

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Especiação de plantas no Sul do Brasil: os casos de *Passiflora* e *Petunia*

Aline Pedroso Lorenz Lemke

Orientador: Francisco Mauro Salzano
Co-Orientadora: Loreta Brandão de Freitas

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

Porto Alegre
Junho de 2006

Instituições e Fontes Financiadoras

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS
- Centro de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS
- Institutos do Milênio (CNPq)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS)
- Fundação Biodiversitas/ CEPF (Programa de Espécies Ameaçadas de Extinção)

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Prof. Francisco M. Salzano e Profa. Loreta B. de Freitas

Ao Prof. Armando C. Cervi

Ao Prof. João R. Stehmann

Ao Prof. Sandro L. Bonatto

À colega e agora Profa. Valéria C. Muschner

Aos primeiros colegas de laboratório: Ana Helena, Carlos André, Dânae, Jaqueline, Nelson, Nicole, Patrícia e Renata

Aos novos colegas de laboratório: Aline, Carol, Jéferson, Lúcia e Priscilla

Aos colegas e colaboradores dos artigos: Geraldo, Pakisa, Raquel e Tielli

A todos os companheiros de campo

A todos que pararam seus carros para que eu pudesse coletar

Aos colegas do Departamento de Genética

À Laci

Ao Clênio

À Cladinara

Ao Elmo e à Ellen

Aos professores do Departamento de Genética e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Às amigas desde o início da graduação: Andrise, Andréa, Cariane, Fabíola e Tatiane

À Ângela

À Josi

À família Pedroso Lorenz

À família Lemke

À família Lorenz Lemke, Ruben e Pedro.

Não sei expressar com palavras o quanto sou grata a todos vocês. Este trabalho resultou do esforço de todos nós. Obrigada a todos!

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
Capítulo I Introdução.....	9
I.1 Especiação em plantas.....	9
I.2 Genética e conservação ambiental.....	12
I.3 Marcadores moleculares.....	14
I.4 O contexto paleoclimático.....	17
I.5 O gênero <i>Passiflora</i>	20
I.6 Primeiro estudo de caso: <i>Passiflora actinia</i> e <i>Passiflora elegans</i>	24
I.7 O gênero <i>Petunia</i>	27
I.8 Segundo estudo de caso: Petúnias da Serra do Sudeste.....	28
I.9 Terceiro estudo de caso: Petúnias dos Planaltos Sul e Sudeste do Brasil.....	31
Capítulo II Objetivos.....	35
Capítulo III 1º Artigo: Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian <i>Passiflora actinia</i> and <i>P. elegans</i> (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation.....	36
Capítulo IV 2º Artigo: Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of <i>Petunia</i> (Solanaceae): a molecular and ecological analysis.....	45
Capítulo V 3º Artigo: Phylogeography of <i>Petunia</i> 's species from Brazilian south and southeast highlands.....	75
Capítulo VI Discussão.....	115
VI.1 A delimitação das espécies e o isolamento reprodutivo.....	115
VI.2 Os mecanismos de diversificação.....	116
VI.3 Implicações para programas de conservação.....	125
Referências Bibliográficas	130
Anexos	
Anexo 1 Material suplementar do capítulo IV.....	140
Anexo 2 Material suplementar do capítulo V.....	147

Resumo

A região sul do Brasil é caracterizada pela ocorrência de diversas áreas fitoecológicas. Esta heterogeneidade de habitats pode condicionar gradientes ambientais, favorecendo a diferenciação regional e até mesmo eventos de especiação. Para investigar possíveis processos evolutivos ocorridos em plantas dessa região, analisamos os padrões de variação genética molecular em três grupos de espécies relacionadas pertencentes aos gêneros *Passiflora* (Passifloraceae) e *Petunia* (Solanaceae).

Passiflora actinia e *Passiflora elegans* são espécies parapátricas que apresentam uma grande similaridade morfológica e genética. *P. actinia* é uma espécie típica da Mata Atlântica, enquanto *P. elegans* ocorre em matas de galeria no interior do Rio Grande do Sul (RS). Análises de marcadores nucleares e plastidiais revelaram um gradiente norte-sul nas relações intra e interespecíficas e contribuíram para a identificação de um híbrido interespecífico com morfologia intermediária encontrado na região de parapatría. É possível que a diferenciação genética entre os grupos geográficos de *P. actinia* e a recente divergência entre *P. actinia* e *P. elegans* tenham sido influenciadas pelos processos históricos ocorridos na região, como a migração da Mata Atlântica para o sul e o seu padrão de estabelecimento no RS.

A Serra do Sudeste (RS) é um dos centros de diversidade do gênero *Petunia*, caracterizado pela presença de espécies com diferentes síndromes florais. *P. exserta* (polinizada por beija-flores, flores vermelhas) tem sua ocorrência restrita a esta região, sendo encontrada no interior de reentrâncias rochosas em torres areníticas. *P. axillaris* (polinizada por mariposas, flores brancas) habita áreas abertas e possui ampla distribuição geográfica. Nas torres onde estas espécies ocorrem em simpatria, foram encontradas

plantas com morfologia floral intermediária, sugerindo hibridação entre elas. As análises de marcadores plastidiais corroboraram a hipótese de hibridação interespecífica e de divergência recente entre estas espécies e revelaram um baixo fluxo gênico entre as populações das torres.

Entre as 11 espécies de *Petunia*, seis são encontradas exclusivamente nos planaltos das regiões sul e sudeste do Brasil: *P. altiplana*, *P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii*, *P. saxicola* e *P. scheideana*. A distribuição de marcadores plastidiais concorda com a hipótese de divergência recente destas espécies. Este padrão talvez esteja relacionado com as mudanças climáticas ocorridas no Quaternário, já que o habitat destas espécies (campos de altitude) foi fortemente afetado por estas alterações. Durante os estágios glaciais havia expansão das áreas de campo e nos interglaciais avanço da floresta com araucária. É possível que o padrão fragmentado dos campos, isolados nas áreas de maior altitude do planalto e cercados por áreas de floresta com araucária, tenha contribuído para a diversificação do grupo.

Abstract

Brazilian southern region is characterized by the occurrence of several phytoecological areas. This habitat heterogeneity can condition environmental gradients, favor regional differentiation, and even speciation events. To investigate the possible evolutionary process which occurred in plants of this region, we analyzed the patterns of molecular genetic variation in three groups of related species classified in the *Passiflora* (Passifloraceae) and *Petunia* (Solanaceae) genera.

Passiflora actinia and *Passiflora elegans* are parapatric species which show high morphologic and genetic similarity. *P. actinia* is a species typical of the Atlantic Forest, while *P. elegans* occurs in gallery forests in the interior of Rio Grande do Sul (RS). Analyses of nuclear and plastid markers revealed a north-south gradient both in the intra e interspecific relationships, and contributed to the identification of an interspecific hybrid with intermediate morphology in the parapatric region. It is possible that the genetic differentiation among *P. actinia*'s geographic groups and the recent *P. actinia/P. elegans* divergence have been influenced by historical processes occurred in the region, like the Atlantic Forest southern migration and its pattern of establishment in RS.

The Serra do Sudeste region (Southeast Sierra in RS) is one of *Petunia*'s centers of diversity, characterized by the presence of species with different floral syndromes. *P. exserta* (pollinated by hummingbirds, red flowers) has its occurrence restricted to this region, and is found in the interior of shelters of sand towers. *P. axillaris* (pollinated by hawkmoths, white flowers) live in open areas and has a wide geographical distribution. In the towers in which these species are found in sympatry, plants with intermediate flower morphology were found, suggesting hybridization between them. Plastid markers analyses

confirmed the interspecific hybridization hypothesis and the recent divergence between these species, revealing a low gene flow between the populations of the towers.

Among the 11 species of *Petunia*, six were found exclusively in the Brazilian south and southeast highlands: *P. altiplana*, *P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii*, *P. saxicola* and *P. scheideana*. Plastid markers distribution agrees with the hypothesis of recent divergence of these species. This pattern is probably related to the climatic changes occurred in the Quaternary since the habitat of these species (*campos de altitude*) has been strongly affected by these modifications. During the glacial stages expansion of grasslands areas occurred, while in the interglacial periods *Araucaria* forest would advance. Possibly the fragmented pattern of the grasslands, isolated in the high altitude areas of the plateau and surrounded by *Araucaria* forest, has contributed to the group's diversification.

Capítulo I

Introdução

I.1 Especiação em plantas

Processos de especiação envolvem a separação de populações em unidades evolutivas independentes. Podem ser desencadeados por alterações geográficas, ecológicas, morfológicas ou comportamentais, sendo a seleção natural e a deriva genética os mecanismos evolutivos mais atuantes (Stearns & Hoekstra 2000). Para entender estes processos evolutivos, é preciso colocar as características genéticas num contexto espacial e temporal, congruente com as regiões geográficas particulares e os eventos geológicos nelas ocorridos (Hewitt 2001).

O modelo de especiação alopátrica propõe que as populações começam a se diferenciar quando barreiras ambientais, ou a própria distância, interrompe o fluxo gênico. Através da deriva genética e da seleção natural, pode haver divergência genética e a eventual evolução de barreiras reprodutivas intrínsecas que impeçam o fluxo gênico se as populações tornarem a ficar em contato (Stearns & Hoekstra 2000; Futuyma 2002).

Especiação parapátrica é o processo de formação de espécies na presença de algum nível de fluxo gênico entre populações que estão divergindo. Se ao longo de um gradiente ambiental a seleção favorece diferentes alelos em populações adjacentes ou parapátricas, estabelece-se uma clina de frequências alélicas. Com uma seleção suficientemente forte sobre *loci* que contribuam para adaptações locais ou para o isolamento reprodutivo, as populações podem se diferenciar em espécies (Gavrilets 2000). Estes processos geralmente estão associados a gradientes ambientais, ou seja, variações no habitat que favorecem diferentes combinações gênicas. Zonas híbridas podem ser o resultado de divergência

primária e se originar *in situ* pela diferenciação de populações parapátricas ou surgir através de contato secundário (Futuyma 2002). Se análises genéticas revelam genomas muito distintos nas zonas híbridas, há um forte indicativo que tenha havido contato secundário entre populações que divergiram em alopatria (Hewitt 2001).

Na especiação simpátrica, uma barreira biológica ao intercruzamento tem que se originar dentro dos limites de uma população panmítica, sem nenhuma segregação espacial das espécies incipientes (Futuyma 2002). Para isso, são propostos modelos graduais e instantâneos. Entre os modelos instantâneos podemos citar: hibridação seguida de poliploidia (alopoliploidia); modificação do sistema reprodutivo de autoincompatível para autocompatível; modificações cromossômicas estruturais, que levam à interesterilidade; e mutações em genes de grande efeito nas estruturas florais (Judd *et al.* 1999; Bradshaw & Schemske 2003).

Existem diversos mecanismos de isolamento reprodutivo em plantas, os quais podem ser classificados de acordo com a etapa reprodutiva em que atuam. Mecanismos pré-zigóticos impedem o cruzamento e a fecundação, podendo incluir: barreiras espaciais e temporais (floração em diferentes épocas do ano ou em diferentes períodos do dia), competição gamética, sistemas genéticos de incompatibilidade (no estigma ou no estilete, impedindo que pólen estranho fecunde o óvulo) e modificações na estrutura floral que alterem o comportamento dos polinizadores (Judd *et al.* 1999).

Se há a formação de híbridos, mecanismos pós-zigóticos podem inviabilizar o sucesso adaptativo destes. Um híbrido é inviável quando não atinge a maturidade reprodutiva ou se não há um nicho ecológico favorável para seu desenvolvimento (Rieseberg & Carney 1998). O isolamento floral dos híbridos ocorre quando estes são originados de espécies adaptadas a polinizadores muito diferentes. O híbrido pode ser

viável, mas estéril, especialmente se as espécies parentais diferirem em número de cromossomos ou tiverem divergido o suficiente para impedir seu pareamento. Falhas no pareamento dos cromossomos durante a meiose podem resultar em gametas não funcionais (Judd *et al.* 1999). Como o isolamento pós-zigótico tem um alto custo biológico, muitas vezes a seleção favorece a origem de mecanismos pré-zigóticos (reforço, “reinforcement”), o que é especialmente relevante em zonas híbridas (Stearns & Hoekstra 2000; Ramsey *et al.* 2003).

Quando os mecanismos de isolamento reprodutivo não são efetivos, pode ocorrer fluxo gênico entre diferentes *taxa*. Este é um fenômeno comum em plantas e ocorre em praticamente todas as famílias de Angiosperma (em aproximadamente 25% das espécies; Mallet 2005). Os híbridos são o resultado do cruzamento entre diferentes espécies, ou entre indivíduos de populações que são distinguíveis com base em um ou mais caracteres herdáveis. Similarmente, introgressão pode ser definida como o movimento de genes entre populações geneticamente distinguíveis (Rieseberg & Carney 1998). O aumento da diversidade genética intraespecífica, a origem e transferência de adaptações genéticas, a origem de novos ecótipos ou espécies e o reforço ou quebra das barreiras reprodutivas, são algumas das possíveis consequências evolutivas da hibridação (Rieseberg 1997).

Gerações híbridas recentes geralmente apresentam altos níveis de variabilidade morfológica, resultado da segregação e recombinação entre os genomas parentais (Chung *et al.* 2005). Embora haja muitas exceções, na maioria dos casos a F₁ híbrida apresenta características quantitativas (controladas por vários genes, cada um dando uma contribuição parcial para a expressão fenotípica) intermediárias entre os parentais. Já as características governadas por um ou poucos genes não se mostram intermediárias na F₁, e os híbridos podem apresentar estados de caráter novos, parentais ou, até mesmo, extremos

(Judd *et al.* 1999). Muito desta variabilidade pode ser perdido nas gerações híbridas posteriores como consequência de deriva genética e seleção (Martin & Cruzan 1999).

Híbridos adaptados a nichos muito específicos ou com valor adaptativo reduzido e a constante dispersão dos genótipos parentais são os principais fatores limitantes para a introgressão extensiva e contribuem para a manutenção de zonas restritas de hibridação. Mas se os genótipos híbridos possuem valor adaptativo igual ou superior ao das espécies parentais, as zonas híbridas podem se expandir levando ao deslocamento de uma ou mais espécies parentais (Martin & Cruzan 1999). Eventos de hibridação podem ser críticos para espécies endêmicas. Em casos de adaptação local, pode haver complexos gênicos co-adaptados, de forma que a introdução de novos genes pode levar a modificação ou perda dessas características (Levin *et al.* 1996; Rhymer & Simberloff 1996).

I.2 Genética e conservação ambiental

Diversos métodos de estimativa da biodiversidade têm sido propostos para a identificação de áreas prioritárias para a conservação. O desenvolvimento de marcadores moleculares possibilitou a avaliação do potencial evolutivo das espécies através do estudo da distribuição espacial da diversidade genética (filogeografia; Avise 2000). Diversos tipos de marcadores têm sido utilizados, sendo possível a obtenção de uma grande quantidade de dados a partir da coleta de pequenas amostras de material biológico, utilizando-se métodos não destrutivos (Petit *et al.* 2001).

Paisagens originais foram reduzidas a mosaicos de habitats remanescentes, cercados por áreas desfavoráveis. Neste processo, grandes populações foram reduzidas ou subdivididas, e possivelmente isoladas (Collevatti *et al.* 2001). Espécies que se tornaram raras recentemente são mais vulneráveis às consequências genéticas do isolamento e do

pequeno tamanho populacional. Nestes casos, o valor adaptativo pode ser reduzido através dos efeitos da deriva genética e do endocruzamento (Lutz *et al.* 2000).

A deriva genética pode alterar a distribuição da variabilidade através de grandes flutuações nas frequências alélicas. A perda de variação genética ao acaso pode levar ao declínio da variação intrapopulacional (perda de heterozigosidade e eventual fixação de alelos) e ao aumento da diferenciação entre as populações. Os efeitos da deriva são especialmente importantes em eventos do tipo gargalo-de-garrafa e efeito fundador (Ellstrand & Elam 1993).

O cruzamento entre indivíduos relacionados (endocruzamento) pode ocorrer através de autofecundação ou de cruzamento biparental. Este último pode acontecer se as populações são pequenas e a dispersão de sementes e pólen são espacialmente restritas. Nas populações autocruzantes ou endogâmicas antigas, a seleção natural remove os alelos recessivos deletérios paulatinamente à medida que se tornam homozigotos. Populações que passaram por reduções drásticas no seu tamanho perdem heterozigosidade rapidamente (Ellstrand & Elam 1993). O aumento repentino da homozigosidade pode levar à depressão endogâmica através da fixação de alelos deletérios, colocando em risco a persistência da espécie (Lutz *et al.* 2000).

A perda de variação genética pode diminuir o potencial da espécie em persistir frente a mudanças no ambiente biótico e abiótico, assim como altera a capacidade de uma população de responder a mudanças repentinas como o surgimento de patógenos e herbívoros (Ellstrand & Elam 1993).

O fluxo gênico pode impedir a perda da variação genética e a depressão endogâmica em populações pequenas. Mas nem sempre o fluxo gênico é benéfico. Se em diferentes locais a seleção favorece alelos distintos, então o fluxo de alelos inapropriados

pode impedir diferenciação local e reduzir o valor adaptativo através de depressão exogâmica (Petit *et al.* 2001). O fluxo gênico pode aumentar em três situações: com o aumento da porção de sementes resultantes da fertilização por pólen migrante; com o aumento da porção de sementes migrantes; ou quando uma espécie relacionada ou subespécie expande sua distribuição e se torna parapátrica ou simpátrica da outra (Ellstrand & Elam 1993).

Uma das estratégias de conservação é priorizar a preservação de grupos que incluam a maior história evolutiva, identificando as linhagens que retêm o máximo de variabilidade genética através de análises filogenéticas moleculares (Vázquez & Gittleman 1998). Acessando a estrutura genética populacional de espécies ameaçadas (ou com o habitat ameaçado) pode-se identificar “hotspots” de diversidade e quais populações estão mais ameaçadas (Matolweni *et al.* 2000). Muita atenção também tem sido dada às regiões ricas em endemismos devido à grande vulnerabilidade destas espécies que, além de apresentar uma distribuição geográfica restrita, muitas vezes requerem nichos ecológicos especiais (Primack & Rodrigues 2001).

I.3 Marcadores moleculares

A maioria dos estudos de filogeografia e especiação utilizam atualmente marcadores moleculares que representam polimorfismos seletiva e adaptativamente neutros (Wu 2001; Durbin *et al.* 2003). O seqüenciamento de DNA é uma das técnicas com maior aplicabilidade, pois diferentes partes do genoma apresentam taxas de evolução distintas, sendo possível avaliar vários níveis taxonômicos em diversas escalas geográficas (Avice 2000).

Entre os marcadores mais utilizados em estudos populacionais de plantas, podemos destacar as regiões não codificadoras do DNA plastidial (cpDNA; Dobes *et al.* 2004; Alsos *et al.* 2005; Takayama *et al.* 2005), especialmente as regiões intergênicas, que toleram mutações e evoluem rapidamente sem afetar as funções dos genes adjacentes (Hamilton *et al.* 2003). A freqüente herança uniparental é uma das vantagens destes marcadores para a avaliação diferencial do fluxo de pólen e sementes (Hamilton & Miller 2002); além disso, a análise do cpDNA possibilita a identificação de eventos de hibridação não detectáveis morfologicamente (Bleeker 2003). Se após cruzamentos interespecíficos a progênie híbrida retrocruzar preferencialmente com um dos parentais, a morfologia das gerações seguintes pode perder os caracteres intermediários e se tornar semelhante a este, mas o cpDNA da outra espécie pode permanecer, um fenômeno conhecido como “chloroplast capture” (Schaal *et al.* 1998).

Como o genoma plastidial é haplóide, o tamanho efetivo populacional é menor que quando considerado o genoma nuclear. Esta característica acelera os processos de deriva genética, conseqüentemente o cpDNA pode apresentar diferenciação entre populações ou linhagens divergentes mais rapidamente. Portanto, quando a divergência entre populações é relativamente recente e o fluxo gênico é limitado, polimorfismos neutros de cpDNA têm mais poder de detectar a diferenciação se comparado a polimorfismos neutros do DNA nuclear (ncDNA; Hamilton *et al.* 2003).

Entre os marcadores nucleares, o DNA ribossomal (nrDNA) é amplamente estudado em plantas. O nrDNA de plantas superiores está arranjado em uma ou mais regiões cromossômicas, sendo que cada arranjo pode apresentar de centenas a milhares de cópias ou parálogos (Buckler IV *et al.* 1997). Mutações nestas repetições em *tandem* são individualmente homogeneizadas através de evolução em concerto, na qual a permuta

desigual e a conversão gênica são os principais mecanismos envolvidos (Arnheim 1983). O modo e o tempo da evolução em concerto do nrDNA varia muito entre diferentes grupos de plantas. Sendo assim, os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS) podem apresentar variação interespecífica, interpopulacional e até intraindividual (Baldwin *et al.* 1995; Mayer & Soltis 1999). Pode haver a formação de pseudogenes na região ITS, o que pode ser identificado através de altos níveis polimórficos, porcentagem de CG (citosina/guanina) abaixo da esperada, estrutura secundária não funcional (envolvida com o processamento do rRNA) e presença de substituições em regiões conservadas do gene 5,8S (Manen 2004).

Geralmente a diversidade intraindividual do nrDNA é baixa, mas algumas espécies podem apresentar heterogeneidade nesta região (Buckler IV *et al.* 1997; Denduangboripant & Cronk 2000). Variação intraindividual pode ser detectada quando o processo de homogeneização de diferentes cópias não é suficientemente rápido devido à hibridação recente, altas taxas de mutação, grande número de *loci*, presença em cromossomos não homólogos ou ausência de recombinação sexual (Campbell *et al.* 1997; Zhang & Sang 1999). Após a hibridação intraespecífica (entre diferentes linhagens) ou interespecífica, as diferentes cópias de ITS (ribotipos) podem evoluir de diferentes maneiras: perda de uma das cópias parentais com a fixação da outra (evolução em concerto unidirecional), formação de um novo tipo através da recombinação dos tipos parentais, ou a manutenção de ambos em híbridos recentes (Koch *et al.* 2003). Neste último caso, o seqüenciamento direto pode revelar um padrão aditivo (sinal de dois nucleotídeos diferentes; Fuertes-Aguilar & Feliner 2003)

I.4 O contexto paleoclimático

Para entender os processos evolutivos, é preciso colocar as características genéticas num contexto espacial e temporal, congruente com as regiões geográficas particulares e os eventos geológicos nelas ocorridos (Hewitt 2001). Estudos filogeográficos têm reconstruído a história evolutiva de diversas espécies de plantas, mas a maior parte dos grupos taxonômicos examinados sob esta perspectiva histórica ocorre no Hemisfério Norte (Comes & Kadereit 1998; Hwang *et al.* 2003) e pouco se sabe o quanto as alterações climáticas afetaram os processos evolutivos na região subtropical da América do Sul.

Durante os últimos dois milhões de anos o planeta conviveu com uma alternância cíclica de períodos frios e quentes, os estágios glaciais e interglaciais. Estas variações são decorrentes de mudanças na taxa de insolação das altas latitudes, controladas por ciclos astronômicos (Ciclos de Milankovitch). Durante estes períodos havia a fusão (estágios interglaciais) ou crescimento (estágios glaciais) das regiões polares e, conseqüentemente, subida (transgressão) ou descida (regressão) do nível do mar (Villwock & Tomazelli 1995).

As mudanças paleoambientais ocorridas no Quaternário, com ênfase nos últimos 20.000 anos, tiveram uma grande importância na estruturação atual das distribuições geográficas de espécies animais e vegetais brasileiras (Villwock & Tomazelli 1995). Dados de abundância estratigráfica de pólen e sua datação por radiocarbono têm ajudado a monitorar as mudanças nos limites de distribuição e abundância das espécies de plantas através dos estágios glaciais e interglaciais. Mas há muitas dificuldades, como o tempo em que se podem considerar os registros e quais as espécies estarão representadas. Os registros que podem ser considerados são posteriores ao Pleistoceno Tardio (a partir de 123.000 anos antes do presente, A.P.) e a maioria deles é de plantas de ambientes úmidos e de

espécies polinizadas pelo vento (que produzem uma quantidade muito maior de pólen); espécies que se autofecundam e as polinizadas por animais não podem ser consideradas nessas análises (Comes & Kadereit 1998).

Além destes tipos de dados, a história das angiospermas no Quaternário também pode ser acessada através de marcadores moleculares. Estes estudos podem conectar estágios glaciais e interglaciais a distâncias genéticas entre linhagens de plantas, ao estabelecimento de novas espécies via isolamento geográfico de populações, e a eventos de hibridação e poliploidização (Comes & Kadereit 1998; Hewitt 2000). Estudos com plantas têm demonstrado que, em muitos casos, mudanças macroevolutivas (especiação ou diversificação) ocorreram em resposta às alterações climáticas do Quaternário (Zhang *et al.* 2001, Alsos *et al.* 2005).

Florestas com araucária (*Araucaria angustifolia* Bertoloni Otto Kuntze) são encontradas nas áreas montanhosas do sul do Brasil, entre as latitudes 24° e 30°S (1000-1400m de altitude), e na região sudeste em pequenas áreas isoladas, entre 18° e 24°S (1400-1800m). Áreas naturais de campos são encontradas nas terras altas do sul do Brasil, especialmente nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC). Nestas regiões, os campos de altitude frequentemente ocorrem como mosaicos com floresta com araucária (Behling 2002).

Durante o último estágio glacial pleistocênico (entre 23.000-11.000 anos A.P.), o planalto sul-brasileiro era predominantemente ocupado por campos onde hoje é dominado por floresta com araucária. Estudos indicam que o clima da região era mais seco e pelo menos 5°C a 7°C mais frio, sendo as frentes frias antárticas mais frequentes e mais intensas. Estas condições proporcionaram que os campos se estendessem por cerca de 750 km em direção ao norte, atingindo latitudes desde 28° até 20°S (Behling 2002). Nesta

época pequenas populações de *Araucaria* ficavam restritas a refúgios em áreas mais úmidas e protegidas, como vales, matas de galeria e encostas (Behling *et al.* 2001).

Assim como a floresta com araucária no planalto, as matas tropicais costeiras (Mata Atlântica) estavam restritas a refúgios ecológicos. Os deslocamentos florestais deveriam ocorrer principalmente através das matas de galeria junto aos rios (Lorscheitter 1997). Estima-se que durante o último máximo glacial (18.000 anos A.P.), a Mata Atlântica da região sul era significativamente reduzida, sendo substituída por campos ou tendo sua composição alterada para espécies mais adaptadas ao frio. Algumas espécies de árvores tipicamente tropicais estiveram totalmente ausentes na região durante este período (Behling & Negrelle 2001).

Com o início do Holoceno (entre 11.000-10.000 anos A.P.) houve uma significativa melhoria climática, com aumento da temperatura e da umidade. Estas condições permitiram a expansão das florestas com araucária sobre o campo, especialmente após 3.000 anos A.P., quando os períodos de seca se tornaram praticamente ausentes (Behling 2002). As melhorias climáticas ocorridas no início do Holoceno também proporcionaram a migração de elementos tropicais do norte para a Mata Atlântica da região sul (Roth & Lorscheitter 1993; Neves & Lorscheitter 1995). No RS esta migração ocorreu através de uma estreita faixa de terra (cerca de 50 km) localizada entre os contrafortes da Serra Geral e o oceano, chamada de “Porta de Torres”. As populações migraram de forma esparsa, ocupando a Planície Costeira, a encosta e borda oriental da Serra Geral, chegando até as regiões mais interiorizadas do RS (Lorscheitter 1997). Além da temperatura e da umidade, a Mata Atlântica tinha sua estrutura muito transformada pelas variações glacioestáticas do nível do mar, sendo as transgressões marinhas a razão primária para que o desenvolvimento da Mata Atlântica fosse fragmentado (Behling & Negrelle 2001).

Durante o Holoceno ainda houve pequenas transgressões marinhas que não permitiam a ocupação das regiões mais próximas à costa (Behling & Negrelle 2001).

Por volta de 6.700 anos A.P. há evidências de transgressão marinha invadindo os atuais limites da Planície Costeira do RS (Lorscheitter 1997). Esta última transgressão causou danos significativos na vegetação litorânea, destruindo as florestas mais próximas do mar. Nas regiões mais interiorizadas esta fase foi favorável. Após o máximo transgressivo, houve uma lenta dessalinização dos terrenos com o recuo do mar, o que gradativamente possibilitou a expansão da mata tropical costeira a partir de 4.000 anos A.P. Portanto, as matas costeiras atuais se desenvolveram após 4.000 anos A.P.; dentre estas, as situadas mais próximas do mar são ainda mais jovens, pois foram as últimas a serem formadas após o processo regressivo. Já as matas atuais mais interiorizadas não mostram indícios da transgressão marinha holocênica em seus sedimentos. Sem a influência negativa da invasão marinha e beneficiadas pelo clima, datações radiométricas mostram que o desenvolvimento florestal ocorreu mais cedo, com início de expansão por volta de 6.000 anos A.P., nas matas próximas aos contrafortes da Serra Geral e da Depressão Central (Lorscheitter 2001; Werneck & Lorscheitter 2001).

Todas estas modificações paleoclimáticas afetaram a estrutura populacional das espécies ocorrentes nestas formações vegetais. Alterações nas taxas de migração, a fragmentação e o isolamento de populações foram possibilitados e transformaram o fluxo gênico entre elas, o que pode ter levado à diferenciação.

I.5 O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) possui cerca de 520 espécies distribuídas em regiões tropicais do Novo Mundo (raramente na Ásia e Austrália). É caracterizado pela

presença de coroa de filamentos, cinco estames e por apresentar as estruturas reprodutivas elevadas em um androginóforo (Ulmer & MacDougal 2004). As plantas são lianas herbáceas ou lenhosas com gavinhas axilares (inflorescências modificadas) e, ocasionalmente, podem ser arbustos ou até árvores (nestes casos as gavinhas estão ausentes; Judd *et al.* 1999). A descoberta do gênero ocorreu durante a expansão européia no Novo Mundo e a denominação *Passiflora* (flor da paixão) foi atribuída por Cieza de León em 1553, numa alusão à crucificação de Cristo. O nome do gênero foi adotado por Carl von Linné, em 1753, no *Species Plantarum* (Ulmer & MacDougal 2004).

Uma das principais características do gênero é a grande variabilidade foliar, possivelmente a maior entre as angiospermas (MacDougal 1994). As folhas apresentam uma grande diversidade de formas, podendo ser inteiras ou ter entre dois a nove lobos, com tamanhos que variam entre 0,5 e 95 cm. É possível que esta diversidade esteja relacionada a um processo de co-evolução com borboletas do gênero *Heliconius*. As fêmeas de *Heliconius* reconhecem visualmente as folhas de *Passiflora* para ovipositar e as larvas só se alimentam de folhas de plantas deste gênero. Uma estratégia de defesa das passifloras é imitar a folhas de outras plantas que não são predadas por *Heliconius*, uma forma de camuflagem. Em florestas tropicais há casos onde as folhas jovens de *Passiflora* imitam folhas de espécies que ocorrem junto ao solo, enquanto as folhas mais velhas imitam as folhas de plantas do dossel (Ulmer & MacDougal 2004).

Outra estratégia de defesa é a estocagem de metabólitos tóxicos (glicosídeos cianogênicos) nas folhas de *Passiflora*. A presença destes compostos evita a predação por insetos, menos pelas larvas de *Heliconius*. Estes insetos desenvolveram enzimas capazes de degradá-los e são capazes de metabolizar estes compostos de forma a construir moléculas de glicosídeos cianogênicos para sua própria defesa (quimicamente diferentes

daqueles produzidos pela planta hospedeira). Cores aposemáticas e o acúmulo destes compostos tóxicos servem como proteção das larvas de *Heliconius* contra a predação por aves (Ulmer & MacDougal 2004).

Os nectários extraflorais presentes nos pecíolos, folhas ou estípulas de *Passiflora* constituem outro mecanismo de defesa. Estas estruturas servem para atrair formigas e vespas que predam ovos e larvas de borboletas. Além disso, os nectários presentes nas folhas imitam ovos, simulando que uma borboleta já ovipositou naquela planta. Borboletas evitam ovipositar em folhas que já tenham ovos para evitar o excesso de larvas e o possível canibalismo existente nestas espécies (Ulmer & MacDougal 2004).

A grande diversidade floral do gênero *Passiflora* está relacionada com as diferentes formas de polinização encontradas no grupo. A corona de filamentos é uma das estruturas florais mais variáveis, apresentando diferentes cores, formas, odores e disposição dos filamentos. As séries mais externas de filamentos estão envolvidas com a atração dos polinizadores, enquanto duas séries internas (opérculo e límen) geralmente se completam, fornecendo proteção mecânica à câmara nectarífera (Endress 1994). Além das variações morfológicas, as adaptações a diferentes polinizadores podem envolver modificações temporais, como a sincronização entre os horários de maior disponibilidade de recursos (principalmente néctar) e de maior atividade dos polinizadores (Varassin *et al.* 2001). Os ancestrais de *Passiflora* provavelmente eram polinizados por insetos da Ordem Hymenoptera, sendo a melitofilia (polinização por abelhas) a síndrome floral mais comum no gênero. Além de abelhas, há registros de polinização por beija-flores, vespas, borboletas e morcegos (MacDougal 1994).

A polinização por abelhas é encontrada em diversos subgêneros de *Passiflora*, que geralmente se caracterizam por flores grandes, brancas ou azuladas e com corona de

filamentos bem desenvolvida. Nestas espécies, os filamentos mais externos possuem cores intensas, produzem odores e estão numa disposição radial, que guia o polinizador até o anel nectarífero na base da flor (Endress 1994). A concentração de açúcar no néctar é maior que 40% e as flores geralmente duram menos de um dia (MacDougal 1994).

A polinização por beija-flores é comum em vários subgêneros de *Passiflora* (MacDougal 1994), inclusive entre espécies distantemente relacionadas (Muschner *et al.* 2006, submetido), um indicativo de que tenha surgido independentemente várias vezes no gênero. Geralmente as espécies de *Passiflora* polinizadas por beija-flores não produzem odores, possuem um androginóforo alongado e uma corona pouco desenvolvida. Mas são caracterizadas por um grande apelo visual, a posição e coloração das flores (avermelhadas, púrpuras ou rosas), tornando-as visíveis à distância (Varassin *et al.* 2001).

As espécies de *Passiflora* tipicamente polinizadas por morcegos (como *Passiflora mucronata* Lam.) atraem estes animais através do odor (Sazima & Sazima 1978). Apesar dos filamentos da corona serem mais curtos, eles produzem odores em maior quantidade quando comparados com os filamentos das espécies melitófilas. Geralmente as flores ficam posicionadas fora da folhagem, possuem longos pedúnculos, e produzem grandes quantidades de néctar, o qual é estocado até a abertura da flor quando rapidamente é consumido (Endress 1994). Assim como a ornitofilia (polinização por aves), a quiropterofilia (polinização por morcegos) é encontrada em diversas espécies não relacionadas de *Passiflora* (Muschner *et al.* 2006, submetido).

A dispersão das sementes de *Passiflora* é freqüentemente feita por aves, morcegos e pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) que são atraídos pela coloração e pelo cheiro dos frutos (Semir & Brown 1975; Koehler-Santos *et al.* 2006).

No gênero *Passiflora* são encontradas espécies autocompatíveis e autoincompatíveis. As espécies de fecundação cruzada obrigatória necessitam de polinizadores para produzir frutos, o que é especialmente importante para espécies comerciais como *Passiflora edulis* Sims. Nesta espécie foram detectados dois sistemas genéticos de autoincompatibilidade: esporofítico (sistema S) e gametofítico (sistema G). A reação de autoincompatibilidade pode ocorrer no estigma (sistema S) ou durante o crescimento do tubo polínico no estilete (sistema G; Suassuna *et al.* 2003).

Mesmo nas espécies autoincompatíveis do gênero, são muito comuns barreiras temporais através do movimento de deflexão dos estigmas e anteras. Em muitos casos, a flor expõe primeiramente as anteras e, somente após todo o pólen ser retirado, há a deflexão dos estigmas e estes se tornam receptivos. O tempo destes movimentos geralmente está relacionado com a atividade do polinizador, especialmente nas espécies polinizadas por abelhas (MacDougal 1994; Varassin *et al.* 2001). O movimento das anteras e do estigma também pode ser uma estratégia para a produção de frutos e sementes em espécies autocompatíveis na ausência de polinizadores. *Passiflora capsularis* L., *Passiflora foetida* L., *Passiflora morifolia* Mast. in Mart. e *Passiflora suberosa* L. podem se autopolinizar e por isso alguns indivíduos solitários produzem frutos (Ulmer & MacDougal 2004).

I.6 Primeiro estudo de caso: *Passiflora actinia* e *Passiflora elegans*

No Brasil, ocorre cerca de 130 espécies de *Passiflora*, sendo a bacia amazônica a região que concentra a maior diversidade (Killip 1938; A. C. Cervi, comunicação pessoal). Devido ao seu clima subtropical, o Rio Grande do Sul apresenta apenas 15 destas espécies (Mondin 2001). Entre estas, *Passiflora elegans* Masters (figura 1) é a única com

distribuição restrita ao RS e a regiões adjacentes de países limítrofes. As análises filogenéticas do gênero revelaram que *Passiflora actinia* Hooker (figuras 2 e 3) é espécie irmã de *P. elegans* (Muschner *et al.* 2003). Apesar da alta similaridade genética, estas espécies estão classificadas em diferentes séries taxonômicas dentro do subgênero *Passiflora* (*P. actinia*, *Simplicifoliae*; *P. elegans*, *Lobatae*; Killip 1938). Esta classificação está baseada na forma da folha, um caráter altamente variável neste gênero e sujeito a influências ambientais (Benson *et al.* 1976; MacDougal 1994). As duas espécies são parapátricas, o limite norte de distribuição de *P. elegans* coincide com o limite sul de *P. actinia*, e não há registros de simpatria até o momento, embora elas vivam em habitats florestais adjacentes.



Figura 1



Figura 2

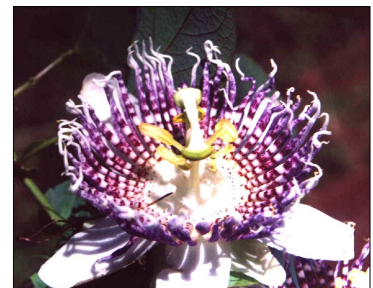


Figura 3

Passiflora actinia é uma espécie típica de Mata Atlântica e de floresta com araucária, e sua ocorrência é descrita desde o Espírito Santo até o Rio Grande do Sul. A distribuição geográfica de *P. elegans* está basicamente restrita a matas de galeria ao longo dos rios de algumas regiões do RS e de alguns locais da Argentina e do Uruguai (Cervi 1997, Deginani 2001).

A Mata Atlântica *sensu strictu* apresentava-se como uma faixa praticamente contínua, com uma largura média de 200 km, ocupando uma área de aproximadamente um

milhão de km², estendendo-se originalmente desde a região de Osório, RS (30°S) até o Cabo de São Roque, Rio Grande do Norte (6°S). Mas cinco séculos de ocupação humana pós-descobrimto reduziram-na a pequenas manchas concentradas na região sul/sudeste (Joly *et al.* 1991). Estima-se que reste menos de 10% desta floresta atualmente, numa condição extremamente fragmentada e com poucas áreas oficialmente protegidas (Marsden *et al.* 2000). O extrativismo, a exploração de madeiras, a agricultura de subsistência, a expansão de monoculturas e, mais recentemente, a especulação imobiliária podem ser apontadas como as principais causas desta drástica redução (Joly *et al.* 1991).

Grande parte da área do RS é dominada por campos que, de modo geral, ocupam as partes mais altas, enquanto nos vales as matas de galeria (ou ciliares) acompanham os cursos dos rios (Rambo 1994). A estrutura e a composição florística destas matas variam de acordo com o grau de umidade do solo. No interior do RS as matas de galeria caracterizam-se pela interpenetração de espécies das principais formações de florestas pluviais do Estado, a Atlântica e a do Alto Uruguai (Rizzini 1997). Estas interpenetrações de flora foram determinadas pelas flutuações climáticas ocorridas no Quaternário, com momentos de expansão e retração das formações florestais. Durante estes processos, as matas de galeria representaram importantes corredores de ligação entre diversas formações (Joly *et al.* 1991). A expansão desordenada das fronteiras agrícolas foi a principal causa da degradação das matas ciliares brasileiras. A exploração florestal, o garimpo, a construção de reservatórios e hidrelétricas, a expansão das áreas urbanas e a poluição industrial são atividades que também contribuíram para a destruição histórica destas formações (Rodrigues & Gandolfi 2000).

Sobre a biologia reprodutiva das espécies que serão consideradas, há apenas um estudo realizado com *Passiflora actinia* (Prazeres 1989). Neste estudo não foram

encontrados indícios de polinização abiótica, sendo o principal polinizador uma mangava, do gênero *Xylocopa* Latreille, tendo sido também observadas, como polinizadores ocasionais, abelhas, moscas e vespas. O pólen tem um alto índice de viabilidade (98%), é produzido em grande quantidade e é bastante ornamentado. O sucesso reprodutivo, em condições naturais, é excelente com praticamente 100% das flores formando frutos. Na região estudada, a floração tem início na primeira semana de setembro, o clímax é em outubro e o término em novembro, já com frutos. Nos testes de polinização artificial de geitonogamia (flores diferentes da mesma planta) e autopolinização artificial e natural (ensacamento das flores) não houve a formação de frutos e sementes. Mas quando flores de diferentes plantas (xenogamia) foram cruzadas artificialmente, o sucesso reprodutivo foi equivalente ao das condições naturais. A impossibilidade do contato mecânico entre o pólen e o estigma da mesma flor é devida ao comportamento floral durante a antese (abertura do botão floral). A corona de filamentos é o principal órgão envolvido na atração e orientação dos polinizadores, produzindo um odor adocicado e apresentando anéis concêntricos coloridos que servem como guias de néctar. É fundamental a exposição antecipada do pólen aos agentes polinizadores em relação à deflexão estigmática. A formação dos frutos está estritamente ligada à fecundação cruzada (autoincompatível). Além disso, o tamanho do fruto e o número de sementes estão positivamente correlacionados com o número de grãos de pólen na superfície estigmática (Prazeres 1989).

I.7 O gênero *Petunia*

O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) apresenta 11 espécies exclusivamente sul-americanas, sendo a maioria delas encontradas no sul e sudeste do Brasil (Stehmann &

Semir 2005). Conhecidas como petúnias-de-jardim, este gênero tem uma longa história de cruzamentos artificiais, sendo os híbridos entre *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns and Poggenb e *Petunia integrifolia* (Hook.) mundialmente disseminados como plantas ornamentais (*Petunia x hybrida*). Como não há barreiras intrínsecas ao cruzamento interespecífico em *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 melitofilia é a síndrome floral mais comum e provavelmente mais ancestral no gênero *Petunia*, enquanto a ornitofilia e a esfingofilia (polinização por mariposas, Lepidoptera) devem ser síndromes derivadas (Stehmann 1999). Em geral as espécies melitófilas são autoincompatíveis (Tsukamoto *et al.* 1998), sendo a polinização uma etapa fundamental para a manutenção das mesmas, preferencialmente realizada por abelhas especializadas, num provável processo de co-evolução (Stehmann 1999). Algumas linhagens de *Petunia axillaris* (Tsukamoto *et al.* 2003), *Petunia exserta* Stehmann (Tsukamoto *et al.* 1998) e *Petunia secreta* Stehmann & Semir (Stehmann 1999) são autocompatíveis. Todas as espécies apresentam frutos capsulares, secos quando maduros, que produzem uma grande quantidade de pequenas sementes. Não há um sistema especializado de dispersão de sementes a longas distâncias e geralmente elas ficam próximas da planta mãe, num processo de autocoria (Stehmann 1999).

I.8 Segundo estudo de caso: Petúnias da Serra do Sudeste

A Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul (RS) é um dos centros de diversidade do gênero *Petunia*, podendo-se destacar a ocorrência de duas espécies exclusivas desta região,

P. exserta (figura 4) e *P. secreta* (figura 5). Juntamente com *P. axillaris* (figura 6), estas espécies compartilham uma série de características morfológicas, como o tubo da corola longo e hipocrateriforme, hábito ereto ou ascendente, 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; Stehmann 1999).

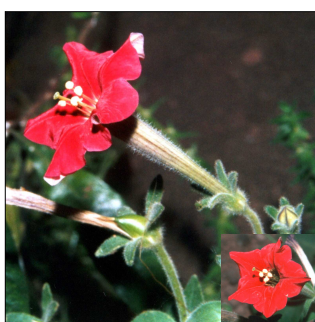


Figura 4



Figura 5



Figura 6

P. axillaris possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil, Uruguai, Argentina e Bolívia (Ando 1996). No Brasil é encontrada apenas na metade sul do RS, em afloramentos rochosos e locais perturbados como beiras de estradas. *P. exserta* habita reentrâncias rochosas sombreadas da formação Guaritas (município de Caçapava do Sul), uma área extremamente restrita da Serra do Sudeste onde ocorrem afloramentos rochosos de origem sedimentar (conglomerado; Stehmann 1999).

No gênero *Petunia*, a esfingofilia é observada apenas em *P. axillaris*, a qual apresenta flores brancas, com corola de tamanho variável (3–7 cm de comprimento) e que liberam um forte perfume ao entardecer, no início das atividades destes insetos noturnos. *P. exserta* possui uma série de características adaptadas para a ornitofilia, como corola vermelha com bordo do limbo reflexo e anteras e estilete fortemente exsertos. Beija-flores

foram observados visitando flores de populações naturais (C. Schlindwein, comunicação pessoal; A.P. Lorenz-Lemke, observações de campo, 2003), bem como de plantas em cultivo (Stehmann 1999). A Serra do Sudeste é o único lugar onde podem ser encontradas espécies de *Petunia* com as três síndromes florais presentes no gênero: *P. axillaris* (esfingófila, flores brancas); *P. exserta* (ornitófila, flores vermelhas); *P. integrifolia* e *P. secreta* (melitófilas, flores magenta). Estas informações indicam que a polinização diferencial teve um papel importante na diversificação do gênero na região (Stehmann 1999).

A fitofisionomia da região da Serra do Sudeste (RS) é bastante heterogênea, sendo a maior parte da vegetação classificada como savana parque. A savana parque caracteriza-se 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). Quanto à origem dos campos encontrados nesta área, existem várias teorias discordantes. Segundo Rambo (1994), o fator determinante seria o controle exercido pelo solo, sendo o clima geral propício ao desenvolvimento de florestas subtropicais.

Com a colonização humana a partir de 1800, houve uma intensa alteração da composição vegetal da região, devido ao pastoreio e à implantação de cultivos agrícolas, não havendo registro de áreas com vegetação original. Esta região abriga um número considerável de plantas endêmicas, muitas delas com distribuição bastante restrita. Das 104 espécies endêmicas do RS, aproximadamente 30 ocorrem na Serra do Sudeste, sendo dez exclusivas da região (Guadagnin *et al.* 2000).

Populações de *P. exserta* são encontradas somente em locais onde o gado não consegue alcançar, o que representa uma superfície muito pequena e onde poucos indivíduos podem habitar. Dentre as espécies ocorrentes na formação Guaritas, *P. exserta* requer uma atenção especial, uma vez que apresenta as maiores exigências de habitat devido à necessidade de sombreamento, e também porque já foi observada a redução do número de indivíduos e até mesmo extinção local de populações, devido ao pisoteio e/ou predação (Guadagnin *et al.* 2000).

I.9 Terceiro estudo de caso: Petúnias dos Planaltos Sul e Sudeste do Brasil

Entre as espécies melitófilas do gênero *Petunia*, seis possuem distribuição geográfica restrita aos campos altitudinais associados à floresta com araucária das regiões sul e sudeste do Brasil.

As flores das petúnias melitófilas são zigomorfas, apresentam tubo da corola infundibuliforme ou campanulado, anteras inclusas próximas à fauce, estigma próximo das anteras, pólen violáceo, antese diurna, não exalam odores perceptíveis ao olfato humano e produzem pequenas quantidades de néctar. Além disso, apresentam alguns padrões visuais que ajudam as abelhas visitantes na localização dos recursos florais, como nervuras longitudinais ou venação fortemente reticulada na fauce e a coloração mais escura desta região em relação ao interior do tubo (Stehmann 1999).

Petunia altiplana T. Ando & G. Hashim. (figura 7) e *Petunia bonjardinensis* T. Ando & G. Hashim. (figura 8) ocorrem em áreas abertas e expostas diretamente ao sol, ocupando locais alterados com solo desnudo, como barrancos de beira de estradas, podendo ser consideradas espécies pioneiras e colonizadoras (Ando & Hashimoto 1993). Apesar de ocuparem o mesmo habitat, estas espécies apresentam distribuições geográficas

distintas. *P. altiplana* pode ser encontrada no planalto nordeste do RS e leste do estado de SC, enquanto *P. bonjardinensis* é endêmica de uma pequena região do planalto catarinense, nos arredores do município de Bom Jardim da Serra (Ando & Hashimoto 1993).



Figura 7



Figura 8

Também no planalto catarinense, *Petunia reitzii* L. B. Sm. & Downs (figura 9) pode ser encontrada em uma pequena região de campos associados à floresta com araucária, no município de Bom Retiro. Próximo a esta região pode ser encontrada a única população de *Petunia saxicola* L. B. Sm. & Downs (figura 10) encontrada até o momento (município de Otacílio Costa), sendo com certeza a mais rara entre as seis espécies amostradas. Esta espécie possui um habitat bem diferente das demais, sendo encontrada sobre rochas úmidas em locais parcialmente sombreados (Stehmann 1999).



Figura 9

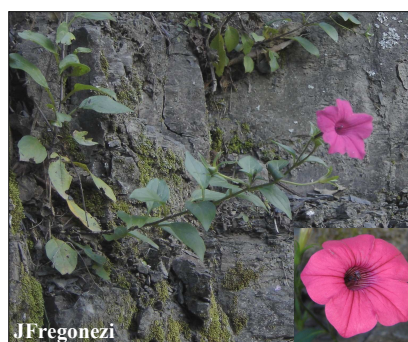


Figura 10

As populações de *Petunia scheideana* L. B. Sm. & Downs (figura 11) são encontradas na zona ecotonal entre campo e floresta no planalto norte de SC e sul do Paraná (PR; Ando & Hashimoto 1995). A descrição original de *P. scheideana* (Smith & Downs 1964) é bastante incompleta e foi baseada apenas na análise de uma amostra, coletada no nordeste de SC. Naquele trabalho não foi descrita a grande variabilidade existente no indumento e no comprimento dos ramos e pedúnculo floral. Diferenças nestas características provavelmente estão envolvidas com plasticidade fenotípica, determinada pelo nível de sombreamento do local. As populações encontradas próximas do município de Guarapuava (PR) foram descritas por Ando & Hashimoto (1995) como *Petunia guarapuavensis* T. Ando & Hashim. Estes autores comentam a semelhança da espécie com *P. integrifolia* e omitem as afinidades com *P. scheideana*. Como as características morfológicas que diferenciam *P. scheideana* e *P. guarapuavensis* são vegetativas e altamente sujeitas às condições ambientais, adotamos a classificação de Stehmann (1999), na qual estes nomes são considerados sinônimos devido à ausência de caracteres florais para distingui-las.

Petunia mantiqueirensis T. Ando & G. Hashim. (figura 12) tem sua ocorrência restrita ao sul de Minas Gerais (MG), na região da Serra da Mantiqueira, onde habita locais parcialmente sombreados entre o campo e a borda da floresta com araucária (Stehmann 1999). Sua morfologia floral é única no gênero, caracterizada por um tubo da corola longo e estreito, com coloração magenta. É a espécie que apresenta as plantas mais altas, chegando a 4 m desde as raízes (Ando & Hashimoto 1994).



Figura 11



Figura 12

As seis espécies acima citadas são alopátricas, possivelmente resultantes de um processo de diferenciação morfológica ocorrido após o isolamento geográfico. A dinâmica das formações vegetais onde estas espécies ocorrem foi muito modificada pelas alterações paleoclimáticas ocorridas no Quaternário. É possível que o processo de diversificação do grupo esteja relacionado com estes acontecimentos, os quais provavelmente influenciaram os padrões de fluxo gênico e possibilitaram o surgimento de novidades evolutivas.

Capítulo II

Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a diversidade genética das espécies *Passiflora actinia*, *Passiflora elegans*, *Petunia altiplana*, *Petunia axillaris*, *Petunia bonjardinensis*, *Petunia exserta*, *Petunia mantiqueirensis*, *Petunia reitzzi*, *Petunia saxicola* e *Petunia scheideana* dando ênfase para as seguintes abordagens:

1. Descrever a distribuição da variabilidade genética intra e interespecífica utilizando os seguintes marcadores moleculares: espaçadores internos transcritos dos genes ribossomais nucleares (ITS), e espaçadores intergênicos plastidiais: *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *psbB-psbH*.
2. Contribuir para o conhecimento dos processos de especiação nos gêneros *Passiflora* e *Petunia*.
3. Verificar as diferenças na variabilidade genética populacional das espécies, considerando seus diferentes padrões geográficos.
4. Correlacionar os dados obtidos sobre a estrutura genética com os efeitos da fragmentação e isolamento de habitats.
5. Inferir possíveis eventos de hibridação interespecífica.
6. Correlacionar os padrões de variabilidade genética das espécies estudadas com os eventos fitogeográficos, para verificar a possível influência destes na sua dinâmica evolutiva.
7. Contribuir para o estabelecimento de programas de conservação nas áreas de ocorrência das espécies estudadas: Mata Atlântica, matas de galeria e formações rochosas Guaritas e campos de altitude das regiões sul e sudeste do Brasil.

Capítulo III

1º Artigo

Publicado na revista *Annals of Botany*

Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation

Capítulo IV

2º Artigo

Aceito para publicação na revista *Molecular Ecology*

Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a
molecular and ecological analysis

**Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia*
(Solanaceae): a molecular and ecological analysis**

ALINE P. LORENZ-LEMKE,^{*} GERALDO MÄDER,^{*} VALÉRIA C. MUSCHNER,^{*}
JOÃO R. STEHMANN,[†] SANDRO L. BONATTO,[‡] FRANCISCO M. SALZANO^{*} and
LORETA B. FREITAS^{*}

^{}Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, [†]Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Antônio Carlos 6627, 31270-110 Belo Horizonte, MG, Brazil, [‡]Centro de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil*

Keywords: *Petunia exserta*, *Petunia axillaris*, evolution, hybridization, speciation, conservation

Corresponding author: Loreta B. Freitas, Ph.D., Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, Tel. no.: 55 51 3316-6731, Fax no.: 55 51 3316-9823, E-mail: loreta.freitas@ufrgs.br

Running title: PETUNIA HYBRIDIZATION AND EVOLUTION

Abstract

Intrinsic reproductive barriers among the species of *Petunia* are weak and genetic isolation is obtained mainly by geographical separation and ecological diversification. The Serra do Sudeste region in the extreme south of Brazil is one of the centres of diversity of this genus and is characterized by the presence of species with different pollination syndromes. *Petunia exserta* is known only from four sandstone towers in a restricted area of this region (about 500 km²) and is characterized by its differentiated habitat (shelters in the sandstone towers) and by its floral characteristics adapted to ornithophily. In towers where this species is sympatric with the sphingophilous *P. axillaris*, phylogenetically close to *P. exserta*, we found plants with intermediate floral morphology, suggesting hybridization between them. To test this hypothesis and to better understand its consequences we analyzed the sequences of the plastid *trnH-psbA*, *trnS-trnG* and *psbB-psbH* intergenic spacers in 121 individuals sampled all over the *P. exserta* distribution. The joint analysis of the three markers revealed 13 haplotypes and the network showed two main genetic clades, which probably represent the original gene pool of the two species in the region. In general, individuals of a given population presented the same haplotype, independently of phenotype, corroborating the hybridization hypothesis. Field observations suggest that hummingbirds are responsible for the interspecific gene flow. Analysis of molecular variance revealed high inter-populational diversity among the towers. The low gene flow between populations is possibly related to the autochoric seed dispersion system.

Introduction

Complex morphological and physiological characteristics in angiosperm flowers evolved to attract specific pollinators (pollination syndromes) as a mean to increase their reproductive efficiency. Pollinators are important factors in the evolution of flower shapes and colors and may contribute to reproductive isolation via reduced gene flow by pollen and differential visitation (Hodges & Arnold 1994; Proctor *et al.* 1996). These evolutionary changes may occur by mutations in genes with major effects in the flower appearance, such as on genes that control pigments (Bradshaw & Schemske 2003). In *Petunia* Juss. (Solanaceae), an extensive diversification of the pollination syndromes occurred and melitophilous, sphingophilous and ornithophilous species can be found. Known as garden petunias, this genus has a long history (since the 19th century) of artificial crossings, and the hybrids between *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. and *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. are disseminated worldwide as ornamental plants (*Petunia hybrida*).

The eleven species of *Petunia* are exclusively South American and the majority of them are found in the Brazilian south and southeast (Stehmann & Semir 2005). The Serra do Sudeste (Southeast Sierra) region, in the south of Brazil, is one of the centres of diversity of the group, characterized by the presence of species with different pollination syndromes: *P. axillaris* (sphingophilous - white flowers), *Petunia exserta* Stehmann (ornithophilous - red flowers), *P. integrifolia* and *P. secreta* Stehmann & Semir (melitophilous - magenta flowers, Stehmann & Semir 2005). As the intrinsic reproductive barriers seem to be weak (Watanabe *et al.* 1996), the biological importance of floral

differences among the species occurring in this region is evident and differential visitation by insects may have played a central role in the evolutionary history of this genus.

P. exserta is the only ornithophilous species of the genus (JRS, unpublished results) and is characterized by showy red flowers with anthers and stigma strongly exerted. In spite of its exuberant colour, *P. exserta* is not the parent of red-flower commercial hybrids, having been discovered some decades after these hybrids had been produced (Grisebach *et al.* 1999; Ando *et al.* 2000). Endemic of a very small area (about 500 km²) of the Serra do Sudeste region, it was found so far growing in shady cracks within the rock (shelters) on only four sandstone towers, which seems to be a very restricted and inhospitable environment for the other species of this genus (Stehmann 1987).

P. exserta and *P. axillaris* are closely related species (Ando *et al.* 2005; Kulcheski *et al.* 2006) which share diverse morphological characteristics, such as the long and hipocrateriform corolla tube, erect or ascendant habit, yellow pollen, basal and apical leaves of different forms and sizes, erect fruit peduncles with large capsules (more than 9 mm in length) and small seeds (with a length of less than 0.5 mm) (Stehmann 1999). *P. axillaris* displays white flowers that emit a strong fragrance at nightfall and produce a considerable amount of nectar to attract nocturnally active hawkmoths (Sphingidae, Ando *et al.* 2001). Its distribution range includes Bolivia, Argentina, Uruguay and Brazil's extreme south and it can be found in rocky outcrops and also in disturbed habitats such as the margins of highways (Ando 1996). In various locations the distribution of *P. axillaris* overlaps that of the other species of the genus, and it is possible to achieve artificial crossings between *P. axillaris* and them (Watanabe *et al.* 1996).

In the majority of cases the differences in floral traits is efficient in maintaining the isolation between the sympatric species of *Petunia*. For example, observations of a few

natural sympatric populations in southern Brazil showed that the differential insect visitation between *P. axillaris* (hawkmoths) and *P. integrifolia* (bees) seems to be sufficient to maintain the isolation between them, and natural hybrids are normally not found (Ando *et al.* 2001). However, in some locations in the Serra do Sudeste region where *P. axillaris* populations were observed near *P. exserta* individuals, we found plants with intermediate floral morphology, indicating a possible process of interspecific hybridization.

Recent hybrid generations can show high levels of morphological variability as a result of segregation and recombination between the parental genomes (Chung *et al.* 2005). Much of this diversity can be lost in older hybrid populations in consequence of selection and drift (Martin & Cruzan 1999). Hybridization can contribute to an increase in the genetic variation of the populations and to the spread of new adaptations (Rieseberg 1997). Hybrids adapted to very specific ecological niches or with reduced fitness, as well as the constant dispersion of parental genotypes, are the main factors limiting extensive introgression. However, if the hybrid genotypes have equal or higher fitness than that of the parental species, hybrid zones may expand and lead to the dislocation of one or more of the parental species (Martin & Cruzan 1999; Arnold 2004). These processes may be critical for endemic species, many of which require special ecological niches and are very vulnerable to disturbances in the restrictive environment they live in. If the direction of the introgression is mainly from the more common into the rare species it could result in a loss of the genetic adaptation of the rare one ("genetic swamping", Rhymer & Simberloff 1996). From a conservationist perspective, it would be crucial to study the spatial distribution of their genetic diversity. Molecular markers are ideal for the evaluation of these phenomena, in special in endangered species, since a large amount of data can be

obtained with relative small amounts of biological material using non-destructive methods (Petit *et al.* 2001). However, hybridization may sometimes be difficult to distinguish from shared ancestral polymorphisms, in special in recently diverged species and using only uniparental markers. Nevertheless, some results are highly suggestive of recent hybridization, such as the presence of individuals with intermediate phenotypes, the existence of haplotype clades associated with different species, and haplotypes found in putative hybrids being always identical or slightly divergent from the non-hybrids from one of the species (see Avise *et al.* 2000 for examples). On the contrary, the opposite results are suggestive of shared ancestral polymorphisms.

Here we investigate the molecular diversity of the endemic *P. exserta* and its closely related species *P. axillaris* and the first case of natural interspecific hybridization between *Petunia* using the *trnH-psbA*, *trnS-trnG* and *psbB-psbH* chloroplast (cp) DNA markers. These plastid intergenic regions are highly variable, as appropriate for population studies (Okaura & Harada 2002; Hamilton *et al.* 2003; Dobes *et al.* 2004) and for identification of hybridization events between closely related species (Bleeker 2003). The extension of the cpDNA gene flow between the species in the sympatric areas and how the cpDNA variation is distributed within and among populations were evaluated. In addition, the relationships among the genetic, morphological, geographical and ecological variations were inferred, as well as the consequences of the hybridization to *P. exserta* conservation.

Materials and methods

Plant material

The material analyzed was obtained during field collections performed between October and December, 2002. From the sixteen sampling sites investigated, ten are located in the Serra do Sudeste region (in the extreme south of Brazil), where *P. exserta* is endemic, and six are located around it (southwest and central region, Table 1 and Fig. 1). Leaves from three to seventeen plants were collected in each location, totalizing 121 individuals identified as *P. axillaris* subsp. *parodii* (Steere) Cabrera (Ando 1996), *P. exserta*, or as presenting an intermediate floral morphology (likely hybrids between them, see Results). Exsiccates were made with one plant of each morphology per population, and for the genetic analysis young leaves were collected in a way that was not damaging to the individuals sampled. These leaves were packed in silica gel for drying and subsequent DNA extraction.

DNA extraction, amplification, and sequencing

The dried leaves were pulverized with liquid nitrogen and the DNA was extracted with cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) as described by Roy *et al.* (1992). From the six cpDNA and one nuclear regions whose variability was investigated in a subset with representatives from the populations under study, the *trnL-trnF* (369 bp) and *rps12-rpl20* (652 bp) intergenic spacers, the *trnL* intron (481 bp) and the nuclear rRNA ITS region (603 bp) had shown no or extremely low levels of variability, and no species-diagnostic markers (information about the techniques used available on request). The plastid intergenic spacers *trnH-psbA*, *psbB-psbH* and *trnS-trnG* were those that presented some intraspecific

variability and were then chosen for further evaluation. For the amplification and sequencing of the *trnH-psbA* spacer the primers described by Sang *et al.* (1997) were used and for the *psbB-psbH* and *trnS-trnG* spacers we employed those described by Hamilton (1999).

PCR amplifications were performed in 25 µl reactions consisting of 1 unit *Taq* polymerase (Invitrogen), 1x buffer (Invitrogen), 0.2 mM each dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer and 20-50 ng of template genomic DNA. The amplification conditions for *trnH-psbA* were as follows: 3 min at 94°C, 30 cycles with 1 min at 94°C, 1 min at 58°C, and 1 min at 72°C, with a final 10-min extension step at 72°C. For *psbB-psbH* and *trnS-trnG* the conditions were the same, except for the 58°C step, substituted by a 50°C step. The PCR products were checked by horizontal electrophoresis in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and purified with PEG 20% (Dunn & Blattner 1987). Sequencing was performed with a MegaBace 1000 automatic sequencer (Amersham Biosciences), in accordance with the manufacturer's specifications. Sequences were deposited in the GenBank, and accession numbers are listed in Table S1 (supplementary material).

Data analysis

The sequences were aligned using the ClustalX 1.81 program (Thompson *et al.* 2001) and manually corrected with the assistance of GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997). Whatever their sizes, all the contiguous insertion/deletion events (indels) were treated as one mutational event (Simmons & Ochoterena 2000). All analyses were performed with the sequences of the three markers combined in a concatenated set. Evolutionary relationships between haplotypes were estimated with the Network 4.1.0.9 program (available at <http://www.fluxus-engineering.com>) using the Median Joining

method ($\epsilon=0$, Bandelt *et al.* 1999). We also used the recently described union of maximum parsimonious trees (UMP) method (Cassens *et al.* 2005) following the authors instructions using maximum parsimony trees estimated by PAUP* 4.0b10 (Swofford 2003) and their combination algorithm (CombineTree).

Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's F_s (Fu 1997) neutrality tests, pairwise mismatch distributions, and the indices of haplotypic (h) and nucleotide (π) diversities (Nei 1987) were obtained with the DnaSP 4.0 program (Rozas *et al.* 2003). Arlequin Ver. 2.000 (Schneider *et al.* 2000) was used to evaluate the distribution of the inter and intrapopulation genetic variation by means of an analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992).

Results

Morphological variability

Although we have made extensive field work that covered great part (but was not limited) of the known geographic range of this species, *P. exserta* was found in only four sandstone towers and in nine shelters of these towers, although it is likely that it could occur in a few other towers that we could not get direct access. In each shelter only a very small number of individuals were found, a typical characteristic of the species, and always in the shadow, most of the time protected from the direct light of the sun. On the other hand, a few plants with the canonical *P. axillaris* morphology were found very near the shelters (<10m), but always in areas most of the time directly exposed to sunlight. Moreover, we have made a thorough investigation on the occurrence of *P. axillaris* in the

area of study and, as far as we know, it presently exhibits the disjunct distribution shown in Fig. 1.

Nine shelters were evaluated (Fig. 1; no.16 refer to the top of tower 4): two presented only plants with *P. exserta*'s canonical morphology; two presented plants with *P. exserta* and *P. axillaris* canonical morphologies; and five shelters presented also plants with intermediate floral morphology. In these latter shelters, the percentage of individuals with intermediate phenotype varied between 16% (shelter 4) and 64% (shelter 9). Plants with intermediate phenotype were always found in the shade with canonical *P. exserta* plants, while *P. axillaris* plants were found nearby. The intermediate flower had pinkish corolla lobes and weakly exerted stamens and style, *P. axillaris* whitish corolla lobes and included stamens and style, while *P. exserta* had reddish corolla lobes and exerted stamens and style (see photos in supplementary material).

In the six collection sites outside Serra do Sudeste region (southwest and central region), all plants presented the canonical *P. axillaris* flowers with no intermediate morphological traits (Fig. 1).

Genetic variation

Fifty seven individuals morphologically identified as *P. axillaris*, forty five as *P. exserta*, and nineteen as likely hybrids between them were analyzed for cpDNA sequence variation. Alignments of *trnH-psbA* included 423 bp (28.0% GC content) of *trnS-trnG* 658 bp (30.4% GC) and of *psbB-psbH* 762 bp (35.9% GC). These three regions were combined in a single alignment (totalizing 1843 bp) revealing 13 haplotypes (Table 2): seven were found exclusively in *P. axillaris* populations from the southeast and central regions (H1, H3, H5, H6, H7, H8 and H11) and six were found exclusively on the *P. exserta* and *P.*

axillaris populations from the Serra do Sudeste region (H2, H4, H9, H10, H12 and H13). Practically the same proportions of nucleotide substitutions (8 sites) and indels (7 sites) were found. Among indels, there are two duplications: (i) a 6 bp duplication in *trnS-trnG* between sites 363 and 368 (H4 haplotype); and (ii) a 21 bp duplication in *psbB-psbH* between sites 449 to 469 (H1, H2 and H3 haplotypes).

Very interestingly, in the Serra do Sudeste region the individuals found in the same shelter generally presented the same plastidial haplotype, independently of their phenotype (*P. exserta*, *P. axillaris*, or intermediate) (Table 1). For example, in shelter 9 all plants presented the H2 haplotype. These data indicate that not only the plants with intermediate morphology, but also some those with one of the parental phenotypes may represent individuals resulting from hybridization events (see below).

Networks

As both the UMP and the median joining methods resulted in identical topologies, only the latter would be shown. The haplotype network obtained with the combined dataset (Fig. 2) presents two main clades with an overall low diversity. The reticulation observed between H1, H2 and H11 is caused by the hypervariable sites 296/*trnH-psbA* (three changes) and 449/*psbB-psbH* (two changes), both involving indels. The relationships remain practically unaltered with the exclusion of these sites from the analysis, but their utilization was useful to enable fine discrimination among haplotypes. The two clades show a strong geographic structure and an asymmetrical distribution between the two species: one, hereafter called *P. exserta*'s clade, present four haplotypes that are found exclusively in the Serra do Sudeste's sandstone towers (where most plants have the *P. exserta* canonical phenotype), and a second clade, hereafter called *P. axillaris*' clade,

found in most plants outside this region and with *P. axillaris*' phenotype. These features suggest that these clades may possibly represent the original gene pool of the two species in the region analyzed. However, if this hypothesis is correct, there should have been introgression in both directions between the two species, since: a) H2 and H12 haplotypes from *P. axillaris*' clade are also found in plants with intermediate and the first also in ten plants with *P. exserta*'s phenotypes; and b) haplotypes H4, H9, and H13 from *P. exserta*'s clade are found in plants with intermediate and *P. axillaris*' phenotypes. It is interesting to note the low diversity and the star-like topology of the putative *P. exserta*'s clade.

Petunia axillaris haplotypes are geographically structured, except for H8 which occurs in two populations that are 387 km away from each other (not shown). The network of the haplotypes found in the four sandstone towers of the Serra do Sudeste (Fig. 2) also exhibits, in a very narrow scale, a clear geographical structure.

Neutrality tests and diversity indices

The neutrality tests, pairwise mismatch distribution, and diversity indices were estimated (Table 3) considering two different ways to group the data: (a) groups defined by morphology (without the plants with intermediate morphology); and (b) groups delimited by the two network clades. In the latter case we also made the analyses with only plants with the two canonical morphologies, but no significant difference was found between the two approaches. The haplotype and nucleotide diversities values found in the *P. axillaris* groups are higher than those found in *P. exserta* ($p < 0.05$), being two to three times higher in the case of the nucleotide diversity. In all cases the neutrality tests did not reject the null hypothesis ($p > 0.10$). The pairwise mismatch distribution for three groups show multiple peaks indicating that the populations are demographically stationary, with the exception of

the *P. exserta*'s clade that presented an unimodal pattern (data not shown). This, together with all the results presented above, indicate that *P. exserta* may have experienced a process of population reduction followed by expansion.

Population differentiation

For the analysis of molecular variance a geographical approach was utilized. The populations of *P. axillaris* that were found outside Serra do Sudeste (where only canonical morphologies were found) were evaluated separately, and a high population structure, with 91.38% of interpopulational variation ($p < 0.001$) was found (results not shown). In the Serra do Sudeste region, the degree of isolation among towers and among the different shelters in the same tower was evaluated (Table 4, see figures 1 and 2). As interspecific gene flow seems to be frequent, all plants found in the same shelter, independently of their phenotype, were considered as a single population. High genetic structure was found in these populations, with about 77% of the variation distributed among the four towers, 11% among shelters within towers and 12% within shelters. This can be seen in Fig. 2, where haplotypes were restricted to single towers, with exception of H9 that is the only haplotype found in more than one tower and in only one of these towers is it found in more than one shelter. The differentiation among shelters within each tower was also high: towers 1 ($F_{ST}=1.0$), 2 ($F_{ST}=0.32$) and 3 ($F_{ST}=0.79$). AMOVA analysis was also done considering exclusively plants with the *P. exserta* canonical morphology, and the results were similar, with the expected reduction in the intrapopulation diversity (among towers = 64%; among shelters = 29%; within shelter = 7%).

Discussion

Geographical distribution, genetic and morphological diversity

We have confirmed that *P. exserta* is a highly endemic species (Stehmann 1987), being found so far in only four sandstone towers in a very small region in south Brazil. Experiments reveal that *P. exserta* seeds germinate equally well in the light or in the dark (J.R.S., unpublished data), so that this aspect does not seem to be a limiting factor for the species dispersion to other environments. The differential adaptation of *P. exserta* to the shelters' shady environment could be related to some stage in development after seed germination. Among the likely limiting factors for the population size of *P. exserta* are the small size of the shelters, substratum availability, and the direction of the shelters opening (that is toward the southeast in all cases).

Phylogenetic studies carried out by Ando *et al.* (2005) and Kulcheski *et al.* (2006) show that, in spite of its notable morphological diversity, the genetic divergence among the various species of *Petunia* is very low, and the latter shown that this extends also to nuclear and mitochondrial markers. In accordance with this, only three substitutions separate the putative clades of *P. axillaris* from *P. exserta* in almost 2000 bp. These suggest a process of recent evolutionary radiation. Another explanation for the lower divergence among species would be that widespread hybridization might have prevented differentiation but by the best of our knowledge the present results are the first concrete case of natural hybridization between *Petunia* species. Diversification of the pollination syndromes is likely one of the most important processes in the divergence and maintenance of the different species of *Petunia* in the Serra do Sudeste region. The evolution of flower shape, color and position of the anthers and stigma are some of the characteristics most

affected by selective pressures due to floral visitors (Proctor *et al.* 1996) although traits influencing floral attractiveness to pollinators can also be affected by others factors such as avoidance of flower predation (Galen & Cuba 2001; Galen 2005). Mutations in genes of greater effect in these floral structures can accelerate the diversification process and cause rapid isolation by insect differential visitation (Bradshaw & Schemske 2003; Durbin *et al.* 2003).

Intraspecific plastidial molecular diversity is also usually small in the species of *Petunia* studied so far (unpublished results). This trend was also found in our study, especially in *P. exserta* that presents a nucleotide diversity of only 0.07% (or 0.04% if we discard the putative hybrids), despite the fact that the entire known distribution of the species was investigated. *P. exserta*'s extremely restricted distribution and small population sizes are important causes for its reduced genetic diversity. The nucleotide diversity estimate for *P. axillaris* was also very small, although actually it could be much larger since only a small part of its distribution was studied.

The mode of cpDNA inheritance usually plays a significant role in the geographic distribution of the genetic diversity. High population subdivision is common in studies with maternally inherited markers, which generally present higher F_{ST} values than paternally or biparentally inherited markers, in which gene flow by pollen plays a homogenization role (Petit *et al.* 2005). The fact that *Petunia* species present maternally inherited cpDNA (Derepas & Dulieu 1992) and an autochoric seed dispersion system (Stehmann 1999), where dispersion is entirely by free fall or propelled explosively by a fruit that opens suddenly or by a trip-lever (van der Pijl 1982) must have greatly contributed for the high among-population structure found in both species, as indicated by the AMOVA and F_{ST} values.

Natural hybridization

The spatial pattern of cpDNA diversity supports the breakdown of the reproductive isolation between these species, initially suggested by the existence of plants with clear intermediate floral morphologies. Another possibility is that this pattern actually represents retention of shared ancestral polymorphisms. However, the existence of plants with intermediate morphologies, the fact that sharing of haplotypes between plants with different morphologies always occurred in plants found in the same location, the network structure, and the geographical distribution of the haplotypes, all point clearly to a recent hybridization scenario instead of shared polymorphisms. Artificial crossings demonstrate that the hybrids between *P. axillaris* and *P. exserta* are completely fertile and without chromosomal abnormalities in the F₁ and backcrosses (Griesbach 2002). In all crossings carried out between *P. exserta* and other species of *Petunia*, those with *P. axillaris* subsp. *parodii* showed the highest indices of reproductive success, with abundant formation of capsules and seeds (Watanabe *et al.* 2001). Pollen viability of the F₁ did not differ from those of the intraspecific crossings. Morphologically the natural hybrids found here are clearly different from the parents; flower color varies between white and pink, as was found in artificial hybrids (Watanabe *et al.* 2001). The putative hybrids we found may present cpDNA haplotypes from *P. axillaris*' or *P. exserta*'s clades, suggesting that gene flow is bilateral in these natural populations, that is, it does not matter which species is the pistillate (seed) or staminate (pollen) parent, as also found in experimental reciprocal crossings (Tsukamoto *et al.* 1998, 2003). Therefore, the flower characters adapted to distinct pollinators and the different habitats do not seem enough to prevent the hybridization of neighbouring populations of *P. exserta* and *P. axillaris*. What could explain the maintenance of this hybrid zone? Pollinator behavior and effectiveness are

basic factors for pollen movement in animal pollinated plant species, and therefore have great effect on the genetic structure of the populations (Wu & Campbell 2005). Observations in the shelters showed that hummingbirds show a preference for *P. exserta*'s flowers, but often visit typical *P. axillaris* plants and individuals of intermediate floral morphology as well. A similar behaviour was observed in an experiment performed with two species of *Nicotiana* (Solanaceae) – one ornithophilous and the other sphingophilous. When these plants were placed in sympatry, hummingbirds and hawkmoths showed a clear preference for their respective attractive flower species, but less often also visited plants of the other species and the hybrids (Ippolito *et al.* 2004). Visits to the hybrids between *P. axillaris* and *P. exserta* having rose-colored flowers by bees (*Pseudagapostemon* sp, Halictidae) were also observed in the shelters, although it is likely that they are not effective pollinators.

Despite their apparent reproductive success, the natural hybrids with intermediate floral morphology were only found in the shelters, together with *P. exserta* individuals. This may indicate that the rigid habitat requirements of *P. exserta* may also be present in these plants, preventing their dispersion or that hybridization has been so recent that the hybrids have not had time to move. However, it is not clear which ecological factors may affect the differential survival of hybrids and their parental species and experiments such as hybrid fitness evaluations relative to parent species are necessary to identify these factors.

P. exserta's conservation

Hybridization with a widespread congener can bring serious consequences for rare plant species (Levin *et al.* 1996). The low levels of interspecific genetic variability

disclosed by diverse molecular markers (Kulcheski *et al.* 2006) and the present results indicate that the separation between *P. axillaris* and *P. exserta* is extremely recent. Habitat shift and modifications of floral traits are some of the probable factors involved in the isolation between these species. Therefore, hybridization with *P. axillaris* can constitute a risk for the maintenance of *P. exserta*'s typical populations, since it allows the dilution or loss of the unique adaptations of this species. A question that remains is whether the hybridization between *P. axillaris* and *P. exserta* is recent (possibly related to antropogenic disturbance) or a more ancient historical process.

A considerable change in the floristic composition of the Serra do Sudeste region took place with the start of the human colonization around 1800, since the introduction of agricultural food and forage crops led to the almost complete degradation of the original vegetation. Some 30 endemic plant species with very restricted distributions are found in this region, and among these *P. exserta* seems to require special attention due to the factors presented here, such as very strict distribution and habitat requirements (Guadagnin *et al.* 2000). Reduction in the number of individuals, and even local population extinctions due to predators have been documented (Guadagnin *et al.* 2000), and the species is now in the list of endangered species (<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especies-ameacadas.pdf>). Besides *P. exserta*, the occurrence of other endangered species indicates the need for the establishment of conservation units in certain Serra do Sudeste areas, especially in the rocky outcrops where these taxa are predominantly found.

References

- Ando T (1996) Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, **47**, 19-30.
- Ando T, Tatsuzawa F, Saito N *et al.* (2000) Differences in the floral anthocyanin content of red petunias and *Petunia exserta*. *Phytochemistry*, **54**, 495-501.
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J *et al.* (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Annals of Botany*, **88**, 403-413.
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H *et al.* (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany*, **96**:289-297.
- Arnold ML (2004) Transfer and origin of adaptations through natural hybridization: were Anderson and Stebbins right? *The Plant Cell*, **16**, 562-570.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Bleeker W (2003) Hybridization and *Rorippa austriaca* (Brassicaceae) invasion in Germany. *Molecular Ecology*, **12**, 1831-1841.
- Bradshaw Jr HD, Schemske DW (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature*, **426**, 176-178.
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2005) Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchids *Liparis kumokiri* and *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in sympatric populations. *Molecular Ecology*, **14**, 4389-4402.
- Derepas A, Dulieu H (1992) Inheritance of the capacity to transfer plastids by pollen parent in *Petunia hybrida* Hort. *Journal of Heredity*, **83**, 6-10.
- Dobes CH, Mitchell-Olds T, 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.
- Dunn IS, Blattner FR (1987) Charons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*, **15**, 2677-2698.
- Durbin ML, Lundy KE, Morrel PL, Torres-Martinez CL, Clegg MT (2003) Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 507-518.

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Galen C, Cuba J (2001) Down the tube: pollinators, predators, and the evolution of flower shape in the alpine skypilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution*, **55**, 1963-71.
- Galen C (2005) Catching ants with honey: an experimental test of distraction and satiation as alternative modes of escape from flower-damaging ants. *Oecologia*, **144**, 80-87.
- Griesbach RJ, Stehmann JR, Meyer F (1999) Anthocyanins in the "red" flowers of *Petunia exserta*. *Phytochemistry*, **51**, 525-528.
- Griesbach RJ (2002) Inheritance of the *An2* gene and epistatic interactions in *Petunia exserta* x *P. axillaris* hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**, 947-956.
- Guadagnin DL, 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* (eds Ronchi LH, Lobato AOC), pp 71-84. Editora Unisinos, São Leopoldo.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 513-525.
- Hamilton MB, Braverman JM, Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 1710-1721.
- Hodges SA, Arnold ML (1994) Columbines: a geographically widespread species flock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5129-5132.
- Ippolito A, Fernandes GW, Holtsford TP (2004) Pollinator preferences for *Nicotiana alata*, *N. forgetiana*, and their F₁ hybrids. *Evolution*, **58**, 2634-2644.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP *et al.* (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica*, **126**, 3-14.
- Levin DA, Francisco-Ortega J, Jansen RK (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology*, **10**, 10-16.
- Martin LJ, Cruzan MB (1999) Patterns of hybridization in the *Piriqueta caroliniana* complex in Central Florida: evidence for an expanding hybrid zone. *Evolution*, **53**, 1037-1049.

- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr. (1997) *GeneDoc: a Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments*. Available at <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Okaura T, Harada K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity*, **88**, 322-329.
- Petit C, Fréville H, Mignot A *et al.* (2001) Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. *Biological Conservation*, **100**, 21-34.
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Fineschi S *et al.* (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, **14**, 689-701.
- Proctor M, Yeo P, Lack A (1996) *The Natural History of Pollination*. Harper Collins Publishers, London.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinctions by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 83-109.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 359-389.
- Roy A, Frascaria N, MacKay J, Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**, 173-180.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496-2497.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1120-1136.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *ARLEQUIN, Version 2.000: a Software Program for Population Genetics Data Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, **49**, 369-381.
- Stehmann JR (1987) *Petunia exserta* (Solanaceae): Uma nova espécie do Rio Grande do Sul, Brasil. *Napaea*, **2**, 19-21.

- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. PhD thesis, Universidade Estadual de Campinas.
- Stehmann JR, Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical south America. In: *Festschrift for William G. Darcy: the legacy of a taxonomist* (eds Keating RC, Hollowell VC, Croat TB), Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis, pp 341-348.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (2001) ClustalX. Available at <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx>.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H *et al.* (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 *et al.* (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiology*, **131**: 1903-1912.
- van der Pijl A (1982) *Principles of Dispersal in Higher Plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Watanabe H, Ando T, Iida S *et al.* (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.
- Watanabe H, Ando T, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E (2001) Cross-compatibility of *Petunia exserta* with other *Petunia* taxa. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **70**, 33-40
- Wu CA, Campbell DR 2005 Cytoplasmic and nuclear markers reveal contrasting patterns of spatial genetic structure in a natural *Ipomopsis* hybrid zone. *Molecular Ecology*, **14**, 781-792.

Acknowledgements

To Patrícia Koehler-Santos and Dânae Longo for help in the analyses, Nelson J. R. Fagundes for a critical reading of the manuscript, and Cladinara Roberts Sarturi for sequencing facilities. This project was supported by grants from Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS).

Figure legends

Fig. 1. Map of the collecting places. Numbers 1-6 indicate collecting places of *P. axillaris* in the central and southwest region of Rio Grande do Sul State, Brazil. In the Serra do Sudeste region, shelters within the towers are represented by ovals numbered 7-15. No.16 refer to the top of tower 4. Circles inside the ovals represent phenotypes of the plants found there as follows: black: *P. exserta*; white: *P. axillaris*; gray: plants with intermediate floral morphology.

Fig 2. Median-joining networks based on the joint analysis of the three cpDNA markers. Each circle represents a haplotype, and their sizes are proportional to their frequencies. The colours indicate the phenotypes of the plants showing the haplotype (white: *P. axillaris*; black: *P. exserta*; grey: plants with intermediate floral morphology). Transversal bars indicate the number of mutations that differentiates the haplotypes. Arrows indicate the locations where the haplotypes had been found (samples from the Serra do Sudeste only).

Table 1 *Petunia* populations sampled for cpDNA analysis

Sampling places	Geographical coordinates	Voucher*	Floral morphology	cpDNA haplotype [†]
1. BR153, Bagé - Caçapava do Sul/RS	30°34'05"S/53°23'18"W	BHCB 75076	<i>P. axillaris</i>	H5 (2) / H6 (1)
2. BR290, Pantano Grande - Cachoeira do Sul/RS	30°12'11"S/52°27'23"W	BHCB 75142	<i>P. axillaris</i>	H7 (1) / H8 (7)
3. Santana do Livramento - Quaraí/RS	30°36'56"S/55°56'19"W	BHCB 79872	<i>P. axillaris</i>	H3 (3)
4. Santana do Livramento - Quaraí/RS	30°36'54"S/55°56'22"W	BHCB 79873	<i>P. axillaris</i>	H1 (4) / H3 (1)
5. Santana do Livramento - Quaraí/RS	30°34'27"S/56°03'50"W	BHCB 79874	<i>P. axillaris</i>	H11 (9)
6. Quaraí - Uruguaiana/RS	30°18'41"S/56°28'42"W	BHCB 79878	<i>P. axillaris</i>	H8 (12)
7. Shelter 1/ tower 1, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°50'17"S/53°29'42"W	BHCB 75113 BHCB 75111	<i>P. axillaris</i> <i>P. exserta</i>	H9 (2) H9 (2)
8. Shelter 2/ tower 1, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°50'18"S/53°29'43"W	BHCB 75107 BHCB 75110	<i>P. exserta</i> intermediate	H4 (2) H4 (1)
9. Shelter 3/ tower 2, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°50'10"S/53°30'16"W	BHCB 79905	<i>P. exserta</i>	H9 (7)
10. Shelter 4/ tower 2, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°50'11"S/53°30'17"W	BHCB 79895 BHCB 79893 BHCB 79894	<i>P. axillaris</i> <i>P. exserta</i> intermediate	H12 (3) H9 (7) H12 (2)
11. Shelter 5/ tower 2, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°50'13"S/53°30'19"W	BHCB 79896 BHCB 79897	<i>P. exserta</i> intermediate	H9 (3) / H10 (10) H9 (3)
12. Shelter 6/ tower 3, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°49'54"S/53°30'09"W	BHCB 79899 BHCB 79898	<i>P. axillaris</i> <i>P. exserta</i>	H13 (2) H 13 (3)
13. Shelter 7/ tower 3, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°49'50"S/53°30'08"W	BHCB 79900	<i>P. exserta</i>	H13 (3)
14. Shelter 8/ tower 3, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°49'52"S/53°30'10"W	BHCB 79901 BHCB 79902	<i>P. exserta</i> intermediate	H9 (5) H9 (1) / H13 (1)
15. Shelter 9/ tower 4, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°53'48"S/53°25'15"W	BHCB 76028 BHCB 76030 BHCB 76031	<i>P. axillaris</i> <i>P. exserta</i> intermediate	H2 (3) H2 (3) H2 (11)
16. Top of tower 4, Minas do Camaquã, Caçapava do Sul/RS	30°53'48"S/53°25'15"W	BHCB 76029	<i>P. axillaris</i>	H2 (7)

* BHCB Herbarium, Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

[†] Numbers of individuals found per haplotype are indicated in parentheses

Table 2 Haplotypes found. Numbers indicate variable positions in each cpDNA region, and dots (·) indicate that the character states are the same as for haplotype H1

Haplotype	trnH-psbA						trnS-trnG							psbB-psbH		No. found	Sampling places code
	170	287	296	297	299	303	175	280	299	309	363-368	495	640	271	449-469		
H1	G	A	-	-	A	T	T	C	-	A	-	-	A	-	*	4	4
H2	·	·	A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	24	15, 16
H3	·	·	A	·	·	A	G	·	·	·	·	·	·	·	·	4	3, 4
H4	·	·	A	·	C	·	·	·	C	†	A	·	A	-	-	3	8
H5	·	T	·	·	C	·	·	G	·	·	·	·	·	-	-	2	1
H6	·	T	·	·	C	·	·	G	·	·	·	·	T	-	-	1	1
H7	·	·	A	A	·	·	·	·	T	·	·	·	·	-	-	1	2
H8	·	·	A	A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	-	-	19	2, 6
H9	·	·	A	·	C	·	·	·	C	·	A	·	A	-	-	30	7, 9, 10, 11, 14
H10	·	·	·	·	C	·	·	·	C	·	A	·	A	-	-	10	11
H11	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	-	-	9	5
H12	·	·	·	·	C	·	·	·	·	·	·	·	·	-	-	5	10
H13	A	·	A	·	C	·	·	·	C	·	A	·	A	-	-	9	12, 13, 14

* 21 bp duplication (TAAAAAGGTGAAATAATTTTT).

† Six bp duplication (TTTTTG).

Table 3 Diversity and neutrality indices in *Petunia* morphological and haplotypic groups

Parameters	Morphological groups		Haplotypic groups	
	<i>P. axillaris</i>	<i>P. exserta</i>	<i>P. axillaris</i> ' clade	<i>P. exserta</i> 's clade
No. of plants	57	45	69	52
No. of haplotypes	11	5	9	4
Nucleotide diversity π (SD)	0.0015 (0.00016)	0.0007 (0.00017)	0.0011 (0.0001)	0.0004 (0.00005)
Haplotype diversity h (SD)	0.831 (0.032)	0.657 (0.059)	0.784 (0.03)	0.609 (0.058)
Tajima's D	-0.371	-0.786	-0.095	0.171
Fu's F_s	-1.220	0.552	-0.643	0.058

SD, standard deviation; all values of D and F_s were not significant.

Table 4 AMOVA and F_{ST} analyses from plants of different towers (no analyses was performed for tower 4, because it did not present variation)

Source of variation	Percentage of variation			
	Total data	Tower 1	Tower 2	Tower 3
Among towers	77.06	-	-	-
Among shelters within towers	10.75	100	32.09	79.36
Within shelters	12.19	0	67.91	20.64
F_{ST} (populations/total)	0.8781*	1.0 [†]	0.3209*	0.7936*

* $p < 0.001$.

[†] $p = 0.0352$.

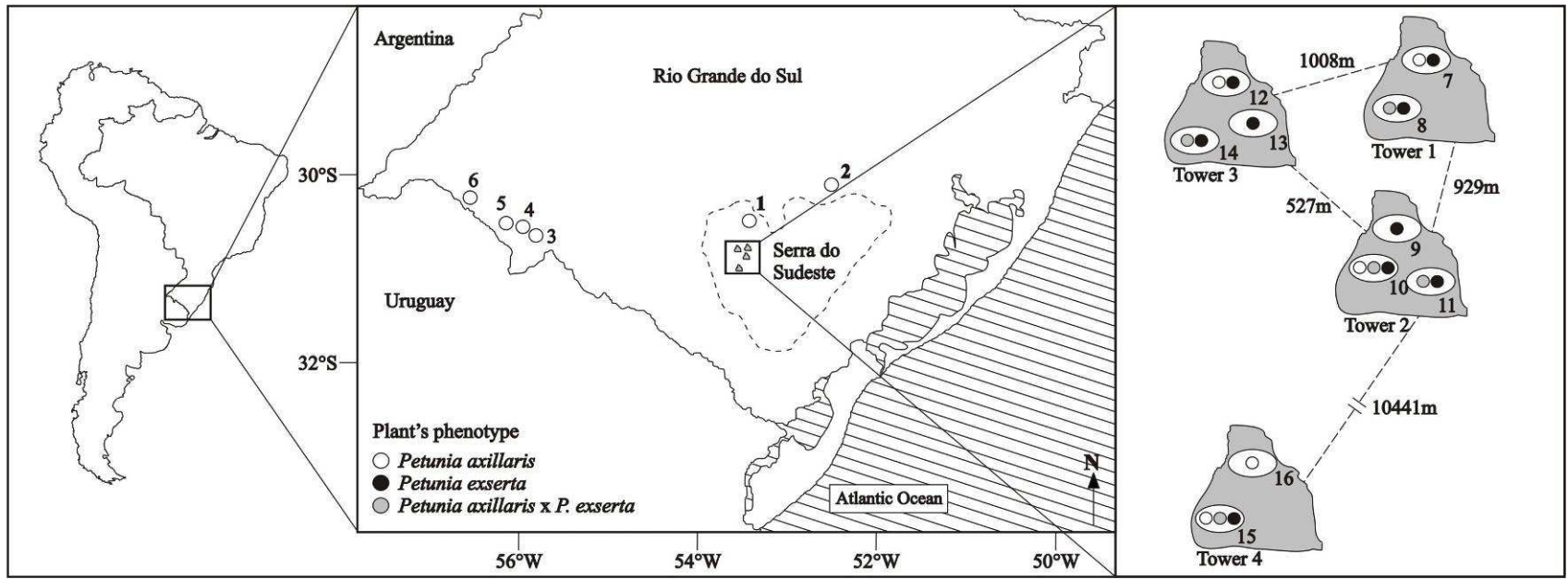


Figure 1

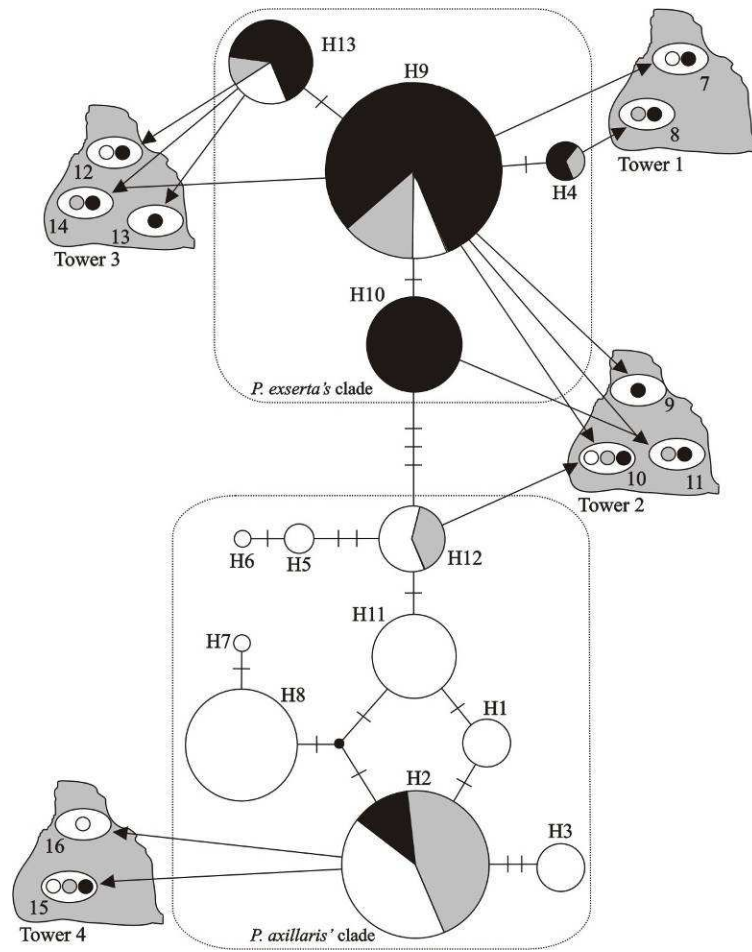


Figure 2

Capítulo V

3º Artigo

Manuscrito a ser submetido à revista *Molecular Ecology*

Phylogeography of *Petunia*'s species from Brazilian south and southeast highlands

Phylogeography of *Petunia*'s species from Brazilian south and southeast highlands

ALINE P. LORENZ-LEMKE,^{*} PAKISA DAGNA TOGNI,^{*} GERALDO MÄDER,^{*}
RAQUEL ATHAYDE KRIEDT,^{*} VALÉRIA C. MUSCHNER,^{*} JOÃO R. STEHMANN,[†]
SANDRO L. BONATTO,[‡] FRANCISCO M. SALZANO^{*} and LORETA B. FREITAS^{*}

^{}Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, [†]Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Antônio Carlos 6627, 31270-110 Belo Horizonte, MG, Brazil, [‡]Centro de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil*

Keywords: *Petunia* evolution, speciation, adaptative radiation, conservation

Corresponding author: Loreta B. Freitas, Ph.D., Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, Tel. no.: 55 51 3316-6731, Fax no.: 55 51 3316-9823, E-mail: loreta.freitas@ufrgs.br

Running title: PETUNIA EVOLUTION

Abstract

Recent studies have shown that the genus *Petunia*, a native plant of South America, is characterized by low genetic variability among its eleven species. Six species are found to occur exclusively in the Brazilian south and southeast highlands: *P. altiplana*, *P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii*, *P. saxicola* and *P. scheideana*. To evaluate the dynamics of diversification in the group, we analyzed the sequences of plastidial intergenic spacers *trnH-psbA* and *trnS-trnG* in 275 individuals collected at 50 sites. Forty-nine haplotypes were found, four of them shared by more than one species. *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola*, with a more limited distribution, presented the lowest indices of genetic diversity. Median-joining networks showed that the phylogenetic relationships between haplotypes are geographically structured in *P. altiplana* and *P. scheideana*. AMOVA revealed that the six species present a high population structure. The analysis of different demographic parameters and the star-like topology of the network with haplotypes of the six species agree with the hypothesis of diversification and recent population expansion. This pattern may possible be related to climate changes that occurred during the Quaternary, since the habitat of these species (grasslands surrounded by *Araucaria* forest) was strongly affected by these changes. Currently, the advance of deforestation in these regions is a critical process in the maintenance of the genetic isolation among these species of *Petunia*.

Introduction

The speciation process involves the separation of populations into independent evolutionary units. It may be triggered by geographic, ecological, morphological or behavioral changes, natural selection and genetic drift being the most important evolutionary mechanisms influencing them (Stearns & Hoekstra 2000). To understand this process, it is necessary to place the genetic characteristics into a spatial and temporal context, congruent with the particular geographic regions and geological events that occurred there (Hewitt 2001). Phylogeographic studies have reconstructed the evolutionary history of several plant species, but most of the taxonomic groups examined from this perspective occur in the Northern Hemisphere (Comes & Kadereit 1998; Hwang *et al.* 2003), and little is known about the extent to which climate changes affected evolutionary processes in the subtropical region of South America.

The eleven species of the genus *Petunia* are exclusively South American and the majority of them are found in the Brazilian south and southeast (Stehmann & Semir 2005). Known as garden petunias, plants of this genus have a long history (since the 19th century) of artificial cross-breedings, the hybrids between *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. and *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. being disseminated worldwide as ornamental plants (*Petunia hybrida*). Pollination by bees (melittophily) occurs in nine species (Stehmann 1999). They are generally self-incompatible (Tsukamoto *et al.* 1998), and pollination is fundamental to maintain them.

Among the melittophilous species of the genus, six have a geographic distribution limited to grasslands at high altitude (*campos de altitude*) associated with the Atlantic Mixed Forest, also known as *Araucaria* forest due to the presence of *Araucaria*

angustifolia (Brazilian pine), of the south and southeast regions of Brazil (Fig. 1). *Petunia altiplana* T. Ando & G. Hashim occurs in the grassland regions of the eastern highlands of the state of Santa Catarina (SC) and northeast of Rio Grande do Sul (RS) (Ando & Hashimoto 1993). On SC eastern highlands three species which only occurs there can also be found: *Petunia bonjardinensis* T. Ando & G. Hashim., *Petunia reitzii* L. B. Sm. & Downs and *Petunia saxicola* L. B. Sm. & Downs. Each of these species has its distribution limited to one site and few populations are known (Stehmann 1999). *Petunia scheideana* L. B. Sm. & Downs can be found on the northern highlands of SC and south of Paraná (PR); while *Petunia mantiqueirensis* T. Ando & G. Hashim. occurs further north, the few populations described being located in the Serra da Mantiqueira in the south of Minas Gerais (MG). These six species are genetically close (a monophyletic group, Kulcheski *et al.* 2006), possibly the result of a morphological differentiation process that occurred after geographic isolation.

The above-indicated habitat (grasslands surrounded by *Araucaria* forest) was strongly affected by Quaternary climate changes (Roth & Lorscheitter 1993). During the last Pleistocene glacial period (23,000-11,000 years before present - ybp) the southern Brazilian highlands were predominantly occupied by grasslands. Studies indicate that the climate of the region was drier and at least 5°C to 7°C colder, the Antarctic cold fronts being more frequent and intense. These conditions allowed the grasslands to extend for about 750 km northwards, reaching 28° to 20°S latitudes (Behling 2002). At the time, small *Araucaria* populations were restricted to refuges in more humid, protected areas, such as valleys (gallery forests) and slopes (Behling *et al.* 2001). When the Holocene began (11,000-10,000 ybp) there was a significant climate improvement with higher temperatures and greater humidity. These conditions allowed the expansion of the

Araucaria forest over the grasslands, especially after 3,000 ybp, when the dry periods practically disappeared (Behling 2002). Besides the paleoclimatic changes, these biomes were strongly influenced by human activity, largely due to the conversion of forest lands to agriculture, logging and pasture (Behling 2002). Certainly, these modifications affected the population dynamics of the species that occur in these biomes, changing the gene flow patterns.

Sequencing of non-coding regions of plastidial DNA (cpDNA) has been one of the most widely used resources in plant evolutionary and population studies (Okaura & Harada 2002; Dobes *et al.* 2004; Alsos *et al.* 2005); especially important are the intergenic regions that tolerate mutations and evolve rapidly without affecting the functions of adjacent genes (Hamilton *et al.* 2003). Besides, the common uniparental non-recombining inheritance is one of the advantages of these markers for differential evaluation of the flow of pollen and seeds (Hamilton & Miller 2002).

The above-indicated situation provides an unusual opportunity to investigate a cluster of geographically restricted species in a framework of documented past and more recent events. Therefore, we investigated the natural history of a set of six species of the genus *Petunia* (*P. altiplana*, *P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii*, *P. saxicola* and *P. scheideana*) with an occurrence limited to Brazilian southern and southeastern highlands using cpDNA (*trnH-psbA* and *trnS-trnG* intergenic spacers) markers. Diversity indices, neutrality tests, phylogenetic relationships between haplotypes (networks) and demographic simulations were performed separately (by species) and jointly (considering the species group). Relationships between their genetic variability and the habitat changes, strongly altered by the paleoclimatic modifications, were made. The evolutionary implications of the advanced deforestation practiced in the region were considered, since

contact between previously isolated grasslands areas may enable the occurrence of interspecific hybridization.

Materials and methods

Sample collection

A total of 275 individuals were obtained at 50 collection points (Table 1) throughout the distribution (Fig. 1) of the six species: *P. altiplana* (90), *P. bonjardinensis* (60), *P. mantiqueirensis* (21), *P. reitzii* (22), *P. saxicola* (24) and *P. scheideana* (58). Exsiccates were made of one plant for each population, and for the genetic analysis young leaves were collected in a way that did not damage the individuals sampled. These leaves were packed in silica gel for drying and subsequent DNA extraction.

DNA extraction, amplification, and sequencing

The dried leaves were powdered with liquid nitrogen and the DNA was extracted with cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) as described by Roy *et al.* (1992). The primers described by Sang *et al.* (1997) were used for the amplification and sequencing of the *trnH-psbA* spacer, while for the *trnS-trnG* spacer we employed those described by Hamilton (1999).

PCR amplifications were performed in 25 µl reactions consisting of 1 unit *Taq* polymerase (Invitrogen), 1x buffer (Invitrogen), 0.2 mM each dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer and 20-50 ng of template genomic DNA. The amplification conditions for *trnH-psbA* were as follows: 3 min at 94°C, 30 cycles with 1 min at 94°C, 1 min at 58°C, and 1 min at 72°C, with a final 10-min extension step at 72°C. For *trnS-trnG* the conditions were the same, except for the 58°C step, substituted by a 50°C step. The PCR

products were checked by horizontal electrophoresis in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and purified with PEG 20% (Dunn & Blattner 1987). Sequencing was performed with a MegaBace 1000 automatic sequencer (Amersham Biosciences), in accordance with the manufacturer's specifications. Sequences were deposited in the GenBank, and accession numbers are listed in Table S1 (supplementary material).

Data analysis

The sequences were aligned using the ClustalX 1.81 program (Thompson *et al.* 2001) with manual correction. Whatever their sizes, the contiguous insertion/deletion events (indels) were treated as one mutational event (Simmons & Ochoterena 2000). The forms and the free energy of stem-loop hairpin structures derived from inverted sequences were determined using the MFOLD program (Zuker 2003). Evolutionary relationships between haplotypes were estimated with the Network 4.1.0.9 program (available at <http://www.fluxus-engineering.com>) using the Median Joining method ($\epsilon=0$, Bandelt *et al.* 1999). Networks were also generated using the Union of Maximum Parsimonious Trees (UMP) method (Cassens *et al.* 2005). The procedure used was maximum parsimony analysis with TBR branch swapping (1000 replicates with random sequence addition) heuristic search option in the program PAUP *4.0b10 (Swofford 2003) to save all most parsimonious trees with their respective branch lengths, that were then combined using an algorithm (CombineTree, available at http://www.ulb.ac.be/sciences/ueg/html_files/combinetree.html) that join all connections from all MP trees into a single reticulated graphic (Cassens *et al.* 2005). Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's F_s (Fu 1997) neutrality tests and the indices of haplotypic (h) and nucleotide (π) diversities (Nei 1987) were obtained with Arlequin Ver. 2.000 (Schneider *et*

al. 2000). The latter was also used to evaluate the distribution of the inter and intrapopulation genetic variation by means of an analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992), and for the calculation of pairwise mismatch distributions (Schneider & Excoffier 1999). Rates of population growth were obtained by maximum likelihood estimation based on coalescence with FLUCTUATE (Kuhner *et al.* 1998). Five runs were carried out to estimate each parameter, and their average recorded. This analysis was performed five times, using randomly generated seeds, and a search strategy of 10 short and two long Monte Carlo chains of 5000 and 50000 steps, respectively. Geographical distances were calculated using the GPS TrackMaker (available at www.gpstm.com/port/).

Results

Species ranges

The sites of the 50 collection points are listed in Table 1. For each species all plants presented a canonical morphology, as described in the literature, and no characters were observed that suggested the possibility of interspecific hybridization.

Petunia altiplana was found at 15 sites in the grasslands region (between 800 and 1500 m of altitude) of the northeast highlands of RS and east of the state of SC, totalizing 90 plants. This species, as described by Ando & Hashimoto (1993), occurs in open areas exposed directly to the sun, occupying places that have been altered, such as roadside slopes and may be considered a pioneering, colonizing species. The habitat of *P. bonjardinensis* is similar to that of *P. altiplana*, but this taxon is endemic to a small grassland region of the (1200 - 1500m) of the Santa Catarina highlands. Sixty plants were sampled at 12 collection points, all in the surroundings and within of the municipality of

Bom Jardim da Serra. The most distant populations, located at points 16 and 27, are only 21 km apart from each other.

In the Santa Catarina highlands, *P. reitzii* was found in a small grasslands region (800 - 1000m) in the municipality of Bom Retiro. The five populations sampled (with a total of 22 plants) are very close one from the other, the most distant (located at points 33 and 37) being only 8.3 km apart from each other. At about 40 km of distance, the only population of *P. saxicola* described so far can be found (municipality of Otacílio Costa), and this is certainly the rarest among the six species sampled. In a very different habitat from the rest (humid rocks), 24 plants were found at partially shadowed places.

In the northern highlands of SC and south of PR, twelve populations of *P. scheideana* were found, and 58 plants collected. This species inhabit sites that are partly in the shade between the grasslands and the edge of the *Araucaria* forest, at an altitude between 800 and 1200 meters. The original description of *P. scheideana* (Smith & Downs 1964) is fairly incomplete and relied in just one sample, collected in the SC northeast. These authors did not mention the large variability that can be found in the indument branch length, and floral stalks, probably determined by the level of shadowing which occurs in the place. Populations found near Guarapuava (PR) were described by Ando & Hashimoto (1995) as *Petunia guarapuavensis* T Ando & Hashim. But since the morphological characteristics which differentiate *P. scheideana* and *P. guarapuavensis* are vegetative and highly variable due to environmental factors, we adopted Stehmann's position, considering them synonymous due to the absence of floral characteristics that could distinguish them.

Approximately 520 km to northeast of the other species of *Petunia* sampled, five populations of *P. mantiqueirensis* (21 plants) were found in the Serra da Mantiqueira

(south of MG). The few known populations are confined to altitudes greater than 1300 m, and like *P. scheideana*, was observed between grasslands and forest.

Genetic variation

The *trnH-psbA* alignments included 433 bp (27.5% GC content) and those of *trnS-trnG* 682 bp (30.3% GC). These two regions were combined in a single alignment (totalizing 1115 bp). Among the 275 plants analyzed, 49 haplotypes were found (Table 1). Of these, 45 were present in one species only: 24 in *P. altiplana*, 9 in *P. bonjardinensis*, two in *P. mantiqueirensis*, one in *P. reitzii* and nine in *P. scheideana*. Four haplotypes were shared by individuals of two species: H1 (*P. altiplana*/*P. bonjardinensis*), H12 (*P. altiplana*/*P. saxicola*), H14 (*P. altiplana*/*P. bonjardinensis*) and H40 (*P. reitzii*/*P. saxicola*).

The complete haplotype frequencies matrix across taxa is available from the authors on request; a summary of the polymorphisms found is presented in Table 2. In the *trnH-psbA* spacer insertion/deletion (indel) and substitution events were practically equivalent, whereas in *trnS-trnG* substitutions were more frequent (69%). In both spacers there was a predominance of transversions: 67% in *trnH-psbA* and 64% in *trnS-trnG*. This pattern is usually found in non-coding cpDNA sequences; the type of substitution depends of the nucleotide composition of the two immediately flanking bases: the larger the A+T content the larger the proportion of transversions (Morton 1995). Among the indels, the occurrence of perfect duplications of 6, 11 and 12 bp in *trnH-psbA* (H26, H6 and H40, respectively) and of 28 bp in *trnS-trnG* (H31) can be highlighted. Deletions of 5 and 8 bp were also found in *trnS-trnG* (H9 and H41). In *trnH-psbA* a poly-T region varied from 8 to 12 repeats (between sites 117 and 128), and a poly-A region varied from 7 to 9 repeats

(between sites 139 and 147); in *trnS-trnG* a poly A region varied from 9 to 11 repeats (between sites 942 and 952). *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola* did not present *trnS-trnG* variation, and just a few polymorphic sites (mostly indels) were found in *trnH-psbA*.

Some *P. altiplana* (36) and *P. bonjardinensis* (14) plants presented highly differentiated *trnH-psbA* sequences. In these haplotypes (H2, H9, H13, H14, H20, H22, H23, H26, H27 and H36), a small (30 bp) inversion was found between sites 356 and 386, flanked by inverted repeat sequences of 17 bp (Fig. 2). Such small inversions form stem-loop hairpin structures that usually have the function of stabilizing the corresponding mRNA molecules. Intra-molecular recombination between the inverted sequences in the stem-forming regions is responsible for generating flip-flop loop orientations (Kim & Lee 2005). The forms of each stem-loop forming region are displayed in Fig. 2, and the free energy estimates of the two orientations were -14.3 (in the most frequent form, found in all species studied; Fig. 2a) and -15.6 (in the form found in some individuals of *P. altiplana* and *P. bonjardinensis*; Fig. 2b). The estimated free energy values indicate that flip-flop changes generate thermodynamically similar stable structures. Thus, these flip-flop inversions may be viewed as selectively neutral, the two forms being interchangeable without a notable energy cost. These small inversions generate a large number of differences in the sequence alignment, and their use may have strong effects in the topology of the trees (Kim & Lee 2005). Previous observations showed that these small inversions were formed by several parallel or back mutations during the recent evolution of *Petunia*. Therefore, these polymorphisms were removed from the analyses and network constructions, but were considered as a distinctive character to define haplotypes.

Networks

The concatenated sequences of the two spacers were used to build the median-joining networks. Besides a network with all the data, the species that presented more than two haplotypes (*P. altiplana*, *P. bonjardinensis* and *P. scheideana*) were analyzed separately. After an initial run with all polymorphisms, the potentially rapidly mutating characters were identified and downweighted or removed in a subsequent analysis. In this way, two regions located in the *trnH-psbA* spacer were not taken into account in building the networks: the inverted region of 30 bp present in some sequences of *P. altiplana* and *P. bonjardinensis*; and the 126/127/128 sites (poly-T region), probably generated by events of slipped-strand mispairing during DNA replication or repair (Aldrich *et al.* 1988).

Descriptions of the haplotypes grouped after the removal of these characters are in the legends of Figures 3 and 5. In the *P. altiplana* network (Fig. 3) geographically defined groups are observed: one clade is formed by the haplotypes of plants collected in RS, and the other by those obtained in SC. They are separated by a single mutation, indicating that their divergence between should not be very old. In *P. scheideana* network (Fig. 4) the most closely related haplotypes occur in individuals from localities that are near to each other. The most differentiated haplotype (H41) occurs in the most distant populations (points 39 and 40), located about 200 km apart from the others. Points 39 and 40 are located in the Serra do Mar, while the others are in the Serra Geral, two different mountain complexes. On the other hand, no spatial structuring was detected in *P. bonjardinensis*, possibly due to the geographical closeness and recent origin of the populations, indicated by the small number of mutations between haplotypes. When all species were analyzed together, a network was obtained with a star-like topology, with a central grouping (G6) composed by haplotypes of *P. altiplana*, *P. bonjardinensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola*

connected by few mutations (Fig.5). The lack of well differentiated clades between the species and the haplotype sharing reinforce the hypothesis that the group underwent a recent diversification process.

Diversity indices and neutrality tests

Since the markers used presented distinct patterns of variability, the diversity and neutrality analyses were performed considering each marker separately and jointly (Table 3). When the six species are analysed as a group, the *trnH-psbA* marker presented higher nucleotide and haplotype diversity indices ($\pi=0.0054$; $h=0.9112$) than *trnS-trnG* ($\pi=0.0012$; $h=0.6197$). Among species, and considering both markers together the highest nucleotide diversity index was found in *P. scheideana* ($\pi=0.0027$), and the greatest haplotype diversity in *P. bonjardinensis* ($h=0.8893$). *P. mantiqueirensis* presented the lowest diversity indices ($\pi=0.0003$; $h=0.3238$). When species with a restricted distribution are compared with those of broad distribution (*P. altiplana* and *P. scheideana*), *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola* show much lower diversity indices ($p<0.05$), while *P. bonjardinensis* interestingly presents similar and even higher levels of variability than *P. altiplana* or *P. scheideana* ($p<0.05$).

The neutrality tests did not reject the null hypothesis ($p>0.05$) in the analyses where only *trnH-psbA* was considered (Table 3). When all species were considered as a group, Tajima's *D* e Fu's *F* indices presented significant values in the *trnS-trnG* and concatenated markers analyses. Among species, these indices were significant in *P. altiplana trnS-trnG*, and concatenated markers only. Fu's *F_s* index is the most appropriate to show deviations from the null model of stationary population with infinite alleles (Fu 1997); therefore the

highly significant value ($p < 0.001$) obtained when the two markers and six species were considered together is a strong indicator of recent population expansion in this group.

Mismatch distribution and demographic analyses

We also analyzed the population history of the groups using mismatch distribution, which compares observed frequencies of differences between pairs of haplotypes with those expected in different demographic models. In a recent population growth model a unimodal distribution is expected, while populations that are in demographic equilibrium generally present a multimodal pattern (Rogers & Harpending 1992). Only *P. altiplana* (in all analyses), *P. bonjardinensis* (*trnH-psbA* only) and *P. mantiqueirensis* (*trnH-psbA* and concatenated data) distributions fell within a 95% confidence interval obtained by simulation of a sudden expansion (according to Schneider & Excoffier 1999; Table 3).

Demographic data by marker estimated using Fluctuate are shown in Table 4. Significantly positive values of g (in comparison with its standard deviation) were found in the simulations performed with *P. altiplana*, *P. bonjardinensis* (*trnS-trnG* only), *P. scheideana* and when all the species were analyzed together. These data corroborate the previous analyses and agree with the hypothesis of population growth.

Population differentiation

Analyses of molecular variance were performed with all populations sampled (defined by the collection point) grouped by species, and with *P. altiplana*, *P. bonjardinensis* and *P. scheideana* populations separately (Table 5). *P. mantiqueirensis* and *P. reitzii* were not analyzed due to restricted variability and *P. saxicola* because just one population (the only known) was studied. When the interspecific variation was considered,

besides the low intrapopulation diversity (18%), levels of interpopulation variation (61%) were three times higher than those of the interspecific variation (21%). The interpopulation diversity values ranged from 55% (*P. altiplana*) to 98% (*P. scheideana*). The high level of population structuring can be related to the low seed dispersion ability and the differences among species with the number of flowers/fruits/seeds produced per plant.

Discussion

Group diversification

Most of the populations of the six species of *Petunia* that inhabit exclusively the Brazilian south and southeast highlands are allopatric. Despite the overlap of distribution areas, they were never found growing side by side. The closest populations were observed 300 m away, but in very different (syntopic) habitats. Since these are no reproductive barriers to species intercrossing (Watanabe *et al.* 1996), probably the evolutionary history of the group is related to successive processes of allopatric divergence and specialization or co-evolution with solitary bees (Stehmann 1999).

The geographic discontinuities found between these species may be associated with the floristic changes that occurred in the glacial and interglacial periods. The last glacial maximum (approximately 18,000 ybp) was especially favorable to the expansion of the habitats of these species. During this colder and drier period the limits of the grassland biome expanded northwards (Behling 2002). Possibly at this time this group of taxa could have had a more continuous distribution, occupying areas that lay further to the north. This would account for the occurrence of *P. mantiqueirensis*, considerably isolated from the other species, in the Serra da Mantiqueira. The later climate improvement and expansion of subtropical forests (10,000 – 11,000 ybp) isolated the grasslands in areas that lay at a

higher altitude in the highlands. In the southern highlands the diversification of the group may have followed an altitudinal gradient, with the colonization of microenvironments in the higher regions formed by grasslands surrounded by the *Araucaria* forest. The landscape conformation could have favored population isolation, the rise of morphological variants, and ultimately speciation. The four microendemic species of the group (*P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola*) may constitute relicts that were left after the extinction of intermediate groups with a wider distribution.

The geographic discontinuities observed in the melittophilous species of *Petunia* are also found in their pollinating bees, suggesting a common biogeographic history. Outstanding among the bees observed visiting the flowers of *P. mantiqueirensis* (J.R.Stehmann, unpublished data) was *Pseudagapostemon fluminensis* Schrottky (Halictidae). This is a species that is endemic to altitudes above 1,300 m in the Serra da Mantiqueira and neighboring mountain ranges, in the states of Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo (Cure 1989, Silveira & Cure 1993). The specialization or co-evolution that occurred between melittophilous species of *Petunia* and the solitary bees may have been a factor of confinement and restriction to their expansion. As suggested for *Petunia*, the richness and subtropical distribution of different groups of predominantly temperate groups of bees is related to the occupation that occurred during the Pleistocene glacial periods (Roubik 1989).

Shared haplotypes

Two possibilities were considered to explain haplotype sharing between species, low genetic variation and retained ancestral polymorphism or interspecific hybridization. Groups that had recent adaptative radiation could have not accumulated neutral DNA

variation, making difficult species delimitation and the interpretation of their relationships (Whittall *et al.* 2005). Low levels of variability among the species of *Petunia* had been already detected in the phylogenetic analysis of the genus based in five plastid, one nuclear, and one mitochondrial systems (Kulcheski *et al.* 2006). The plants that shared haplotypes H1 (*P. altiplana* and *P. bonjardinensis*) and H40 (*P. reitzii* and *P. saxicola*) are from geographically distant populations (H1 – at least 100 km; H40 - 41 km). As for haplotype H12, the populations were quite close, about 300 m, but in very different, syntopic, habitats. *P. altiplana*, collected at point 12, was in open grasslands, directly exposed to the sun, while *P. saxicola* (point 38) was on humid rocks of a scarp in the mountain range, at a place that was partly in the shade. The two haplotypes found in the single population of *P. saxicola* are shared with other species. If these were an indication of hybridization, part of the population (19 plants) would have hybridized with *P. altiplana* (H12) and the other (5 plants) with *P. reitzii* (H40).

None of the plants with shared haplotypes presented morphological characters indicating interspecific gene flow. Despite this, the possibility of hybridization cannot be dismissed, since there seems to be no intrinsic reproductive barriers between the six species (Watanabe *et al.* 1996); they flower during the same period and are typically pollinated by bees. Lorenz-Lemke *et al.* (2006) described the first proven case of natural hybridization in this genus, between *Petunia axillaris* and *Petunia exserta* Stehmann. Beyond this one, there is no evidence that other species of *Petunia* are hybridizing naturally. The analysis of cpDNA enables the identification of hybridization events that cannot be detected morphologically (Bleeker 2003). If after interspecific crossings the hybrid progeny backcrosses preferentially with one of the parents, the morphology of the next generations may lose the intermediate characters and become similar to this one, but the cpDNA of the

other species may remain, a phenomenon known as chloroplast capture (Schaal *et al.* 1998). In this case, the investigation of nuclear DNA is essential to identify these processes correctly.

Considering all these facts, retained ancestral polymorphism in recently diverged taxa seems to be the best explanation for haplotype sharing in the species studied. Additionally, this characteristic occurs throughout a broad geographic region, not only in the transitional areas. Such phenomena can be confounded with gene flow, induce overestimations of dispersion abilities, and genetically connect populations that already diverged a long time ago (Russell *et al.* 2005).

Evidence of population expansion

Population expansions leave several signs in the molecular diversity pattern (Schneider & Excoffier 1999). These patterns were detected when the whole group was considered, but it was not possible to identify them individually in all species. The star-shaped network (Fig. 5), high h values and low π values, the negative neutrality tests, unimodal distributions of pairwise differences and maximum-likelihood estimate of the growth parameter (g) were all consistent with population growth.

The already mentioned high cross compatibility between these species (Watanabe *et al.* 1996) and their small genetic differentiation associated with a large morphological diversification (Kulcheski *et al.* 2006) already indicated the recent origin of the genus. But it was not possible to calculate the time of this adaptive radiation, since there are no fossil records of proximally related taxa that could be used to calibrate the nucleotide substitution rates. Rates calculated from more distant taxa might not be applicable, because there may be great variability among groups (Hodges & Arnold 1994).

Population structure

The *P. altiplana* and *P. scheideana* haplotype networks presented a geographic structure. Spatial structure is common in the analysis of maternally inherited markers (Petit *et al.* 2005), as is the case of *Petunia* cpDNA (Derepas & Dulieu 1992). In these situations, the seeds are the only form of dispersion and in many cases this dispersion is limited to short distances (Cain *et al.* 2000). Under these circumstances, the populations could differentiate through isolation by distance or by allopatric divergence. The Pelotas River (Fig. 3) may have restricted the gene flow between *P. altiplana* populations, and this fact would account for the formation of the SC and RS clades. In another species of this genus, *P. axillaris*, the presence of different subspecies (*P. axillaris* subsp. *axillaris* and *P. axillaris* subsp. *parodii*) on opposite sides of the Negro River in Uruguay indicates that a river can act as a geographic barrier and limit gene flow between the populations (Ando 1996). The spatial structure found in *P. scheideana*, on the other hand, should involve isolation by distance possibly related with its low seed dispersion abilities (discussed below).

The AMOVA revealed a high population structure in the six species evaluated. This pattern has already been previously found in other species of genus (*P. integrifolia* Longo *et al.* unpublished data; *P. axillaris* and *P. exserta*, Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). No differences were found in the levels of population structure between the species with a broader distribution (*P. altiplana* and *P. scheideana*) and the more restricted ones (*P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola*). This level is generally related to the crossing and dispersion systems. Since these characteristics tend to be preserved in related species, little difference is expected in the F_{ST} values of rare or common congeners (Cole 2003). The mode of cpDNA inheritance usually plays a

significant role in the estimation of the geographic distribution of the genetic diversity. High population subdivision estimates are common in studies with maternally inherited markers, which generally present higher F_{ST} values than paternally or biparentally inherited markers, in which gene flow by pollen plays a homogenization role (Petit *et al.* 2005). The maternal inheritance of cpDNA and the restricted seed dispersion in *Petunia* (Stehmann 1999) should have greatly contributed to the high population structure found in the present investigation.

Although they are high and statistically significant, the F_{ST} values found in *P. altiplana* and *P. bonjardinensis* (0.55 and 0.78, respectively) are much lower than the one found in *P. scheideana*. Since the seed dispersion system does not appear to be differentiated, all of them having seeds entirely dispersed by free fall (autochory) (Stehmann 1999, van der Pijl 1982), maybe the difference could be related to the number of seeds produced per plant. Since the number of flowers, fruits, and seeds are positively correlated (Primack 1987), a smaller number of flowers in *P. scheideana* as compared to *P. altiplana* and *P. bonjardinensis* (J.R.Stehmann, unpublished data) could determine a lower seed production, and consequently less chances of dispersal.

Conservation

With the deforestation of the *Araucaria* forest biome (only 1% remain of the original area), instability zones were created (Medeiros *et al.* 2005), enabling contact between populations of different species, and linking grasslands that were formerly isolated by forests. A problem especially arises when rare species are placed in contact with more abundant related species (Levin *et al.* 1996). If the genetic material of the more common species introgress into the rare species this may result in the genetic dilution of

their local adaptations ("genetic swamping"; Ellstrand & Elam 1993; Lenormand 2002). Since spatial segregation seems to be main reproductive barrier between the six species studied, deforestation may significantly influence their genetic isolation.

P. bonjardinensis, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola* can be considered as highly threatened, because besides the fact that their distribution is restricted to one locality and a few known populations, the physiognomy of the regions where they occur is being highly altered by anthropic activities (Stehmann 1999). The natural grassland areas remaining in the south and southeast regions of Brazil are scarce and small (Behling 2002). *P. reitzii* and *P. saxicola* were already included in the List of Threatened Brazilian Flora, classified as critically endangered (2004 IUCN Red List of Threatened Species, available at www.iucnredlist.org). Maintaining the populations throughout the ecological and geographic gradient of the taxon of interest is considered the best way to capture most of its adaptive variation, especially when the main part of its genetic diversity is interpopulational (Ellstrand & Elam 1993).

References

- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E, Christopherson L (1988) The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics*, **14**, 137-146.
- Alsos IG, Engelskjon T, Gielly L, Taberlet P, Brochmann C (2005) Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species. *Molecular Ecology*, **14**, 2739-2753.
- Ando T (1996) Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, **47**, 19-30.
- Ando T, Hashimoto G (1993) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **111**, 265-280.
- Ando T, Hashimoto G (1995) *Petunia guarapuavensis* (Solanaceae): A new species from planalto of Paraná and Santa Catarina, Brazil. *Brittonia*, **47**, 328-334.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during late quaternary times: A synthesis. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, **177**, 19-27.
- Behling H, Bauermann SG, Neves PCP (2001) Holocene environmental changes in the São Francisco de Paula region, southern Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*, **14**, 631-639.
- Bleeker W (2003) Hybridization and *Rorippa austriaca* (Brassicaceae) invasion in Germany. *Molecular Ecology*, **12**, 1831-1841.
- Cain ML, Milligan BG, Strand AE (2000) Long-distance seed dispersal in plant populations. *American Journal of Botany*, **87**, 1217-1227.
- Cassens I, Mardulyn P, Milinkovitch MC (2005) Evaluating intraspecific “network” construction methods using simulated sequence data: Do existing algorithms outperform the global maximum parsimony approach? *Systematic Biology*, **54**, 363-372.
- Cole CT (2003) Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**, 213-237.

- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*, **3**, 432-438.
- Cure JR (1989) Revisão de *Pseudagapostemon* Schrottky e descrição de *Oragapostemon*, gen. n. (Hymenoptera, Halictidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **33**, 229-335.
- Derepas A, Dulieu H (1992) Inheritance of the capacity to transfer plastids by pollen parent in *Petunia hybrida* Hort. *Journal of Heredity*, **83**, 6-10.
- Dobes CH, Mitchell-Olds T, 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.
- Dunn IS, Blattner FR (1987) Charons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*, **15**, 2677-2698.
- Ellstrand NC, 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, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 513-525.
- Hamilton MB, Miller JR (2002) Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics*, **162**, 1897-1909.
- Hamilton MB, Braverman JM, Soria-Hernandez df (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 1710-1721.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, **10**, 537-549.

- Hodges SA, Arnold ML (1994) Columbines: a geographically widespread species flock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5129-5132.
- Hwang S-H, Lin T-P, MA C-S *et al.* (2003) Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology*, **12**, 2689-2695.
- Kim K-J, Lee H-L (2005) Widespread occurrence of small inversions in the chloroplast genomes of land plants. *Molecules and Cells*, **19**, 104-113.
- Kuhner MK, Yamato J, Felsenstein J (1998) Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics*, **149**, 429-434.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP *et al.* (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica*, **126**, 3-14.
- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 183-189.
- Levin DA, Francisco-Ortega J, Jansen RK (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology*, **10**, 10-16.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC *et al.* (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): A molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology* (in press).
- Medeiros JD, Savi M, Brito BFA (2005) Seleção de áreas para criação de unidades de conservação na floresta ombrófila mista. *Biotemas*, **18**, 33-55.
- Morton BR (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.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Okaura T, Harada K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity*, **88**, 322-329.
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Fineschi S *et al.* (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, **14**, 689-701.
- Primack RB (1987) Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 409-430.

- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569.
- Roth L, Lorscheitter ML (1993) Palynology of a bog in Parque Nacional de Aparados da Serra, east plateau of Rio Grande do Sul, Brazil. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*, **8**, 39-69.
- Roubik DW (1989) *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Roy A, Frascaria N, MacKay J, Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**, 173-180.
- Russell AL, Medellín RA, McCracken GF (2005) Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology*, **14**, 2207-2222.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1120-1136.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, **7**, 465-474.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**, 10179-10189.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *ARLEQUIN, Version 2.000: a software program for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Silveira FA, Cure JR (1993) High-altitude bee fauna of southeastern Brazil: implications for biogeographic patterns (Hymenoptera: Apoidea). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **28**, 47-55.
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, **49**, 369-381.
- Smith LB, Downs R (1964) Notes on the Solanaceae of Southern Brazil. *Phytologia*, **10**, 422-453.

- Stearns SC, Hoekstra RF (2000) *Evolution: an introduction*. Oxford University Press, New York.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. PhD thesis, Universidade Estadual de Campinas.
- Stehmann JR, Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. In: *Festschrift for William G. Darcy: the legacy of a taxonomist* (Eds Keating RC, Hollowell VC, Croat TB), Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis, pp 341-348.
- Swofford DL (2003) PAUP*, *phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (2001) *ClustalX*. Available at <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx>.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H *et al.* (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, **49**, 115-133.
- van der Pijl A (1982) *Principles of dispersal in higher plants*, 2nd Edition. Springer Verlag, Berlin.
- Watanabe H, Ando T, Iida S *et al.* (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 JB, Medina-Marino A, Zimmer EA, Hodges AS (2005) Generating single-copy nuclear gene data for a recent adaptive radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**, 124-134.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3406-3415.

Acknowledgements

To Patrícia Koehler-Santos for help in the analyses, and to Cladinara Roberts Sarturi for sequencing facilities. This project was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Institutos do Milênio, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS), and Fundação Biodiversitas/ CEPF (Programa de Espécies Ameaçadas).

Figure legends

Fig. 1. Map of the collecting places. The regions sampled for *P. altiplana* and *P. scheideana* are represented by gray shading while those for *P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola* are given in black. The RS, SC, PR, SP and MG abbreviations indicate the following Brazilian States: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais.

Fig 2. The forms of each stem-loop forming region observed in the *trnH-psbA* spacer. A) The most frequent form, found in all species ($-\Delta G = -14.3$); B) Form observed in some individuals of *P. altiplana* and *P. bonjardinensis* ($-\Delta G = -15.6$).

Fig 3. *Petunia altiplana* median-joining network based on the combined analysis of the two cpDNA markers. Each circle represents a haplotype or a group, and the sizes of the former are proportional to their frequencies. Transversal bars indicate the number of mutations that differentiates the haplotypes. Some of them have been grouped: G1 (H1,

H2, H17, H19, H20); G2 (H3, H4); G3 (H7, H8), G4 (H12, H13, H16, H25) and G5 (H14, H22, H23, H24).

Fig 4. *Petunia scheideana* median-joining network based on the combined analysis of the two cpDNA markers.

Fig 5. Median-joining network based on concatenated cpDNA markers. The different shadings indicate the species. Grouped haplotypes: G6 (H1, H2, H12, H13, H16, H17, H19, H20, H21, H25, H39); G7 (H37, H38), G8 (H28, H29, H30); G9 (H32, H36); G10 (H15, H34); G11 (H14, H22, H23, H24); G12 (H3, H4); G13 (H7, H8); G14 (H47, H48) and G15 (H44, H49).

Table 1 *Petunia* populations sampled for cpDNA analysis

Species	Places of collection	Geographical coordinates, altitude	Voucher	Haplotypes*
<i>Petunia altiplana</i>	1. São Francisco de Paula/RS	29°25'13"S/50°30'03"W, 907m	BHCB [†] 79906	H1(2), H2(1)
	2. Jaquirana/RS	29°07'18"S/50°26'38"W, 941m	BHCB 79907	H7(1), H10(1), H11(1)
	3. Jaquirana/RS	29°01'31"S/50°15'58"W, 886m	BHCB 87267	H17(1), H18(1)
	4. Cambará do Sul/RS	29°05'32"S/50°11'18"W, 930m	BHCB 79907	H1(4), H3(1), H4(2), H5(1), H6(1), H7(1), H8(1), H9(1)
	5. Cambará do Sul/RS	29°10'14"S/50°05'55"W, 897m	BHCB 87269	H19(2), H20(1), H21(1)
	6. São Joaquim/SC	28°13'15"S/49°47'36"W, 1463m	BHCB 80100	H15(1)
	7. São Joaquim/SC	28°12'53"S/49°47'29"W, 1424m	JRS 4371	H14(2), H23(4), H24(3), H25(1), H26(1), H27(3)
	8. São Joaquim/SC	28°10'06"S/49°45'41"W, 1205m	BHCB 80101	H14(2), H16(6)
	9. Urubici/SC	28°04'04"S/49°36'42"W, 1404m	JRS 4357	H14(16), H22(1), H23(1)
	10. Urubici/SC	28°00'26"S/49°32'18"W, 915m	BHCB 80075	H14(2)
	11. Otacílio Costa/SC	27°39'48"S/49°45'07"W, 893m	JRS 4348	H12(14)
	12. Otacílio Costa/SC	27°35'36"S/49°44'23"W, 844m	BHCB 80064	H12(1)
	13. Otacílio Costa/SC	27°36'47"S/49°47'49"W, 839m	BHCB 80062	H12(3), H13(1)
	14. Otacílio Costa/SC	27°36'16"S/49°58'44"W, 837m	JRS 3323	H12(3)
	15. Otacílio Costa/SC	27°34'56"S/50°00'05"W, 826m	BHCB 80059	H12(1)
<i>Petunia bonjardinensis</i>	16. Bom Jardim da Serra/RS	28°16'20"S/49°45'28"W, 1334m	JRS 4374	H33(2), H34(4)
	17. Bom Jardim da Serra/RS	28°16'31"S/49°45'20"W, 1383m	BHCB 80098	H14(8)
	18. Bom Jardim da Serra/RS	28°17'56"S/49°43'54"W, 1351m	BHCB 80097	H14(4)
	19. Bom Jardim da Serra/RS	29°19'54"S/49°41'24"W, 1245m	BHCB 80080	H28(2)
	20. Bom Jardim da Serra/RS	28°22'24"S/49°38'04"W, 1453m	BHCB 80093	H28(1), H32(1)
	21. Bom Jardim da Serra/RS	28°20'25"S/49°37'52"W, 1239m	BHCB 80092	H1(4), H29(2), H30(3)
	22. Bom Jardim da Serra/RS	28°20'53"S/49°37'28"W, 1305m	JRS 3356	H29(3)
	23. Bom Jardim da Serra/RS	28°19'11"S/49°37'13"W, 1339m	JRS 4397	H32 (2), H36(2)
	24. Bom Jardim da Serra/RS	28°19'46"S/49°37'18"W, 1313m	JRS 4395	H32(6)
	25. Bom Jardim da Serra/RS	28°20'20"S/49°36'55"W, 1257m	BHCB 80085	H29(3)
	26. Bom Jardim da Serra/RS	28°20'34"S/49°36'23"W, 1263m	BHCB 80086	H31(8)
	27. Bom Jardim da Serra/RS	28°22'10"S/49°34'17"W, 1405m	JRS 4392	H30(4), H35(1)

Table 1 Cont.

Species	Places of collection	Geographical coordinates	Voucher	Haplotypes*
<i>Petunia mantiqueirensis</i>	28. Camanducaia/MG	22°42'35"S/45°56'50"W, 1677m	BHCB 78264	H37(10)
	29. Gonçalves/MG	22°41'45"S/45°55'28"W, 1577m	BHCB 78270	H37(1)
	30. Camanducaia/MG	22°41'21"S/45°54'11"W, 1463m	BHCB 78265	H37(4)
	31. Gonçalves/MG	22°40'57"S/45°52'49"W, 1438m	BHCB 78268	H37(2)
	32. Gonçalves/MG	22°40'31"S/45°52'33"W, 1421m	BHCB 78269	H38(4)
<i>Petunia reitzii</i>	33. Bom Retiro/SC	27°51'02"S/49°29'46"W, 883m	BHCB 80068	H39(2)
	34. Bom Retiro/SC	27°51'11"S/49°27'02"W, 880m	BHCB 80074	H39(5)
	35. Bom Retiro/SC	27°51'03"S/49°26'47"W, 875m	BHCB 80069	H39(4)
	36. Bom Retiro/SC	27°50'57"S/49°25'56"W, 891m	BHCB 80071	H40(6)
	37. Bom Retiro/SC	27°51'23"S/49°24'43"W, 917m	BHCB 80073	H39(5)
<i>Petunia saxicola</i>	38. Petrolândia/SC	27°35'31"S/49°44'15"W, 830m	BHCB 80065	H12(19), H40(5)
<i>Petunia scheideana</i>	39. Campo Alegre/SC	26°12'28"S/49°18'25"W, 835m	JRS 3310	H41(3)
	40. Campo Alegre/SC	26°12'29"S/49°18'46"W, 879m	JRS 3312	H41(10)
	41. Prudentópolis/PR	25°12'04"S/50°57'23"W, 805m	JRS 4236	H42(10)
	42. Guarapuava/PR	25°20'10"S/51°13'00"W, 1148m	JRS 4251	H43(5)
	43. Guarapuava/PR	25°21'50"S/51°21'00"W, 1109m	JRS 4255	H44(3)
	44. Guarapuava/PR	25°22'19"S/51°16'43"W, 1190m	JRS 4253	H43(13)
	45. Guarapuava/PR	25°25'05"S/51°40'17"W, 1036m	JRS 4262	H43(1), H45(1)
	46. Guarapuava/PR	25°27'33"S/51°31'14"W, 1053m	JRS 4273	H46(3)
	47. Guarapuava/PR	25°28'50"S/51°32'18"W, 971m	JRS 4280	H46(5)
	48. Bituruna/PR	26°09'21"S/51°32'32"W, 898m	JRS 4291	H47(1)
	49. Bituruna/PR	26°17'12"S/51°29'24"W, 1133m	JRS 4297	H48(2)
	50. Matos Costa/SC	26°32'44"S/51°09'08"W, 1087m	JRS 4316	H49(1)

* Based on concatenated cpDNA markers. Numbers of individuals found per haplotype are indicated in parentheses.

† BHCB Herbarium, Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Table 2 Number of collection points, plants sampled, and haplotypes, as well as the types of polymorphisms found

	<i>P. altiplana</i>	<i>P. bonjardinensis</i>	<i>P. mantiqueirensis</i>	<i>P. reitzii</i>	<i>P. saxicola</i>	<i>P. scheideana</i>	Total
No. of collection points	15	12	5	5	1	12	50
No. of plants sampled	90	60	21	22	24	58	275
No. of haplotypes	27	11	2	2	2	9	49*
<i>trnH-psbA</i>							
transitions	2	2	-	-	-	-	3
transversions	3	1	-	1	1	4	6
indels	7	3	1	3	2	3	10
inversions	1	1	-	-	-	-	1
<i>trnS-trnG</i>							
transitions	3	1	-	-	-	1	4
transversions	5	1	-	-	-	2	7
indels [†]	3	2	-	-	-	1	5

*Four haplotypes were shared by plants of two species: H1 (*P. altiplana/P. bonjardinensis*), H12 (*P. altiplana/P. saxicola*), H14 (*P. altiplana/P. bonjardinensis*), and H40 (*P. reitzii/P. saxicola*).

Table 3 Diversity and neutrality indices, mismatch distribution and parameters of demographic expansion

		<i>P. altiplana</i>	<i>P. bonjardinensis</i>	<i>P. mantiqueirensis</i>	<i>P. reitzii</i>	<i>P. saxicola</i>	<i>P. scheideana</i>	Total
<i>trnH-psbA</i>	nucleotide diversity π (SD*)	0.0041 (0.0027)	0.0048 (0.0031)	0.0008 (0.0009)	0.0040 (0.0027)	0.0025 (0.0019)	0.0042 (0.0028)	0.0054 (0.0034)
	haplotype diversity h (SD)	0.7878 (0.0294)	0.8497 (0.0218)	0.3238 (0.1082)	0.4156 (0.0902)	0.3442 (0.0987)	0.7913 (0.0289)	0.9112 (0.0080)
	Tajima's D	-0.7837 ^{NS}	1.3527 ^{NS}	-	0.8953 ^{NS}	0.4803 ^{NS}	0.2780 ^{NS}	-0.8612 ^{NS}
	Fu's F_s	-1.9047 ^{NS}	1.2648 ^{NS}	-	1.1162 ^{NS}	0.8470 ^{NS}	-0.0544 ^{NS}	-3.2368 ^{NS}
	mismatch distribution	unimodal [†]	unimodal [†]	unimodal [†]	bimodal	bimodal	bimodal	unimodal
<i>trnS-trnG</i>	nucleotide diversity π (SD)	0.0011 (0.0009)	0.0009 (0.0007)	-	-	-	0.0018 (0.0013)	0.0012 (0.0010)
	haplotype diversity h (SD)	0.5076 (0.0561)	0.4904 (0.0724)	-	-	-	0.7411 (0.0266)	0.6197 (0.0302)
	Tajima's D	-1.4700 ^{p=0.051}	-0.7006 ^{NS}	-	-	-	0.4081 ^{NS}	-1.4914 ^{p=0.043}
	Fu's F_s	-5.4309 ^{p=0.003}	-0.8554 ^{NS}	-	-	-	0.3426 ^{NS}	-7.7853 ^{p=0.007}
	mismatch distribution	unimodal [†]	unimodal	-	-	-	unimodal	unimodal
<i>trnH-psbA</i> and <i>trnS-trnG</i>	nucleotide diversity π (SD)	0.0022 (0.0014)	0.0023 (0.0014)	0.0003 (0.0003)	0.0016 (0.0011)	0.0010 (0.0008)	0.0027 (0.0016)	0.0028 (0.0016)
	haplotype diversity h (SD)	0.8427 (0.0252)	0.8893 (0.0155)	0.3238 (0.1082)	0.4156 (0.0902)	0.3442 (0.0987)	0.8028 (0.0277)	0.9331 (0.0065)
	Tajima's D	-1.3847 ^{NS}	0.5724 ^{NS}	-	0.8953 ^{NS}	0.4803 ^{NS}	0.4109 ^{NS}	-1.3869 ^{p=0.051}
	Fu's F_s	-7.4128 ^{p=0.002}	0.9070 ^{NS}	-	1.1162 ^{NS}	0.8470 ^{NS}	-0.6691 ^{NS}	-12.1451 ^{p<0.001}
	mismatch distribution	unimodal [†]	unimodal	unimodal [†]	bimodal	bimodal	bimodal	bimodal

* SD, standard deviation. ^{NS} not significant.

[†] Goodness-of-fit statistic fell within a 95% confidence interval obtained by simulation (sudden expansion).

- Indices that could not be calculated due to absence of variability.

Table 4 Fluctuate simulation results by marker. Population size is represented by two parameters: the exponential growth rate g and the present day value of theta ($\Theta=2N\mu$ in a haploid genome). Positive values of g indicate population growth, negative ones, decline

		<i>P. altiplana</i>	<i>P. bonjardinensis</i>	<i>P. mantiqueirensis</i>	<i>P. reitzii</i>	<i>P. saxicola</i>	<i>P. scheideana</i>	Total
<i>trnH-psbA</i>	g	1591.5769	125.5743 [†]	1000 [†]	18.8497 [†]	2316.8135 [†]	857.6745	816.9317
	SD*	214.6633	417.9037	33122.0059	1080.6614	2083.6795	385.5685	80.1325
	Θ	0.0112	0.0019	0.00008	0.0006	0.0007	0.0037	0.0214
	SD	0.0008	0.0003	0.00005	0.0002	0.0003	0.0005	0.0008
<i>trnS-trnG</i>	g	5255.2026	7923.0443	-	-	-	2028.2823	1651.7347
	SD	461.107	1916.7742				892.9174	116.7511
	Θ	0.0108	0.0015	-	-	-	0.0017	0.0294
	SD	0.001	0.0002				0.0002	0.0012

* SD, standard deviation.

[†] Inconclusive results.

Table 5 AMOVA and F_{ST} analyses from plants of different species

General total	percentage of variation			F_{ST}
	among species	among populations within species	within populations	
	20.72	60.92	18.36	0.8164*
	among populations		within populations	
<i>P. altiplana</i>	54.96		45.04	0.5496*
<i>P. bonjardinensis</i>	78.40		21.60	0.7840*
<i>P. scheideana</i>	98.01		1.99	0.9801*

* $p < 0.001$

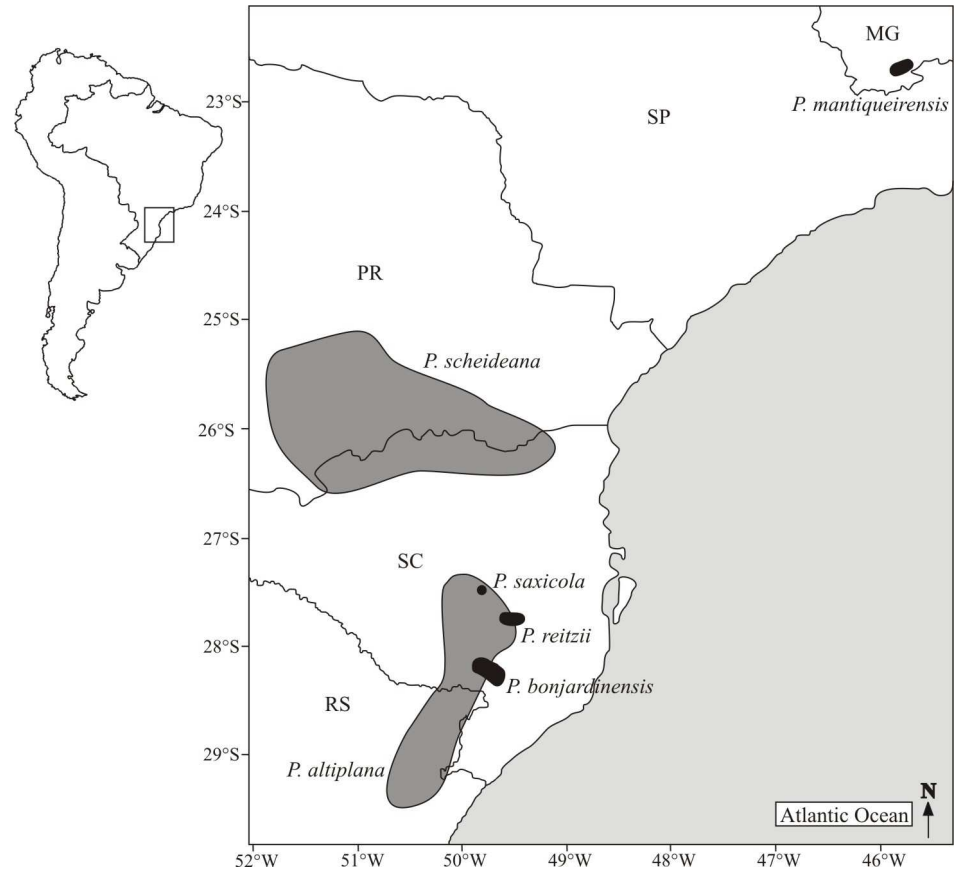


Figure 1

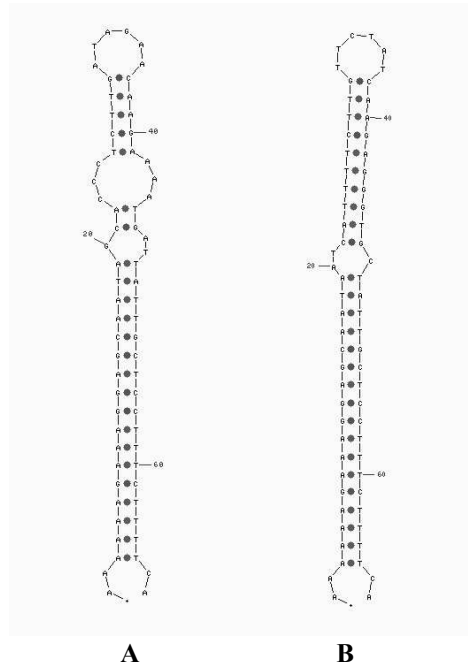


Figure 2

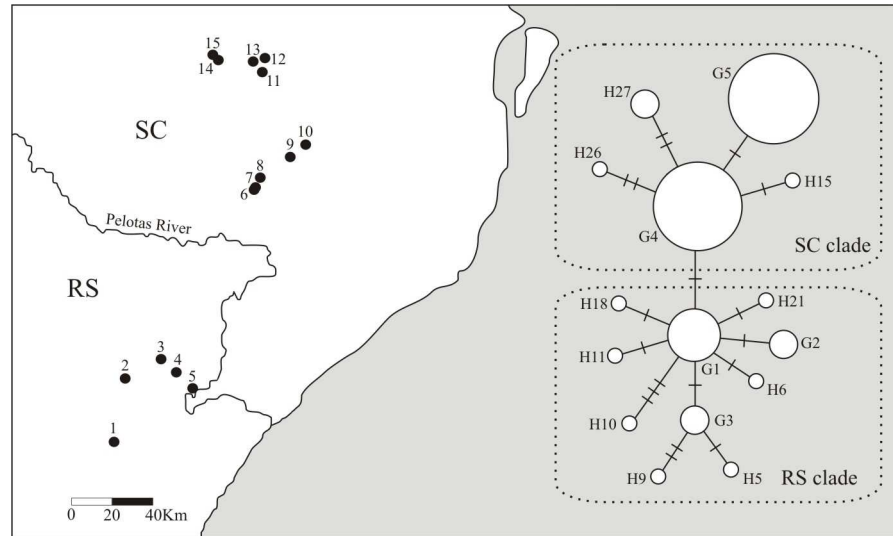


Figure 3

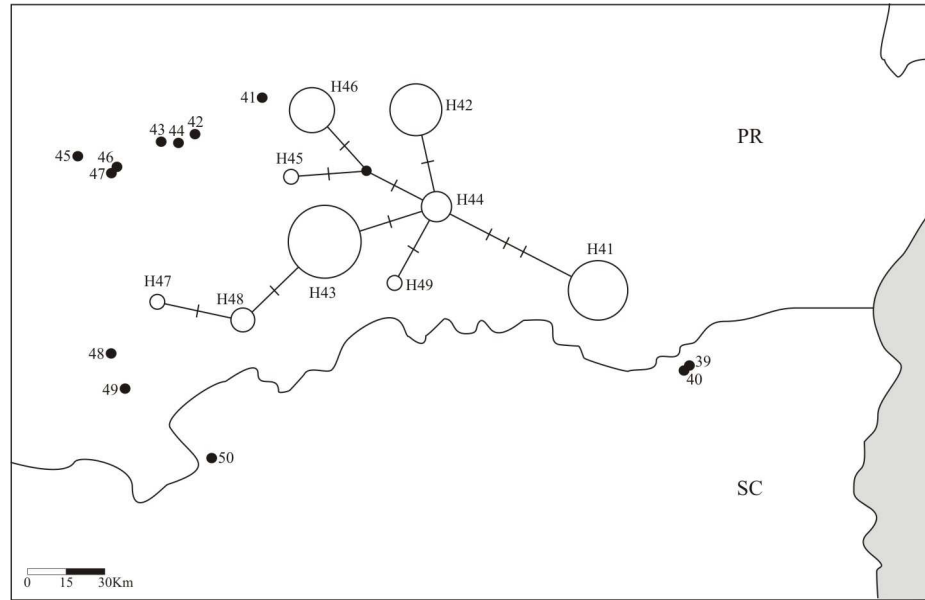


Figure 4

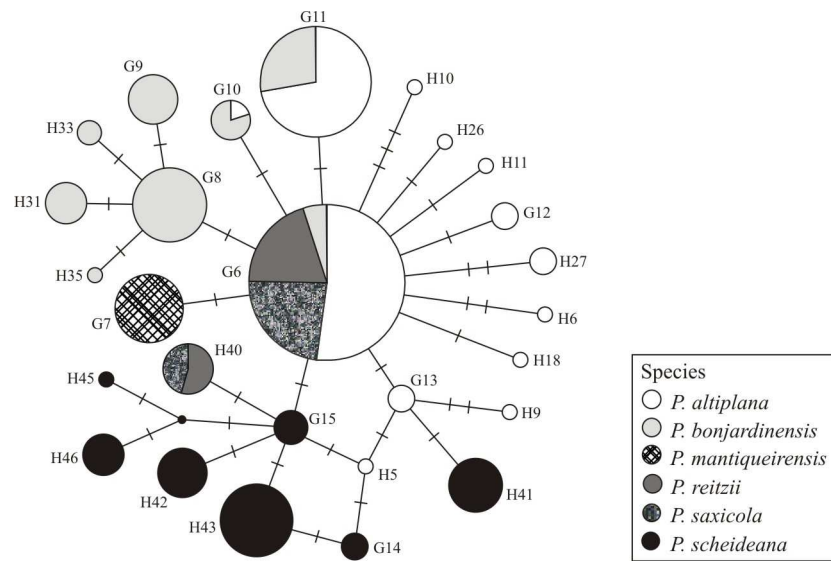


Figure 5

Capítulo VI

Discussão

VI.1 A delimitação das espécies e o isolamento reprodutivo

Especiação e isolamento reprodutivo nem sempre estão ligados em processos de diversificação de plantas. O isolamento reprodutivo pode surgir diretamente através da ação da seleção natural sobre caracteres relacionados com o sucesso reprodutivo ou indiretamente como uma consequência da divergência adaptativa entre as populações (Johnson & Steiner 2000).

Em nenhum dos três casos aqui investigados há o isolamento reprodutivo total entre as espécies. A possibilidade de hibridação indica que, mais do que reprodutivamente isoladas, as espécies incluídas neste estudo podem ser definidas como grupos de populações que estão (ou foram) geneticamente isoladas e que podem ser reconhecidas através de suas divergências morfológicas e ecológicas.

A morfologia foi a principal base para o reconhecimento destas espécies. Através destes dados, estabelecemos as unidades taxonômicas e avaliamos suas relações evolutivas através da análise de marcadores moleculares. De acordo com o conceito filogenético, quando comparados com outros grupos, os genes de indivíduos de uma mesma espécie são mais relacionados e apresentam um ancestral comum mais recente (Avice 2000). As caracterizações genéticas realizadas nos estudos aqui descritos indicaram que o conceito filogenético pode ser utilizado na delimitação de *Passiflora actinia* e *Passiflora elegans*, as quais possuem linhagens de nrDNA e cpDNA bem distintas. Por outro lado, as espécies de *Petunia* apresentaram pouca divergência genética, hibridação e retenção de polimorfismo ancestral causando o compartilhamento de linhagens de cpDNA entre elas, o que restringe

a aplicação deste conceito no gênero, pelo menos com a análise destes marcadores. Portanto, as espécies de *Petunia* consideradas neste estudo foram delimitadas através de suas diferenças morfológicas (revisadas por Stehmann 1999) e ecológicas evidenciadas pela ocupação de diferentes regiões e habitats.

VI.2 Os mecanismos de diversificação

A segregação espacial e a diversificação ecológica foram os principais fatores envolvidos no isolamento genético de populações e no surgimento de novas espécies dos gêneros *Passiflora* e *Petunia* na região sul do Brasil. Este padrão é comum em plantas, onde geralmente as espécies incipientes ocorrem em ambientes diferentes ou utilizam recursos distintos. Entre as forças que modelam os padrões de diversificação, podemos citar elementos abióticos do habitat, como o clima, tipo de solo, intensidade de luz e disponibilidade de recursos; e as interações com outras espécies como competição, mutualismo, predação, parasitismo e sistemas de polinização (Linhart & Grant 1996).

Processos de diferenciação ecológica e especiação podem ser enfatizados em diferentes estágios. Wiens (2004) sugere que a tendência das populações em manter seu nicho ecológico ancestral (conjunto de condições bióticas e abióticas nas quais a espécie está apta a sobreviver, reproduzir e manter tamanhos populacionais viáveis) é a primeira fase na formação de espécies incipientes. Segundo este modelo, a separação de linhagens começa quando mudanças ambientais criam condições dentro da distribuição geográfica da espécie que estão fora do seu nicho ecológico ancestral. Como os indivíduos são incapazes de persistir ou dispersar nas novas condições ecológicas, a distribuição geográfica da espécie se torna fragmentada. A falha na adaptação a novos ambientes e a novas condições ecológicas é o que frequentemente isola populações e dá início ao processo de especiação

(Wiens 2004). Os modelos mais tradicionais focam a divergência subsequente e necessária para a ocupação de novos habitats. Para uma espécie expandir sua distribuição e ocupar novos ambientes, as populações têm que sofrer seleção natural divergente em caracteres morfológicos, fisiológicos e comportamentais. Nestes casos, a adaptação às novas condições ambientais e ecológicas é o que direciona as divergências evolutivas (Schluter 2001).

Áreas transicionais são de grande importância em processos de especiação, pois grande parte da variação adaptativa está concentrada nestas regiões (Smith *et al.* 2001). No século passado, o padre naturalista B. Rambo realizou extensivos levantamentos florísticos na região sul, abordando de maneira histórica a distribuição geográfica das formações vegetais. Suas análises são tão detalhadas que ainda se mantêm atuais e são amplamente utilizadas em estudos botânicos. Seus trabalhos indicaram que a Região Sul pode ser considerada uma área transicional, pois é limítrofe para a distribuição de diversas espécies de plantas: limite norte para elementos austral-antárticos (Rambo 1951a) e limite sul para elementos tipicamente tropicais (Rambo 1951b).

É neste contexto que o processo de diversificação de *Passiflora actinia* e *Passiflora elegans* está inserido. A região de parapatría entre estas espécies também representa o limite sul da Mata Atlântica. Além de *P. actinia*, muitas outras espécies de plantas têm o paralelo 30°S como limite sul de distribuição. A composição florística de Porto Alegre (RS), por exemplo, é composta por apenas 14% de espécies tipicamente tropicais, apesar da Mata Atlântica da escarpa da Serra Geral estar há menos de 50 km de distância (Rambo 1954). Esta mudança na conformação da paisagem deve estar relacionada com gradientes ambientais determinados por fatores abióticos como temperatura, pluviosidade e tipo de

solo. Esta região é um clássico divisor de solos do RS e o limite do derramamento basáltico da Serra Geral.

A dinâmica da Mata Atlântica no RS está relacionada com as modificações paleoclimáticas ocorridas no Quaternário, tendo a atual estruturação geográfica sido estabelecida somente nos últimos 10.000 anos (Behling & Negrelle 2001). Segundo Rambo (1951b), a Mata Atlântica teria como centro de diversidade e irradiação a região entre a Serra da Mantiqueira e o oceano, e sua presença no RS seria resultante de processos migratórios. Estudos palinológicos indicaram que a migração da Mata Atlântica do norte para o sul ocorreu de forma fragmentada (Lorscheitter 1997). Populações que migraram de forma descontínua, formando isolados constituídos por poucos indivíduos, estão mais sujeitas à ação da deriva genética e do endocruzamento, o que pode gerar diferenciação genética ao longo do tempo (Salomon 2001).

Além da deriva e do endocruzamento, a seleção natural também deve ter atuado no processo de divergência. *Passiflora actinia* e *Passiflora elegans* ocorrem em formações florestais similares e adjacentes, apesar disto não há relatos de simpatria entre elas. Isto sugere que algum fator ambiental é limitante para a expansão das espécies (*P. actinia* para o sul e *P. elegans* para o norte). Provavelmente as populações ancestrais também estiveram sujeitas a pressões seletivas diferentes, e somente após o surgimento de novas adaptações que possibilitaram o processo de colonização elas puderam explorar os novos ambientes, embora tenham mantido uma condição ancestral de dependência de áreas florestais e de umidade (Mata Atlântica e matas de galeria).

As análises dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS) indicaram uma possível direção evolutiva deste processo. No network (figura 1, capítulo III) pode-se reconhecer um gradiente norte-sul no relacionamento das seqüências de

Passiflora actinia, ou seja, após o surgimento desta espécie houve tempo suficiente para a diferenciação regional das populações. Em *Passiflora elegans* não foi possível detectar um padrão geográfico no relacionamento das seqüências, mas observa-se que estas são geneticamente mais próximas das seqüências das populações de *P. actinia* do RS. Como o centro de diversidade do gênero está localizado ao norte (Cervi 1997), é mais provável que *P. actinia* tenha uma origem anterior a *P. elegans*, e que esta última tenha divergido a partir de populações de *P. actinia* já diferenciadas ao sul (processo influenciado pelos deslocamentos migratórios da Mata Atlântica).

Apesar da extensa amostragem na região de contato entre *Passiflora actinia* e *Passiflora elegans* somente foi encontrado um híbrido interespecífico. Esta planta apresentava características morfológicas intermediárias, bem como cpDNA de *P. actinia* e seqüências de ITS de ambos os parentais. Os demais indivíduos analisados apresentavam seqüências de ITS coerentes com o padrão da espécie. Junto com os resultados obtidos com marcadores plastidiais, estes dados descartaram a hipótese de hibridação interespecífica não detectável morfológicamente.

Passiflora actinia e *Passiflora elegans* florescem na mesma época do ano e apresentam flores morfológicamente semelhantes que atraem o mesmo grupo de polinizadores (mamangavas; observações de campo; Prazeres 1989). No presente estudo, as populações de *P. actinia* e *P. elegans* mais próximas estavam localizadas a 9 km uma da outra. Esta distância é facilmente alcançada por mamangavas (Janzen 1971), não sendo este um impedimento para o cruzamento. Linhagens genéticas de nrDNA e cpDNA bem divergentes entre as espécies sugerem que o híbrido seja resultante de contato secundário entre populações que divergiram em alopatria, a exemplo do que foi descrito por Hewitt (2001) para outras espécies. A ausência de hibridação extensiva na região pode indicar que

o contato secundário é muito recente, ou que a diferenciação entre as espécies foi suficiente para a evolução de barreiras reprodutivas intrínsecas não completamente eficientes.

Análises filogenéticas demonstraram que as 11 espécies do gênero *Petunia* são geneticamente muito similares (Ando *et al.* 2005; Kulcheski *et al.* 2006). Estes dados combinados com sua grande diversidade morfológica indicam um processo recente de radiação adaptativa no gênero. Através da análise de espaçadores intergênicos plastidiais procuramos avaliar a dinâmica evolutiva de dois grupos de espécies relacionadas de *Petunia*, um deles ocorrente na Serra do Sudeste (RS) e o outro típico dos planaltos das regiões sul e sudeste do Brasil.

A Serra do Sudeste é considerada um dos centros de diversidade de espécies do gênero *Petunia*. Nesta região, a diversificação das síndromes florais e a ocupação diferencial de habitats devem ter sido os mecanismos determinantes para a divergência das espécies. O presente estudo investigou as relações evolutivas entre *Petunia axillaris* e *Petunia exserta*, espécies geneticamente relacionadas e que compartilham diversas características morfológicas.

Populações de *Petunia axillaris* podem ser encontradas em afloramentos rochosos e locais perturbados como beira de estradas, enquanto *Petunia exserta* habita reentrâncias rochosas de torres areníticas. Estes habitats são principalmente diferenciados pelo nível de sombreamento e tipo de substrato. Tais fatores ecológicos são de grande importância para o estabelecimento de populações vegetais. Caracteres que influenciam a eficiência de captação da luz, a produção fotossintética e a capacidade de alocação de reservas são diferenciais na adaptação de espécies que vivem em ambientes secos e rochosos, locais onde as espécies relacionadas podem não conseguir se estabelecer (Walck *et al.* 1999).

Além de ficarem espacialmente separadas, populações de plantas que crescem em solos com composição físico-química diferenciadas podem sofrer forte seleção divergente e subsequente diferenciação genética (Savolainen *et al.* 2006).

Petunia axillaris e *Petunia exserta* apresentam caracteres florais específicos para a atração de diferentes polinizadores, como a coloração da corola, a posição das anteras e do estigma e a produção de odores. Alterações em caracteres florais associados com a preferência do polinizador podem reduzir a frequência de cruzamento entre populações vizinhas através da visitação diferencial, e constituem um dos mecanismos de isolamento mais comuns em processos de especiação em plantas (Schemske & Bradshaw 1999). Mudanças em algumas destas características, como a produção de pigmentos carotenóides nas pétalas, podem levar ao isolamento reprodutivo rapidamente, pois envolvem genes de grande efeito e podem ter um controle genético relativamente simples (Bradshaw & Schemske 2003). Híbridos artificiais entre *P. axillaris* (esfingófila) e *P. integrifolia* (melitófila) têm sido utilizados para investigar a arquitetura genética das diferentes síndromes de polinização, encontrando de um a cinco *loci* que codificam características quantitativas (QTLs) envolvidos na determinação de características distintivas entre as espécies (Stuurman *et al.* 2004).

Plantas com características intermediárias entre *Petunia axillaris* e *Petunia exserta* indicaram que, atualmente, as diferenças florais e a ocupação de habitats específicos não constituem barreiras reprodutivas eficientes entre estas espécies. Estes possíveis híbridos foram encontrados dentro das reentrâncias rochosas (abrigos) nas torres areníticas, juntamente com populações de *P. exserta*. Próximas a estes locais, mas em áreas ensolaradas, foram encontradas plantas com morfologia típica de *P. axillaris*.

Os marcadores plastidiais 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 se distinguir as populações simpátricas de *Petunia axillaris* e *Petunia exserta* através das linhagens de cpDNA indica que, além das plantas com morfologia intermediária, plantas com fenótipo parental também podem representar híbridos interespecíficos.

Além da Serra do Sudeste, também foram coletadas e analisadas populações típicas de *Petunia axillaris* nas regiões central e oeste do RS. Entre os 13 haplótipos encontrados, sete são exclusivos das populações de *P. axillaris* das regiões central e oeste e seis de populações de *P. axillaris* e *P. exserta* da Serra do Sudeste. O network construído com todos os haplótipos revelou dois clados geograficamente estruturados, mas com representantes de ambas as espécies: um composto por haplótipos encontrados na Serra do Sudeste, no qual a maioria das plantas apresentava a morfologia de *P. exserta*; e outro formado por haplótipos encontrados em todas as regiões, mas composto principalmente por plantas com morfologia de *P. axillaris*.

A baixa divergência entre os clados (três modificações em 1843 nucleotídeos analisados) indica que a separação entre eles é recente. É possível que estes clados representem o conjunto genético original destas espécies nas regiões analisadas. A presença de características morfológicas e ecológicas com significados adaptativos tão diferentes indica que, para divergirem, estas espécies devem ter passado por um período de isolamento genético.

O terceiro grupo de espécies investigado foi composto por seis taxa alopátricos de *Petunia* com ocorrência exclusiva nos planaltos das regiões sul e sudeste do Brasil. *Petunia alti plana*, *Petunia bonjardinensis*, *Petunia mantiqueirensis*, *Petunia reitzii*, *Petunia*

saxicola e *Petunia scheideana* florescem na mesma época do ano e são melitófilas. A ausência de barreiras reprodutivas intrínsecas (Watanabe *et al.* 1996) e o compartilhamento de alguns visitantes florais (Stehmann 1999) indicam que a segregação espacial teve um papel fundamental no processo de diversificação do grupo. Estas espécies ocorrem em áreas montanhosas onde os campos de altitude formam mosaicos com florestas com araucária. Assim como a Mata Atlântica, estas formações vegetais tiveram sua dinâmica alterada pelas variações climáticas do Quaternário. Portanto, as disjunções geográficas entre estas espécies podem estar associadas às alterações florísticas ocorridas nos seus habitats durante este período.

O último máximo glacial (18.000 anos A.P.) foi especialmente favorável para a expansão do habitat destas espécies. Nesta época mais fria e seca, os campos de altitude expandiram-se para o norte (Behling 2002). Possivelmente, neste período tanto as petúnias quanto seus polinizadores tinham uma distribuição mais contínua e ocupavam áreas mais setentrionais. Isto explicaria a ocorrência de *P. mantiqueirensis* isolada das demais espécies na Serra da Mantiqueira, na região sudeste. A posterior melhoria climática no início do Holoceno (11.000-10.000 anos A.P.) possibilitou a expansão das florestas subtropicais e os campos ficaram isolados nas áreas de maior altitude do planalto. As quatro espécies microendêmicas do grupo (*P. bonjardinensis*, *P. mantiqueirensis*, *P. reitzii* e *P. saxicola*) podem constituir relíquias que sobraram após a extinção de grupos intermediários com distribuição mais ampla. É provável que a história evolutiva do grupo esteja relacionada com sucessivos processos de especiação alopátrica após o isolamento de populações nas áreas campestres mais altas e cercadas por floresta com araucária. A ocorrência de populações pequenas e isoladas pode ter promovido rápida divergência e a fixação de características morfológicas típicas de cada espécie.

Disjunções geográficas observadas nas espécies melitófilas de *Petunia* e do gênero irmão *Calibrachoa* também são encontradas nas abelhas polinizadoras, sugerindo uma história biogeográfica comum. Das abelhas observadas visitando as flores de *P. mantiqueirensis* (J.R. Stehmann, dados não publicados), destacou-se *Pseudagapostemon fluminensis* Schrottky (Halictidae), uma espécie endêmica das altitudes acima de 1400 m da Serra da Mantiqueira e serras vizinhas, nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Cure 1989, Silveira & Cure 1993). As populações de *Calibrachoa elegans* Miers estão restritas a uma pequena região do quadrilátero ferrífero de Minas Gerais. Stehmann & Semir (2001) observaram que esta espécie é exclusivamente polinizada pela abelha *Hexanthesa missionica* Oglobin (Colletinae), a qual só era conhecida até então na região sul do Brasil e no norte da Argentina (Michener 1989). Tanto *C. elegans* como *H. missionica* constituem as ocorrências mais setentrionais dos seus gêneros na América do Sul. Estes dados sugerem que a especialização ou co-evolução ocorrida entre as espécies melitófilas e as abelhas solitárias pode ter sido um fator de confinamento e restrição à expansão da sua distribuição geográfica. Assim como foi sugerido para *Petunia*, a riqueza e a distribuição subtropical de diversos grupos de abelhas de regiões predominantemente temperadas estão relacionadas com a ocupação ocorrida nos períodos glaciais pleistocênicos (Roubik 1989).

A análise do cpDNA indicou que a diversificação do grupo é extremamente recente. Foram encontrados 49 haplótipos distribuídos nas seis espécies. O network construído com todos os dados (figura 5, capítulo IV) apresentou uma topologia em forma de estrela, com um agrupamento central composto por haplótipos de *Petunia altiplana*, *Petunia bonjardinensis*, *Petunia reitzii* e *Petunia saxicola* conectado aos demais por

poucas mutações. Não foi possível detectar clados espécie-específicos e quatro haplótipos foram compartilhados por diferentes espécies.

Em grupos que divergiram recentemente, pode haver o compartilhamento de haplótipos por diferentes espécies devido à retenção de polimorfismos ancestrais (Neigel 2002). Estes processos estocásticos podem ser confundidos com fluxo gênico, levar a superestimativas da capacidade de dispersão e conectar geneticamente populações que já divergiram há muito tempo (Russell *et al.* 2005). O compartilhamento também poderia ser interpretado como hibridação interespecífica, mas alguns padrões encontrados nas unidades taxonômicas que estudamos reforçam a hipótese de retenção de polimorfismos ancestrais: (i) há haplótipos compartilhados ao longo de uma ampla região geográfica e não somente nas áreas de contato dos diferentes taxa; (ii) nenhuma das plantas que apresentaram haplótipos compartilhados com outra espécie apresentava caracteres morfológicos que indicassem fluxo gênico interespecífico.

VI.3 Implicações para programas de conservação

A destruição e fragmentação de habitats e as alterações nos padrões de fluxo gênico estão entre as maiores ameaças para a viabilidade e a persistência das populações das espécies analisadas.

Séculos de desmatamento reduziram drasticamente o tamanho das formações florestais onde *Passiflora actinia* e *Passiflora elegans* são encontradas. Fragmentos florestais remanescentes são expostos a mudanças dramáticas nas condições microclimáticas, sendo os ambientes biótico e abiótico grandemente alterados nas áreas limítrofes (efeito de borda). Para algumas espécies de plantas, pequenas mudanças nas condições do solo e na disponibilidade de luz e água podem afetar a estrutura demográfica

das populações, particularmente o estabelecimento de plântulas (Ohara *et al.* 2006). É possível que a fragmentação tenha afetado o padrão de crescimento e a densidade populacional de *P. actinia* e *P. elegans*, as quais ocorrem tipicamente na borda de florestas.

Plantas de fecundação cruzada obrigatória, que dependem de polinizadores especializados para a formação de frutos e sementes, podem ser mais suscetíveis à fragmentação do habitat. Este é o caso de *Passiflora actinia*, *Passiflora elegans*, e das seis espécies melitófilas de *Petunia*. Nestas espécies, a diminuição populacional e o aumento da distância entre os indivíduos podem dificultar o encontro de parceiros compatíveis. Além disso, o tamanho e a densidade populacional estão relacionados com a atração aos polinizadores e têm influência significativa no sucesso reprodutivo. Como populações pequenas podem ser menos atrativas aos polinizadores, a redução no tamanho populacional pode diminuir a produção de frutos e sementes devido à transferência insuficiente de pólen. Reduções no número de sementes produzidas podem trazer sérias conseqüências para estas espécies, uma vez que aumentam a probabilidade de extinção de populações (Memmott *et al.* 2004; Ohara *et al.* 2006).

O fluxo gênico interespecífico pode ser considerado como um fator de risco para algumas espécies de *Petunia*, especialmente para as microendêmicas. Cruzamentos interespecíficos entre uma espécie rara e uma comum podem ter duas conseqüências. Se a progênie híbrida for vigorosa e fértil, pode haver a perda da diferenciação fenotípica e genética e a espécie rara ser assimilada pela comum (Rhymer & Simberloff 1996). Se a progênie híbrida é estéril ou tem vigor diminuído, então a espécie rara pode ser prejudicada por depressão exogâmica. O tamanho relativo das populações determinará o impacto da hibridação interespecífica. Quanto mais a espécie comum for numericamente superior, maior será o risco para a espécie rara (Ellstrand & Elam 1993).

O impacto da extensiva hibridação interespecífica sobre o valor adaptativo de *Petunia exserta* não pôde ser avaliado, especialmente porque não conseguimos determinar se este é um fenômeno histórico estável, que não traz conseqüências prejudiciais para a espécie, ou se é um processo recente, talvez até impulsionado por distúrbios antropogênicos. A diferenciação morfológica existente entre *Petunia axillaris* e *P. exserta*, principalmente no que se refere aos caracteres florais especializados na atração de diferentes polinizadores, indica que elas passaram por um período de isolamento genético. Este isolamento pode ter sido espacial ou mediado pelas diferenças nos sistemas de polinização. Portanto, a hibridação pode ter se originado de duas maneiras: através da expansão da espécie mais comum (*P. axillaris*) que se tornou parapátrica ou simpátrica da espécie rara (*P. exserta*); ou através de alterações no sistema de polinização.

Ambos os casos podem ter causas antropogênicas. A introdução de espécies não nativas e a modificação do habitat podem colocar espécies previamente isoladas em contato (Rhymer & Simberloff 1996). E a destruição e fragmentação dos ambientes naturais podem afetar o comportamento e a biologia populacional de animais polinizadores, alterando suas interações com as plantas (Memmott *et al.* 2002).

A modificação do ambiente pode colocar outro grupo de petúnias em risco de perda de diferenciação genética e morfológica. Os campos de altitude e as florestas com araucária têm sido fortemente alterados pela atividade humana, sendo a derrubada de florestas, a agricultura e o pastoreio os principais fatores transformantes da vegetação original (Behling 2002). Como a segregação espacial é o principal mecanismo de isolamento genético entre as petúnias exclusivas do planalto, áreas de campo previamente isoladas por florestas podem entrar em contato e possibilitar o fluxo gênico entre populações de diferentes espécies.

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, percebemos o quanto é urgente a criação de estratégias de conservação para as espécies analisadas, em especial para as microendêmicas. Inicialmente, o estudo desenvolvido na Serra do Sudeste também tinha como objetivo estudar outra espécie endêmica da região, *Petunia secreta* Stehmann & Semir. As flores de *P. secreta* possuem corola de coloração magenta, típica de espécies melitófilas, mas o tubo é muito estreito e comprido, deixando o néctar praticamente inacessível para abelhas com língua curta, sendo apenas o pólen disponibilizado para os visitantes. Estas características morfológicas indicam que a espécie poderia estar secundariamente ajustada à melitofilia e que, provavelmente, teria se originado de ancestrais que utilizavam polinizadores de língua comprida como mariposas e beija-flores, aptos para alcançar a câmara nectarífera, como *Petunia axillaris* e *Petunia exserta* (Stehmann 1999). Nos anos 90, grandes populações desta espécie eram facilmente encontradas em afloramentos rochosos da formação Pedra do Segredo (Stehmann 1999), localizada no município de Caçapava do Sul (RS). Após três anos de coletas na região, somente seis plantas foram encontradas, o que impossibilitou um estudo populacional e evolutivo desta espécie. Nossas observações de campo indicaram que o pisoteio e a predação por gado (bovino, caprino e ovino), bem como a queima do campo após o inverno, podem ser os principais entraves ao estabelecimento das populações. Reduções drásticas no número de indivíduos são críticas para a viabilidade e a persistência de uma espécie tão rara como esta. Estes dados indicam que esta espécie, apenas recentemente descrita por Stehmann & Semir (2005), já está criticamente ameaçada de extinção.

Os três artigos que compõem esta tese são exemplos da contribuição que estudos filogeográficos podem trazer à elucidação de questões evolutivas pertinentes ao estudo dos processos de especiação e do quanto essas investigações poderão vir a ser importantes para

o estabelecimento de programas de preservação de espécies. Esperamos que estas análises sirvam de motivação para o desenvolvimento de novas pesquisas sobre os temas abordados, trazendo perspectivas para a proteção de espécies ameaçadas de extinção. O trabalho constante do capítulo V, parcialmente financiado pelo Programa de Espécies Ameaçadas de Extinção (Fundação Biodiversitas/CEPF), determinou a inclusão de *Petunia bonjardinensis*, junto com as já citadas *P. retzii* e *P. saxicola*, na Lista de Espécies Ameaçadas do Brasil.

Referências Bibliográficas

- Alsos IG, Engelskjon T, Gielly L, Taberlet P and Brochmann C (2005) Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species. *Mol Ecol* 14: 2739-2753.
- Ando T (1996) Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *Acta Phyt Geobot* 47: 19-30.
- Ando T and Hashimoto G (1993) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 111: 265-280.
- Ando T and Hashimoto G (1994) A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from the Serra da Mantiqueira. *Brittonia* 46: 340-343.
- Ando T and Hashimoto G (1995) *Petunia guarapuavensis* (Solanaceae): a new species from planalto of Paraná and Santa Catarina, Brazil. *Brittonia* 47: 328-334.
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E and Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96:289-297.
- Arnheim N (1983) Concerted evolution of multigene families. In: Nei M and Koehn RK (eds) *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, pp 38-61.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, London, 447 pp.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS and Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 82: 247-277.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during late quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177: 19-27.
- Behling H and Negrelle RRB (2001) Tropical Rain Forest and climate dynamics of the Atlantic Lowland, Southern Brazil, during the late quaternary. *Quaternary Res* 56: 383-389.
- Behling H, Bauermann SG and Neves PCP (2001) Holocene environmental changes in the São Francisco de Paula region, southern Brazil. *J S Am Earth Sci* 14: 631-639.
- Benson WW, Brown Jr KS and Gilbert LE (1976) Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29: 659-680.

- Bleeker W (2003) Hybridization and *Rorippa austriaca* (Brassicaceae) invasion in Germany. *Mol Ecol* 12: 1831-1841.
- Bradshaw Jr HD and Schemske DW (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 426: 176-178.
- Buckler IV ES, Ippolito A and Holtsford TP (1997) The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145: 821-832.
- Campbell CS, Wojciechowski MF, Baldwin BG, Lawrence AA and Donoghue MJ (1997) Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol Biol Evol* 14: 81-90.
- Cervi AC (1997) *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueria* 45: 1-92.
- Chung MY, Nason JD and Chung MG (2005) Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchids *Liparis kumokiri* and *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in sympatric populations. *Mol Ecol* 14: 4389-4402.
- 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. *Mol Ecol* 10: 349-356.
- Comes HP and Kadereit JW (1998) The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci* 3: 432-438.
- Cure JR (1989) Revisão de *Pseudagapostemon* Schrottky e descrição de *Oragapostemon*, gen. n. (Hymenoptera, Halictidae). *Rev Bras Entomol* 33: 229-335.
- Deginani NB (2001) Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana* 39:43-129.
- Denduangboripant J and Cronk QCB (2000) High intraindividual variation in internal transcribed spacer sequences in *Aeschynanthus* (Gesneriaceae): implications for phylogenetics. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267: 1407-1415.
- 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). *Mol Ecol* 13: 349-370.
- Durbin ML, Lundy KE, Morrell PL, Torres-Martinez CL and Clegg MT (2003) Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. *Mol Phylogenet Evol* 29: 507-518.
- Ellstrand NC and Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217-242.

- Endress PK (1994) Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge, 511 pp.
- Fuertes-Aguilar J and Feliner GN (2003) Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria*, Plumbaginaceae). *Mol Phylogenet Evol* 28: 430-447.
- Futuyma DJ (2002) Evolutionary Biology. Sunderland, Sinauer Associates, 3th ed., 763pp.
- Gavrilets S (2000) Waiting time to parapatric speciation. *Proc R Soc Lond B* 267: 2483-2492.
- Guadagnin DL, Laroocca J and 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. Ed. Unisinos, São Leopoldo, pp 71-84.
- Hamilton MB and Miller JR (2002) Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics* 162: 1897-1909.
- Hamilton MB, Braverman JM and Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Mol Biol Evol* 20: 1710-1721.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt G (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Mol Ecol* 10: 537-549.
- Hwang S-H, Lin T-P, Ma C-S, Lin C-L, Chung JD and Yang JC (2003) Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Mol Ecol* 12: 2689-2695.
- Janzen DH (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203-205.
- Johnson SD and Steiner KE (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol Evol* 15: 140-143.
- Joly CA, Leitão-Filho HF and Silva SM (1991) O patrimônio florístico. In: Mata Atlântica/Atlantic Rain Forest. Editora Index e Fundação S.O.S. Mata Atlântica, Rio de Janeiro, pp 94-125.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA and Stevens PF (1999) Plant Systematics. A phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland, 464 pp.
- Killip EP (1938) The American species of Passifloraceae. *Publ Field Mus, Bot Ser* 19: 1-613.

- Koch MA, Dobes C and Mitchell-Olds T (2003) Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). *Mol Biol Evol* 20: 338-350.
- Koehler-Santos P, Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006) Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. *Biol J Linn Soc Lond* 88 (no prelo).
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae) *Genetica* 126: 3-14.
- Levin DA, Francisco-Ortega J and Jansen RK (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conserv Biol* 10: 10-16.
- Linhart YB and Grant MC (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 237-277.
- Lorscheitter ML (1997) Paleoambientes do sul do Brasil no quaternário através da palinologia: revisão dos resultados obtidos. *Rev Univ Guarulhos – Geociências II*: 197-199.
- Lorscheitter ML (2001) Estudo palinológico comparativo entre as idades das matas paludosas atuais da planície costeira e da depressão central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Boletim de Resumos, Mudanças Globais e o Quaternário, VIII Congresso da ABEQUA, 14-20/out, Imbé-RS*: 380-381.
- 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. *Am J Bot* 87: 583-590.
- MacDougal JM (1994) Revision of *Passiflora*, Subgenus *Decaloba*, Section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). *Syst Bot Monogr* 41: 1-146.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol* 20: 229-237.
- Manen J-F (2004) Are both sympatric species *Ilex perado* and *Ilex canariensis* secretly hybridizing? Indication from nuclear markers collected in Tenerife. *BMC Evol Biol* 4:46.
- Marsden SJ, Whiffin M, Sadgrove L and Guimarães P (2000) Parrot populations and habitat use in and around two lowland Atlantic forest reserves, Brazil. *Biol Conserv* 96: 209-217.

- Martin LJ and Cruzan MB (1999) Patterns of hybridization in the *Piriqueta caroliniana* complex in Central Florida: evidence for an expanding hybrid zone. *Evolution* 53: 1037-1049.
- Matolweni LO, Balkwill K and MacLellan T (2000) Genetic diversity and gene flow in the morphologically variable, rare endemics *Begonia dregei* and *Begonia homonyma* (Begoniaceae). *Am J Bot* 87: 431-439.
- Mayer MS and Soltis PS (1999) Intraspecific phylogeny analysis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). *Syst Bot* 24: 47-61.
- Memmot J and Waser NM (2002) Integration of alien plants into native flower-pollinator visitation web. *Proc R Soc Lond B* 269: 2395-2399.
- Memmot J, Waser NM and Price MV (2004) Tolerance of pollination networks to species extinctions. *Proc R Soc Lond B* 271: 2605-2611.
- Michener CD (1989) Classification of American Colletidae (Hymenoptera, Apoidea). *Univ Kansas Sci Bull* 53: 622-703.
- Mondin CA (2001) *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. *Pesquisas-Botânica* 51: 147-150.
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM and Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *Am J Bot* 90: 1229-1238.
- Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Cervi AC, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB (2006) Phylogenetic relationships among *Passiflora* (Passifloraceae) species: Molecular data strengthen a new taxonomic proposal for subgenera. *Submetido*.
- Neigel JE (2002) Is Fst obsolete? *Conserv Genet* 3: 167-173.
- Neves PCF and Lorscheitter ML (1995) Upper Quaternary paleoenvironments in the northern coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Quatern South Am Antarctic Penins* 9: 39-67.
- Ohara M, Tomimatsu H, Takada T and Kawano S (2006) Importance of life history studies for conservation of fragmented populations: a case study of the understory herb, *Trillium camschatcense*. *Plant Species Biol* 21: 1-12.
- Petit C, Fréville H, Mignot A, Colas B, Riba M, Imbert E, Hurtrez-Boussés S, Virevaire M and Olivieri I (2001) Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. *Biol Conserv* 100: 21-34.

- Prazeres LC (1989) Estudo dos aspectos biológicos da flor e do sistema de reprodução de *Passiflora actinia* Hooker (*Passifloraceae*) na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Primack RB and Rodrigues E (2001) *Biologia da conservação*. Editora Vida, Londrina, 328 pp.
- Rambo B (1951a) O elemento andino no pinhal riograndense. *Sellowia* 3: 7-39.
- Rambo B (1951b) A imigração da selva higrófila no Rio Grande do Sul. *Sellowia* 3: 55-91.
- Rambo B (1954) Análise histórica da flora de Porto Alegre. *Sellowia* 6: 9-111.
- Rambo B (1994) A fisionomia do Rio Grande do Sul. Ed. UNISINOS, São Leopoldo, 473 pp.
- Ramsey J, Bradshaw Jr HD and Schemske DW (2003) Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (*Phrymaceae*). *Evolution* 57: 1520-1534.
- Rhymer JM and Simberloff D (1996) Extinctions by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 83-109.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annu Rev Ecol Syst* 28: 359-389.
- Rieseberg LH and Carney SE (1998) Plant hybridization. *New Phytol* 140: 599-624.
- Rizzini CT (1997) *Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos*. Âmbito Cultural Edições, Rio de Janeiro, 747 pp.
- Rodrigues RR and Gandolfi S (2000) Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares. In: *Matas ciliares: conservação e recuperação*. Ed. Universidade de São Paulo/FAPESP, São Paulo, pp 235-247.
- Roth L and Lorscheitter ML (1993) Palynology of a bog in Parque Nacional de Aparados da Serra, east plateau of Rio Grande do Sul, Brazil. *Quatern South Am Antarctic Penins* 8: 39-69.
- Roubik DW (1989) *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, Cambridge, 514pp.
- Russell AL, Medellín RA and McCracken GF (2005) Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Mol Ecol* 14: 2207-2222.
- Salomon M (2001) Evolutionary biogeography and speciation: essay on a synthesis. *J Biogeogr* 28: 13-27.

- Savolainen V, Anstett M-C, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup MV, Powell MP, Springate D, Salamin N and Baker WJ (2006) Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* 441: 210-213.
- Sazima M and Sazima I (1978) Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. *Biotropica* 10: 100-109.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT and Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7: 465-474.
- Schemske DW and Bradshaw Jr HD (1999) Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11910-11915.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends Ecol Evol* 16: 372-380.
- Semir J, Brown KS Jr. 1975. Maracujá: a flor da paixão. *Rev Geogr Univers*, fevereiro: 41-47.
- Silveira FA and Cure JR (1993) High-altitude bee fauna of southeastern Brazil: implications for biogeographic patterns (Hymenoptera: Apoidea). *Stud Neotrop Fauna Environ* 28: 47-55.
- Smith LB and Downs R (1964) Notes on the Solanaceae of Southern Brazil. *Phytologia* 10: 422-453.
- Smith TB, Kark S, Schneider CJ and Wayne RK (2001) Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends Ecol Evol* 16: 431.
- Stearns SC and Hoekstra RF (2000) *Evolution: an introduction*. Oxford University Press Inc., New York, 381 pp.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave and Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann and Semir. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Stehmann JR and Semir J (2001) Biologia reprodutiva de *Calibrachoa elegans* (Miers) Stehmann & Semir (Solanaceae). *Rev Brasil Bot* 24: 43-49.
- Stehmann JR and Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. In: Keating RC, Hollowell VC and Croat TB (eds). *Festschrift for William G. Darcy: the legacy of a taxonomist*. Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis, pp 341-348.
- Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C and Kuhlemeier C (2004) Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. *Genetics* 168: 1585-1599.

- Suassuna TMF, Bruckner CH, Carvalho CR and Borém A (2003) Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theor Appl Genet* 106: 298-302.
- Takayama K, Ohi-Toma T, Kudoh H and Kato H (2005) Origin and diversification of *Hibiscus glaber*, species endemic to the oceanic Bonin Islands, revealed by chloroplast DNA polymorphism. *Mol Ecol* 14: 1059-1071.
- Teixeira MB, Coura Neto AB, Pastore U and Rangel-Filho ALR (1986) Vegetação. In: Levantamento de recursos naturais, V.33. IBGE, Rio de Janeiro, pp 541-620.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, Hashimoto G, Marchesi E and Kao (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phyt Geobot* 49: 115-133.
- Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E and Kao T (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiol* 131: 1903-1912.
- Ulmer T and MacDougal JM. 2004. *Passiflora*: passionflowers of the world. Timber Press, Portland, 430 pp.
- Varassin IG, Trigo JR and Sazima M (2001) The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae). *Bot J Linn Soc* 136: 139-152.
- Vázquez DP and Gittleman JL (1998) Biodiversity conservation: does phylogeny matter? *Curr Biol* 8: R379-R381.
- Villwock JA and Tomazelli LJ (1995) Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1-45.
- Walck JL, Baskin JM, Baskin CC (1999) Relative competitive abilities and growth characteristics of a narrowly endemic and a geographically widespread *Solidago* species (Asteraceae). *Am J Bot* 86: 820-828.
- Watanabe H, Ando T, Iida S, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Hashimoto G and Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *J Japan Soc Horticult Sci* 65: 625-634.
- Werneck PB and Lorscheitter ML (2001) Paleoambientes dos últimos milênios na zona da mata do Faxinal, Torres, Rio Grande do Sul, Brasil, através de um estudo de sucessão vegetal. *Boletim de Resumos, Mudanças Globais e o Quaternário, VIII Congresso da ABEQUA, 14-20/out, Imbé-RS*: 405-406.
- Wiens JJ (2004) Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58: 193-197.

Wu C-I (2001) The genic view of the process of speciation. *J Evol Biol* 14: 851-865.

Zhang D and Sang T (1999) Physical mapping of ribosomal RNA genes in paeonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. *Am J Bot* 86: 735-740.

Zhang L-B, Comes HP and Kadereit JW (2001) Phylogeny and quaternary history of the European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and AFLP variation. *Am J Bot* 88: 2331-2345.

Anexos

Anexo 1. Material suplementar do capítulo IV

Table S1. GenBank accession numbers of the identified sequences by sampling place and individual plant

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.		
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	<i>psbB-psbH</i>
1	axil2	DQ225609	DQ225367	DQ225488
	axil3	DQ225610	DQ225368	DQ225489
	axil4	DQ225611	DQ225369	DQ225490
7	axil6	DQ225612	DQ225370	DQ225491
	axil7	DQ225613	DQ225371	DQ225492
2	axil9	DQ225614	DQ225372	DQ225493
	axil10	DQ225615	DQ225373	DQ225494
	axil11	DQ225616	DQ225374	DQ225495
	axil12	DQ225617	DQ225375	DQ225496
	axil13	DQ225618	DQ225376	DQ225497
	axil14	DQ225619	DQ225377	DQ225498
	axil15	DQ225620	DQ225378	DQ225499
	axil16	DQ225621	DQ225379	DQ225500
3	axil33	DQ225622	DQ225380	DQ225501
	axil34	DQ225623	DQ225381	DQ225502
	axil36	DQ225624	DQ225382	DQ225503
4	axil37	DQ225625	DQ225383	DQ225504
	axil38	DQ225626	DQ225384	DQ225505
	axil39	DQ225627	DQ225385	DQ225506
	axil40	DQ225628	DQ225386	DQ225507
	axil68	DQ225629	DQ225387	DQ225508
5	axil41	DQ225630	DQ225388	DQ225509
	axil43	DQ225631	DQ225389	DQ225510
	axil44	DQ225632	DQ225390	DQ225511
	axil45	DQ225633	DQ225391	DQ225512
	axil46	DQ225634	DQ225392	DQ225513
	axil47	DQ225635	DQ225393	DQ225514
	axil48	DQ225636	DQ225394	DQ225515
	axil49	DQ225637	DQ225395	DQ225516
	axil50	DQ225638	DQ225396	DQ225517
	6	axil51	DQ225639	DQ225397
axil52		DQ225640	DQ225398	DQ225519
axil53		DQ225641	DQ225399	DQ225520
axil54		DQ225642	DQ225400	DQ225521
axil55		DQ225643	DQ225401	DQ225522
axil56		DQ225644	DQ225402	DQ225523

Table S1. Cont.

Sampling places code	Plant code	GenBank Accession Nos.		
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	<i>psbB-psbH</i>
6	axil57	DQ225645	DQ225403	DQ225524
	axil58	DQ225646	DQ225404	DQ225525
	axil59	DQ225647	DQ225405	DQ225526
	axil60	DQ225648	DQ225406	DQ225527
	axil61	DQ225649	DQ225407	DQ225528
	axil62	DQ225650	DQ225408	DQ225529
10	axil63	DQ225651	DQ225409	DQ225530
	axil64	DQ225652	DQ225410	DQ225531
	axil65	DQ225653	DQ225411	DQ225532
12	axil66	DQ225654	DQ225412	DQ225533
	axil67	DQ225655	DQ225413	DQ225534
16	axil70	DQ225656	DQ225414	DQ225535
	axil71	DQ225657	DQ225415	DQ225536
	axil72	DQ225658	DQ225416	DQ225537
	axil73	DQ225659	DQ225417	DQ225538
	axil74	DQ225660	DQ225418	DQ225539
	axil75	DQ225661	DQ225419	DQ225540
	axil76	DQ225662	DQ225420	DQ225541
15	axil77	DQ225663	DQ225421	DQ225542
	axil78	DQ225664	DQ225422	DQ225543
	axil79	DQ225665	DQ225423	DQ225544
8	exse2	DQ225666	DQ225424	DQ225545
	exse3	DQ225667	DQ225425	DQ225546
7	exse5	DQ225668	DQ225426	DQ225547
	exse6	DQ225669	DQ225427	DQ225548
10	exse11	DQ225670	DQ225428	DQ225549
	exse13	DQ225671	DQ225429	DQ225550
	exse14	DQ225672	DQ225430	DQ225551
	exse15	DQ225673	DQ225431	DQ225552
	exse16	DQ225674	DQ225432	DQ225553
	exse17	DQ225675	DQ225433	DQ225554
	exse18	DQ225676	DQ225434	DQ225555
11	exse19	DQ225677	DQ225435	DQ225556
	exse20	DQ225678	DQ225436	DQ225557
	exse21	DQ225679	DQ225437	DQ225558
	exse22	DQ225680	DQ225438	DQ225559

Table S1. Cont.

Sampling places code	Plant code	GenBank Accession Nos.		
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	<i>psbB-psbH</i>
11	exse23	DQ225681	DQ225439	DQ225560
	exse24	DQ225682	DQ225440	DQ225561
	exse25	DQ225683	DQ225441	DQ225562
	exse27	DQ225684	DQ225442	DQ225563
	exse29	DQ225685	DQ225443	DQ225564
	exse30	DQ225686	DQ225444	DQ225565
	exse31	DQ225687	DQ225445	DQ225566
	exse32	DQ225688	DQ225446	DQ225567
	exse33	DQ225689	DQ225447	DQ225568
12	exse34	DQ225690	DQ225448	DQ225569
	exse35	DQ225691	DQ225449	DQ225570
	exse36	DQ225692	DQ225450	DQ225571
13	exse37	DQ225693	DQ225451	DQ225572
	exse38	DQ225694	DQ225452	DQ225573
	exse41	DQ225695	DQ225453	DQ225574
14	exse42	DQ225696	DQ225454	DQ225575
	exse43	DQ225697	DQ225455	DQ225576
	exse44	DQ225698	DQ225456	DQ225577
	exse45	DQ225699	DQ225457	DQ225578
	exse46	DQ225700	DQ225458	DQ225579
9	exse48	DQ225701	DQ225459	DQ225580
	exse49	DQ225702	DQ225460	DQ225581
	exse50	DQ225703	DQ225461	DQ225582
	exse51	DQ225704	DQ225462	DQ225583
	exse52	DQ225705	DQ225463	DQ225584
	exse53	DQ225706	DQ225464	DQ225585
	exse54	DQ225707	DQ225465	DQ225586
	15	exse55	DQ225708	DQ225466
exse56		DQ225709	DQ225467	DQ225588
exse59		DQ225710	DQ225468	DQ225589
8	hibr1	DQ225711	DQ225469	DQ225590
10	hibr2	DQ225712	DQ225470	DQ225591
	hibr3	DQ225713	DQ225471	DQ225592
11	hibr4	DQ225714	DQ225472	DQ225593
	hibr5	DQ225715	DQ225473	DQ225594
	hibr6	DQ225716	DQ225474	DQ225595

Table S1. Cont.

Sampling places code	Plant code	GenBank Accession Nos.		
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	<i>psbB-psbH</i>
14	hibr7	DQ225717	DQ225475	DQ225596
	hibr8	DQ225718	DQ225476	DQ225597
15	hibr9	DQ225719	DQ225477	DQ225598
	hibr10	DQ225720	DQ225478	DQ225599
	hibr11	DQ225721	DQ225479	DQ225600
	hibr12	DQ225722	DQ225480	DQ225601
	hibr13	DQ225723	DQ225481	DQ225602
	hibr14	DQ225724	DQ225482	DQ225603
	hibr15	DQ225725	DQ225483	DQ225604
	hibr16	DQ225726	DQ225484	DQ225605
	hibr17	DQ225727	DQ225485	DQ225606
	hibr18	DQ225728	DQ225486	DQ225607
	hibr19	DQ225729	DQ225487	DQ225608

Figure Legends

Fig. F1. *Petunia exserta*

Fig. F2. *Petunia exserta* habitat

Fig. F3. Tower 2

Fig. F4. Towers 1, 2 and 3 (from left to right)

Fig. F5. *Petunia axillaris*

Fig F6. *Petunia axillaris* x *Petunia exserta*

Fig. F7. Flowers from shelter 9



Figure F1



Figure F2

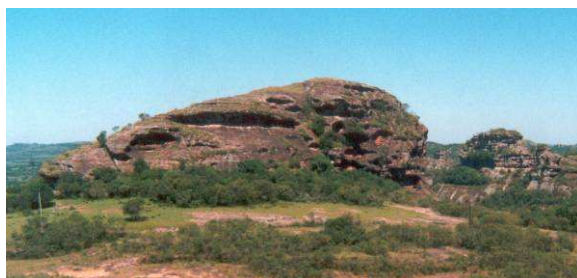


Figure F3

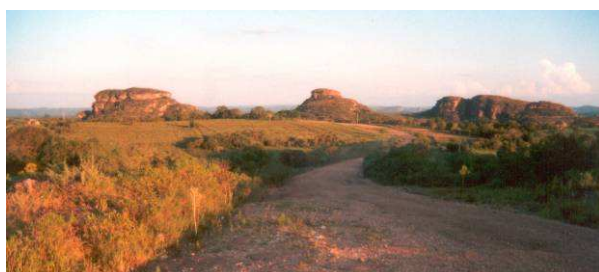


Figure F4



Figure F5



Figure F6



Figure F7

Anexo 2. Material suplementar do capítulo V

Table S1. GenBank accession numbers of the identified sequences by sampling place and individual plant

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.		
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	
1	alti4	DQ791909	DQ792184	
	alti5	DQ791910	DQ792185	
	alti6	DQ791911	DQ792186	
4	alti7	DQ791912	DQ792187	
	alti8	DQ791913	DQ792188	
	alti9	DQ791914	DQ792189	
	alti10	DQ791915	DQ792190	
	alti11	DQ791916	DQ792191	
	alti12	DQ791917	DQ792192	
	alti13	DQ791918	DQ792193	
	alti14	DQ791919	DQ792194	
	alti15	DQ791920	DQ792195	
	alti16	DQ791921	DQ792196	
	alti17	DQ791922	DQ792197	
	alti18	DQ791923	DQ792198	
2	alti19	DQ791924	DQ792199	
	alti20	DQ791925	DQ792200	
	alti21	DQ791926	DQ792201	
15	alti22	DQ791927	DQ792202	
14	alti23	DQ791928	DQ792203	
	alti24	DQ791929	DQ792204	
	alti25	DQ791930	DQ792205	
13	alti26	DQ791931	DQ792206	
	alti27	DQ791932	DQ792207	
	alti28	DQ791933	DQ792208	
	alti29	DQ791934	DQ792209	
12	alti30	DQ791935	DQ792210	
10	alti31	DQ791936	DQ792211	
	alti32	DQ791937	DQ792212	
6	alti34	DQ791938	DQ792213	
8	alti35	DQ791939	DQ792214	
	alti36	DQ791940	DQ792215	
	alti37	DQ791941	DQ792216	
	alti38	DQ791942	DQ792217	
	alti39	DQ791943	DQ792218	
		alti40	DQ791944	DQ792219

Table S1. Cont.

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.	
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
8	alti41	DQ791945	DQ792220
	alti42	DQ791946	DQ792221
3	alti44	DQ791947	DQ792222
	alti45	DQ791948	DQ792223
5	alti47	DQ791949	DQ792224
	alti49	DQ791950	DQ792225
	alti51	DQ791951	DQ792226
	alti52	DQ791952	DQ792227
11	alti53	DQ791953	DQ792228
	alti54	DQ791954	DQ792229
	alti55	DQ791955	DQ792230
	alti56	DQ791956	DQ792231
	alti57	DQ791957	DQ792232
	alti58	DQ791958	DQ792233
	alti59	DQ791959	DQ792234
	alti60	DQ791960	DQ792235
	alti61	DQ791961	DQ792236
	alti62	DQ791962	DQ792237
	alti64	DQ791963	DQ792238
	alti65	DQ791964	DQ792239
	alti66	DQ791965	DQ792240
	alti71	DQ791966	DQ792241
9	alti88	DQ791967	DQ792242
	alti89	DQ791968	DQ792243
	alti91	DQ791969	DQ792244
	alti92	DQ791970	DQ792245
	alti93	DQ791971	DQ792246
	alti94	DQ791972	DQ792247
	alti95	DQ791973	DQ792248
	alti96	DQ791974	DQ792249
	alti97	DQ791975	DQ792250
	alti98	DQ791976	DQ792251
	alti99	DQ791977	DQ792252
	alti100	DQ791978	DQ792253
	alti101	DQ791979	DQ792254
	alti102	DQ791980	DQ792255
	alti104	DQ791981	DQ792256
alti105	DQ791982	DQ792257	

Table S1. Cont.

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.	
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
9	alti106	DQ791983	DQ792258
	alti107	DQ791984	DQ792259
7	alti130	DQ791985	DQ792260
	alti132	DQ791986	DQ792261
	alti133	DQ791987	DQ792262
	alti134	DQ791988	DQ792263
	alti135	DQ791989	DQ792264
	alti136	DQ791990	DQ792265
	alti137	DQ791991	DQ792266
	alti138	DQ791992	DQ792267
	alti139	DQ791993	DQ792268
	alti140	DQ791994	DQ792269
	alti142	DQ791995	DQ792270
	alti143	DQ791996	DQ792271
	alti146	DQ791997	DQ792272
	alti147	DQ791998	DQ792273
	19	bonj3	DQ791999
bonj4		DQ792000	DQ792275
21	bonj5	DQ792001	DQ792276
	bonj6	DQ792002	DQ792277
	bonj7	DQ792003	DQ792278
	bonj8	DQ792004	DQ792279
	bonj9	DQ792005	DQ792280
	bonj10	DQ792006	DQ792281
	bonj11	DQ792007	DQ792282
	bonj12	DQ792008	DQ792283
	bonj13	DQ792009	DQ792284
25	bonj14	DQ792010	DQ792285
	bonj15	DQ792011	DQ792286
	bonj16	DQ792012	DQ792287
26	bonj17	DQ792013	DQ792288
	bonj18	DQ792014	DQ792289
	bonj19	DQ792015	DQ792290
	bonj20	DQ792016	DQ792291
	bonj21	DQ792017	DQ792292
	bonj22	DQ792018	DQ792293
	bonj23	DQ792019	DQ792294
	bonj24	DQ792020	DQ792295

Table S1. Cont.

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.	
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
22	bonj25	DQ792021	DQ792296
	bonj26	DQ792022	DQ792297
	bonj27	DQ792023	DQ792298
20	bonj28	DQ792024	DQ792299
	bonj29	DQ792025	DQ792300
18	bonj30	DQ792026	DQ792301
	bonj31	DQ792027	DQ792302
	bonj32	DQ792028	DQ792303
	bonj33	DQ792029	DQ792304
17	bonj34	DQ792030	DQ792305
	bonj36	DQ792031	DQ792306
	bonj37	DQ792032	DQ792307
	bonj38	DQ792033	DQ792308
	bonj39	DQ792034	DQ792309
	bonj41	DQ792035	DQ792310
	bonj42	DQ792036	DQ792311
	bonj43	DQ792037	DQ792312
16	bonj44	DQ792038	DQ792313
	bonj46	DQ792039	DQ792314
	bonj47	DQ792040	DQ792315
	bonj50	DQ792041	DQ792316
	bonj51	DQ792042	DQ792317
	bonj52	DQ792043	DQ792318
27	bonj53	DQ792044	DQ792319
	bonj54	DQ792045	DQ792320
	bonj55	DQ792046	DQ792321
	bonj57	DQ792047	DQ792322
	bonj58	DQ792048	DQ792323
24	bonj59	DQ792049	DQ792324
	bonj60	DQ792050	DQ792325
	bonj61	DQ792051	DQ792326
	bonj62	DQ792052	DQ792327
	bonj63	DQ792053	DQ792328
	bonj64	DQ792054	DQ792329
23	bonj66	DQ792055	DQ792330
	bonj67	DQ792056	DQ792331
	bonj68	DQ792057	DQ792332
	bonj69	DQ792058	DQ792333

Table S1. Cont.

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.	
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
28	mant6	DQ792059	DQ792334
	mant7	DQ792060	DQ792335
30	mant8	DQ792061	DQ792336
	mant9	DQ792062	DQ792337
	mant10	DQ792063	DQ792338
	mant11	DQ792064	DQ792339
31	mant12	DQ792065	DQ792340
	mant13	DQ792066	DQ792341
32	mant14	DQ792067	DQ792342
	mant15	DQ792068	DQ792343
	mant16	DQ792069	DQ792344
	mant17	DQ792070	DQ792345
29	mant18	DQ792071	DQ792346
28	mant19	DQ792072	DQ792347
	mant20	DQ792073	DQ792348
	mant21	DQ792074	DQ792349
	mant22	DQ792075	DQ792350
	mant23	DQ792076	DQ792351
	mant24	DQ792077	DQ792352
	mant25	DQ792078	DQ792353
	mant26	DQ792079	DQ792354
33	reit2	DQ792080	DQ792355
	reit3	DQ792081	DQ792356
35	reit4	DQ792082	DQ792357
	reit5	DQ792083	DQ792358
	reit6	DQ792084	DQ792359
	reit7	DQ792085	DQ792360
36	reit8	DQ792086	DQ792361
	reit9	DQ792087	DQ792362
	reit10	DQ792088	DQ792363
	reit11	DQ792089	DQ792364
	reit12	DQ792090	DQ792365
	reit13	DQ792091	DQ792366
37	reit14	DQ792092	DQ792367
	reit15	DQ792093	DQ792368
	reit16	DQ792094	DQ792369
	reit17	DQ792095	DQ792370
	reit18	DQ792096	DQ792371

Table S1. Cont.

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.	
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
34	reit19	DQ792097	DQ792372
	reit20	DQ792098	DQ792373
	reit21	DQ792099	DQ792374
	reit22	DQ792100	DQ792375
	reit23	DQ792101	DQ792376
38	saxi1	DQ792102	DQ792377
	saxi2	DQ792103	DQ792378
	saxi3	DQ792104	DQ792379
	saxi4	DQ792105	DQ792380
	saxi5	DQ792106	DQ792381
	saxi6	DQ792107	DQ792382
	saxi7	DQ792108	DQ792383
	saxi8	DQ792109	DQ792384
	saxi9	DQ792110	DQ792385
	saxi10	DQ792111	DQ792386
	saxi11	DQ792112	DQ792387
	saxi12	DQ792113	DQ792388
	saxi13	DQ792114	DQ792389
	saxi14	DQ792115	DQ792390
	saxi15	DQ792116	DQ792391
	saxi17	DQ792117	DQ792392
	saxi18	DQ792118	DQ792393
	saxi19	DQ792119	DQ792394
	saxi20	DQ792120	DQ792395
	saxi21	DQ792121	DQ792396
	saxi22	DQ792122	DQ792397
	saxi23	DQ792123	DQ792398
	saxi24	DQ792124	DQ792399
	saxi25	DQ792125	DQ792400
	39	sche5	DQ792126
sche6		DQ792127	DQ792402
sche8		DQ792128	DQ792403
40	sche9	DQ792129	DQ792404
	sche10	DQ792130	DQ792405
	sche11	DQ792131	DQ792406
	sche12	DQ792132	DQ792407
	sche13	DQ792133	DQ792408
	sche14	DQ792134	DQ792409

Table S1. Cont.

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.	
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
40	sche15	DQ792135	DQ792410
	sche16	DQ792136	DQ792411
	sche17	DQ792137	DQ792412
	sche18	DQ792138	DQ792413
41	sche19	DQ792139	DQ792414
	sche20	DQ792140	DQ792415
	sche21	DQ792141	DQ792416
	sche22	DQ792142	DQ792417
	sche23	DQ792143	DQ792418
	sche24	DQ792144	DQ792419
	sche25	DQ792145	DQ792420
	sche26	DQ792146	DQ792421
	sche27	DQ792147	DQ792422
	sche28	DQ792148	DQ792423
42	sche29	DQ792149	DQ792424
	sche30	DQ792150	DQ792425
	sche31	DQ792151	DQ792426
	sche32	DQ792152	DQ792427
	sche33	DQ792153	DQ792428
43	sche34	DQ792154	DQ792429
	sche35	DQ792155	DQ792430
	sche36	DQ792156	DQ792431
44	sche37	DQ792157	DQ792432
	sche39	DQ792158	DQ792433
	sche40	DQ792159	DQ792434
	sche41	DQ792160	DQ792435
	sche47	DQ792161	DQ792436
	sche48	DQ792162	DQ792437
	sche49	DQ792163	DQ792438
	sche50	DQ792164	DQ792439
	sche51	DQ792165	DQ792440
	sche52	DQ792166	DQ792441
	sche53	DQ792167	DQ792442
	sche54	DQ792168	DQ792443
	sche56	DQ792169	DQ792444
45	sche68	DQ792170	DQ792445
	sche69	DQ792171	DQ792446
46	sche70	DQ792172	DQ792447

Table S1. Cont.

Sampling places code (see Table 1)	Plant code	GenBank Accession Nos.	
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
46	sche71	DQ792173	DQ792448
	sche72	DQ792174	DQ792449
47	sche73	DQ792175	DQ792450
	sche74	DQ792176	DQ792451
	sche75	DQ792177	DQ792452
	sche76	DQ792178	DQ792453
	sche77	DQ792179	DQ792454
48	sche78	DQ792180	DQ792455
49	sche79	DQ792181	DQ792456
	sche80	DQ792182	DQ792457
50	sche81	DQ792183	DQ792458