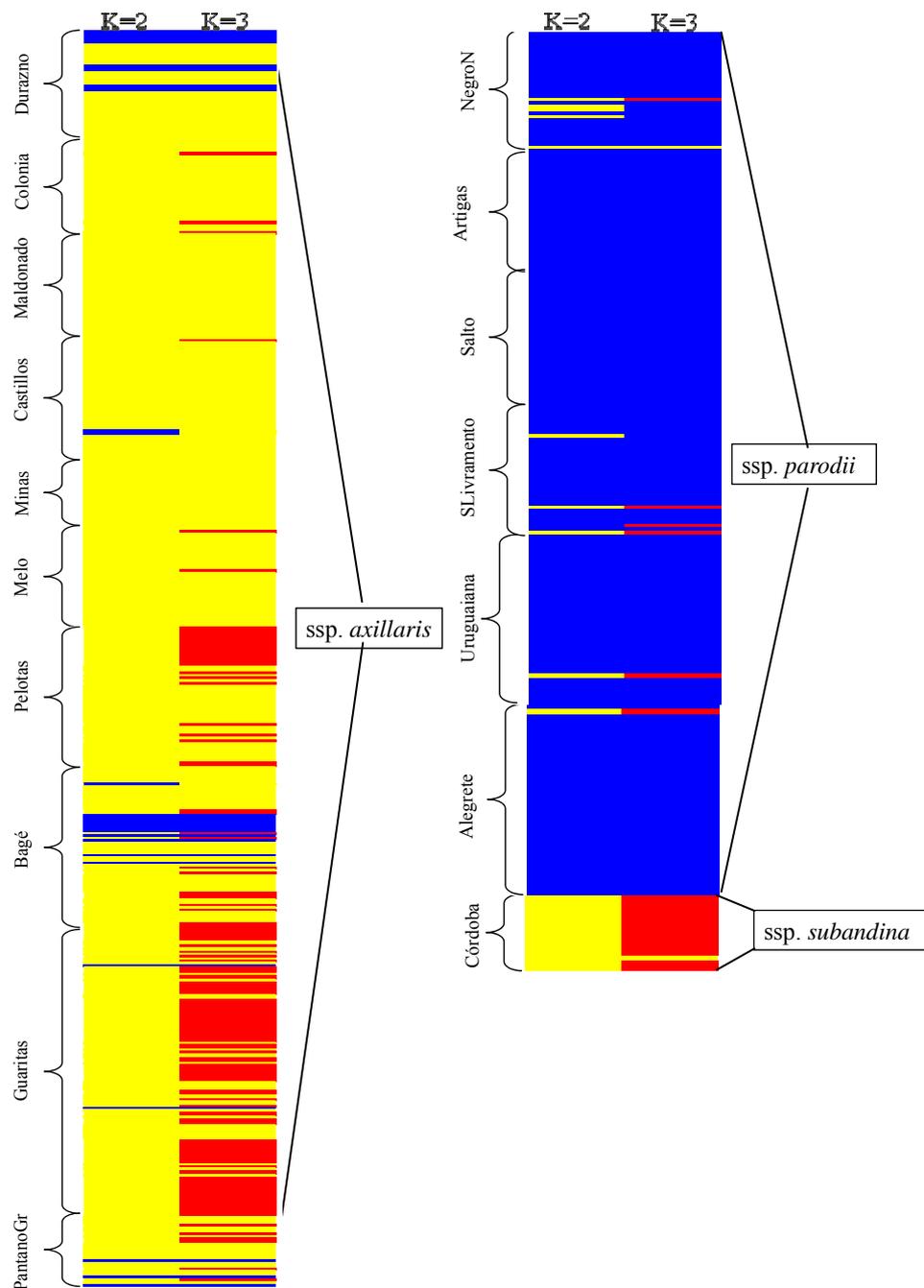


Figura 14: Análise *K-means* para os escores dos PCAs dos dados morfológicos de 790 indivíduos de *Petunia axillaris*. Os nomes de cada grupos estão de acordo com a Tabela 2. As cores amarelo e azul representam a morfologia das subespécies *axillaris* e *parodii*, respectivamente. Para K=3, o terceiro grupo em vermelho sugere um subconjunto da subespécie *axillaris*. A subespécie *subandina* apresenta-se com morfologia da subespécie *axillaris*.

Quando o valor de K é 3, observamos que o terceiro cluster é um subconjunto da ssp. *axillaris*, formado principalmente por indivíduos do RS, com apenas alguns indivíduos do Uruguai. Estes indivíduos do RS são aqueles que se separam pelo PCA2 no gráfico (Figura 11), como descrito acima. Interessante notar que, mesmo com a formação de três agrupamentos, a ssp. *subandina* permanece agrupada com a ssp. *axillaris*. Esses dados sugerem que os caracteres morfológicos utilizados para separação das subespécies não são válidos para a ssp. *subandina*, a qual apresenta morfologia semelhante à da ssp. *axillaris*. Importante ressaltar, ainda que, quanto às populações Pop1 e Pop36 da ssp. *axillaris*, ambos os indivíduos classificados como ssp. *parodii* na análise com K=2 permaneceram com essa classificação quando o valor de K foi aumentado para 3, enquanto que para a ssp. *parodii* os indivíduos classificados como ssp. *axillaris* com K=2, com K=3 passaram a fazer parte do terceiro agrupamento que corresponde ao subconjunto da ssp. *axillaris* e da ssp. *subandina*.

Para obter informações mais detalhadas da variabilidade morfológica, foi realizado o *K-means* utilizando as medidas de cada flor. Para isto foram analisadas 1689 flores (1192 da ssp. *axillaris*, 466 da ssp. *parodii* e 29 da ssp. *subandina*). Nesta abordagem, foi observado um pequeno aumento de mistura de morfologia dentro das subespécies. Para a ssp. *axillaris*, 5,62% das flores foram classificadas como ssp. *parodii* e, como na análise para indivíduos, as duas populações com maior índice de mistura de morfologia foram a Pop1 – NegroS1 (12 de 29 flores, 41,4%) e a Pop36–Bagé5 (21 de 24 flores, 87,5%), seguidas da população Pop42–Cpedra (11 de 31 flores, 35,5%). Enquanto que para a ssp. *parodii*, 3% das flores foram classificadas como ssp. *axillaris*, sendo as populações Pop66-Tucuaembo (4 de 16 flores, 25%), Pop78-Livramento3 (3 de 20 flores, 15%), Pop67-Paysandu (2 de 18 flores, 11,1%), Pop76-Livramento2 (2 de 25 flores, 8%) as que tiveram maior número de flores classificadas como sendo da outra subespécie. Isso sugere que há uma variação populacional dos caracteres morfológicos e uma pequena variação individual, mas a maioria das flores dos indivíduos apresenta medidas congruentes quanto à classificação esperada pela análise da morfologia de cada subespécie (Figura 15).

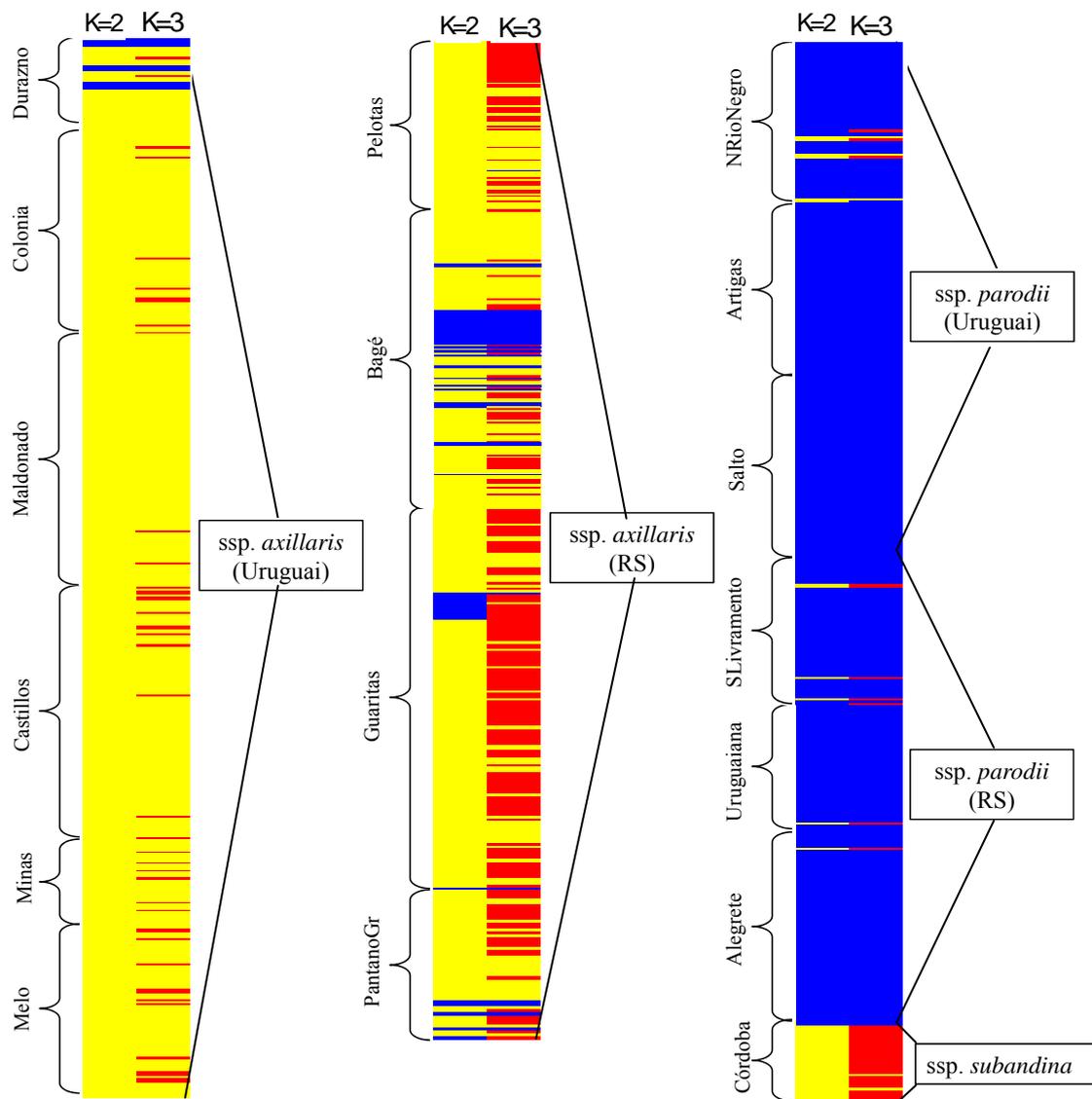


Figura 15: Análise *K-means* para os escores dos PCAs dos dados morfológicos de 1689 flores de *Petunia axillaris*. Os nomes de cada grupo estão de acordo com a Tabela 2. As cores amarelo e azul representam as características morfológicas típicas das subespécies *axillaris* e *parodii*, respectivamente. Para  $K=3$ , o terceiro grupo, em vermelho, sugere um subconjunto da *ssp. axillaris*. A *ssp. subandina* apresenta morfologia da *ssp. axillaris*.

#### 4.1.5 Variabilidade morfológica em *P. axillaris*

Ao longo de toda a distribuição geográfica de *P. axillaris* analisada foi encontrada uma grande variação, tanto de habitat como de caracteres morfológicos. A variabilidade morfológica não foi restrita somente aos caracteres utilizados para identificação de subespécies, mas também pode ser verificada em órgãos vegetativos da planta. A ssp. *parodii* não apresentou grande variação, tanto de habitat quanto de morfologia. Geralmente, as plantas eram encontradas em beiras de estradas próximas às margens de rios e em relevos planos, em afloramentos rochosos ou não. As plantas eram eretas e apresentavam menos flores abertas por indivíduos do que observado na ssp. *axillaris*. Aparentemente, na ssp. *parodii*, as flores não abrem ao mesmo tempo, podendo ser observados no mesmo indivíduo botões florais, flores abertas e frutos (Figura 16). Para a ssp. *axillaris* observou-se uma ampla variabilidade de habitat e de morfologia. No Uruguai, as plantas variavam de eretas (no interior), ascendentes e procumbentes (no litoral), e ocorrendo em relevo plano a ondulado, em altitudes que variavam do nível do mar até 300 m. As plantas do litoral (tanto do Rio da Prata quanto do Oceano Atlântico) ocorrem em solo arenoso e em afloramentos rochosos (pontas rochosas que chegam até o oceano). Algumas dessas plantas do litoral apresentavam um ramo principal ereto e os demais ramos secundários se estendiam no solo, com folhas cráceas formando um aspecto de roseta muito frequente em outras espécies de *Petunia* que ocorrem em ambientes arenosos e litorâneos, como *P. integrifolia* spp. *depauperata*. A ssp. *axillaris* do RS ocorre em regiões de campos em beira de estrada, em afloramentos rochosos ou não, e nas formações rochosas denominadas Guaritas e Casa de Pedra. Nestes dois locais, as plantas ocorrem próximas a reentrâncias rochosas. Nas Guaritas ocorrem em simpatria com *P. exserta*, que fica dentro das reentrâncias da rocha, enquanto *P. axillaris* fica na parte externa das reentrâncias ou na parte superior das torres, sempre expostas ao sol, e apresentam grande variabilidade dos caracteres morfológicos (Figura 17).



Figura 16: Imagens da variação do habitat e caracteres morfológicos para *Petunia axillaris* ssp. *parodii*. Diferentes populações do Uruguai.



Figura 17: Imagens da variação do habitat e caracteres morfológicos para *Petunia axillaris* ssp. *axillaris*. (A) localizadas no Uruguai na parte continental; (B) localizadas no Uruguai no litoral; (C) localizadas na Serra do Sudeste / RS; e (D) medidas morfológicas da ssp. *axillaris*.

Além desses caracteres, vários outros foram observados em *P. axillaris* os quais, até o momento, não tinham sido descritos para a espécie. *Petunia axillaris* é descrita como uma espécie anual (Stehmann, 1999), mas algumas características encontradas em diversos indivíduos sugerem que eles possam permanecer no ambiente por vários anos. Foram encontradas plantas que apresentavam caule espesso, com diâmetro grande, um ramo ereto que brota da base, com ramos laterais secos e outros brotando na base do caule, sugerindo que esses indivíduos secam no inverno e rebrotam durante a primavera. Além disso, na mesma população, foram encontrados indivíduos com comprimento e diâmetro do ramo de

tamanho muito discrepantes, o que sugere que esses indivíduos não devem ter germinado na mesma época. Também foram encontrados indivíduos, aleatoriamente em algumas populações do Uruguai e RS da ssp. *axillaris*, com estigma exserto semelhante ao encontrado na espécie *P. exserta*, endêmica da Serra do Sudeste / RS. Essa característica na espécie está relacionada à síndrome de polinização (por beija-flores). *Petunia axillaris* é efetivamente polinizada por mariposas, mas foram observados beija-flores em uma população do Uruguai, isso sugere que eventualmente beija-flores visitam *P. axillaris* e esses caracteres semelhantes a *P. exserta* poderiam estar relacionados com o polinizador, mas mais estudos se fazem necessário para a compreensão dessa característica encontrada em alguns indivíduos da espécie.

Na região da Serra do Sudeste (RS) foram encontradas flores de *P. axillaris* levemente rosadas, especialmente na região das Guaritas. Nessa região já foi reportada a ocorrência de híbridos entre *P. exserta* e *P. axillaris* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). As flores rosadas observadas no presente trabalho poderiam sugerir introgressão dos caracteres de *P. exserta* em *P. axillaris*. Entretanto foi encontrada flor de *P. axillaris*, em um indivíduo na Casa de Pedra, de coloração fortemente rosada, sendo que nesta região não foi observada a presença de *P. exserta* ou de *P. integrifolia*. Mas é necessário mais estudos para identificar a ocorrência dessa característica (Figura 18).

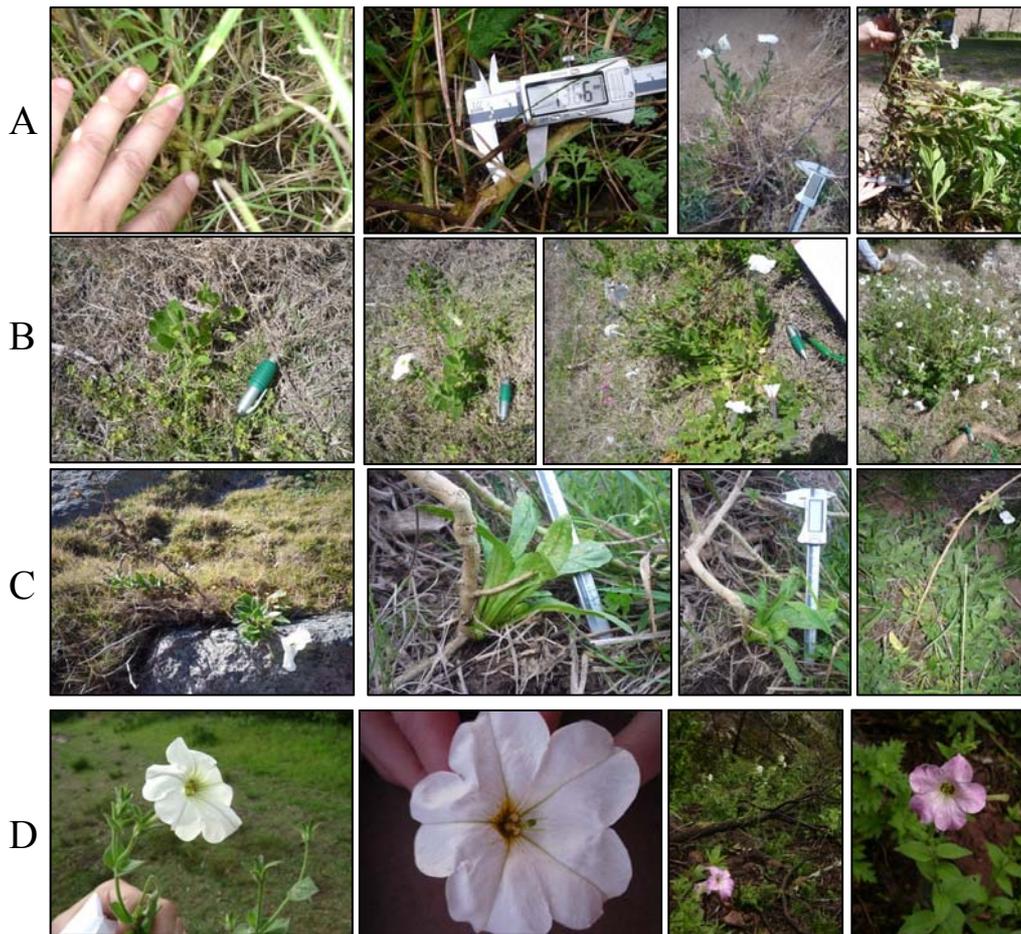


Figura 18: Imagens de características morfológicas encontradas em populações naturais de *Petunia axillaris*. (A) espessura dos caules; (B) diferenças de tamanho de indivíduos da mesma população; (C) ramos secos e brotos em indivíduos; (D) estigma exserto e corola rosada.

Essa grande variabilidade morfológica se reflete na análise de PCA para os grupos regionais. Para melhor visualizar essa variação foram plotadas elipses para cada grupo de populações (conforme Tabela 2), que representam 95 % da variação de cada grupo. Assim como observado para os dados ecológicos, a ssp. *axillaris* apresenta um alto grau de variabilidade quanto à morfologia, principalmente em relação às populações coletadas no RS onde, como ressaltado anteriormente, alguns indivíduos se separam daqueles coletados no Uruguai pelo PCA2. Também se observa que para a ssp. *parodii* a maior variabilidade está nas populações coletadas no RS. O que mais chama atenção no gráfico é a grande variabilidade morfológica encontrada nas populações da Serra do Sudeste, principalmente

o Grupo Guaritas (que corresponde às populações das Guaritas e Casa de Pedra). A Serra do Sudeste ocupa uma área aproximada de 44000 km<sup>2</sup>, com altitudes variando entre 200 e 500 metros. O relevo da região apresenta grandes diferenças topográficas, ambientes fisionomicamente distintos e a vegetação apresenta grande riqueza e diversidade (Caporal & Boldrini, 2007). Uma possível explicação para a diversidade morfológica nessa região encontrada na ssp. *axillaris* seria explicada pela fisionomia do solo. Outra explicação poderia ser o fato de na região das Guaritas ocorrerem eventos de hibridação entre *P. axillaris* spp. *axillaris* e *P. exserta* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; A. L. Segatto, com. pess.). Os eventos de hibridação poderiam implicar na introgressão de caracteres em ambas as direções, resultando no alto grau de variação encontrado na região.

A maior parte da sobreposição nos caracteres morfológicos entre as duas subespécies *axillaris* e *parodii* é devida aos grupos 8-Bagé, 9-Guaritas e 10-PantanoGr, todos da Serra do Sudeste no RS. Em relação às populações do Uruguai, percebe-se uma clara separação entre estas subespécies, com exceção do grupo 1 (Durazno), que se comporta como intermediário entre ambas, como mencionado acima (Figura 19).

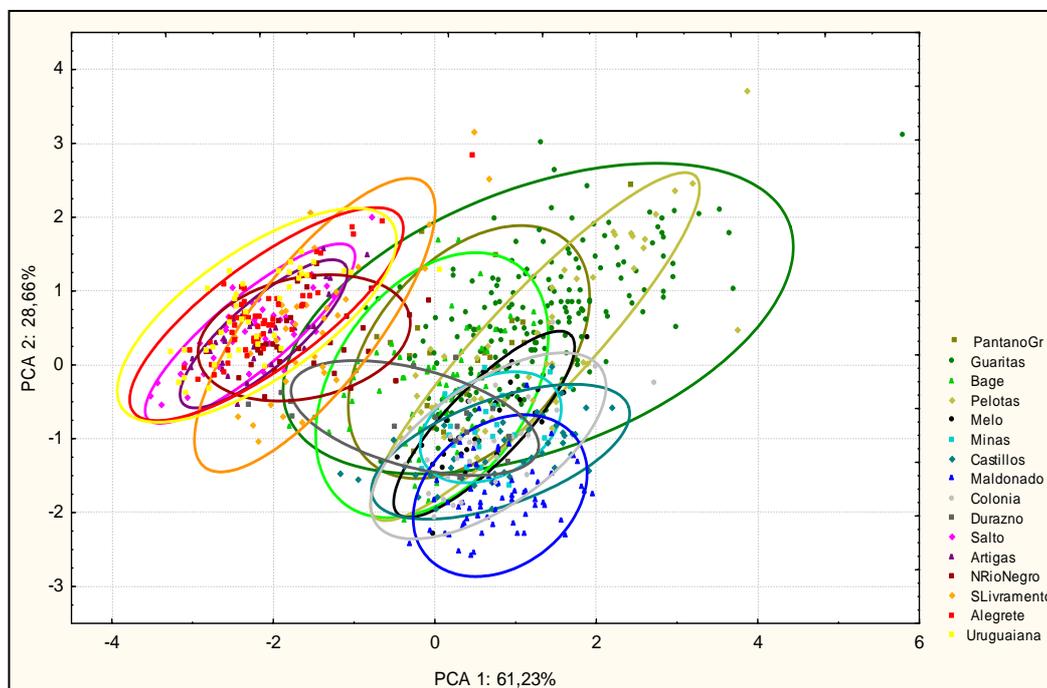


Figura 19: Análise de componentes principais dos caracteres florais de *Petunia axillaris* ssp. *axillaris* e *P. axillaris* ssp. *parodii*. Cada elipse representa um grupo geográfico de populações, destacando a variação regional de *P. axillaris*.

Apesar dos esfingídeos serem considerados os polinizadores efetivos, constatou-se visitas de beija-flor em flores de *P. axillaris*, além de abelha de espécie não identificada (observações de campo). Também foram observadas abelhas mamangavas, que perfuram as partes basais do tubo, pilhando néctar. Não se acredita que estas abelhas desempenhem qualquer papel na polinização em *P. axillaris*, visto que não se aproximam das anteras e nem do estigma (observações de campo; Figura 20).

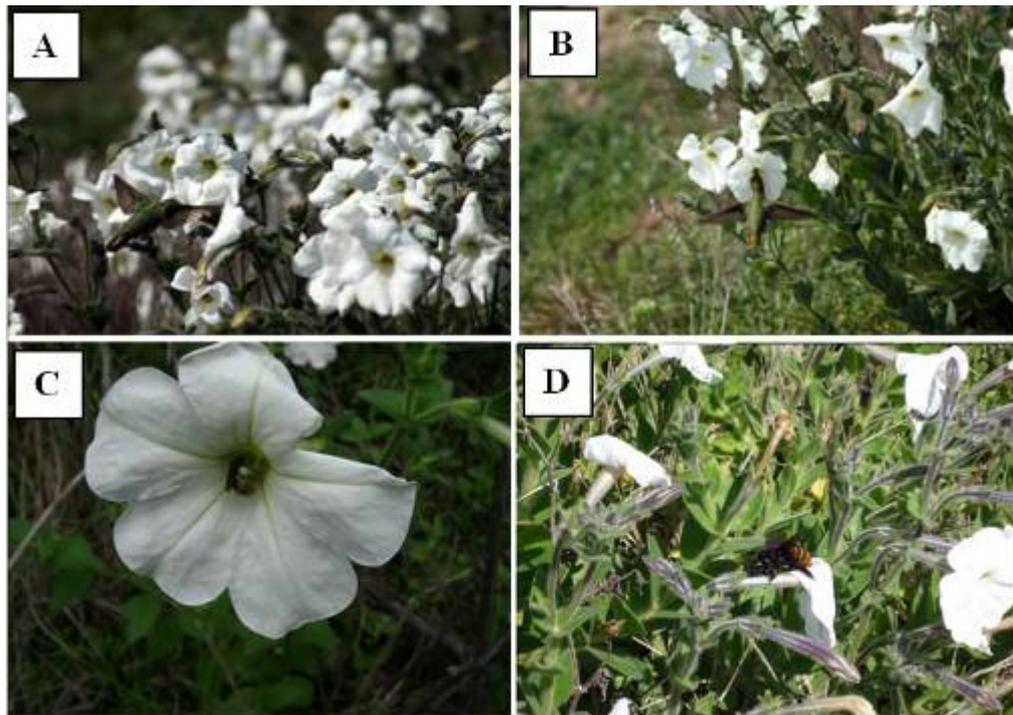


Figura 20: Flores de *Petunia axillaris* mostrando os diferentes visitantes observados no campo. (A) e (B) Plantas de populações do Uruguai visitadas por beija-flores. (C) Plantas de uma população das Guaritas/RS visitadas por abelhas. (D) População do Uruguai na região de Colônia em que uma abelha mamangava pilhava néctar.

## 4.2 Dados moleculares

### 4.2.1 Caracterização das sequências obtidas

O sequenciamento dos marcadores plastidiais gerou um alinhamento com 1062 pares de base (pb) para os 614 indivíduos analisados. Destes, 652 pb corresponderam à amplificação do espaçador intergênico *trnS-trnG* (de 1 a 652) e 410 pb (de 653 a 1062) do espaçador *trnH-psbA*. Para as análises foram retirados todos os eventos de inserção/deleção (indels) correspondentes a regiões de poli-A e poli-T, resultando assim em um alinhamento de 1056 pb (de 1 a 650 *trnS-trnG* e de 651 a 1056 *psbA-trnH*).

As análises foram conduzidas com as sequências dos dois espaçadores combinadas, e o conteúdo GC (guaninas e citosinas) apresentado foi de 29,3 %. Foram identificados 29 sítios polimórficos no alinhamento concatenado (11 na porção correspondente ao *trnS-trnG* e 18 no *trnH-psbA*), dos quais, 28 foram substituições mononucleotídicas (12 transições e 17 transversões) e uma microinversão de 29 pb codificada como um evento mutacional único. Esse padrão é usualmente encontrado em sequências não-codificantes de cpDNA. O tipo de substituição depende da composição nucleotídica, sendo que altos conteúdos de A+T resultam em maior proporção de transversões (Morton, 1995). Para a amostra como um todo, a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) verificada foi de 0,0022, enquanto a diversidade haplotípica ( $H_d$ ) foi 0,704, entre os 35 haplótipos identificados pelo programa DnaSP. Quando os marcadores foram analisados separadamente, os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica foram: 0,0015 e 0,624 para o *trnS-trnG* e 0,0035 e 0,638 para o *trnH-psbA*, respectivamente. Levando em consideração a recente história evolutiva de toda a subfamília Petunioideae, a diversidade haplotípica e nucleotídica para *P. axillaris* pode ser considerada alta para os marcadores utilizados. Estes índices de diversidade podem refletir a amplitude da distribuição demográfica da espécie. A observação de valores altos de diversidade haplotípica e valores mais baixos de diversidade nucleotídica pode ser um indicativo de rápido crescimento populacional e pouco tempo de separação entre as linhagens de cpDNA.

Fregonezi *et al.* (2007) observaram valores de diversidade haplotípica e nucleotídica semelhantes ao verificado neste trabalho para *Calibracoa excellens* e *Calibracoa linooides*, espécies com distribuição ampla assim como *P. axillaris*. Por outro lado, *Petunia exserta* apresentou índices de diversidade mais baixos em relação ao que observamos no presente trabalho, resultado esperado pelo fato de que essa espécie possui caráter micro-endêmico (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006).

A análise dos índices de diversidade genética para os 21 grupos de populações permitiu identificar as áreas de maior diversidade genética para *P. axillaris* ao longo de toda a sua distribuição. O grupo 11 foi o que apresentou maior índice de diversidade, seguido dos grupos 6, 12, 13 e 5, enquanto os demais apresentaram índices de diversidade relativamente mais baixos (Tabela 8). A diversidade genética diminui progressivamente ao longo da escala de maior diversidade, possivelmente devido a uma série de eventos de gargalo de garrafa consecutivos ou efeito fundador. As áreas onde estão localizados estes grupos de *P. axillaris* de maior diversidade genética, ao norte (ssp. *parodii*) e ao sul do Uruguai (ssp. *axillaris*) correspondem a áreas previamente identificadas como refúgios de espécies de plantas durante o período de oscilações climáticas do Quaternário, que serviram de refúgios para plantas de clima mais úmido durante a fase seca e fria (Ab'Sáber, 1977; Grela, 2004). Possivelmente, a concentração da flora nestes locais, e sua posterior expansão com a melhora do clima, poderia ter isolado populações de *P. axillaris* nessas áreas, cujos indivíduos apresentam alta diversidade genética. Os grupos mais diversos geneticamente nem sempre se apresentaram com maior diversidade morfológica, principalmente se tratando da ssp. *parodii*, visto que o grupo mais diverso geneticamente nesta subespécie, o grupo 11, é bem homogêneo morfológicamente. Porém o grupo das Guaritas, que apresentou a maior diversidade morfológica também possui uma alta diversidade genética. Como essa região está em um espaço geograficamente pequeno em relação à distribuição de toda a subespécie, é bem provável que o fluxo de sementes seja maior nesta região. É necessário ressaltar que foi na Serra do Sudeste (RS) que foram observados eventos de hibridação entre *P. axillaris* e *P. exserta*, que poderia afetar também os índices de diversidade genética assim como em relação à morfologia.

Quando a diversidade genética é calculada para as três subespécies, observamos que os maiores valores são encontrados para a ssp. *axillaris* (diversidade haplotípica e nucleotídica de 0,767 e 0,0021, respectivamente, enquanto que para a ssp. *parodii* os

valores foram de  $Hd=0,553$  e  $\pi=0,0020$ , e para a ssp. *subandina*  $Hd=0,580$  e  $\pi= 0,019$ ). Esse resultado também é observado para os dados morfológicos.

Tabela 8: Diversidade nucleotídica e haplotípica dos 21 grupos de *Petunia axillaris*. (\*) correspondem aos grupos com maior diversidade.

<b>Grupo</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>Hd</b>
1	0.0008	0.6212
2	0.0000	0.0000
3	0.0005	0.4833
4	0.0015	0.5146
5*	0.0026	0.7977
6*	0.0030	0.8053
7	0.0006	0.3587
8	0.0017	0.4986
9	0.0014	0.6969
10	0.0015	0.5333
11*	0.0035	0.8312
12*	0.0032	0.7218
13*	0.0030	0.6397
14	0.0019	0.6767
15	0.0000	0.0833
16	0.0005	0.2193
17	0.0004	0.1193
18	0.0018	0.4857
19	0.0001	0.1111
20	0.0003	0.3333
21	0.0019	0.5800

#### 4.2.2 Variação Genética em *Petunia axillaris*

O relacionamento entre os haplótipos foi inferido pelo método de *median-joining network* (Bandelt, 1999) com o auxílio do programa Network 4.5 (Figura 21). Os haplótipos e suas frequências são apresentados na Tabela 9.

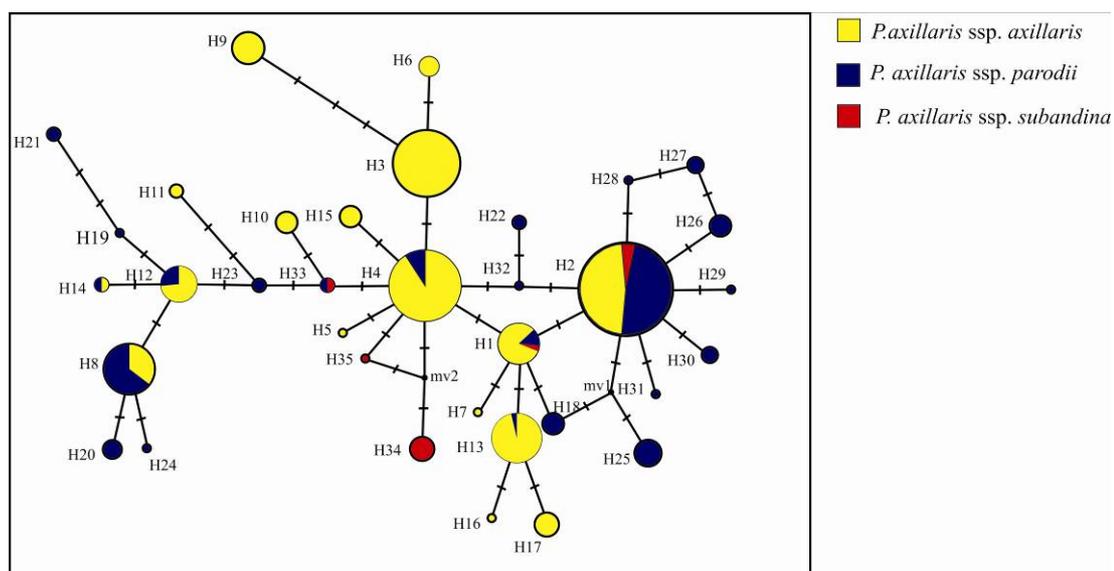


Figura 21: *Network* mostrando o relacionamento evolutivo entre os 35 haplótipos das populações de *Petunia axillaris* (combinação das sequências dos espaçadores *trnS-trnG* e *trnH-psbA*). Cada uma das cores representa uma das três subespécies de acordo com a classificação da Tabela 1. A área dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. As barras perpendiculares indicam o número de passos evolutivos que separam os haplótipos.

Tabela 9: Descrição dos haplótipos encontrados na análise do cpDNA de *Petunia axillaris*, com destaque para os sítios polimórficos e a frequência dos haplótipos.

Haplótipos	Posição Nucleotídica																				Nº observado											
	<i>trnS-trnG</i>												<i>trnH-psbA</i>																			
	1	1	2	3	3	3	4	5	5	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	8		8	8	8	8	8	9	9	9	9	0	0
H1	G	T	C	A	G	T	G	G	C	A	C	C	C	T	C	A	A	T	G	T	T	G	C	G	C	C	C	G	T	22		
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	322	
H3	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	48	
H4	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	55	
H5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H6	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H8	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31	
H9	T	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	11	
H10	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6	
H11	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	
H12	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	14	
H13	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28	
H14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	
H15	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	6	
H16	.	.	G	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H17	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	7	
H18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6	
H19	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H20	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	A	A	.	.	A	.	.	.	.	.	5	
H21	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	C	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	2	
H22	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	
H23	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	
H24	.	.	.	C	.	A	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H25	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8	
H26	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6	
H27	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	
H28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	
H31	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H32	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
H33	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	
H34	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	7	
H35	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	

Microinversão

Foram encontrados trinta e cinco haplótipos, sendo que o relacionamento entre os mesmos não corresponde a uma estruturação geográfica clara e nem à separação das três subespécies. Apesar de terem sido encontrados haplótipos exclusivos de cada subespécie, eles não apresentaram estruturação geográfica de acordo com os grupos morfológicos. Os haplótipos H1 e H2 são compartilhados pelas três subespécies, estando presentes em indivíduos geograficamente distantes, enquanto que os haplótipos H3, H4, H8, H12 e H14 são compartilhados por indivíduos das subespécies *parodii* e *axillaris*. O haplótipo H33 é compartilhado por indivíduos das subespécies *parodii* e *subandina*. Isso indica que as linhagens evolutivas de cpDNA são pouco informativas para a distinção entre os grupos morfológicos e taxonômicos de *P. axillaris*, uma vez que os haplótipos correspondentes a esses grupos encontram-se misturados ao longo da *network* (Figura 22).

Uma possível explicação para a falta de concordância geográfica é que o atual padrão de variabilidade genética das subespécies possa refletir melhor as propriedades da paisagem do passado do que a atual (Fortuna *et al.*, 2009). O compartilhamento de haplótipos e a falta de concordância geográfica entre a *network* e a morfologia das subespécies de *P. axillaris* podem ser devidos à baixa variação genética e a retenção de polimorfismo ancestral. Grupos que tem radiação adaptativa recente podem não ter acumulado um número suficiente de mutações neutras, sendo difícil a delimitação de espécies ou subespécies e a interpretação de seus relacionamentos (Whittall *et al.*, 2006). Os baixos níveis de variabilidade entre as espécies do gênero *Petunia* já foram detectados em análises filogenéticas baseadas em cinco marcadores plastidiais, um nuclear e um mitocondrial (Kulcheski *et al.*, 2006). A retenção de polimorfismo ancestral em *taxa* que divergiram recentemente pode explicar o compartilhamento de haplótipos. O compartilhamento de haplótipos pode ocorrer em regiões geográficas amplas, não somente em áreas transicionais. Tal fenômeno pode ser confundido com fluxo gênico, induzir superestimativas de habilidade de dispersão e pode conectar geneticamente populações que já divergiram a longo tempo (Russell *et al.*, 2005).

Outra possibilidade para explicar o compartilhamento de haplótipos seria hibridação intraespecífica por contato secundário das subespécies. Kokubun *et al.* (1997) estudaram a morfologia das subespécies de *P. axillaris* através da coleta de sementes e cultivo em casa de vegetação (nas mesmas condições ambientais) e sugerem que há

introgressão dos caracteres morfológicos em áreas ao longo do Rio Negro e Rio da Prata no Uruguai. Adicionalmente, Kokubun *et al.* (2006) sugeriram que a morfologia floral de poucas populações estudadas da ssp. *axillaris* do Rio Grande do Sul é diferente daquela encontrada para essa subespécie em outras áreas, e compararam essa morfologia com a forma encontrada anteriormente e relatada por Kokubun *et al.* (1997), sugerindo ser uma forma intermediária entre as subespécies *parodii* e *axillaris*. Nossos estudos com os caracteres morfológicos também revelaram a diferenciação nos caracteres florais dos indivíduos coletados nestas áreas consideradas como de morfologia intermediária por Kokubun *et al.* (1997 e 2006), embora estes indivíduos sejam incluídos preferencialmente no grupo da ssp. *axillaris*. A região próxima ao Rio Negro, Uruguai, pode ser uma região onde houve um contato secundário das subespécies, sendo os indivíduos lá coletados híbridos entre elas. As análises de cpDNA permitem a identificação de eventos de hibridação que não podem ser detectados morfológicamente (Bleeker, 2003). Se após cruzamentos interespecíficos a progênie híbrida retrocruzar preferencialmente com um dos parentais, a morfologia das futuras gerações pode perder a condição intermediária e se tornar uniforme em relação a um dos parentais, mas o cpDNA da outra espécie pode persistir, num fenômeno conhecido como captura de cloroplasto (Schaal *et al.*, 1998). Nesse caso a investigação de DNA nuclear é essencial para esclarecer esses processos.

Para melhor ilustrar a variabilidade genética das populações e sua distribuição geográfica, cada haplótipo foi representado com uma cor diferente e sua ocorrência nas populações foi indicada no mapa (Figura 22). O código dos haplótipos coincide com os da Figura 21. O haplótipo H2 foi o mais frequente, ocorrendo em 56 das 102 populações estudadas, sendo predominante nas populações da Argentina, províncias de Corrientes e Entre Rios, e na Campanha Gaúcha. Esse haplótipo parece estar mais associado com a ssp. *parodii*, apesar de também ser encontrado em populações de ssp. *axillaris* do Uruguai principalmente próximas ao Rio Negro e Rio da Prata, e em populações do RS. Isso poderia ser interpretado pelo exposto acima sobre hibridação por contato secundário entre as subespécies *axillaris* e *parodii*.

Dentre as características da rede de haplótipos que mais chamaram atenção está o compartilhamento de haplótipos entre populações distantes geograficamente, como observado para as populações das Guaritas (Pop49, 50, 51, 53, 57, 58, 59 e 60), de Formosa/Argentina (Pop97) e as populações do sul do Uruguai (Pop11, 12 e 13), que

compartilham o haplótipo H4. Esse compartilhamento de haplótipos não pode ser confundido com fluxo gênico. O cpDNA de *Petunia* é herdado matematicamente (Derepas & Dulieu, 1992), de modo que o fluxo gênico de cpDNA se dá através da dispersão de sementes, que nesta situação está restrita a curtas distâncias (Stehmann, 1999). Sendo assim, a explicação mais provável para o compartilhamento de haplótipos entre essas populações é a retenção de polimorfismo ancestral. Como as sementes não apresentam qualquer adaptação à dispersão a longas distâncias, é provável que a maioria das populações tenha se originado de poucos indivíduos fundadores, o que é coerente com a baixa variabilidade intrapopulacional encontrada na maioria das populações estudadas.

Segundo Excoffier *et al.* (2009), populações pequenas e pouco conectadas por fluxo gênico tendem a ser altamente diferenciadas. Foram encontradas algumas populações muito próximas geograficamente que apresentam haplótipos diferentes, como é o caso de populações da região das Guaritas e da Casa de Pedra, mencionadas acima. Este fato sugere um forte efeito fundador para a colonização de *P. axillaris*.

Essas duas localidades, Guaritas e Casa de Pedra, são muito próximas (cerca de 30 km) e estão localizadas na Serra do Sudeste, pertencendo ao mesmo sistema orográfico, cuja característica geomorfológica é o afloramento meridional do Escudo Brasileiro. Esse sistema inclui as serras a leste do Uruguai e as serras do sudeste do Rio Grande do Sul. Ao longo dessa região se observam haplótipos que ocorrem quase que exclusivamente ali, como por exemplo, o haplótipo H1 e seus derivados (H7, H13, H16, H17, H18). Da mesma forma, os haplótipos H3, H6 e H9 ocorrem exclusivamente no sul do Uruguai, no sentido leste-sul, exatamente no sentido da continuação da formação do Escudo Riograndense, sendo que o haplótipo H9, pertencente às populações Pop20 e 21, é o mais distinto de todos, com três passos mutacionais. Isso reforça a grande variabilidade genética encontrada na formação do Escudo Riograndense.

O distintivo florístico da região que corresponde ao afloramento do escudo Riograndense tem sido reportado por Rambo (1954) quando hipotizou que essas formações metamórficas elevadas podem ter sido isoladas no passado por ingressos marinhos. A grande biodiversidade da região tem sido reportada também por vários trabalhos (Girardi-Deiro & Gonçalves, 1987; Zocche & Porto, 1993; Girardi-Deiro & Porto, 2001; Caporal & Boldrini, 2007) e, inclusive, muitas áreas da Serra do Sudeste são consideradas de extrema

importância biológica e parte integrante das áreas prioritárias para conservação da biodiversidade (MMA, 2000). A conexão florística entre as altas elevações dessa área é uma hipótese antiga (Rambo, 1954; Crisci *et al.*, 2001), tendo sido sugerido, mais recentemente, que essa área constitui refúgios para algumas espécies (Grela, 2004). A distribuição dos haplótipos de *P. axillaris*, apesar de não estar claramente estruturada geograficamente, é congruente com a proposta de conexão florística dessa região.

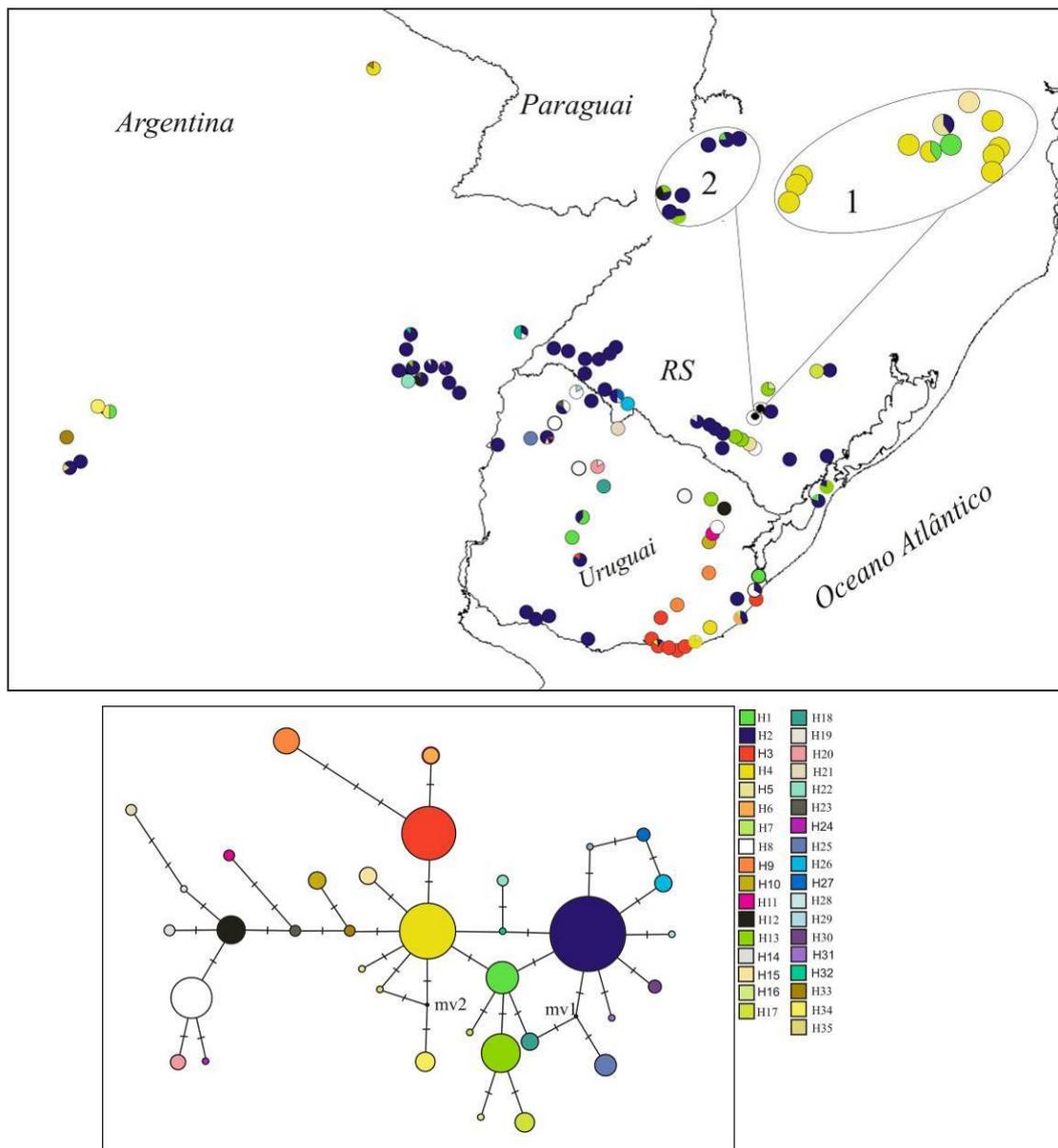


Figura 22: (A) Mapa da variabilidade genética nas populações de *Petunia axillaris* estudadas. Cores conforme a rede de haplótipos apresentada em B. (B) *Network* mostrando o relacionamento entre os 35 haplótipos nas populações de *P. axillaris* (combinação das sequências dos espaçadores *trnS-trnG* e *trnH-psbA*). Os detalhes 1 e 2 correspondem às populações amostradas nas Guaritas e Casa de Pedra, respectivamente.

O grau de estruturação genética das populações pode ser verificado através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) e do cálculo do índice de fixação  $\Phi_{ST}$ . Para

estes testes, as populações Pop24, 27, 35, 92 e 100, por possuírem apenas um indivíduo amostrado, não foram incluídas na análise. Analisando as populações sem impor qualquer agrupamento entre os pontos de coleta, observou-se que 80,52% da variação encontrada entre as sequências correspondem à variação entre as populações, enquanto que 19,48% são relativos à variação intrapopulacional. Quando a AMOVA é calculada definindo-se três grupos, correspondentes às três subespécies, o percentual de variação entre os grupos é extremamente baixo: 6,92%, enquanto que 74,25% da variação estão divididos entre as populações dentro dos grupos e os 18,83% restantes estão distribuídos dentro das populações.

Foi realizado o teste de AMOVA para os grupos de populações (conforme Tabela 2) e, nesse caso, os grupos foram analisados como se fossem populações. Novamente, observou-se que a maior variação foi dentro dos grupos de populações, correspondendo a 63,57% da variação total, enquanto que a variação dentro das populações foi 36,43%, com um  $\Phi_{ST}$  de 0,364. A variação entre populações caiu um pouco em comparação à análise feita com as populações separadas. Isso mostra que mesmo populações muito próximas podem divergir bastante, enquanto que populações distantes geograficamente muitas vezes se assemelham muito e, até mesmo, compartilham haplótipos. Assim como a *network*, a AMOVA indica um forte efeito fundador para cada ponto, uma vez que populações próximas são geneticamente muito distintas, sem que isso corresponda de fato a uma diferenciação evolutiva.

Com esses dados também podemos observar a baixa variabilidade intrapopulacional em *P. axillaris*. Certo sincronismo é observado em populações próximas, como nas populações das Guaritas, Casa de Pedra e Campanha Gaúcha. Extinções de populações locais podem sincronizar a dinâmica da estrutura espacial das populações, uma vez que a redução de migrantes que resulta da extinção deprime simultaneamente a diversidade em populações vizinhas, produzindo mais sincronismo dinâmico. A extinção de populações locais produz mudanças fundamentais na estrutura espacial de populações (Matter & Rolland, 2010). Quando a extinção de populações ocorre em uma escala espacial pequena, é necessária uma retroalimentação positiva para a persistência da diversidade das populações. Não só o potencial de re-colonização poderá ser perdido como populações próximas podem tornar-se sincronizadas. Sincronismo seguido de extinção é maior quando populações grandes são extintas e estão rodeadas de populações pequenas. Como

populações grandes tem um risco de extinção menor que populações pequenas, essa situação pode ser menos comum em sistemas naturais e ocorre mais frequentemente quando a extinção resulta de fatores como a destruição do habitat (Matter & Roland, 2010). As regiões citadas, Casa de Pedra e Guaritas, ambas localizadas na Serra do Sudeste, e a Campanha Gaúcha fazem parte do Bioma Pampa no Rio Grande do Sul. A biodiversidade dessas regiões tem sido altamente ameaçada por extensas monoculturas de acácias, eucaliptos e pinus (Pillar, 2003; Pillar, 2006; Caporal & Boldrini, 2007; Pillar *et al.*, 2009; Suertegaray & Silva, 2009). O sincronismo de populações próximas destas áreas, assim como a baixa diversidade principalmente em populações da Campanha Gaúcha (Tabela 8), podem ser explicados pela destruição do habitat.

O teste de Mantel não foi significativo, revelando que não há correlação entre as distâncias genéticas e geográficas para as populações de *P. axillaris* [Coeficiente de correlação ( $r$ ) = - 0,0102;  $P > 0,05$ ]. Esse resultado também foi verificado através do teste de Autocorrelação Espacial, que não foi significativo como um todo ( $P > 0,05$ ). Esses resultados sugerem que o modelo de isolamento por distância não explica de maneira adequada o grau de diferenciação genética das populações de *P. axillaris* (Figura 23).

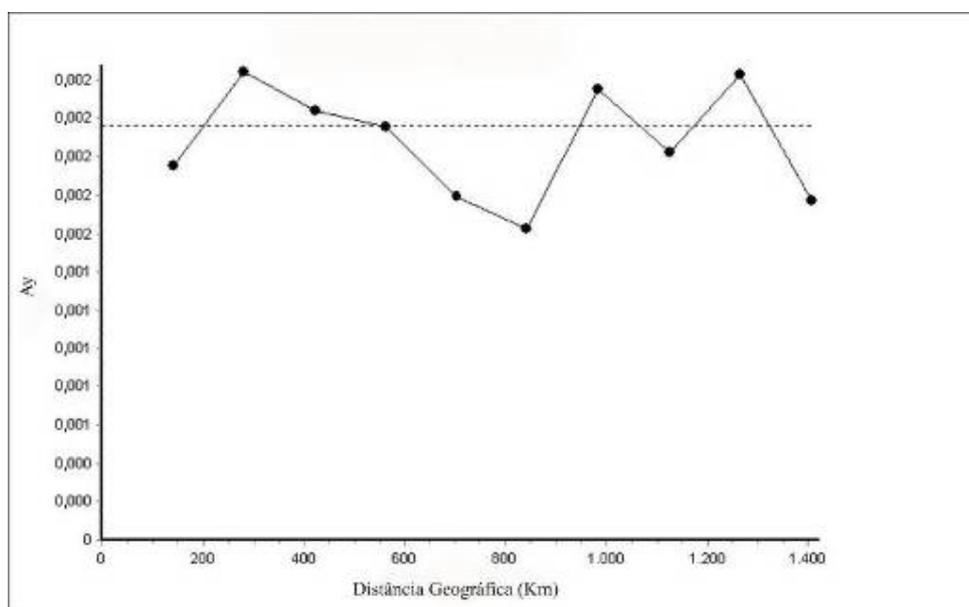


Figura 23: Análise de Autocorrelação Espacial para *Petunia axillaris*. Ay = média da distância genética entre os pares de indivíduos. A linha pontilhada paralela ao eixo “x” indica o valor médio de Ay para o conjunto de dados ( $2,16 \times 10^{-3}$ ).

#### 4.2.3 Detecção de Barreiras Biogeográficas

A fim de detectar possíveis barreiras biogeográficas que impeçam o fluxo gênico entre as populações amostradas, foram feitas análises no programa SAMOVA 1.0. Esse programa agrupa as populações de acordo com sua similaridade genética e localização geográfica. Também para esta análise as populações Pop24, Pop27, Pop35, Pop92 e Pop100 foram removidas por apresentarem um único indivíduo. O resultado obtido com a análise de SAMOVA mostra o maior valor de  $F_{CT}$  para  $K=2$ , em seguida o valor decresce e fica oscilando até  $K=8$  (Tabela 10).

Tabela 10: Resultado da Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) em populações de *Petunia axillaris*. Na composição do grupo estão representadas entre parênteses as populações de cada grupo, cujas informações estão indicadas na Tabela 1.  $K$  refere-se ao número de grupos predefinidos na análise. Todos os testes para diferenciação são significativos para  $P < 0,001$ .

$K$	$F_{SC}$	$F_{ST}$	$F_{CT}$	Composição do grupo
2	0,802	0,940	0,698	(68) x (todas as demais populações)
3	0,799	0,890	0,454	(25) x (62) x (todas as demais populações)
4	0,793	0,904	0,538	(32) x (70) x (99) x (todas as demais populações)
5	0,748	0,915	0,661	(20, 21) x (22) x (65) x (66, 67, 68, 70, 72) x (todas as demais populações)
6	0,773	0,897	0,545	(16) x (43) x (66, 67, 68, 72) x (62) x (99) x (todas as demais populações)
7	0,752	0,914	0,653	(20, 21) x (15) x (66, 67, 68, 72) x (56) x (32) x (50) x (todas as demais populações)
8	0,777	0,887	0,492	(23, 25) x (58) x (66, 67, 68, 72) x (60) x (56) x (82) x (42) x (todas as demais populações)

Os índices de fixação  $F_{SC}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{CT}$  medem a variação genética entre populações dentro dos grupos, dentro das populações e entre grupos, respectivamente.

Diante disso, podemos sugerir que o melhor agrupamento para os dados de cpDNA de *P. axillaris* é quando  $K=2$ , que separa a população Pop 68 das demais,

indicando uma barreira entre esses grupos (Figura 24). Como podemos observar na rede de haplótipos, a população Pop68 está presente em um ramo separado dos demais e é geneticamente distante da população mais próxima geograficamente (Pop 76). Dentre a variação observada, 69,77% correspondem à variação dentro dos grupos e 24,21% entre as populações dentro dos grupos, sendo os 6,01% restantes encontrados dentro das populações. Esse resultado não é surpreendente para os dados de cpDNA de *P. axillaris*, visto que há grande compartilhamento de haplótipos e forte efeito fundador. Sendo assim, o programa vai acabar agrupando um ou alguns pontos uniformes e geograficamente próximos, sem que isso tenha uma explicação biológica. Por isso, os resultados do Samova não refletem algo muito relevante no sentido biológico da espécie em estudo. Isso também é válido para as demais barreiras inferidas pelo programa, as quais não apresentaram qualquer sentido quando comparadas aos resultados obtidos com a análise da morfologia.

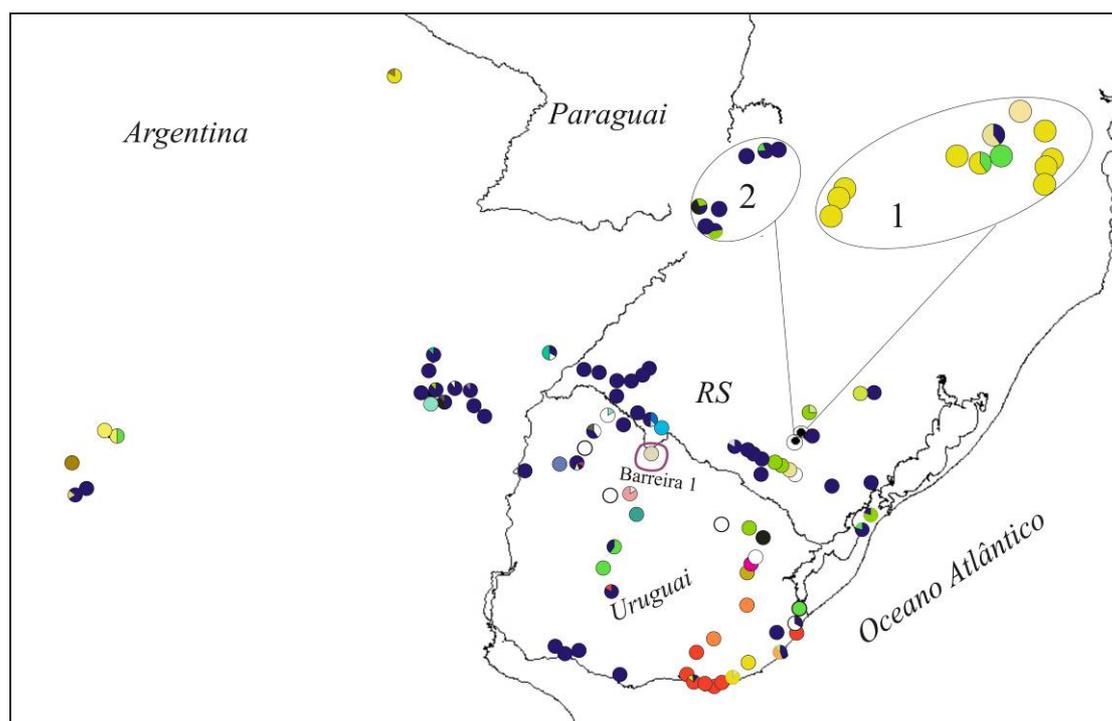


Figura 24: Localização da barreira biogeográfica inferida pelo programa SAMOVA 1.0 para os dados de cpDNA de *Petunia axillaris*.

Para testar a existência de possíveis barreiras biogeográficas para os dados genéticos foi utilizado o programa Barrier 2.2, o qual também foi utilizado para inferir barreiras para os dados morfológicos. Foi testada a hipótese de duas barreiras, para avaliar

a existência de separação entre as três subespécies. A primeira barreira inferida pelo programa agrupa as populações Pop66, 67, 68, 70, 71, 72, ao norte do Uruguai. A segunda barreira agrupa as populações Pop 23, 25 e 32, sendo que as duas primeiras se localizam a sudeste do Uruguai e última a sudeste do RS (Figura 25). Esses padrões, pelo fato do grande compartilhamento de haplótipos, podem refletir um alto grau de efeito fundador e deriva genética para as populações de *P. axillaris*. Porém, também é importante ressaltar que essas duas barreiras se posicionam em localidades onde estão presentes os grupos que apresentaram maior diversidade genética, medida através das diversidades nucleotídica e haplotípica. Nessa região, ao norte do Uruguai, está localizado o sistema de ravinas da Cuchilla do Haedo. Este local tem sido sugerido como refúgio para a flora adaptada a clima úmido durante os períodos de oscilações climáticas nas glaciações (Ab'Sáber, 1977; Grela, 2004). A região ao sul do Uruguai, onde se posiciona a segunda barreira, estende-se por uma área onde a principal característica geomorfológica é o afloramento do Escudo Sulbrasileiro que inclui as serras a leste do Uruguai e a sudoeste do Rio Grande do Sul. Ab'Sáber (1977) sugere que as inclinações destes sistemas montanhosos podem ter fornecido refúgios úmidos para a flora local durante as fases de oscilações climáticas que resultaram num clima mais frio e seco. A fase fria e seca foi propícia para a expansão do habitat de *P. axillaris*, os campos. Nesse período, a espécie pode ter colonizado a maior parte de sua vasta distribuição geográfica. O fato de identificar barreiras nesses locais que corresponderiam a refúgios para a flora adaptada a clima mais úmido pode explicar o grau de variabilidade encontrado nessas populações, pois o isolamento das populações de *P. axillaris* que ali habitavam devido à predominância de florestas nessas regiões teria permitido sua diferenciação.

As barreiras inferidas para os dados de cpDNA não são congruentes com aquelas inferidas para os dados morfológicos, que neste caso separa as subespécies. Isto sugere, mais uma vez, que a variação de cpDNA não é congruente com a variação morfológica que define as subespécies para *P. axillaris*, como exposto anteriormente.

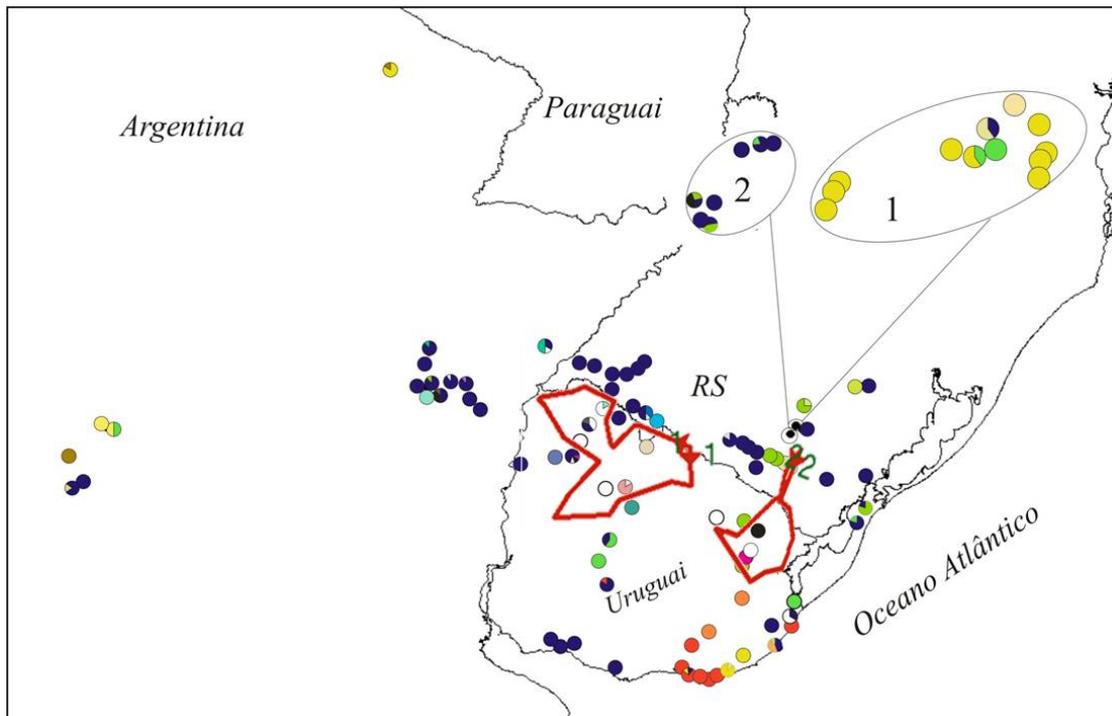


Figura 25: Barreiras inferidas pelo programa Barrier 2.2 para os dados de cpDNA de *Petunia axillaris*.

#### 4.2.4 Dinâmica Populacional

Os índices  $D$  de Tajima e  $F_S$  de Fu foram estimados para os dados de cpDNA. O objetivo destes testes é distinguir se uma sequência de DNA está evoluindo randomicamente (de forma neutra) ou se está evoluindo sobre a influência de processos não randômicos, incluindo seleção direcional ou balanceadora, expansão ou contração populacional e introgressão.

Os testes utilizando o conjunto completo de dados apresentaram como resultados:

- $D$  de Tajima: - 1.14107;  $P = 0.10800$
- $F_S$  de Fu: -17.58432;  $P = 0.00100$

Valores negativos para estes testes indicam excesso de polimorfismos de baixa frequência, decorrente de expansão no tamanho da população e/ou seleção positiva. Para nosso conjunto de dados, observamos que os dois testes apresentaram valores negativos, ou seja, indicando, possivelmente, expansão populacional recente nesse grupo, embora o teste  $D$  de Tajima não tenha dado significativo.

Foram calculados índices de neutralidade para as populações agrupadas conforme descrito na Tabela 2. Os valores dos dois testes de neutralidade para cada grupo estão descritos na Tabela 11. Dos 21 grupos, apenas dois (Grupos 16 e 17) tiveram resultados significativos e negativos para o teste D de Tajima ( $P < 0,02$ ), o que pode sugerir um sinal de expansão nesses grupos, embora os índices  $F_s$  de  $F_u$  não tenham sido significativos. O Grupo 16 é composto por cinco populações (Pop79, 83, 84, 85 e 86), as quatro primeiras se encontram entre os municípios de Quaraí e Uruguaiana, na Campanha Gaúcha, enquanto que a última localiza-se a uns 70 km em linha reta da população Pop85 (localizada em Uruguaiana), na Província de Corrientes na Argentina, em beira de estrada próximo à ponte do Rio Miriñay. O Grupo 17 é composto por quatro populações (Pop87, 88, 89, 90), todas da Argentina. As populações Pop88 e Pop89 localizam-se na Província de Corrientes, enquanto que Pop87 e Pop90 estão na Província de Entre Rios. Essas populações da Argentina estão localizadas na região chamada Mesopotâmia, uma extensa planície entre os rios Paraná e Uruguai.

A planície do Chaco é caracterizada por solos salinos e um clima altamente sazonal resultando em formações florestais xeromórficas. Essas condições ecológicas limitam a expansão da floresta paranaense para oeste, o que faria as planícies aluviais ao longo de paleocanais dos principais rios da planície da mesopotâmia servirem como rota de dispersão para muitas espécies (Spichiger *et al.*, 2004). Isso poderia explicar o fato dos grupos 16 e 17 terem apresentado valores significativos para D de Tajima, pois, como essas condições limitam a expansão de florestas, o habitat fica propício para o desenvolvimento de espécies de campo como *P. axillaris*. Além disso, essa região da mesopotâmia pode ter tido vários eventos de contração e expansão de florestas durante as glaciações.

Tabela 11: Índices de neutralidade calculados para os grupos de populações de *Petunia axillaris* estudadas.

Grupo	Nº indivíduos	D de Tajima	F <sub>s</sub> de Fu
Grupo 1	12	-0,42854	0,39413
Grupo 2	28	0,00000	-
Grupo 3	50	-0,80046	-0,49403
Grupo 4	19	2,17171	4,23716
Grupo 5	30	1,02219	1,37032
Grupo 6	20	0,89187	2,13884
Grupo 7	24	0,40435	0,38457
Grupo 8	47	0,41696	2,79974
Grupo 9	114	0,01747	0,36221
Grupo 10	15	2,18387	3,98835
Grupo 11	22	1,62022	1,78061
Grupo 12	30	1,52760	2,22648
Grupo 13	17	2,62122	2,99246
Grupo 14	25	-0,82533	1,02404
Grupo 15	24	-1,15933	-1,02785
Grupo 16	34	-2,0002*	0,21663
Grupo 17	33	-2,17860*	-0,1977
Grupo 18	21	-0,14751	0,56132
Grupo 19	18	-1,16467	-0,79427
Grupo 20	6	-0,93302	-0,00275
Grupo 21	25	1,36837	0,97863

\*P<0,02

Os mesmos índices de neutralidade foram calculados para os três grupos correspondentes às subespécies de *P. axillaris*. O grupo da ssp. *parodii* foi o único que apresentou resultado significativo e negativo para o F<sub>s</sub> de Fu (P<0,02). Enquanto que o teste D de Tajima não foi significativo para qualquer grupo de subespécies (P<0,02).

É interessante notar que o sinal de expansão parece estar associado com a ssp. *parodii* e, como observado nos teste dos grupos, esse sinal de expansão está restrito a alguns grupos da ssp. *parodii* (divisa a leste da Campanha Gaúcha com continuação na região da mesopotâmia da Argentina). Isso nos leva a sugerir que a ssp. *parodii* teria expandido recentemente a partir de grupos da ssp. *axillaris*, e se encontra atualmente em processo de diversificação, como se verifica através dos dados morfológicos.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 Implicações Biogeográficas

A análise de variação de cpDNA através da distribuição de *P. axillaris* revelou que, nessa espécie, a distribuição dos haplótipos não tende a ter uma estruturação geográfica clara compatível com a distribuição geográfica baseada na morfologia. Embora possa se observar uma tendência à estruturação geográfica decorrente da continuidade de algumas formações geomorfológicas, com a ocorrência de um mesmo haplótipo ou de grupos de haplótipos evolutivamente relacionados em regiões específicas (como é o caso do Escudo Sulriograndense).

Processos geológicos juntamente com episódios climáticos do Quaternário são considerados por muitos autores como tendo desempenhado um importante papel na estruturação da diversidade de plantas. Durante o Último Máximo Glacial, a maior parte do Hemisfério Norte esteve coberta por gelo (Hewitt, 1996). O Hemisfério Sul, entretanto, não foi sujeito a extensivas glaciações, embora o clima tenha sido consideravelmente modificado (Damuth & Fairbrid, 1970; Ab'Sáber, 1977; Clapperton, 1993; Iriondo, 1999; Bromley *et al.*, 2009). Mudanças climáticas no Quaternário no sul da América não envolvem a exclusão da vegetação pela formação de extensivas geleiras. As mudanças climáticas dessa área são principalmente explicadas por pequenas mudanças na localização de anticiclones do Atlântico e do Pacífico. Durante os períodos mais secos, uma aceleração de atividades eólicas depositou grandes massas de lodo e areia fina sobre a maior parte das terras baixas (Popolizio, 1982; Iriondo & Garcia, 1993; Panario & Gutierrez, 1999; Iriarte, 2006). A vegetação da região não tem sido estável desde o Último Máximo Glacial, tendo avançado várias vezes em direção ao nordeste nos períodos frios e secos e recuado para sudoeste nos períodos úmidos e quentes.

Durante as fases de frio e seca, os vales dos rios e ravinas nas áreas montanhosas da Argentina, Uruguai e Rio Grande do Sul, bem como algumas áreas de várzeas, podem ter servido como refúgios para uma flora adaptada a clima mais úmido (Ab'Sáber, 1977;

Haffer, 1982). Esse período, segundo Behling (2002a) foi favorável à expansão dos campos e estes permaneceram mesmo com a melhora nas condições climáticas.

Uma hipótese pode ser sugerida para *P. axillaris* nesse cenário. Na fase fria e seca, *P. axillaris* expandiu tomando a vasta proporção que ocupa hoje, porém esses grupos teriam sido isolados pela concentração das florestas nessa região durante posterior melhora do clima. Resultados semelhantes foram encontrados para haplótipos de cpDNA de *Turnera sidoides*, cuja distribuição geográfica é semelhante à de *P. axillaris* (Speranza *et al.*, 2007). Estes autores sugerem a existência de refúgios que coincidem com a região de maior diversidade e os locais onde se posicionam as barreiras encontradas para *P. axillaris*. Speranza *et al.* (2007) encontram três haplótipos para *T. sidoides* que seriam fixados em três áreas de refúgios, durante a fase seca e fria, e também não encontraram concordância entre as linhagens de cpDNA e os morfotipos da espécie. Para *P. axillaris* não foi possível observar um padrão de fixação de haplótipos nas áreas de refúgio devido ao grande compartilhamento de haplótipos entre as diferentes populações e grupos.

A distribuição total de *P. axillaris* é congruente com a proposta de que a conexão florística acompanha a continuidade das formações geológicas da região entre Uruguai e Rio Grande do Sul, mais claramente observada através da morfologia. Os resultados aqui apresentados indicam que a espécie *P. axillaris* constitui um modelo bastante informativo para as transformações biogeográficas ocorridas na região, embora mais estudos se façam necessários para que um panorama definitivo seja compreendido.

## **5.2 Delimitação de taxa intraespecíficos para o complexo *P. axillaris***

As análises de cpDNA, modelo climático de nicho e caracteres morfológicos da flor da espécie *P. axillaris* revelaram que, em nível filogenético, os diagnósticos dos limites geográficos das subespécies são amplamente equivalentes entre os critérios morfológicos e ecológicos, para a ssp. *parodii* e ssp. *axillaris*, suportando, assim, a separação dessas duas subespécies. Já em relação à subespécie *subandina*, sua condição de táxon independente não é suportada, porque apesar de ser ecologicamente distinta da subespécie *axillaris*, as populações de ambas as subespécies não são morfológicamente distintas umas das outras. Esses dados são congruentes com a análise de dados nucleares (A.L. Segatto, comunicação pessoal), na qual se observa a divergência entre as subespécies

*axillaris* e *parodii*, mas não a primeira em relação à *subandina*. O cpDNA não suporta a exclusividade de qualquer destes grupos. Apesar da falta de resolução genealógica pelo cpDNA, esses dados fornecem informações relevantes em relação à biogeografia da espécie.

O conjunto geral dos dados suporta a existência de duas subespécies para *P. axillaris*, *parodii* e *axillaris*. Quanto à ssp. *subandina*, esta faz parte do grupo da ssp. *axillaris*, a qual apresenta uma grande variação morfológica que pode ser devida aos diferentes nichos que as populações ocupam. A ssp. *parodii* apresenta morfologia mais homogênea e também ocupa menor diversidade de nichos. O mesmo se verifica em relação aos dados de cpDNA, sendo que a ssp. *parodii* além de apresentar menor diversidade genética, possui sinal de expansão populacional, sugerindo ser derivada da ssp. *axillaris* recentemente.

Assim, estamos propondo uma reformulação na classificação taxonômica infraespecífica, de forma que sejam reconhecidas apenas as subespécies *axillaris* e *parodii*.

### **5.3 Implicações para a Conservação**

O Bioma Pampa, um dos seis grandes biomas brasileiros, é um ecossistema natural com alta diversidade de espécies vegetais e animais, pouco conhecido. Ele garante serviços ambientais importantes, como a conservação de recursos hídricos, a disponibilidade de polinizadores e o provimento de recursos genéticos. Além disso, tem sido a principal fonte forrageira para a pecuária, abrigando alta biodiversidade e oferecendo beleza cênica com potencial turístico importante (Suertegaray & Silva, 2009). Porém, sua conservação tem sido negligenciada, ameaçada pela conversão em monoculturas anuais e silvicultura (pinus e eucalipto), associadas à invasão de espécies exóticas e por uma aplicação leniente da legislação ambiental, como se tais formações naturais abertas não tivessem a mesma importância das florestas (Pillar, 2003; Pillar, 2006; Suertegaray & Silva, 2009). Nas últimas décadas, devido à influência e pressão seletiva das monoculturas e árvores exóticas, esse bioma, que tem a menor representatividade no Sistema Nacional de Unidades de Conservação, já perdeu cerca de metade de sua vegetação natural nativa (Suertegaray & Silva, 2009).

A compreensão da biodiversidade, tanto do ponto de vista estrutural e funcional quanto dos serviços ambientais que oferece, é a base para identificar e propor estratégias de conservação e manejo adequadas. A grande diversidade biológica ocorrente no RS se deve, em especial, à diversidade de solos procedentes de grande variabilidade geológica, da topografia, da distribuição da pluviosidade, da temperatura e da disponibilidade de água. A topografia associada à hidrografia, formada por rios e lagoas, constitui uma grande variedade de ambientes que sustentam uma ampla diversidade biológica (Suertegaray & Silva, 2009).

Como pode ser observado nos resultados aqui apresentados, *P. axillaris* possui grande variabilidade morfológica e a maior parte dela é encontrada no RS, principalmente na Serra do Sudeste. Por outro lado, essa variação morfológica não está associada com os maiores níveis de variação genética, os quais estão presentes em populações do Uruguai, ainda no Bioma Pampa, que neste País ainda está mais bem preservado, devido às políticas agrícolas baseadas principalmente na pecuária. A baixa variabilidade genética das populações do RS, principalmente observada na Campanha Gaúcha, pode ser atribuída à perda de habitat e extinção de populações locais devido à pressão que este bioma vem sofrendo pelas monoculturas e mais recentemente pela silvicultura. A fragmentação de habitat pode levar ao sincronismo de populações seguido de extinção, afetando a variabilidade genética das populações (Matter & Roland, 2010).

Muitas áreas da Serra do Sudeste são consideradas de extrema importância biológica e parte integrante das áreas prioritárias para conservação (MMA, 2000). A região da Serra do Sudeste foi a que apresentou maior variabilidade morfológica para a espécie *P. axillaris*, e, de certa forma, uma significativa variabilidade genética. Essa variação pode ser atribuída ao substrato geológico e altitude, que contribuem para a diversidade dos tipos vegetacionais da região, ou à introgressão de caracteres de *P. exserta*, endêmica desta área, visto que já foram observados eventos de hibridação entre ambas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Essa região, principalmente na formação Guaritas, é uma área candidata para criação de Unidade de Conservação. Esta região abriga um número considerável de plantas endêmicas, muitas delas de distribuição bastante restrita. Por exemplo, das 104 espécies endêmicas do RS, aproximadamente 30 ocorrem na Serra do Sudeste, sendo dez exclusivas dessa região (Guadagnin *et al.*, 2000). Ações de conservação são urgentes no Bioma Pampa com a finalidade de frear a extinção de muitas espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Sáber, A.N. (1977) Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *Paleoclimas* 3, 1-19.
- Ando, T., Lida, S., Kokubun, H., Ueda, Y., Marchesi, E. (1994) Distribution of intraspecific taxa of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay as revealed by discriminant analysis. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 45, 95–109.
- Ando, T., Lida, S., Kokubun, H., Ueda, Y., Marchesi, E. (1995a) Distribution of *Petunia axillaris* sensu lato in Uruguay as revealed by discriminant analysis of the live plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64, 381–391.
- Ando, T., Kurata, M., Sasaki, S., Ueda, Y., Hashimoto, G., Marchesi, E. (1995b) Comparative morphological studies on infraspecific taxa of *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz et Thell. (Solanaceae). *J. Jpn. Bot.* 70, 205–217.
- Ando, T. (1996) Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 47, 19-30.
- Aoki, K., Matsumura, T., Hattori, T., Murakami, N. (2006) Chloroplast DNA phylogeography of *Photinia glabra* (Rosaceae) in Japan. *American Journal of Botany* 93, 1852-1858.
- Arana, M.V., Gallo, L.A., Vendramin, G.G., Pastorino, M.J., Sebastiani, F., Marchelli, P. (2010). High genetic variation in marginal fragmented populations at extreme climatic conditions of the Patagonian Cypress *Austrocedrus chilensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54 (2010) 941–949.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, London. 447 pp.
- Avise, J.C. (2009) *Phylogeography: retrospect and prospect*. *Journal of Biogeography* 36, 3-15.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Rohlf, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37:48.
- Bauert, M.R., Kaelin, M., Edwards, P.J., Baltisberger, M. (2007) Genetic structure and phylogeography of alpine relict populations of *Ranunculus pygmaeus* and *Saxifraga cernua*. *Botanica Helvetica* 117, 181-196.
- Behling, H. (1995) A High-resolution holocene pollen record from Lago do Pires, se Brazil - Vegetation, Climate and fire History *Journal of Paleolimnology* 14, 253-268.

- Behling, H. (1997) Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais, Parana State (South Brazil). *Review of Palaeobotany and Palynology* 97, 109-121.
- Behling, H. (2002a) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 177, 19-27.
- Behling, H. (2002b) South and southeast Brazilian grasslands during late quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 177:1-2, 19-27.
- Behling, H., Pillar, V.D. (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. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 362, 243-251.
- Behling, H., Pillar, V.D., Muller, S.C., Overbeck, G.E. (2007) Late-Holocene fire history in a forest-grassland mosaic in southern Brazil: Implications for conservation. *Applied Vegetation Science* 10, 81-90.
- Behling, H. (2002c) Carbon storage increases by major forest ecosystems in tropical South America since the Last Glacial Maximum and the early Holocene. *Global and Planetary Change* 33, 107-116.
- Bermingham, E., Moritz, C. (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7, 367-369.
- Bleeker, W. (2003) Hybridization and *Rorippa austriaca* (Brassicaceae) invasion in Germany. *Molecular Ecology* 12, 1831-1841.
- Bossi, J., Ferrando, L., Montaña, J., Campal, N., Morales, H., Gancio, F., Schipilov, A., Piñeyro, D., Sprechman, P. (1998) Carta Geológica del Uruguay Escala 1:500.000. Geoditores S.R.L. y Technobank Graphics Research, Montevideo.
- Bromley, G.R.M., Schaefer, J.M., Winckler, G., Hall, B.L., Todd, C.E., Rademaker, K.M. (2009) Relative timing of last glacial maximum and late-glacial events in the central tropical Andes. *Quaternary Science Reviews* 28, 2514-2526.
- Burnham, R.J., Graham, A. (1999) The history of neotropical vegetation: New developments and status. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86, 546-589.
- Butlin, R.K., Galindo, J., Grahame, J.W. (2008) Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 363, 2997-3007.
- Cabrera, A.L. (1977) Novedades en las Solanaceas de Entre Rios. *Hickenia* 14, 79-81.
- Cain, M.L.M., B.G. e Strand, A.E. (2000) Long-distance seed dispersal in plant populations. *American Journal of Botany*, 87, 1217-1227.

- Caporal, F.J., Boldrini, I.L. (2007) Florística e fitossociologia de um campo manejado na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências* 5, n. 2-3, 37-44.
- Carnaval, A.C., Moritz, C. (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B, Rodriguez, M.T., Moritz, C. (2009) Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Chen, K.M., Abbott, R.J., Milne, R.I., Tian, X.M., Liu, J.Q. (2008) Phylogeography of *Pinus tabulaeformis* Carr. (Pinaceae), a dominant species of coniferous forest in northern China. *Molecular Ecology* 17, 4276-4288.
- Chen, S., Matsubara, K., Kokubun, H., Kodama, H., Watanabe, H., Marchesi, E., Ando, T. (2007) Reconstructing historical events that occurred in the petunia Hfl gene, which governs anthocyanin biosynthesis, and effects of artificial selection by breeding. *Breeding Science* 57, 203-211.
- Clapperton, C.M. (1993) Nature of environmental changes in South America at the last Glacial Maximum. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 101, 189-208.
- Colinvaux, P.A., DeOliveira, P.E., Moreno, J.E., Miller, M.C., Bush, M.B. (1996) A long pollen record from lowland Amazonia: Forest and cooling in glacial times. *Science* 274, 85-88.
- Collevatti, R. G., Rabelo, S.G., Vieira, R.F. (2009) Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany* 104, 655–664.
- Coyne, J.A.e.O., H.A. (2004) *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland. 545 pp.
- Crisci, J., Freire, S., Sancho, G., Katinas, L., 2001. Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania mountain ranges (Buenos Aires, Argentina). *Caldasia* 23, 21-41.
- Damuth, J.E., Fairbrid.,R.W. (1970) Equatorial Atlantic deep sea arkosic sands and ice-age aridity in tropical South America. *Geological Society of America Bulletin* 81, 189-&.
- De Francesco, C.G., Zarate, M.A., Miquel, S.E. (2007) Late Pleistocene mollusc assemblages and inferred paleoenvironments from the Andean piedmont of Mendoza, Argentina. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 251, 461-469.

- Derepas, A., Dulieu, H. (1992) Inheritance of the capacity to transfer plastids by the pollen parent in *Petunia hybrida* hort. *Journal of Heredity* 83, 6-10.
- DNM, Dirección Nacional de Meteorología (2010) El clima del Uruguay. (meio eletrônico: [http://www.meteorologia.com.uy/caract\\_climat.htm](http://www.meteorologia.com.uy/caract_climat.htm)).
- Dobes, C.H., Mitchell-Olds, T., Koch, M.A. (2004) Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabis drummondii*, *A. x divaricarpa*, and *A. holboellii* (Brassicaceae). *Molecular Ecology* 13, 349-370.
- Dunn, I.S., Blattner, F.R. (1986) Sharoons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research* 15, 2677-2698.
- Dupanloup, I., Schneider, S. e Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11, 2571-2581.
- Excoffier, L. Smouse., P.E. e Quattro, J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Excoffier, L., Foll, M., Petit, R.J. (2009) Genetic Consequences of Range Expansions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 40, 481-501.
- Excoffier, L., Laval., G. e Schneider, S. (2005) Arlequin3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1, 47-50.
- Fambrini, G.L., Fragoso-Cesar, A.R.S., Almeida, R.P., Riccomini, C. (2005) A Formação Barriga Negra (Edicariano do Uruguai): Caracterização estratigráfica e correlação com unidades do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Geociências* 35, 515-524.
- Fant, J.B., Kamau, E.A., Preston, C.D. (2003) Chloroplast evidence for the multiple origins of the hybrid *Potamogeton x sudermanicus* Hagstr. *Aquatic Botany* 75, 351-356.
- Fant, J.B., Kamau, E., Preston, C.D. (2005) Chloroplast evidence for the multiple origins of the hybrid *Potamogeton x fluitans*. *Aquatic Botany* 83, 154-160.
- Fehlberg, S.D., Ranker, T.A. (2009) Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular Deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50, 326-335.
- Foote, A.D., Newton, J., Piertney, S.B., Willerslev, E., Gilbert, M.T.P. (2009) Ecological, morphological and genetic divergence of sympatric North Atlantic killer whale populations. *Molecular Ecology* 18, 5207-5217.

- Fortuna, M.A., Albaladejo, R.G., Fernandez, L., Aparicio, A., Bascompte, J. (2009) Networks of spatial genetic variation across species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 19044-19049.
- Fregonezi, J.N., Lorenz-Lemke, A.P., Stehmann, J.R., Bonatto, S.L., Salzano, F.M. & Freitas, L.B (2007) Relações filogeográficas e dinâmica populacional em *Calibrachoa excellens* e *Calibrachoa linoides* (Solanaceae). In: CD-ROM do 53<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia-SP.
- Fu, Y.X. (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* 143, 557–570.
- Fujii, N. (2007) Chloroplast DNA phylogeography of *Pedicularis* ser. *Gloriosae* (Orobanchaceae) in Japan. *Journal of Plant Research* 120, 491-500.
- Futuyma, D.J. (1998) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, massachussetts. 3, 763 pp.
- Futuyma, D.J. (2002) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Sunderland. 763 pp.
- Gavrilets, S., Losos, J.B. (2009) Adaptive Radiation: Contrasting Theory with Data. *Science* 323, 732-737.
- Girardi-Deiro, A.M., Gonçalves, J.O.N. (1987) Estrutura da vegetação de um campo natural submetido a três cargas animais na Região Sudeste do Rio Grande do Sul. EMBRAPA/CNPO. Coletânea das Pesquisas Forrageiras 1.
- Girardi-Deiro, A.M., Porto, M.L. (2001) Aspectos da dinâmica de espécies herbáceas após corte e queima de plantas lenhosas. EMBRAPA. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 24, 5-25.
- Gong, W., Chen, C., Dobes, C., Fu, C.X., Koch, M.A. (2008) Phylogeography of a living fossil: Pleistocene glaciations forced *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) into two refuge areas in China with limited subsequent postglacial expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48, 1094-1105.
- Grela, I.A. (2004) Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas. Universidad de la República, Montevideo, p. 103.
- Guadagnin, D.L., Larocca, J., Sobral, M.(2000) Flora vascular de interesse para a conservação na bacia do arroio João Dias: avaliação ecológica rápida. In: Minas do Camaquã, um estudo multidisciplinar. Unisinos, São Leopoldo.
- Haffer, J. (1982) General aspects of the refuge theory. Part 1: The refuge theory. *Biological diversification in the Tropics*. Columbia University, 6-24.
- Hamilton, M.B. (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with. *Molecular Ecology* 8, 513-525.

- Hewitt, G.M. (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10, 537-549.
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58, 247-276.
- Hewitt, G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1997a). Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil, Rio de Janeiro.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1997b) Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil, Rio de Janeiro.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) Mapa de Biomas. [ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas\\_murais/biomas.pdf](ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas_murais/biomas.pdf).
- Iriarte, J. (2006) Vegetation and climate change since 14,810 C-14 yr BP in southeastern Uruguay and implications for the rise of early Formative societies. *Quaternary Research* 65, 20-32.
- Iriondo, M.H. (1981) Antigüedad del último cambio climático en el Litoral. *Ecología* 6, 5-8.
- Iriondo, M.H. (1992) El Chaco. *Holoceno* 1, 50-63.
- Iriondo, M.H. (1999) Climatic changes in the South American plains: Records of a continent-scale oscillation. *Quaternary International* 57-8, 93-112.
- Iriondo, M.H., Garcia, N.O. (1993) Climatic variations in the Argentine plains during the last 18,000 years. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 101, 209-220.
- Iwata, H.K., T. e Ohno, S. (2000) Triparental origin of *Damask roses*. *Gene* 259, 53-59.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. (1999) *Plant Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland. 464pp.
- Knowles, L.L. (2001) Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Mol Ecol* 10, 691–701.
- Knowles, L.L., Carstens, B.C. (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology* 56, 887-895.
- Kokubun, H., Ando, T., Kohyama, S., Vatanabe, H., Tsukamoto, T., Marchesi, E. (1997) Distribution of Intermediate Forms of *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* and subsp. *parodii* (Solanaceae) in Uruguay Revealed by Discriminant analysis. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 48, 173-185.

- Kokubun, H., Nakano, M., Tsukamoto, T., Watanabe, H., Hashimoto, G., Marchesi, E., Bullrich, L., Basualdo, I.L., Kao, T.H., Ando, T. (2006) Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. *Journal of Plant Research* 119, 419-430.
- Korpelainen, H. (2004) The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. *Naturwissenschaften* 91, 505-518.
- Kulcheski, F.R., Muschner, V.C., Lorenz-Lemke, A.P., Stehmann, J.R., Bonatto, S.L., Salzano, F.M., Freitas, L.B. (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126, 3-14.
- Latch, E.K., Heffelfinger, J.R., Fike, J.A., Rhodes, O.E. (2009) Species-wide phylogeography of North American *Mule deer* (*Odocoileus hemionus*): cryptic glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology* 18, 1730-1745.
- Leache, A.D., Koo, M.S., Spencer, C.L., Papenfuss, T.J., Fisher, R.N., McGuire, J.A. (2009) Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12418-12423.
- Ledru, M.P. (1993) Late Quaternary environment and climatic changes in Central Brazil. *Quaternary Research* 39, 90-98.
- Li, E.X., Yi, S., Qiu, Y.X., Guo, J.T., Comes, H.P., Fu, C.X. (2008) Phylogeography of two East Asian species in *Croomia* (Stemonaceae) inferred from chloroplast DNA and ISSR fingerprinting variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 702-714.
- Lorenz-Lemke, A.P., Mader, G., Muschner, V.C., Stehmann, J.R., Bonatto, S.L., Salzano, F.M., Freitas, L.B. (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology* 15, 4487-4497.
- Lorenz-Lemke, A.P., Muschner, V.C., Bonatto, S.L., Cervi, A.C., Salzano, F.M., Freitas, L.B. (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany* 95, 799-806.
- Mace, G.M., Purvis, A. (2008) Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molecular Ecology* 17, 9-19.
- Manni, F., Guerard, E., Heyer, E. (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* 76, 173-190.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.

- Martino, D. (2004) Conservación de praderas en el cono sur: valoración de las áreas protegidas existentes. *Ecosistemas* 13, 114-123.
- Matter, S.F., Roland, J. (2010) Local extinction synchronizes population dynamics in spatial networks. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 277, 729-737.
- Miles, L., Grainger, A., Phillips, O. (2004) The impact of global climate change on tropical forest biodiversity in Amazonia. *Global Ecology and Biogeography* 13, 553-565.
- Miller, M. (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96, 722-724.
- Miller, M.J., Bermingham, E., Klicka, J., Escalante, P., Do Amaral, F.S.R., Weir, J.T., Winker, K. (2008) Out of Amazonia again and again: episodic crossing of the Andes promotes diversification in a lowland forest flycatcher. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275, 1133-1142.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente (2000) Avaliação e Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos, Brasília: MMA/SBF.
- Moritz, C. (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51, 238-254.
- Morton, B.R. (1995) Neighboring base composition and transversion/transition bias in a comparison of rice and maize chloroplast noncoding regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9717-9721.
- Muellner, A.N., Tremetsberger, K., Stuessy, T., Baeza, C.M. (2005) Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochoeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14, 203-212.
- Nicholas, K.B., Nicholas, K.B.J. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc).
- Novaes, R.M., Lemos F<sup>o</sup>, J.P., Ribeiro, R.A., Lovato, M.B. (2010). Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* 19, 985–998.
- Okaura, T., Harada, K. (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese Beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88, 322-329.
- Olsen, K.M. (2002) Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Ecology* 11, 901-911.
- Olsen, K.M., Schaal, B.A. (1999) Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5586-5591.

- Ortiz, M.A., Tremetsberger, K., Terrab, A., Stuessy, T.F., Garcia-Castano, J.L., Urtubey, E., Baeza, C.M., Ruas, C.F., Gibbs, P.E., Talavera, S. (2008) Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to worldwide introduced populations. *Molecular Ecology* 17, 3654-3667.
- Paim, P.S.G., Chemale, F., Lopes, R.C. (2000) A Bacia do Camaquã. In: Holz M e Rios LF (orgs.) *Geologia do Rio Grande do Sul*. UFRGS, Porto Alegre.
- Panario, D., Gutierrez, O. (1999) The continental Uruguayan Cenozoic: an overview. *Quaternary International* 62, 75-84.
- Palma-Silva<sup>1</sup>, C., Lexer, C., Paggi<sup>1</sup>, G.M., Barbara, T., Bered, F., & Bodanese-Zanettini<sup>1</sup>, M.H (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity*, 1-10.
- Pastorino, M.J., Gallo, L.A. (2002) Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *Journal of Biogeography* 29, 1167-1178.
- Pastorino, M.J., Gallo, L.A., Hattemer, H.H. (2004) Genetic variation in natural populations of *Austrocedrus chilensis*, a cypress of the Andean-Patagonian Forest. *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 993-1008.
- Pelser, P.B., Gravendeel, B., van der Meijden, R. (2003) Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobaea* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29, 613-628.
- Pennington, R.T., Lavin, M., Prado, D.E., Pendry, C.A., Pell, S.K., Butterworth, C.A. (2004) Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 359, 515-537.
- Pennington, R.T., Prado, D.E., Pendry, C.A. (2000) Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27, 261-273.
- Pielou, E.C. (2008) Plankton, from the last ice age to the year 3007. *Ices Journal of Marine Science* 65, 296-301.
- Pillar, V.P. (2003) Dinâmica da Expansão Florestal em Mosaicos de Floresta e Campos no Sul do Brasil. *Ecossistemas Brasileiros: Manejo e Conservação*, 209-216.
- Pillar, V.P. (2006) Estado atual e desafios para a conservação dos campos. Workshop Estado atual e desafios para a conservação dos campos. UFRGS, <http://www.ecologia.ufrgs.br/ecologia/campos/finalcampos.htm>. Porto Alegre.

- Pillar, V.P., Muller, S.C., Castilhos, Z.M.S., Jacques, A.V.A. (2009) Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 403 pp.
- Popolizio, E. (1982) Geomorphology of the Argentine Northeast. *Water International* 7, 162-177.
- Posada, D. & Crandall, K. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 37-45.
- Prance, G.T. (1996) Islands in Amazonia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 351, 823-833.
- Premoli, A.C., Kitzberger, T., Veblen, T.T. (2000) Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27, 251-260.
- Prieto, A.R. (1996) Late Quaternary vegetational and climatic changes in the Pampa grassland of Argentina. *Quaternary Research* 45, 73-88.
- Primack, R.B., Rodrigues, E. (2001) *Biologia da Conservação*. Editora Vida, Londrina. 328 pp.
- Rahimmalek, M., Tabatabaei, B.E.S., Arzani, A., Etemadi, N. (2009) Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochemical Systematics and Ecology* 37, 354-361.
- Rambo, B., 1954. Análise histórica da flora de Porto Alegre. *Sellowia* 6, 9-112.
- Ramos, A.C.S., De Lemos, J.P., Lovato, M.B. (2009) Phylogeographical Structure of the Neotropical Forest Tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and Its Relationship with the Vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity* 100, 206-216.
- Ricklefs, R.E., Schluter, (1993). *Species diversity in ecological communities: Historical and geographical perspectives*. University of Chicago Press, Chicago.
- Roy, A.F., Frascaria, N.; Mackay, J. & Bouquest, J. (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 85:2-3, 173-180.
- Rozas, J.S.-D., J.C.; Messeguer & Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- Rozzi, R., Feinsinger, P., Massardo, F., Primack, R. (2001) Qué es la diversidad biológica? In.: *Fundamentos de Conservación Biológica: Perspectivas Latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica, México.

- Russell, A.L., Medellín, R.A., McCracken, G.F. (2005) Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology* 14, 2207-2222.
- Sang, T.C., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84, 1120-1136.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T., Smith, W.A. (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7, 465-474.
- Serrano-Serrano, M.L., Hernandez-Torres, J., Castillo-Villamizar, G., Debouck, D.G., Sanchez, M.I.C. (2010) Gene pools in wild *Lima bean* (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54, 76-87.
- Simpson, B.B., Todzia, C.A. (1990) Patterns and processes in the development of the high Andean Flora. *American Journal of Botany* 77, 1419-1432.
- Speranza, P.R., Seijo, J.G., Grela, I.A., Neffa, V.G.S. (2007) Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *Journal of Biogeography* 34, 427-436.
- Spichiger, R., Calenge, C., Bise, B. (2004) Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Parana Basin. *Journal of Biogeography* 31, 1489-1501.
- Steere, W.C. (1931) *Petunia parodii*, a new species of the subgenus *Pseudonicotiana* from Argentina. *Pap. Michigan Acad. Sci* 13, 213-215.
- Stehmann, J.R. (1999) Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Tese de doutorado.
- Stehmann, J.R., Semir, J. (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. *Missouri Botanical Garden Press*, 341-348.
- Stehmann, J.R., Lorenz-Lemke, A.P., Freitas, L.B., Semir, J. The genus *Petunia*. In: *The Petunia Monograph*. Gerats T, Strommer J (org.). Ed. Springer, 2009, Heidelberg, 412 p
- Stuurman, J., Hoballah, M.E., Broger, L., Moore, J., Basten, C., Kuhlemeier, C. (2004) Dissection of floral pollination syndromes in petunia. *Genetics* 168, 1585-1599.
- Suertegaray, D.M.A. & Silva, L.A.P. (2009) Tchê Pampa: histórias da natureza gaúcha. In: Pillar, V.D., Muller, S.C., Castilhos, Z.M.S., Jacques, A.V.A. (Eds.), *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. MMA, Brasília, p. 403.

- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tan, B., Liu, K., Yue, X.L., Liu, F., Chen, J.M., Wang, Q.F. (2008) Chloroplast DNA variation and phylogeographic patterns in the Chinese endemic marsh herb *Sagittaria potamogetifolia*. *Aquatic Botany* 89, 372-378.
- Teixeira, M.B., Coura Neto, A.B., Pastore, U., Rangel-Filho, A.L.R. (1986) Vegetação. In: Levantamento de recursos naturais. IBGE, Rio de Janeiro.
- Thomassen, H.A., Buermann, W., Mila, B., Graham, C.H., Cameron, S.E., Schneider, C.J., Pollinger, J.P., Saatchi, S., Wayne, R.K., Smith, T.B. (2010) Modeling environmentally associated morphological and genetic variation in a rainforest bird, and its application to conservation prioritization. *Evolutionary Applications* 3, 1-16.
- Tonni, E.P., Fidalgo, F. (1978) Consideraciones sobre los cambios climáticos durante el Pleistoceno tardío-reciente en la Provincia de Buenos Aires. Aspectos ecológicos y zoogeográficos relacionados. *Ameghiniana* 15, 235-253.
- Tovar-Sanchez, E., Mussali-Galante, P., Esteban-Jimenez, R., Pinero, D., Arias, D.M., Dorado, O., Oyama, K. (2008) Chloroplast DNA polymorphism reveals geographic structure and introgression in the *Quercus crassifolia* x *Quercus crassipes* hybrid complex in Mexico. *Botany-Botanique* 86, 228-239.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Kokubun, H., Watanabe, H., Tanaka, R., Hashimoto, G., Marchesi, E., Kao, T. (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 49, 115-133.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Takahashi, K., Omori, T., Watanabe, H., Kokubun, H., Marchesi, E., Kao, T. (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiology* 131, 1903-1912.
- Turchetto-Zolet, A. (2009) Filogeografia e sistemática Molecular de *Schizolobium parhyba* (Vell.). Black (Guapuruvu) através do seqüenciamento de regiões cloroplásticas e nucleares. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.
- Vargas, P. (2003) Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon* 52, 463-476.
- Vazquez, D.P., Gittleman, J.L. (1998) Biodiversity conservation: Does phylogeny matter? *Current Biology* 8, R379-R381.
- Venail, J., Dell'Olivo, A., Kuhlemeier, C. (2010) Speciation genes in the genus *Petunia*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365, 461-468.

- Watanabe, H., Ando, T., Lida, S., Suzuki, A., Buto, K., Tsukamoto, T., Hashimoto, G., Marchesi, E. (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P-axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 65, 625-634.
- Whittall, J.B., Medina-Marino, A., Zimmer, E.A., Hodges, S.A. (2006) Generating single-copy nuclear gene data for a recent adaptive radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 124-134.
- Wijsman, H.J.W. (1982) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. 1. Taxonomic notes on the parental species of *petunia hybrida*. *Acta Botanica Neerlandica* 31, 477-490.
- Young, K.R. (1996) Species diversity in ecological communities: Historical and geographical perspectives - Ricklefs, RE, Schluter, D. *Annals of the Association of American Geographers* 86, 150-153.
- Yuan, Q.J., Zhang, Z.Y., Peng, H., Ge, S. (2008) Chloroplast phylogeography of *Dipentodon* (Dipentodontaceae) in southwest China and northern Vietnam. *Molecular Ecology* 17, 1054-1065.
- Zocche, J.J., Porto, M.L.I. (1993) Florística e fitossociologia de campo natural sobre banco de carvão e áreas mineradas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 6, 47-84.
- Zucol, A.F., Brea, M., Scopel, A. (2005) First record of fossil wood and phytolith assemblages of the Late Pleistocene in El Palmar National Park (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences* 20, 33-43.