

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

**Diversidade genética e estrutura populacional de espécies de plantas
raras, endêmicas e com diversificação recente**

ALICE BACKES DA ROSA

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.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Loreta Brandão de Freitas

Coorientador: Dr. Geraldo Mäder

Porto Alegre, Abril de 2017

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Molecular (LEM), Departamento de Genética, UFRGS e parte dos experimentos foram executados no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

O projeto teve como fontes financiadoras a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e o Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Loreta, pela confiança que teve no meu trabalho e por todos os momentos compartilhados. Obrigada por todas as oportunidades!

Aos amigos que estiveram no LEM comigo durante estes dois anos e antes, quando eu ainda estava na Iniciação Científica: **Ana Laura, Ana Lúcia, Caroline, Daniele, Geraldo, Giovanna, Gustavo, Lauís, Lina, Luana, Maikel, Marcelo, Sara e Verônica**, por compartilharem todo esse tempo juntos, por toda a ajuda científica - ou então conversas com café e bolo. Vocês são especiais! Preciso agradecer imensamente ao meu coorientador, **Gera**, pela ajuda constante desde o início deste trabalho. E também à **Carol**, o que dizer de ti? Tu és demais! Aprendi muito contigo nestes últimos anos e só tenho a te agradecer por toda a paciência e ensinamentos. Mereces todo o sucesso do mundo!

Aos amigos do PPGBM, por todos os momentos compartilhados, sejam eles sofrendo durante as aulas e provas ou comemorando o final das disciplinas. **Curi, Martiela e Bragatte**, que trio! Como foi bom poder contar com vocês durante esses anos. Obrigada por serem assim como são! Agradeço também aos professores do PPGBM, por proporcionarem um ambiente rico em discussão e que sempre acrescentou imensamente aos meus conhecimentos científicos.

Um agradecimento especial ao **Elmo**, por toda a paciência e ajuda ao longo destes últimos anos. A todos os amigos, de todas as cidades, que torceram por mim e acompanharam esta longa jornada.

A minha família, **Mãe, Pai, Rique e Rafa**, amo vocês! Obrigada pelo apoio incondicional de sempre. **Manu**, amor da tia, obrigada por existir. Amo-te! **Helena**, a tia te ama.

Ao **Alexandre**. Amor da minha vida, obrigada pelo companheirismo durante esses anos. Te amo e te quero sempre perto.

Ao colaborador esquecido.

RESUMO

Os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*, pertencentes à família Solanaceae, possuem 14 e 27 espécies, respectivamente, sendo muitas delas endêmicas e raras. A espécie *Petunia mantiqueirensis* é endêmica de regiões elevadas (altitudes superiores a 1300 m) da Serra da Mantiqueira em Minas Gerais, apresentando a distribuição mais setentrional e separada das outras espécies do gênero; apresenta distribuição restrita, com pequenas populações isoladas, sendo classificada como espécie ameaçada de extinção. A espécie *Calibrachoa elegans* é endêmica de altitudes acima de 1000 m no estado de Minas Gerais e apresenta a distribuição mais setentrional do gênero na América do Sul; possui poucas populações conhecidas e seu habitat é bastante impactado pela mineração, o que a torna também ameaçada de extinção. Acessar a informação genética de espécies raras e ameaçadas de extinção, especialmente as que possuem um número reduzido de indivíduos ou poucas populações, é fundamental para o estabelecimento de estratégias de conservação. Para isso, os marcadores moleculares são adequados pois permitem acessar diretamente a variabilidade genética, analisar os sistemas de cruzamento e estimar o fluxo gênico das espécies. Neste trabalho foram utilizados marcadores nucleares (SSR) e plastidiais (cpDNA) para acessar a diversidade genética de *P. mantiqueirensis* e *C. elegans* e compará-las com espécies relacionadas, tanto de distribuição ampla como restrita. Com a finalidade de contribuir para o estabelecimento de estratégias que possam auxiliar na preservação destas espécies. A variabilidade genética encontrada através dos marcadores plastidiais foi extremamente baixa nestas espécies sendo que elas apresentaram a menor diversidade dentro de seus respectivos gêneros. A diversidade obtida com os marcadores nucleares também foi baixa com diversas combinações de *loci* e populações apresentando excesso ou déficit de heterozigotos. Não há indícios de endocruzamento em *P. mantiqueirensis*, porém em *C. elegans* foram encontrados altos níveis de endogamia. As duas espécies são descritas como autoincompatíveis e dependentes da ação de polinizadores para promover a polinização e manter o fluxo gênico e sua diversidade genética. Além disso, estão sofrendo com a perda do habitat e as mudanças em seus respectivos ambientes podem leva-las à extinção.

ABSTRACT

The genera *Petunia* and *Calibrachoa* belonging to the Solanaceae family and encompass 14 and 27 species, respectively, and many of these species are endemic and rare. The species *Petunia mantiqueirensis* is endemic from elevated regions (altitudes higher than 1300 m) in Serra da Mantiqueira, Minas Gerais. This species presents the most northern distribution and is separated from the other species of *Petunia*; it presents a narrow distribution, with small and isolated populations, being classified as endangered species. The species *Calibrachoa elegans* is endemic from altitudes above 1000 m in Minas Gerais and presents the northernmost distribution of the *Calibrachoa* genus in South America; it has few known populations and its habitat is greatly impacted by mining, which also makes it threatened. Accessing the genetic information for rare and endangered species, especially those with a reduced number of individuals or populations, is essential for the establishment of conservation strategies. The molecular markers are suitable for this purpose as they allow direct access to genetic variability, to analyze the crossing systems, and to estimate the gene flow. In this work, nuclear (SSR) and plastid (cpDNA) markers were used to access the genetic diversity of *P. mantiqueirensis* and *C. elegans* comparing them to related species, both with wide and restricted distribution. In order to contribute to the establishment of strategies that may assist in the preservation of these species. The genetic variability found through the plastid markers was extremely low in these species and they presented the lowest diversity within their respective genera. The diversity obtained with nuclear markers was also low with various combinations of loci and populations exhibiting heterozygous excess or deficit. There is no evidence of inbreeding in *P. mantiqueirensis*, but in *C. elegans* high levels of endogamy have been found. Both species are described as self-incompatible and dependent on the action of pollinators to promote pollination and maintain gene flow and genetic diversity. In addition, they are suffering from habitat loss and changes in their respective environments may lead them to extinction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. <i>Petunia</i> Juss.	7
1.2. <i>Petunia mantiqueirensis</i> T.Ando & Hashim.....	8
1.3. <i>Calibrachoa</i> Cerv.	9
1.4. <i>Calibrachoa elegans</i> (Miers) Stehmann & Semir	9
1.5. Espécies raras e espécies amplamente distribuídas	11
1.6. Uso de marcadores genéticos para a conservação	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. CAPÍTULO I – ARTIGO.....	16
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Petunia* Juss.

O gênero *Petunia*, pertencente à família Solanaceae, foi estabelecido no início do século XVII, em 1803, por Jussieu, que descreveu duas espécies, *Petunia nyctaginiflora* e *Petunia parviflora*, conhecidas atualmente como *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb e *Calibrachoa parviflora* (Jussieu) D'Arcy, respectivamente. Fries (1911) reconheceu 27 espécies divididas em dois subgêneros, *Pseudonicotiana*, agrupando as espécies de flores brancas *P. axillaris* e *P. pygmaea* R.E.Fr., e o subgênero *Eupetunia*, com 25 espécies de flores violáceas.

Mais tarde, Wijsman & Jong (1985), interessados no melhoramento e na elucidação da origem da petúnia-de-jardim (*P. hybrida*), realizaram experimentos desenvolvendo cruzamentos entre algumas espécies do gênero. Como resultado, eles encontraram dois grupos de espécies geneticamente distintos, que apresentavam diferentes números cromossômicos. Após isso, publicaram um estudo com a morfologia das espécies e o número cromossômico, dividindo o gênero *Petunia* em dois novos gêneros. Baseado no número cromossômico, a denominação *Petunia* permaneceu para as espécies com $2n = 14$ e as espécies $2n = 18$ passaram a ser conhecidas como *Calibrachoa* La Llave & Lex. (Wijsman, 1990). A classificação mais atual do gênero, baseada também em dados moleculares, atribui a *Petunia* 14 espécies que são exclusivas das áreas subtropicais e temperadas da América do Sul (Stehmann *et al.*, 2009).

Análises filogenéticas baseadas em resultados de marcadores moleculares plastidiais dividiram o gênero *Petunia* em dois clados, um deles de terras altas, com espécies localizadas 500 m acima do nível do mar, e um clado de terras baixas, que compreende espécies localizadas na região dos Pampas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010). Quando são utilizados marcadores plastidiais e nucleares em combinação, ou somente nucleares, o gênero é dividido em espécies de tubo curto e espécies de tubo longo (Reck-Kortmann *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2016). As espécies do gênero são conhecidas no mundo todo pelo importante valor comercial das petúnias-de-jardim, um híbrido artificial interespecífico, cultivado desde o século XIX (Stout 1952).

No gênero *Petunia* existem diferentes síndromes florais, sendo a melitofilia, polinização realizada por abelhas, a mais comum. A maioria das espécies melitófilas são autoincompatíveis e dependem da polinização realizada por abelhas especializadas para a sua reprodução (Ando *et al.*; 2001; Gerats & Strommer 2008)

1.2. *Petunia mantiqueirensis* T.Ando & Hashim

Petunia mantiqueirensis (Figura 1) é uma espécie herbácea anual que apresenta hábito decumbente. A morfologia floral é caracterizada pelo tubo da corola curto e estreito, com coloração magenta. Os ramos desta espécie podem medir entre 0,5 e 2 m de altura e atingir até quatro metros de comprimento (Ando & Hashimoto, 1994). É uma espécie autoincompatível e polinizada por abelhas (Stehmann *et al.*, 2009; Araujo, 2016).



Figura 1: Morfologia floral de *Petunia mantiqueirensis*.

Petunia mantiqueirensis é endêmica de regiões elevadas da Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais, podendo ser encontrada em altitudes superiores a 1300 m, apresentando a distribuição mais setentrional do gênero, estando isolada das outras espécies (Figura 2). Está localizada em áreas degradadas, onde grande parte da cobertura vegetal original foi removida, já que os locais de ocorrência vêm sendo modificados devido a atividades agrícolas e, atualmente, ocupa uma área de 92 km² (Kamino *et al.*, 2012). Segundo classificação de raridade, proposta por Rabinowitz (1981), a espécie é rara, apresenta distribuição restrita e populações pequenas, sendo classificada como espécie ameaçada de extinção na categoria em perigo (CNCFlora, <http://cncflora.jbrj.gov.br>).

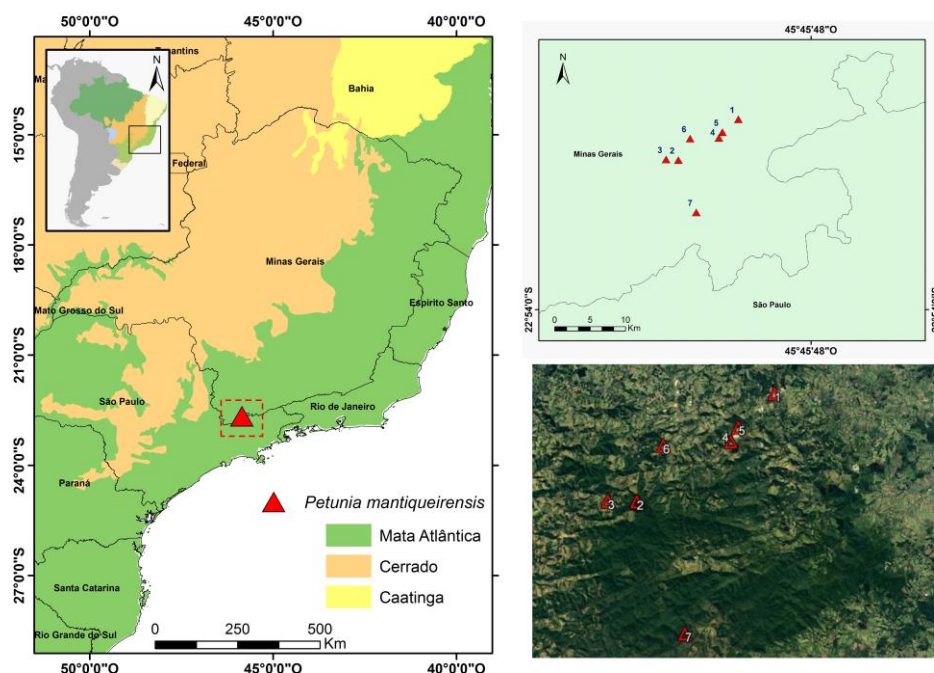


Figura 2: Mapa do local de ocorrência das sete populações de *Petunia mantiqueirensis*.

1.3. *Calibrachoa Cerv.*

O gênero *Calibrachoa*, pertencente à família Solanaceae, possui 27 espécies que ocorrem em sua maioria na região subtropical da América do Sul, desde o estado de Minas Gerais até o Uruguai, com o maior número de espécies ocorrendo nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Stehmann 1999). Uma única espécie (*Calibrachoa parviflora*) ocorre tanto na América do Sul como na América do Norte, (Fries 1911), mas se atribui a esta distribuição a introdução acidental a partir de portos da América do Norte (Fregonezi *et al.*, 2012). Muitas espécies do gênero estavam incluídas em *Petunia* até 1985 quando os gêneros foram separados. Poucos estudos foram realizados sobre a polinização das espécies, mas as melitófilas possuem sistemas de autoincompatibilidade, o que significa que dependem de polinizador para sua reprodução (Tsukamoto *et al.*, 2002).

1.4. *Calibrachoa elegans* (Miers) Stehmann & Semir

Calibrachoa elegans (Figura 3) é uma espécie herbácea anual com flores magenta e, em geral, não ultrapassa os 50 cm de altura. É endêmica de regiões de altitude

acima de 1000 m em Minas Gerais. São conhecidas três populações na região da canga do quadrilátero ferrífero e uma população disjunta (localizada em 2006 pelo Prof. João Renato Stehmann no município de Santana do Garambéu), que fica a aproximadamente 160 km ao sul da área ocupada pelas outras populações (Stehmann & Semir 2001; Fregonezi, 2009).



Figura 3: Morfologia floral de *Calibrachoa elegans*. Fotos cedidas por Jéferson N. Fregonezi.

Apesar da grande disjunção entre os pontos de coleta, todas as populações conhecidas crescem sobre o mesmo tipo de solo. Esta é a espécie com a distribuição mais setentrional do gênero na América do Sul, ocorrendo em uma região montanhosa, com relevo fortemente ondulado, com vegetação campestre denominada campo ferruginoso sobre canga nodular (Figura 4) (Rizzini 1979). Nos locais de ocorrência, a mineração da hematita é aberta e a cobertura vegetal, e também o solo, são totalmente removidos, o que impacta diretamente as populações desta e de outras plantas. A espécie é adaptada ao clima da região, com regime de chuvas rigoroso e quatro meses de estação seca. É autoincompatível e polinizada por abelhas (Stehmann & Semir 2001). É uma espécie ameaçada de extinção, classificada como em perigo (CNCFlora). Apresenta distribuição restrita e vem sofrendo com a destruição do seu habitat, ameaçado por diversos impactos antrópicos, como a mineração, urbanização e a especulação imobiliária. Conta com somente algumas pequenas populações isoladas e conforme classificação proposta por Rabinowitz (1981), a espécie é considerada rara.

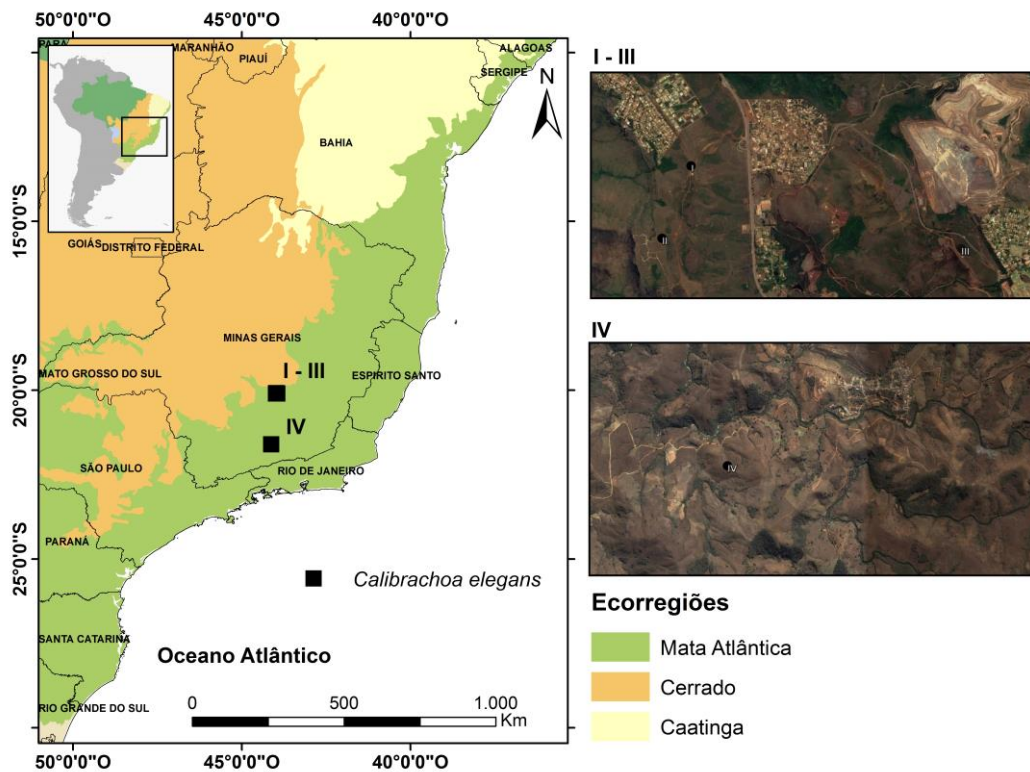


Figura 4: Mapa do local de ocorrência das quatro populações de *Calibrachoa elegans*.

1.5. Espécies raras e espécies amplamente distribuídas

Por muito tempo, as espécies raras foram consideradas como tendo níveis de diversidade mais baixos que as espécies abundantes e se acreditava que sua diversidade genética seria mais afetada pela fragmentação do habitat (Young & Clarke, 2000). Entretanto, nem toda a espécie rara tem baixos níveis de variabilidade genética, uma vez que histórias de vida, como sistema de cruzamento e mecanismos de dispersão de pólen e sementes, podem manter altos os níveis de diversidade, apesar da fragmentação do habitat (Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick & Godt, 1996; Turchetto *et al.*, 2016). Além disso, há indícios de que espécies que sempre foram raras não sofrem tanto com as consequências genéticas do isolamento e do pequeno tamanho populacional quanto as espécies que se tornaram raras recentemente (Lutz *et al.*, 2000).

Espécies amplamente distribuídas tendem a apresentar uma maior variabilidade genética que espécies relacionadas, mas com distribuição restrita (Maki *et al.*, 1999). Esta ideia é bastante difundida, embora nem sempre verdadeira, pois há vários casos de espécies com ampla distribuição geográfica e baixos níveis de variabilidade quando

comparadas com espécies raras relacionadas (Vogelmann & Gastony, 1987; Ranker, 1994; Young & Brown, 1996), bem como espécies raras com altos níveis de diversidade [*Adenophorus periens* (Ranker, 1994); *Daviesia suaveolens* (Young & Brown, 1996); *Petunia secreta* (Turchetto *et al.*, 2016)]. Na revisão feita por Gitzendanner & Soltis (2000), espécies com distribuição ampla foram comparadas com outras relacionadas evolutivamente, mas com distribuição restrita, quanto à diversidade genética. A comparação de espécies relacionadas é importante nestes casos porque evita a interferência de outros fatores que afetam a diversidade. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre as espécies de distribuição ampla e restrita, em relação à variação genética populacional.

1.6. Uso de marcadores genéticos para a conservação

Acessar a informação genética de espécies raras e ameaçadas de extinção, especialmente as que possuem um número reduzido de indivíduos ou poucas populações, é extremamente importante para que possamos traçar estratégias de conservação (Gitzendanner *et al.*, 2012). Marcadores moleculares possuem muitas aplicações importantes quando pensamos em conservação de espécies. Através deles podemos acessar a variabilidade genética, analisar os sistemas de cruzamento e estimar o fluxo gênico das espécies (Kalia *et al.*, 2011).

Os marcadores microssatélites (SSR), como os utilizados neste trabalho, são definidos como repetições simples de DNA compostas por pequenos motivos que podem variar de 1 a 6 nucleotídeos repetidos de quatro a cerca de 60 vezes. Também variam em abundância em diferentes genomas de eucariotos e procariotos, incluindo organelas (Chambers & MacAvoy, 2000). Além disso, a transferibilidade de marcadores entre espécies ou gêneros também é possível (Kalia *et al.*, 2011), sendo uma ótima alternativa para a realização de estudos, tendo em vista a redução de custo da pesquisa, não havendo a necessidade de desenvolvimento de novos iniciadores para as reações de amplificação destas regiões (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os SSR se tornaram muito importantes para estudos genéticos em plantas, isso porque são altamente polimórficos, tem natureza multialélica, são relativamente abundantes, estão presentes em grande parte do genoma, possuem herança codominante,

localização cromossômica específica e apresentam facilidade de uso (Parida *et al.*, 2009). Esses marcadores são eficientes para avaliar a variabilidade genética em populações naturais, auxiliando nos estudos e na conservação da biodiversidade, o que é possível através da estimativa dos níveis de heterozigosidade, que pode ser relacionada com parâmetros importantes para a sobrevivência das espécies. A análise da estrutura das populações, o efeito da reprodução na espécie, a verificação do fluxo gênico e a quantificação dos efeitos da fragmentação do habitat em espécies com populações reduzidas, todos esses parâmetros contribuem para a criação de estratégias de conservação de espécies ameaçadas (Ellstrand & Elam, 1993; Collevatti *et al.*, 2001).

Sequências de DNA plastidial (cpDNA) são muito utilizadas em estudos que analisam padrões evolutivos em plantas devido ao grande número de cópias desta molécula presentes no citoplasma de células vegetais. Além disso, apresentam variabilidade genética adequada para diferentes enfoques de estudo, além de apresentar poucos rearranjos, ao contrário do DNA mitocondrial de plantas. São regiões conservadas evolutivamente e tem um tamanho relativamente pequeno, com aproximadamente 150.000 pb (Wolfe *et al.*, 1987). O sequenciamento dessas regiões tem um amplo potencial de variação para estudos populacionais e evolutivos, fornecendo uma visão histórica mais conservadora do que os marcadores nucleares (Dobes *et al.*, 2004). O cpDNA apresenta taxas evolutivas diferenciadas pela presença de genes que codificam proteínas com diferentes graus de conservação, além de regiões intergênicas e íntrons, que são muito utilizados em estudos filogeográficos (Gaut *et al.*, 1993).

Regiões não codificadoras apresentam alta frequência de mutações, pois acumulam mudanças sem pressão seletiva e, por esse motivo, o nível de variação nas sequências do cpDNA não as torna limitadas para serem utilizadas entre indivíduos de uma mesma espécie (Taberlet *et al.*, 1991). O espaçador entre os genes *trnH* e *psbA* apresenta variações ricas em eventos de inserção/deleção e em sequências repetidas de AT variáveis em comprimento (Aldrich *et al.*, 1988) e, segundo Shaw *et al.* (2007), esta é uma das regiões não-codificadoras mais variáveis do cloroplasto. O espaçador entre os genes *trnS* e *trnG* também é bastante variável, sendo muito útil para estudos populacionais (Hamilton 1999). Alguns estudos utilizaram esses dois espaçadores e encontraram altos níveis de variabilidade entre as espécies de *Petunia* e *Calibrachoa*

(Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; 2010; Fregonezi *et al.*, 2013; Mäder *et al.*, 2013; Reck-Kortmann *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2014; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015), confirmando a importância desses marcadores para estudos de diversidade nas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética das espécies *Petunia mantiqueirensis* e *Calibrachoa elegans* que apresentam distribuição geográfica restrita e comparar os padrões encontrados com espécies de distribuição ampla, associando-os a diferentes aspectos de história de vida.

2.2. Objetivos específicos

- a) estimar parâmetros de diversidade genética através de marcadores plastidiais;
- b) determinar a estrutura genética das populações baseada em marcadores biparentais;
- c) caracterizar os mecanismos de reprodução a partir de marcadores genéticos;
- d) comparar a diversidade genética estimada por marcadores uni e biparentais em uma mesma espécie, entre espécies de distribuição geográfica ampla, entre espécies de distribuição geográfica restrita e entre gêneros;
- e) contribuir para o entendimento dos processos de especiação e manutenção da diversidade genética nestes gêneros.

3. CAPÍTULO I – ARTIGO

Artigo em preparação para ser submetido à revista

Botanical Journal of the Linnean Society

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas espécies com diversificação recente são classificadas como raras. Algumas espécies dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* apresentam diversificação recente e um grande número de espécies raras e restritas a algum local geográfico específico e, às vezes, até a habitats específicos. Mas permanecem em aberto questões sobre o quanto essas espécies estão realmente ameaçadas em função da sua diversidade genética; se elas apresentam uma diversidade baixa ou comparável à de espécies de ampla distribuição; o quanto da diversidade genética apresentada por estas espécies está relacionado à sua história evolutiva; ou ainda, se a baixa diversidade genética apresentada pelas espécies de distribuição restrita as torna espécies ameaçadas de extinção.

Muitos estudos tem mostrado padrões contrastantes com relação a todas as questões envolvendo diversidade genética e amplitude de distribuição das espécies, particularmente em relação a espécies de plantas. Historicamente, espera-se que espécies raras tenham baixa diversidade, mas alguns trabalhos mostram outros padrões. Temos um exemplo de espécie rara com alta diversidade em um dos gêneros que estamos estudando, *P. secreta*, e provavelmente isso está associado a sua história evolutiva (Turchetto *et al.*, 2016) e à biologia reprodutiva desta espécie (D.M. Rodrigues, comunicação pessoal). Por outro lado, alguns estudos mostram que espécies raras podem apresentar baixa diversidade (Forrest *et al.*, 2017; Vander Stelt *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017), como é o caso das espécies estudadas nesse trabalho, *P. mantiqueirensis* e *C. elegans*.

No presente estudo, somente um haplótipo foi encontrado para *P. mantiqueirensis*, enquanto que para *C. elegans* foram encontrados dois haplótipos, sendo que um deles está restrito à população mais afastada, disjunta das demais, como pode ser visto na análise realizada no DNASP 5.10.01, onde os haplótipos foram identificados (Rozas *et al.*, 2003). Além disso, não há indícios de endocruzamento em *P. mantiqueirensis*, enquanto em *C. elegans* encontramos valores significativos de cruzamento entre indivíduos aparentados tendo em vista que a espécie é autoincompatível, não havendo a possibilidade de autofecundação, conforme resultados obtidos através do programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). A estruturação genética, obtida através do programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010), em *P. mantiqueirensis* foi mais fraca do que em *C. elegans*, concordando com os resultados obtidos com marcadores nucleares e plastidiais.

Uma espécie com distribuição restrita, rara e com baixa diversidade pode sofrer depressão por endogamia e também por algum evento futuro de mudança climática global (Abbott *et al.*, 2017; Legrand *et al.*, 2017; Schierenbeck, 2017), mas é necessário identificar o quanto isso pode afetar sua sobrevivência levando-a à extinção e o quanto esta diversidade permitiria que a espécie resistisse a uma eventual mudança climática global. Ambas as espécies deste estudo são adaptadas a um habitat bastante específico e qualquer mudança, seja climática ou antrópica, que altere esse ambiente pode levá-las à extinção. Elas são consideradas espécies ameaçadas, considerando-se que ocorrem em um ecossistema extremamente ameaçado, com poucas populações conhecidas e apresentam baixa diversidade genética. Por esses motivos, é necessário que ocorra sua preservação *in situ*, bem como de seu habitat, o qual vem sofrendo constante redução por impactos antrópicos.

Desta forma, é muito importante que se conheça a diversidade e a estrutura dessas populações, únicas para cada uma destas espécies, e, se necessário, sejam feitas intervenções *ex situ*, com a criação de banco de sementes para reintroduzi-las no ambiente natural. O conhecimento da constituição genética e da estrutura populacional destas espécies permitirá evitar o cruzamento entre plantas geneticamente relacionadas, evitando assim depressão por endogamia; ou introduzir plantas de linhagens genéticas diferentes que poderiam não estar perfeitamente adaptadas ao local de introdução.

A diversidade genética encontrada através dos marcadores plastidiais foi extremamente baixa nestas espécies e, inclusive, elas apresentaram a menor diversidade quando comparadas com espécies relacionadas. A diversidade dos marcadores nucleares, quando comparada a outras espécies dos respectivos gêneros foi a mais baixa, tanto quando comparamos com espécies amplamente distribuídas, como quando a comparação foi feita com espécies também raras. Ambas, *P. mantiqueirensis* e *C. elegans*, são espécies autoincompatíveis e necessitam da ação de polinizadores para promover a polinização e manter o fluxo gênico e sua diversidade genética. É importante que outros estudos sejam feitos com espécies raras dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* para, acessando a diversidade genética dessas espécies, podermos estabelecer um padrão geral para estes importantes grupos de espécies características dos campos sulinos e de altitude. Nas espécies alvo deste trabalho, estudos complementares sobre sistema reprodutivo, dinâmica de polinização e, principalmente, um monitoramento constante, são necessários para que programas de manejo e preservação possam ser estabelecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott RE, Doak DF and Peterson ML (2017) Portfolio effects, climate change, and the persistence of small populations: analyses on the rare plant *Saussurea weberi*. *Ecology* 98: 1939-1970
- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E and Christopherson L (1988) The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics* 14: 137-146.
- Ando T and Hashimoto G (1994) A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from the Serra da Mantiqueira. *Brittonia* 46: 340-343.
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watanabe H, Kokubun H, Tsukamoto T and Kitching IJ (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Annals of Botany* 88: 403-413.
- Araujo FF (2016) Biologia reprodutiva de *Petunia mantiqueirensis* (Solanaceae) e comportamento de coleta de pólen de abelhas polinizadoras. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e manejo da Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- Chambers GK and MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 126: 455-476.
- Collevatti RG, Grattapaglia D and Hay JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349-356.
- Dobes CH, Mitchell-Olds T and Koch MA (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.
- Ellstrand NC and Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Excoffier L and Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*

- Resources 10: 564–567.
- Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Embrapa.
- Forrest A, Escudero M, Heuertz M, Wilson Y, Cano E and Vargas P (2017) Testing the hypothesis of low genetic diversity and population structure in narrow endemic species: the endangered *Antirrhinum charidemi* (Plantaginaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 183: 260-270.
- Fregonezi JN (2009) *História Evolutiva do gênero Calibrachoa* La Llave & Lex.(Solanaceae). PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Fregonezi JN, Freitas LB, Bonatto SL, Semir J and Stehmann JR (2012) Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence. *Taxon* 61: 120-130.
- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL and Freitas LB (2013) Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 140-153.
- Fries RE (1911) Die arten der gattung *Petunia*. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 46: 1-72.
- Gaut BS, Muse SV and Clegg MT (1993) Relative rates of nucleotide substitution in the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 89-96.
- Gerats T and Strommer J (2008) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Springer Science & Business Media.
- Gitzendanner MA, Weekley CW, Germain-Aubrey CC, Soltis DE and Soltis PS (2012) Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. *Conservation Genetics* 13: 223-234.
- Gitzendanner MA and Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.
- Goudet J (1995) FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Hamilton MB (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 513-525.

- Hamrick JL and Godt MJW (1996) Effects of the history traits on genetic diversity in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 351: 1291-1298.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R and Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
- Kamino LHY, Siqueira MF, Sánchez-Tapia A and Stehmann JR (2012) Reassessment of the extinction risk of endemic species in the Neotropics: how can modelling tools help us. *Natureza & Conservação* 10: 191-198.
- Legrand D, Cote J, Fronhofer EA, Holt RD, Ronce O, Schtickzelle N and Clobert J (2017) Eco-evolutionary dynamics in fragmented landscapes. *Ecography* 40: 9-25.
- Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL and Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology* 19: 5240–5251.
- Loveless MD and Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of the Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Lutz E, Schneller J and Holderegger R (2000) Understanding population history for conservation purposes; population genetics of *Saxifraga aizoides* (Saxifragaceae) in the lowlands and lower mountains north of the Alps. *American Journal of Botany* 87: 583-590.
- Mäder G, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Bonatto SL and Freitas LB (2013) Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of *Petunia*. *BMC Evolutionary Biology* 13: 178.
- Maki M, Morita H, Oiki S and Takahashi H (1999) The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis* section *Flavae* (Liliaceae). *American Journal of Botany* 86: 287-292.
- Parida SK, Kalia SK, Kaul S, Dalal V, Hemaprabha G, Selvi A and Srivastava PS (2009) Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 327-338.
- Rabinowitz D (1981) Seven forms of rarity. In: Syngé H, ed. *The biological aspects of rare plant conservation*. Chichester: John Wiley 205-217.
- Ranker TA (1994) Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern

- Adenophorus periens* and implications for conservation management. *Biological Conservation* 70: 19–24.
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: new insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 81: 19-28.
- Rizzini CT (1979) *Tratado de fitogeografia do Brasil*. 2 ed. Hucitec/ Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schierenbeck KA (2017) Population-level genetic variation and climate change in a biodiversity hotspot. *Annals of Botany* 119: 215-228.
- Segatto ALA, Ramos-Fregonezi AM, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *American Journal of Botany* 101: 119-127.
- Segatto ALA, Thompson CE and Freitas LB (2016) Contribution of WUSCHEL-related homeobox (WOX) genes to identify the phylogenetic relationships among *Petunia* species. *Genetics and Molecular Biology*, 39: 658-664.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE and Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Stehmann JR (1999) *Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de Petunia Jussieu, das espécies brasileiras de Calibrachoa La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero Petuniopsis*. PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Stehmann JR and Semir J (2001) Reproductive biology of *Calibrachoa elegans* (Miers) Stehmann & Semir (Solanaceae). *Brazilian Journal of Botany* 24: 43-49.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB and Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats T, Strommer J, eds. *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. New York: Springer 1–28.
- Stout AB (1952) Reproduction on *Petunia*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 20: 1–202.

- Su Z, Richardson BA, Zhuo L and Jiang X (2017) Divergent population genetic structure of the endangered *Helianthemum* (Cistaceae) and its implication to conservation in northwestern China. *Frontiers in Plant Science* 7: 2010.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G and Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tsukamoto T, Ando T, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G, Sakazaki U, Suárez E, Marchesi E, Oyama K and Kao T (2002) Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). *Journal of Plant Research* 115: 0185-0193.
- Turchetto C, Fagundes NJ, Segatto AL, Kuhlemeier C, Solis Neffa VG, Speranza PR and Freitas LB (2014) Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology* 23: 374-389.
- Turchetto C, Segatto ALA, Mäder G, Rodrigues DM, Bonatto SL and Freitas LB (2016) High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: implications for conservation. *AoB Plants* 8, plw002.
- Vander Stelt E, Fant JB, Masi S and Larkin DJ (2017) Assessing habitat requirements and genetic status of a rare ephemeral wetland plant species, *Isoëtes butleri* Englem. *Aquatic Botany* 133: 267-279.
- Vogelmann JE and Gastony GJ (1987) Electrophoretic enzyme analysis of North American and eastern Asian populations of *Agastache* sect. *Agastache* (Labiatae). *American Journal of Botany* 74: 385–393.
- Wijsman HJW (1990) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae). *Acta Botanica Neerlandica* 39: 101-102.
- Wijsman HJW e Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. IV. Hybridization and nomenclatural consequences in the *Petunia* group. *Acta Botanica Neerlandica* 34: 337-349.
- Wolfe KH, Li WH, Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among

plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 9054 – 9058.

Young AB and Brown AHD (1996) Comparative population genetic structure of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*. *Conservation Biology* 10: 1220–1228.

Young AG and Clarke GM (2000) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge: Cambridge University Press.