

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

**Variabilidade Genética em Populações Naturais de
Petunia exserta Stehmann (Solanaceae)**



Ana Lúcia Anversa Segatto

**Orientação: Loreta Brandão de Freitas
Co-Orientação: Nelson Jurandi Rosa Fagundes**

Porto Alegre, Março de 2010.

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

**Variabilidade Genética em Populações Naturais de
Petunia exserta Stehmann (Solanaceae)**

Ana Lúcia Anversa Segatto

**Orientação: Loreta Brandão de Freitas
Co-Orientação: Nelson Jurandi Rosa Fagundes**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre, Março de 2010.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS.
- Laboratório de Biologia Gênômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS.
- Institute of Plant Sciences, University of Bern.
- 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).
- National Centres of Competence in Research- Plant Survival.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho de mestrado faz parte de uma etapa muito importante da minha vida, por isso não posso deixar de agradecer algumas das pessoas que me ajudaram nesse período.

Agradecer à minha orientadora Dra. Loreta Brandão de Freitas, por ter acreditado na minha capacidade e confiado em mim, pela amizade e por estar sempre disposta a buscar soluções para os problemas que surgiram, com muita tranquilidade.

Ao meu co-orientador Dr. Nelson Jurandi Rosa Fagundes, pela ajuda em todas as etapas do trabalho, por me dar ânimo e ser um exemplo com seu enorme conhecimento e empolgação pela genética.

À Dra. Aline Lorenz Lemke por ter iniciado o trabalho com *P. exserta*, ajudado a encontrar as plantas e, mesmo longe, estar sempre disposta a ajudar.

À minha colega de mestrado Caroline Turchetto pela amizade, ajuda e compreensão em todos os momentos.

Aos demais colegas do Laboratório de Evolução Molecular pela amizade no dia-a-dia, auxílio nas atividades laboratoriais e nas coletas, além de discussões sobre esse trabalho: Aline, Ana Luíza, Clênio, Geraldo, Jéferson, Pakisa, Priscilla, Raquel, Rosana e Verônica.

Ao Dr. Cris Kuhlemeier e todos os colegas e amigos da Universidade de Berna-Suíça que me receberam de braços abertos.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Genética.

Ao Elmo e à Ellen pela disponibilidade e atenção.

Aos meus pais, João Alberto e Maria de Lourdes, por sempre me apoiarem e confiarem nas minhas decisões.

Ao meu namorado Juliano por estar sempre do meu lado, mesmo quando estamos longe.

Aos meus tios Décio e Celso e suas famílias, pela preocupação, ajuda e almoços de domingo.

Às minhas colegas de apartamento, Denise, Lucieli e agora Nair, pela paciência, amizade e momentos de descontração.

À UFRGS e instituições e fontes financiadoras desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1- INTRODUÇÃO	8
1.1- Caracterização do grupo de estudo.....	8
1.2- Descrição da região de ocorrência de <i>P. exserta</i> : O bioma Pampa e a Serra do Sudeste.....	14
1.3- Especiação.....	17
1.4- Hibridação interespecífica e fluxo gênico.....	20
1.5- Filogeografia, Genética de Populações, Conservação e Marcadores Moleculares..	23
2- OBJETIVOS	27
2.1- Objetivo geral.....	27
2.1- Objetivos Específicos.....	27
3- MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1- Coleta do Material.....	28
3.2- Extração do DNA	37
3.3- Marcadores CAPS	38
3.3.1- Caracterização	38
3.3.2- Amplificação e clivagem.....	40
3.3.3- Análises dos dados	42
3.4- Marcadores Plastidiais.....	44
3.4.1- Amplificação e sequenciamento.....	44
3.4.2- Análises das sequências	49
4- RESULTADOS.....	50
4.1- Distribuição geográfica e morfologia de <i>P. exserta</i>	50
4.1- Especificidade dos marcadores CAPS	53
4.2- Caracterização dos marcadores de cloroplasto.....	58
4.3- Caracterização das populações de <i>P. exserta</i>	63
5- DISCUSSÃO.....	80
5.1- Níveis de introgressão	80
5.2- <i>P. exserta</i> como uma espécie derivada de <i>P. axillaris</i>	83
5.3- Caracterização da espécie <i>P. exserta</i>	85
6- CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

RESUMO

O gênero *Petunia* Juss. é caracterizado pela distribuição exclusivamente sul-americana e diversificação recente. *Petunia exserta* Stehmann é uma espécie endêmica da região fisiográfica da Serra do Sudeste (RS). Essa região faz parte do Bioma Pampa e apresenta um relevo muito característico com a presença de grandes torres de pedra. As plantas de *Petunia exserta* são encontradas nessas torres, em reentrâncias semelhantes a pequenas cavernas, um habitat muito restrito e inóspito para as outras espécies do gênero. Além de *P. exserta*, são descritas cerca de 30 espécies de plantas endêmicas dessa região, o que faz da Serra do Sudeste um local muito importante para a preservação da biodiversidade do Bioma Pampa. Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar a estrutura populacional da espécie *P. exserta* através de marcadores moleculares plastidiais e nucleares. Dentro desse objetivo maior, também são objetivos desse trabalho: caracterizar as novas populações encontradas quanto ao modo de vida e variabilidade fenotípica; avaliar a presença de introgressão gênica a partir de *P. axillaris*; e fornecer subsídios que reforcem a necessidade da criação de uma unidade de conservação na Serra do Sudeste. Foram analisados 655 indivíduos para as sequências concatenadas dos espaçadores intergênicos plastidiais *trnH/psbA* e *trnG/trnS* e 487 indivíduos foram genotipados para cinco marcadores nucleares do tipo CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences). As populações de *P. exserta* estudadas se caracterizam por uma ampla variabilidade fenotípica na coloração das flores e posição do aparelho reprodutivo. A análise dos dados demonstrou que a introgressão entre *P. exserta* e *P. axillaris* é restrita, possivelmente devido à seleção adaptativa, o que sugere que o habitat diferenciado pode desempenhar um papel importante nesse aspecto. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstrou grande estruturação genética, indicando o endocruzamento como uma característica da espécie. O compartilhamento de haplótipos plastidiais e alelos nucleares juntamente com a distribuição geográfica simpátrica, a ocorrência de eventos de hibridação e a pouca variabilidade genética permitem sugerir que *P. exserta* é uma espécie derivada de *P. axillaris*. Assim, a manutenção dessa espécie é dependente da manutenção do seu habitat que é limitado aos pequenos abrigos das torres da Serra do Sudeste.

ABSTRACT

Petunia Juss. is a genus characterized by an exclusive South American distribution and by its recent diversification. *Petunia exserta* Stehmann is an endemic species from Serra do Sudeste (RS) physiographic region, which is parte of the Pampa biome and has a characteristic landscape with the presence of stone towers. *P. exserta* plants grow in these towers, in shady cracks resembling small caves. Its habitat is very restrict and inhospitable for the other species of the genus. In addition to *P. exserta*, more than 30 endemic plant species are described for this region, making of the Serra do Sudeste a very important region for maintaining the biodiversity of the Pampa biome. The main goal of this study was characterizing *P. exserta* population structure using chloroplast and nuclear markers. Within this framework, other goals of this study are: characterizing the newly discovered populations regarding its habit and phenotypic variation; evaluating the occurrence of introgression from *P. axillaris*; and presenting evidences that reinforce the need of a conservation unit in the Serra do Sudeste region. Overall, 655 plants were analyzed for the plastidial intergenic spacers *trnH/psbA* and *trnG/trnS*, and five CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) nuclear markers were used to genotype 487 individuals. The populations of *P. exserta* found were characterized by a wide phenotypic variation regarding flower color and position of the reproductive organs. Data analyses indicated low levels of introgression between *P. exserta* and *P. axillaris*, possibly due to natural selection, suggesting that the different habitat for these two species may influence this point. As shown by the Molecular Variance Analyze (AMOVA) the species presents strong genetic structure, indicating that inbreeding seems to be a characteristic of this species. The sharing of both cpDNA haplotypes and nuclear alleles, together with the sympatric geographical distribution, hybridization, and low genetic variability in *P. exserta* allow the suggestion that *P. exserta* is derived from *P. axillaris*. Thus, the maintenance of this species depends on the maintenance of its habitat, which is restricted to the small shelters on the towers in the Serra do Sudeste region.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Caracterização do grupo de estudo

A família Solanaceae A. Juss. pertence à ordem Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl, Lamídeas (APG III, 2009) e é composta por cerca de 3000 espécies e aproximadamente 150 gêneros. Possui distribuição cosmopolita concentrada na região neotropical, sendo que no Brasil são encontrados 32 gêneros e 350 espécies (Souza & Lorenzi, 2008). Olmstead & Palmer (1992) sugerem que a diversificação inicial das Solanaceae seguiu o desmembramento e a separação do Gondwana, há aproximadamente 50 milhões de anos, e que a família teve um provável centro de origem na América do Sul.

Essa importante família de plantas com flores se destaca pela utilidade na alimentação (batata, tabaco, tomate e algumas pimentas), por seu papel na etnobotânica (plantas medicinais, venenosas e alucinógenas) e na ciência (várias espécies servem como modelos para pesquisas) (Olmstead & Palmer, 1992).

Solanaceae é considerada monofilética com base em caracteres morfológicos e de marcadores de cloroplasto (Olmstead & Palmer, 1992; Olmstead *et al.*, 1999). As relações infrafamiliares têm sido investigadas por vários autores e frequentemente a família tem sido dividida em dois grandes subgrupos, Cestroideae e Solanoideae (Judd *et al.*, 2009).

Entre os gêneros de Cestroideae, encontra-se o gênero *Petunia* Juss. o qual é conhecido popularmente através da petúnia de jardim, um híbrido cultivado em todo o mundo como planta ornamental. O gênero *Petunia* foi descrito originalmente por Jussieu (1803), baseado em material coletado no Uruguai, com a descrição de duas espécies, *P. nyctaginiflora* Juss. [(=*P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb)] e *P. parviflora* (Juss.) Wijsman [(=*Calibrachoa parviflora* (Juss.) D'Arcy)]. Após três revisões do gênero, a primeira monografia sobre *Petunia* foi publicada por Fries (1911) que reconheceu 27 espécies e estabeleceu dois subgêneros. Com base em estudos citotaxonômicos, Wijsman & De Jong (1985) determinaram a existência de dois grupos de espécies geneticamente distintos propondo a divisão do gênero. Seriam mantidas no gênero *Petunia* somente as espécies relacionadas à *Petunia parviflora* Juss. ($2n = 18$). Espécies com $2n = 14$ seriam transferidas para o gênero *Stimoryne* Rafin. Wijnands & Bos (1986) propuseram a

conservação de *Petunia nyctaginiflora* ($2n = 14$) como a espécie tipo e a transferência das espécies com $2n=18$ para o gênero *Calibrachoa* La Llave & Lexarza. Essa é a classificação utilizada atualmente e foi confirmada por diferentes estudos morfológicos e filogenéticos, sendo *Petunia* e *Calibrachoa* considerados grupos irmãos (Watanabe *et al.*, 1999; Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006).

Petunia é um gênero sul-americano, predominantemente subtropical atlântico. Todas as espécies, exceto *P. occidentalis* R. E. Fr., distribuem-se no sul e sudeste do Brasil. São reconhecidos dois centros de diversidade do gênero: os campos altitudinais da borda oriental do planalto das Araucárias em Santa Catarina e os afloramentos rochosos areníticos da Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul (Stehmann, 1999).

A história evolutiva do gênero *Petunia* tem sido investigada por diferentes tipos de marcadores moleculares, sendo um padrão geral a baixa diferenciação genética entre as espécies, indicando uma diversificação recente do gênero (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Stehmann *et al.*, 2009). Os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* teriam surgido de uma radiação Andina e se diversificado durante os períodos glaciais e interglaciais Pleistocênicos com uma radiação mais recente para a planície costeira (Stehmann, 1999). Não existem barreiras morfológicas ao cruzamento entre as diferentes espécies e a radiação adaptativa das síndromes florais, juntamente com o isolamento geográfico, devem ter tido um papel fundamental no processo de especiação do gênero (Watanabe *et al.*, 1996). Na maioria dos casos, as espécies com mesma síndrome floral são alopátricas (com exceção de *P. integrifolia* (Hook.) e *P. secreta* Stehmann & Semir) e as espécies com diferentes síndromes florais são simpátricas.

As espécies de *Petunia* florescem geralmente no mesmo período, não ocorrendo isolamento sazonal. A maioria das espécies é anual e tem ciclo de vida curto ajustado ao clima. As flores são sempre vistosas e na maioria das vezes púrpuras ou magentas, raramente brancas ou vermelhas. Os frutos são capsulares, secos e, quando maduros, liberam as sementes sempre próximas à planta mãe, num processo de autocoria. Predominantemente heliófilas, habitam campos, afloramentos rochosos e capoeiras da zona ecotonal entre campo e mata. A síndrome da melitofilia é predominante e provavelmente ancestral, tendo evoluído num provável processo de co-especiação. A ornitofilia (polinização por beija-flores) e a esfingofilia (polinização por mariposas da ordem Lepidoptera) devem ser síndromes derivadas (Stehmann, 1999). Em geral, as espécies

melitófilas são auto-incompatíveis (Tsukamoto *et al.*, 1998). Algumas linhagens de *P. axillaris* (Tsukamoto *et al.*, 2003), *P. exserta* Stehmann (Tsukamoto *et al.*, 1998) e *P. secreta* (Stehmann, 1999) são auto-compatíveis.

Stehmann *et al.* (2009) reconhecem 14 espécies para o gênero. Essas espécies formam dois clados principais, um composto por espécies que crescem em altitudes superiores a 500m (terras altas) e outro composto por espécies que ocorrem a menos de 500m (terras baixas).

Petunia exserta, espécie de interesse desse trabalho, foi descrita por Stehmann (1987), e pertence ao grupo de terras baixas, juntamente com *P. axillaris*, *P. secreta*, *P. inflata* R. E. Fr., *P. integrifolia*, *P. bajeensis* T. Ando & Hashim, e *P. interior* T. Ando & Hashim (Stehmann *et al.*, 2009). Dentre essas espécies, *P. exserta* é muito próxima evolutivamente de *P. axillaris* e *P. secreta*, compartilhando com essas espécies uma série de características morfológicas, como o tubo da corola longo e hipocrateriforme; hábito ereto ou ascendente; pólen de coloração amarela; folhas basais e apicais com tamanhos e formas diferentes (heterofilia); pedúnculos frutíferos eretos com cápsulas grandes; e sementes pequenas (Stehmann, 1999). Além disso, essas espécies são simpátricas em algumas áreas de sua distribuição (Stehmann, 1987; Ando, 1996). As diferenças entre as três espécies restringem-se a adaptações para diferentes polinizadores, sendo as flores de *P. axillaris* brancas e fragrantas ao entardecer (esfingófilas) e as de *P. secreta* púrpuras e sem fragrância (melitófilas). Estas duas espécies possuem estames inclusos e hábito preferencialmente heliófilo (Stehmann, 1999). *P. exserta* possui uma série de características adaptadas à ornitofilia, como a corola vermelha com bordo do limbo reflexo e anteras e estilete fortemente exsertos. Beija-flores foram observados visitando flores de populações naturais (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006), bem como plantas cultivadas (Stehmann, 1999).

Petunia exserta é considerada endêmica da região da Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul onde é encontrada em reentrâncias semelhantes a cavernas (ou abrigos) em grandes rochas areníticas (Figura 1). Esse habitat é considerado muito restrito e inóspito para as outras espécies do gênero (Stehmann, 1987). As plantas crescem em solo seco e raso, com pouco húmus, em locais escuros que não recebem luz direta do sol (Ando *et al.*, 1999). A chuva também não atinge as plantas diretamente.



Figura 1- Habitat da espécie *Petunia exserta*.

A) Visão geral das Guaritas- Caçapava do Sul/RS; B) Torre 6- abrigo 17; C) Torre12- abrigo 28; D) Torre 1- abrigo 1.

O conjunto de estames e o estigma podem estar localizados distantes um do outro o que diminui a probabilidade de autopolinização espontânea, mas há uma grande variação do tamanho dos estiletos das flores, garantindo a autofecundação e produção de sementes. A semente não possui adaptações para a dispersão a longas distâncias. Após a abertura da cápsula, as sementes são liberadas como projéteis e o vento atua como agente externo (Stehmann,1999). Assim, a distribuição restrita de *P. exserta* pode ser decorrente de um comportamento não competitivo, devido a suas características diferenciadas (Stehmann, 1999; Tsukamoto *et al.*, 1998).

Apesar da cor vermelha, *P. exserta* não é relacionada diretamente aos híbridos vermelhos (*Petunia x hybrida*), pois foi descrita algumas décadas depois desses terem sido produzidos e selecionados artificialmente (Griesbach *et al.*, 1999). *Petunia exserta* pode ser muito útil para melhorar cultivares vermelhos devido à combinação genética diferente,

além de ter um grande potencial ornamental em função de seu hábito esciófilo e flores vistosas (Griesbach *et al.*, 1999; Stehmann, 1999).

Nas torres areníticas onde *P. axillaris* e *P. exserta* ocorrem em simpatria, foram encontradas plantas com morfologia floral intermediária, sugerindo hibridação entre essas espécies, sendo o primeiro caso descrito de hibridação natural entre espécies de petúnia (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006) (Figura 2).

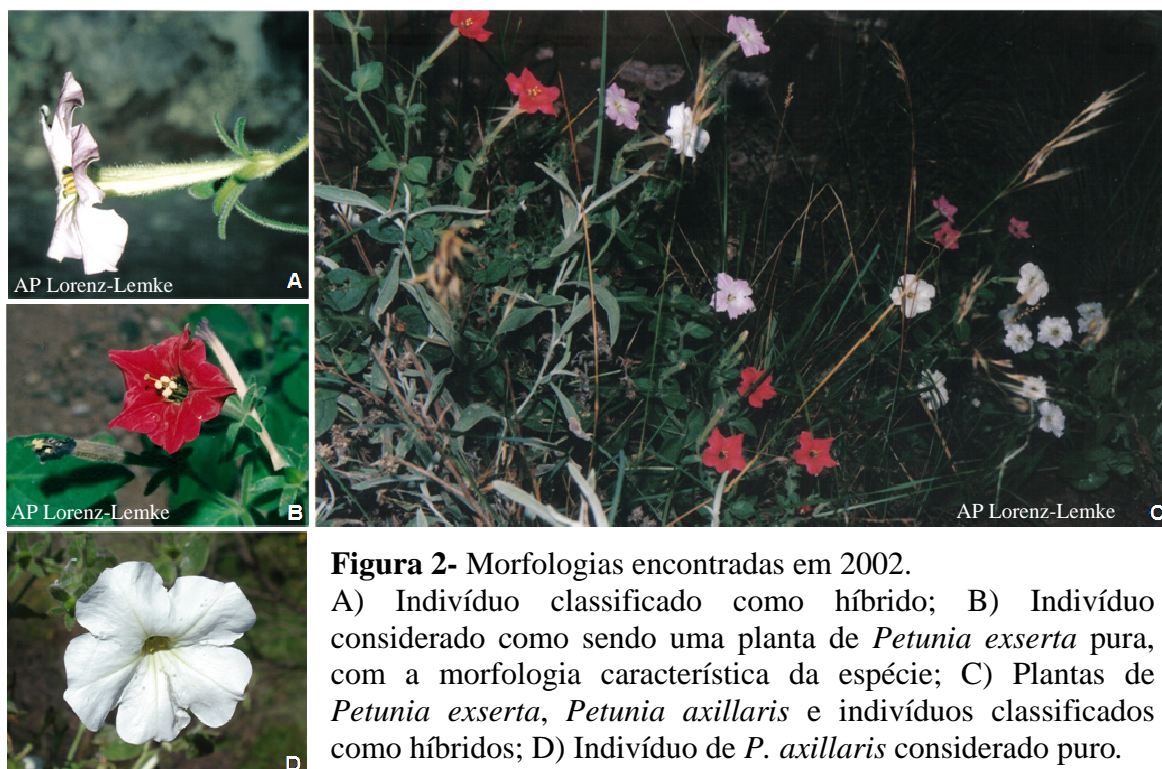


Figura 2- Morfologias encontradas em 2002.

A) Indivíduo classificado como híbrido; B) Indivíduo considerado como sendo uma planta de *Petunia exserta* pura, com a morfologia característica da espécie; C) Plantas de *Petunia exserta*, *Petunia axillaris* e indivíduos classificados como híbridos; D) Indivíduo de *P. axillaris* considerado puro.

Petunia axillaris possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo no sul do Brasil, no Uruguai, na Argentina e na Bolívia (Ando, 1996). No Brasil, a espécie é encontrada apenas na metade sul do Rio Grande do Sul, no Bioma Pampa, incluindo as regiões da Depressão Central, Serra do Sudeste e Campanha (Stehmann, 1999). Os afloramentos rochosos são o ambiente preferencial dessa espécie, que também pode ser encontrada habitando locais perturbados como beiras de estradas (Ando, 1996; Stehmann, 1999).

Análises de marcadores plastidiais (espaçadores intergênicos *trnH/psbA*, *trnG/trnS*, *psbB/psbH*) corroboraram a hipótese de hibridação interespecífica e de divergência recente entre essas duas espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Os autores relataram que todos os híbridos morfologicamente distinguíveis foram encontrados dentro das reentrâncias

rochosas nas torres areníticas, juntamente com populações de *P. exserta*, indicando que as rígidas exigências de habitat permanecem presentes nessas plantas. Os indivíduos classificados como híbridos tinham lobos da corola rosados e estames e estigma levemente exsertos. As plantas encontradas próximas geralmente apresentaram o mesmo haplótipo plastidial, independente do fenótipo. Assim, não somente plantas com morfologia intermediária, mas também algumas com um dos fenótipos parentais podem representar indivíduos resultantes de eventos de hibridação. Além disso, como os haplótipos são compartilhados pelas duas espécies, a introgressão observada na região da Serra do Sudeste deve ter ocorrido em ambas as direções (Lorenz-Lenke *et al.*, 2006). A modificação das características florais e mudança de habitat são os prováveis fatores que levaram à diferenciação entre *P. axillaris* e *P. exserta*. Como *P. exserta* tem uma distribuição restrita, a hibridação pode constituir um grande risco para a manutenção da espécie, podendo essa perder as adaptações únicas que possui (Stehmann *et al.*, 2009). Uma questão ainda não resolvida é se o processo de hibridação é recente (associado a distúrbios ambientais antropogênicos) ou um processo mais antigo. Devido a sua distribuição restrita e relatos de extinções locais (Guadagnin *et al.*, 2000), *P. exserta* está incluída na lista de espécies da flora ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul (SEMA, 2010).

1.2- Descrição da região de ocorrência de *P. exserta*: O bioma Pampa e a Serra do Sudeste

O local que hoje conhecemos como Rio Grande do Sul teve origem no Proterozóico, há aproximadamente um bilhão de anos, com o choque dos crátons Rio de La Plata e Kalahari. Esse evento faz parte do chamado Ciclo Brasileiro, que afetou a formação de toda a América do Sul (Holz, 1999). O ciclo Brasileiro originou no Rio Grande do Sul uma bacia sedimentar onde hoje corre o rio Camaquã (Bacia do Camaquã), da qual fazem parte as formações rochosas da Serra do Sudeste. A Bacia do Camaquã caracterizou-se pela alternância entre episódios de subsidência e sedimentação e de soerguimento e erosão. O tipo de preenchimento também foi alternado, por atividade vulcânica ou deposição siliciclástica. Assim, a formação dos afloramentos apresenta uma deposição alternada de arenitos, conglomerados e granitos. De acordo com Paim & Lopes (2000) a sucessão aflorante na região compreende três unidades aloestratigráficas relativamente mais deformadas (alogrupos Bom Jardim, Cerro do Bugio e Santa Bárbara), afetados por dobras abertas e falhas gravitacionais e direcionais, sobrepostas por uma unidade predominantemente horizontal (Alogrupo Guaritas). Essa última afetada apenas por uma deformação rúptil de caráter direcional e gravitacional. O último evento deposicional, representado pelo Alogrupo Guaritas, ocorreu há aproximadamente 470 milhões de anos (Paim, 2002). Assim, a região fisiográfica denominada Serra do Sudeste, com sua paisagem marcada pela presença das grandes torres de pedra, é caracterizada por uma complexidade litológica, envolvendo as rochas mais antigas do Rio Grande do Sul, datadas do Pré-Cambriano (Holz, 1999).

Em torno de 42.000-10.000 anos antes do presente, os campos dominavam a região do Pampa que apresentava um clima frio e seco (Behling *et al.*, 2005). Depois dos 10.000 anos a temperatura aumentou, mas o clima continuou seco, por isso a floresta de Araucária não se expandiu e a mata Atlântica deve ter se expandido pela costa. No início do Holoceno, o fogo se tornou mais frequente no Pampa, o que é indicado pela abundância de partículas de carvão nos perfis de turfeiras (Behling *et al.*, 2007). Esse fato está possivelmente relacionado à chegada de populações indígenas na região (Overbeck *et al.*, 2007). No Holoceno-médio, em torno de 4000 anos antes do presente, o clima se tornou mais úmido, permitindo uma lenta expansão da floresta sobre o campo. No século 17, os

jesuítas introduziram a pecuária na região do Pampa e essa atividade permanece muito importante até hoje (Pillar & Quadros, 1997). Com a supressão do gado e do fogo, um ativo processo de expansão florestal, o qual tem sido historicamente reprimido através de distúrbios humanos, seria re-estabelecido (Overbeck *et al.*, 2007).

A vegetação campestre do Sul do Brasil está incluída em dois biomas na classificação do IBGE (2004), Pampa e Mata Atlântica. Os campos de altitude do bioma Mata Atlântica são encontrados na região do Planalto Sul-Brasileiro conhecida como Campos de Cima da Serra. Os campos subtropicais do Bioma Pampa podem ser encontrados na Depressão Central, Serra do Sudeste e região da Campanha, na metade sul do Rio Grande do Sul. Essas formações apresentam uma matriz geral formada por áreas extensas de campos, com inclusões florestais pelas margens dos rios (Boldrini, 2009).

O Bioma Pampa compreende um conjunto ambiental de diferentes litologias e solos recobertos por fitofisionomias campestres. É caracterizado pelo clima chuvoso, sem período seco sistemático, mas marcado por frequentes frentes polares e temperaturas negativas no inverno. As paisagens campestres do Bioma são naturalmente invadidas por contingentes arbóreos representantes da Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual e da Floresta Ombrófila Densa, notadamente nas partes norte e leste. Essa mudança caracteriza um processo de substituição natural das estepes por formações florestais em função da mudança climática de frio/seco para quente/úmido no atual período interglacial, como já citado acima (IBGE, 2004).

A região fisiográfica da Serra do Sudeste, também conhecida como Escudo Sul-Rio-grandense, ocupa uma área aproximada de 44.000 km² representando aproximadamente um quarto do Bioma Pampa no Rio Grande do Sul. A estrutura vegetacional dessa região é muito diversa, em resposta a vários fatores como o clima, o solo, o relevo e o manejo a que esta vegetação está submetida (Boldrini, 2009). Rambo (1956) comentou não ser possível fazer uma descrição minuciosa de todas as paisagens da Serra do Sudeste, muitas vezes destoando do resto do Pampa por apresentar uma vegetação savanóide (arbóreo-arbustiva) sobre solos rasos. A região tem relevo ondulado a fortemente ondulado, com altitudes que variam de 150 a 500 m. Nessa região, como no resto do bioma Pampa, muitas áreas atualmente cobertas por vegetação campestre seriam ocupadas por subarbustos, arbustos e árvores de baixo porte, as quais aos poucos vão sendo cortadas e queimadas, ampliando as áreas utilizadas como pastagem (Girardi-Deiro *et al.*,

1994). Segundo produtores locais, tais práticas são seculares e servem para conter o crescimento da vegetação arbustiva e arbórea sobre o campo (Caporal & Boldrini, 2007). A Serra do Sudeste, como um todo, não permite o desenvolvimento de uma agricultura pujante e economicamente rentável pela pequena profundidade do solo. As principais atividades geradoras de renda são a bovinocultura, ovinocultura e caprinocultura. Na localidade conhecida como Minas do Camaquã, iniciou-se em 1870 a extração de cobre que parou em 1996, quando ocorreu o esgotamento total das reservas economicamente viáveis conhecidas (Paim, 2000). Com essa atividade, acredita-se que tenha ocorrido um povoamento maior da região com o conseqüente aumento da utilização da terra, o que poderia ter acentuado o impacto humano na área.

A Serra do Sudeste é classificada como área de extrema importância biológica e de extremamente alta prioridade para conservação (Ministério do Meio Ambiente, 2009). No entanto, nenhuma Unidade de Conservação foi de fato implementada nesta região e são raras as informações sobre os aspectos biológicos desta área do Estado. Contudo, os trabalhos científicos que vêm sendo publicados relatam uma grande riqueza de biodiversidade nessa região, com aproximadamente 30 espécies de plantas endêmicas (Guadagnin *et al.*, 2000; Paz *et al.*, 2008).

1. 3- Especiação

A dificuldade em encontrar um conceito único para espécie fez surgir vários conceitos diferentes: conceito biológico, conceito de espécie baseado no reconhecimento, conceito fenético, conceito evolutivo, conceito filogenético (dividido em apomórfico, diagnóstico e genealógico), entre outros (Judd *et al.*, 2009). Cada um desses tem seus prós e contras e é pouco provável que um conceito seja aceito universalmente. A chave para entender o que são espécies e de que forma se originam está, em grande parte, em um conhecimento detalhado dos fatores naturais e genéticos que limitam o fluxo gênico entre elas (Abbott *et al.*, 2008). O contexto espacial tem um papel importante no modo de especiação que é classificado em três categorias segundo esse aspecto: simpátrico, parapátrico e alopátrico. A especiação simpátrica ocorre sem isolamento espacial e com a divergência ocorrendo em condições de cruzamentos aleatórios; a especiação alopátrica ocorre quando populações divergentes estão espacialmente isoladas e não trocam genes uma com a outra; já a especiação parapátrica descreve a situação onde níveis intermediários de fluxo gênico persistem durante a divergência (Abbott *et al.*, 2008). No entanto, essa classificação é considerada uma divisão artificial de um processo contínuo por alguns autores (Fitzpatrick *et al.*, 2009).

Algum grau de isolamento reprodutivo é um passo essencial para a transição de ecótipos a espécies (Abbott & Comes, 2007). O surgimento do isolamento reprodutivo em plantas é assunto de muitos estudos e atualmente acredita-se que o número de genes controlando o isolamento reprodutivo e seus efeitos variam entre espécies. Em alguns casos, poucos genes, de grande efeito, podem controlar o isolamento reprodutivo (Abbott *et al.*, 2008; Lexer & Widmer, 2008; Lowry *et al.*, 2008). Assim, a evolução do isolamento reprodutivo, em muitos organismos, pode seguir o modelo proposto por Wu (2001) no qual é uma consequência de adaptações controladas por um número moderado de genes enquanto outros genes, com efeitos neutros na seleção, podem se mover entre espécies.

Embora muitos estudos sobre especiação tentem entender como ocorre a divergência de linhagens evolutivas a diferenciação, muitas vezes, principalmente em plantas, envolve a reunião e/ou duplicação de genomas através da hibridação. Existem dois tipos de especiação com hibridação: homoplóide (sem mudança no número cromossômico) e poliplóide (com duplicação de todo genoma híbrido- alopoliplóide). Poliplóides que não

tiveram origem através da hibridação são chamados autopoliplóides (Rieseberg & Willis 2007).

O tempo e o modo de especiação podem ser fortemente influenciados pela natureza das barreiras de isolamento reprodutivo (Cozzolino & Scopece, 2008). Em plantas, essas barreiras podem ser classificadas de acordo com o momento da ocorrência em relação à reprodução: barreiras pré-reprodutivas (antes da polinização), pós-reprodutivas pré-zigóticas (após a polinização e antes da fertilização) e pós-reprodutivas pós-zigóticas (após a fertilização). São barreiras pré-reprodutivas: o isolamento temporal (floração em épocas diferentes ou períodos diferentes do dia); o isolamento de hábitat; o isolamento floral (atração de polinizadores diferentes ou diferenças morfológicas que impeçam a polinização por um mesmo polinizador); o sistema reprodutivo (autopolinização, agamospermia). Uma barreira pós-reprodutiva pré-zigótica é a incompatibilidade estigma-estilete. Finalmente, são barreiras pós-reprodutivas pós-zigóticas: a incompatibilidade da semente; a inviabilidade do híbrido; o isolamento floral do híbrido (ausência de polinizadores efetivos); a esterilidade do híbrido; e o colapso do híbrido (a primeira geração pode ser viável e fértil, mas as gerações seguintes ou indivíduos provindos de retrocruzamento podem ser inviáveis ou estéreis) (Judd *et al.*, 2009). Uma combinação de mecanismos de isolamento pode atuar em conjunto ou um deles reforçar o outro. Como o isolamento pós-zigótico tem um alto custo biológico, muitas vezes, mecanismos pré-zigóticos podem se tornar mais intensos, através de um fenômeno conhecido como reforço. Isso ocorre pela evolução de cruzamentos preferenciais prevenindo o gasto de gametas (Mallet, 2005).

Grande parte das angiospermas usa animais na transferência de gametas, esse fenômeno pode influenciar a evolução das plantas com flores, não só através da polinização, mas também promovendo ou reforçando o isolamento reprodutivo. O isolamento floral é um tipo de isolamento pré-reprodutivo mediado pela morfologia floral (isolamento morfológico) e pelo comportamento do polinizador (isolamento etológico) (Schiestl & Schlüter, 2009). Esse tipo de isolamento pode ter um papel muito importante durante a especiação, estabelecendo o isolamento reprodutivo (Rieseberg & Willis, 2007). Por outro lado, o isolamento floral não é necessariamente parte do processo de especiação em plantas que representam linhagens que evoluíram separadas, sem influência de polinizadores. Nesses casos, ele reforça a separação entre espécies, reduzindo, por exemplo, o gasto de gametas com cruzamentos sem sucesso (Schiestl & Schlüter, 2009).

As solanáceas, pelo menos em nível de gênero, parecem não ter sofrido adaptação radiativa em termos de diferentes polinizadores, mas certos clados, como *Petunia* e *Brunfelsia*, apresentam muitos tipos de síndromes florais (Knapp, 2010).

1.4- Hibridação interespecífica e fluxo gênico

Os híbridos resultam de cruzamentos entre diferentes espécies, ou entre indivíduos de populações que são distinguíveis com base em um ou mais caracteres herdáveis (Harrison, 1990). Hibridação interespecífica é considerada comum em plantas, ocorrendo em 25% das espécies (Mallet, 2005). Em animais, esse fenômeno é menos frequente, sendo que aproximadamente 10% das espécies estariam envolvidas em eventos de hibridação e possível introgressão (Mallet, 2005).

Diferentes fatores ecológicos podem estar envolvidos no processo de hibridação, acarretando diferentes consequências evolutivas. A integridade das linhagens irá depender, entre outras coisas, das taxas de dispersão e fluxo gênico e da seleção natural atuando nas espécies envolvidas e nos indivíduos híbridos (Genovart, 2009).

Pode ocorrer a formação de uma zona de hibridação estável e localizada, comportando-se de acordo com a dinâmica do modelo de zona de tensão ou zona bimodal, onde a frequência dos alelos ou características fenotípicas é mantida pelo balanço entre o efeito da homogeneização e seleção (Barton & Hewitt, 1985; Fitzpatrick *et al.*, 2008). No entanto, se os híbridos são geralmente mais adaptados que uma ou ambas as espécies que os originaram, podemos esperar que ocorra o deslocamento dos genótipos parentais, resultando em introgressão extensiva e o desenvolvimento de uma zona híbrida ampla, chamada unimodal ou enxame híbrido (Martin & Cruzan, 1999; Fitzpatrick *et al.*, 2008). Se esse processo continuar por muitas gerações, pode resultar na formação de uma linhagem única, substituindo uma ou ambas as espécies originais (Mallet, 2008). Uma possível explicação para essa situação seria o valor adaptativo maior dos híbridos em relação às espécies parentais (vigor híbrido ou heterose). Alternativamente, os híbridos podem ser mais adaptados a um nicho diferente, sendo intermediários, de fenótipos extremos ou mesmo fora do padrão parental (segregação transgressiva) (Rieseberg *et al.*, 1999). Eventos de hibridação também podem reduzir a taxa de crescimento populacional das espécies pelo aumento da pressão de patógenos e herbivoria, isso pode ocorrer, por exemplo, devido aos híbridos serem mais suscetíveis a pestes (Levin *et al.*, 1996).

Como citado acima, uma das consequências da hibridação é a introgressão; isto é, o movimento de genes, mediado por retro-cruzamento, entre duas espécies ou duas populações distintas (Avice, 2004). Através da introgressão podemos dizer que a

hibridação tem um duplo papel na dinâmica da biodiversidade: por um lado, pode criar nova diversidade genotípica, mover adaptações genéticas e mesmo gerar novas linhagens recombinantes estáveis (Rieseberg, 1997; Avise, 2004); por outro, pode diminuir o número de espécies, colapsando as existentes (Harrison & Bogdanowicz, 1997).

Atualmente existe uma grande dificuldade em determinar se a hibridação é natural ou se duas espécies estão em contato secundário devido a modificações causadas por atividades humanas. Esse cenário faz surgir a questão se devemos tomar medidas para evitar a hibridação ou não. A hibridação não segue um padrão, cada situação será diferente e para podermos tomar decisões e entender o que está por trás desse fenômeno precisamos estudar caso por caso (Genovart, 2009). Segundo Allendorf & Luikart (2007), taxas de hibridação e introgressão têm aumentado devido à translocação acidental e intencional de organismos e modificações de habitats, na maioria dos casos realizada pelo homem. Esse fato tem contribuído para a extinção de diversas espécies direta ou indiretamente (Levin *et al.*, 1996; Allendorf *et al.*, 2001). Eventos de hibridação podem ser críticos para espécies endêmicas, podendo levar à perda de complexos gênicos co-adaptados, fenômeno conhecido como “genetic swamping” (Levin *et al.*, 1996; Rhymer & Simberloff, 1996; Lorenz-Lemke *et al.* 2006).

Há muitas dificuldades para identificar híbridos apenas morfologicamente, já que depois de muitas gerações de intercrossamentos a introgressão nem sempre é demonstrada fenotipicamente (Rhymer & Simberloff, 1996). Mesmo a presença de fenótipos intermediários pode representar outras situações como mutações, plasticidade fenotípica, tendências evolutivas, convergências evolutivas, ou separação de uma espécie em duas derivadas (Judd *et al.*, 2009). Marcadores moleculares podem ser úteis em estudos que visam diferenciar esses fenômenos, mas muitas vezes, a natureza estocástica do processo de coalescência causa a retenção de alelos. Esse processo, conhecido como sorteio de genes, torna difícil a diferenciação entre polimorfismo ancestral e hibridação (Wolf *et al.*, 1997; McCracken & Sorenson, 2005; Buckley *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2008).

O compartilhamento de alelos poderá estar presente em todas as populações de pares de espécies divergentes e, nesse caso, a diferenciação entre essas espécies será devida à frequência diferencial de alelos e não à existência de alelos exclusivos (Muir & Schlötterer, 2005). Uma abordagem biogeográfica pode ser utilizada para diferenciar hibridação recente de polimorfismo ancestral. Na presença de fluxo gênico, populações de

duas espécies que ocorrem próximas devem ser menos diferenciadas que populações distantes (Grant *et al.*, 2005, Muir & Schlötterer, 2005). Outra possível abordagem é a utilização de diferentes marcadores, por exemplo, diferentes *loci* nucleares. É pouco provável que o sorteio de linhagens atue igualmente em todos os *loci*, podendo-se dessa forma diferenciar esse processo de introgressão gênica (Buckley *et al.*, 2006).

Um processo que pode gerar um padrão genético semelhante ao descrito acima é a diferenciação recente de uma espécie derivada a partir de uma espécie progenitora, fenômeno que tem sido descrito em muitas famílias de plantas. Alguns padrões de variação genética são típicos desse processo: (1) a similaridade genética entre a espécie progenitora e a derivada deve ser alta, já que todos os alelos da derivada se originaram dos alelos da espécie progenitora; (2) a espécie derivada apresenta uma redução na variabilidade genética quando comparada com a progenitora; (3) os alelos da espécie derivada deverão ser um subconjunto daqueles encontrados na progenitora (4) a espécie derivada geralmente apresenta uma menor distribuição geográfica; (5) as duas espécies envolvidas podem hibridar (Purps & Kadereit, 1998; Mason-Gamer *et al.*, 1999, Perron *et al.*, 2000). Casos de espécies derivadas e progenitoras são mais bem caracterizados a partir da congruência de dados de diferentes genomas (plastidial, mitocondrial, nuclear) (Perron *et al.*, 2000).

1.5- Filogeografia, Genética de Populações, Conservação e Marcadores Moleculares

Para possibilitar o manejo e a conservação dos recursos genéticos existentes é necessário compreender os processos evolutivos envolvidos na manutenção da biodiversidade. A filogeografia é um campo integrativo da ciência que usa informações genéticas para estudar a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas encontradas dentro das espécies (Avice, 2000). Muitas espécies mostram uma estrutura populacional que pode ser interpretada em contextos geográficos e cronológicos. Decifrar os componentes espaciais e temporais da estrutura populacional e interpretar os processos ecológicos e evolutivos responsáveis por eles são os maiores objetivos da filogeografia (Beheregaray, 2008).

Baseada em uma amostragem apropriada de genes e indivíduos, a filogeografia pode ser utilizada para testar hipóteses biogeográficas, descrever a evolução do isolamento reprodutivo de unidades populacionais e inferir processos de origem, distribuição e manutenção da biodiversidade (Beheregaray, 2008). Além disso, pode ser usada para fazer inferências sobre mudanças no ambiente de uma população a partir de dados genéticos atuais.

Cada vez mais estudos que avaliam a diversidade genética de espécies vegetais e animais têm sido utilizados como ferramenta para a análise da biodiversidade e para guiar programas de manejo e conservação, tanto de ambientes específicos como de espécies em particular. O conhecimento da variabilidade genética das populações está sendo reconhecido em diversos países, inclusive no Brasil, por órgãos governamentais e privados que financiam as pesquisas e propõem a legislação na área de preservação. Essas informações estão sendo utilizadas inclusive como parte integrante do arcabouço científico que dará sustentação ao estabelecimento de parques e reservas (Frankham *et al.*, 2008).

Marcadores moleculares são uma ferramenta muito utilizada em estudos de genética de populações e filogeografia, pois permitem acessar um grande número de caracteres. O uso de marcadores moleculares, juntamente com informações morfológicas, permite acessar a história evolutiva dos organismos com alto grau de confiabilidade. Marcadores moleculares são ideais para o estudo de espécies ameaçadas, uma vez que fornecem uma grande quantidade de dados a partir de pouco material biológico que pode ser obtido por métodos não destrutivos (Petit *et al.*, 2001).

Entre os marcadores mais utilizados em estudos populacionais de plantas destacam-se as regiões não codificadoras do DNA plastidial (cpDNA), especialmente regiões intergênicas (Hamilton *et al.*, 2003). A frequente herança uniparental, geralmente materna, desses marcadores e a ausência de recombinação são vantagens para uma avaliação diferencial do fluxo de pólen e sementes (Liston *et al.* 2007). Eventos de hibridação no passado podem ser detectados por marcadores plastidiais, através de um fenômeno conhecido como captura de cloroplasto, em espécies que perderam as sequências híbridas no genoma nuclear, por deriva ou seleção (Liston *et al.* 2007). Como o genoma plastidial é haplóide, o tamanho efetivo populacional é menor que quando o genoma nuclear é considerado. Essa característica acelera o processo de deriva genética, conseqüentemente, o cpDNA pode apresentar diferenciação neutra maior que o DNA nuclear entre populações ou linhagens divergentes. 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 comparados a polimorfismos neutros do DNA nuclear (Hamilton *et al.* 2003). Enquanto genes do cpDNA passaram a ser utilizados para estudos filogenéticos, regiões não codificadoras são mais utilizadas em estudos taxonômicos em níveis mais baixos, como infra-genéricos (Shaw *et al.*, 2005). Os espaçadores intergênicos plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG* estão entre os mais usados para estudos populacionais e evolutivos, seja na construção de filogenias de espécies com diversificação recente (Kulcheski *et al.*, 2006) ou na investigação da ocorrência de hibridação (Lorenz-Lenke *et al.*, 2006).

A herança do genoma do cloroplasto é predominantemente materna em plantas, no gênero *Petunia* inclusive. Assim, sua utilização traça a genealogia de um dos parentais (Derepas & Dulieu, 1992). Muitas vezes, marcadores de cpDNA são incapazes de fornecer inferências diretas sobre alguns processos evolutivos (Sang 2002). Um tipo de marcador nuclear muito utilizado em estudos populacionais são os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal nuclear (nrDNA), mas no gênero *Petunia* estas regiões não apresentam variabilidade inter-específica suficiente para separar as espécies *P. exserta* e *P. axillaris* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006).

Diferentes tipos de marcadores nucleares podem ser utilizados em estudos sobre hibridação e especiação de plantas. O RFLP (polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição) é uma técnica baseada em fragmentos de restrição e hibridação

por *Southern Blot*, e foi por muito tempo a principal técnica molecular para a identificação de polimorfismos genéticos. Depois do surgimento dos métodos baseados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o RFLP está sendo menos utilizado. Isso ocorreu devido à necessidade de grandes quantidades de DNA genômico e desenvolvimento de sondas e marcadores radioativos para detecções mais sensíveis nessa técnica (Hartl, 2008). Uma alternativa ao RFLP são os marcadores CAPS (do inglês: cleaved amplified polymorphic sequences, para designar sítios polimórficos amplificados clivados), também chamados PCR-RFLP. Nos marcadores CAPS o genótipo é identificado por amplificação de um fragmento específico e digestão enzimática, ao invés de ser identificado por *Southern Blot*, como no RFLP tradicional. O desenvolvimento dos marcadores CAPS é trabalhoso e de alto custo, porque a identificação dos polimorfismos envolve a identificação das sequências desejadas, clonagem, desenvolvimento de *primers*, reações de PCRs, sequenciamento e busca por sítios de restrição (Tsumura & Tomaru, 1999). No entanto, depois dos polimorfismos identificados, essa abordagem é rápida e conveniente, permitindo acesso a polimorfismos Mendelianos e em um grande número de indivíduos (Konieczny & Ausubel, 1993). Uma pequena quantidade de DNA é suficiente para a reação de PCR e, como o tamanho dos fragmentos é conhecido, sítios de restrição podem ser distinguidos de eventos de inserção deleção. Além disso, essa técnica não é influenciada pela metilação do DNA, como no RFLP, e os produtos da digestão podem ser diferenciados em gel de agarose. Esses marcadores são geralmente desenvolvidos a partir de genes conhecidos ou cDNA, produzindo dados que podem ser classificados como homocigotos ou heterocigotos (Konieczny & Ausubel, 1993). Marcadores CAPS foram desenvolvidos para *Petunia* pelo grupo do Dr. Cris Kuhlemeier (Universidade de Berna, Suíça) a partir de cDNA, com o objetivo de realizar mapeamento genético de genes envolvidos com as modificações florais relacionadas aos diferentes polinizadores, como por exemplo coloração e odor. Assim, esses marcadores possibilitam uma abordagem diferenciada, uma vez que podem apresentar uma grande identidade com as espécies que apresentam diferentes polinizadores como no caso de *P. exserta* e *P. axillaris*.

Petunia exserta é uma das espécies de plantas com maior risco de extinção na região da Serra do Sudeste, além de ter uma distribuição restrita, extinções locais já foram descritas e a introgressão de genes plastidiais de *P. axillaris* foi relatada. Assim, um estudo populacional, utilizando diferentes tipos de marcadores genéticos, além de contribuir para

o melhor entendimento da influência da hibridação e introgressão na diversidade genética da espécie, será de grande importância para o planejamento de futuras estratégias para a conservação.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é contribuir para o entendimento da estrutura populacional da espécie *Petunia exserta*, como parte integrante da análise filogeográfica e conhecimento da biodiversidade do Bioma Pampa, utilizando para isso marcadores moleculares de cloroplasto (espaçadores intergênicos) e marcadores nucleares (CAPS), assim como informações geográficas e morfológicas.

2.1- Objetivos Específicos

2.1.1- Contribuir para o conhecimento da distribuição geográfica, modo de vida e variabilidade fenotípica nas populações de *P. exserta*.

2.1.2- Avaliar a variabilidade genética dentro e entre populações de *Petunia exserta* através do uso de marcadores moleculares.

2.1.3- Determinar as relações evolutivas entre os indivíduos da espécie através de um estudo filogeográfico baseado nos dados obtidos por marcadores moleculares.

2.1.4- Avaliar a presença de introgressão gênica a partir dos marcadores estudados.

2.1.5- Contribuir para o conhecimento taxonômico e evolutivo do gênero, fornecendo subsídios que reforcem a necessidade da criação de uma unidade de conservação na Serra do Sudeste.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Coleta do Material

O material analisado foi obtido através de coletas em populações naturais das espécies *P. exserta* e *P. axillaris*. Indivíduos de populações de *P. exserta* foram coletados nas primaveras dos anos de 2008 e 2009, numa área que abrange toda a distribuição conhecida da espécie, somando 258 indivíduos. Além desses indivíduos, foram incluídos nas análises 64 indivíduos utilizados por Lorenz-Lemke *et al.* (2006) (45 classificados como *P. exserta* e 19 como híbridos entre *P. exserta* e *P. axillaris*) que foram coletados no ano de 2002 (Figura 3 e Tabela 1).

As plantas coletadas nos mesmos abrigos em diferentes anos foram utilizadas para verificar se houve mudança na constituição genética das populações ao longo do tempo. Foram realizadas coletas nos mesmos abrigos em 2002 e 2009 ou em 2008 e 2009, o que permitiu uma comparação entre esses dois intervalos de tempo (sete anos e um ano). Nesse trabalho foram primeiramente classificados como *P. exserta* todos os indivíduos que cresciam dentro dos abrigos (ou cavernas), esse critério inclui os 19 indivíduos classificados como híbridos no trabalho de Lorenz-Lemke *et al.* (2006). Essa estratégia de coleta foi adotada devido à presença de uma grande variabilidade na coloração e posição do aparelho reprodutivo nas flores de *P. exserta* que impedia a classificação de híbridos somente pela morfologia. A distribuição conhecida da espécie é formada por um conjunto de populações na região das Guaritas, localizadas no Município de Caçapava do Sul e duas populações mais distantes localizadas no Município de Pinheiro Machado na localidade de Torrinhas (Figura 3). Nesse trabalho, trata-se como região das Guaritas uma área de aproximadamente 42 km² que inclui algumas das formações rochosas conhecidas como Guaritas e a Pedra da Cruz.

A amostragem de *Petunia axillaris* utilizada nesse trabalho abrange toda a distribuição conhecida da espécie no Rio Grande do Sul (223 indivíduos) e algumas populações do Uruguai (33 indivíduos) e Argentina (32 indivíduos). As coletas de indivíduos de *P. axillaris* foram realizadas em colaboração com Caroline Turchetto (dados não publicados), incluindo plantas pertencentes às três subespécies reconhecidas por Ando

(1996). Também foram analisados os 57 indivíduos utilizados no trabalho de Lorenz-Lemke *et al.* (2006) (Tabela 2 e Figura 3).

As coordenadas geográficas dos locais de coleta foram obtidas através do Sistema de Posicionamento Global (GPS) e uma exsicata de cada população foi confeccionada, as quais foram depositadas no Herbário ICN (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

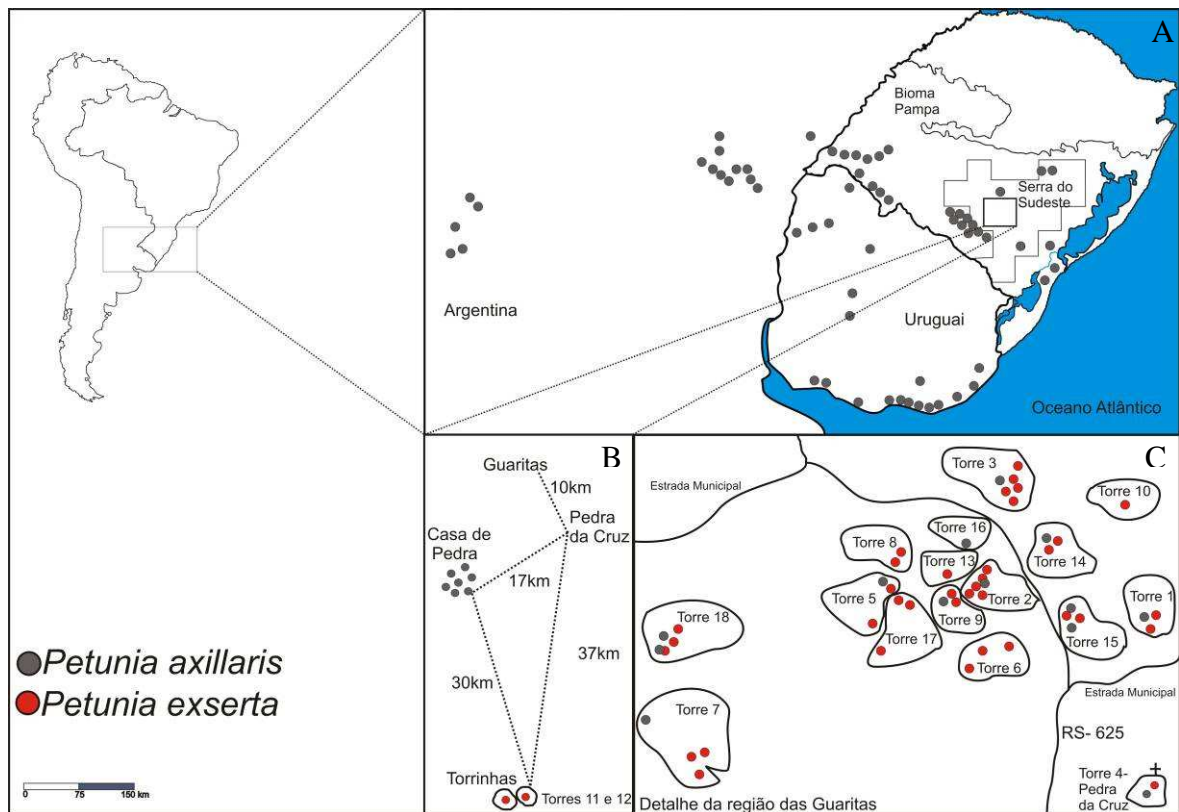


Figura 3- Amostragem total utilizada no trabalho. A) Pontos de coleta de *Petunia axillaris*; B) Detalhe de alguns pontos de coleta na Serra do Sudeste; C) Detalhe da região das Guaritas, representando os locais denominados como Guaritas e Pedra da Cruz.

Tabela 1- Amostragem de *Petunia exserta* utilizada no trabalho e número de indivíduos genotipados para cada marcador.

Pop.	Origem	Número de plantas Genotipadas		Ano de coleta	Coordenadas
		Cloroplasto	CAPS		
1	torre1/caverna1- Guaritas-	3	4	2002	30° 50' 19"S/
	Caçapava do Sul- RS*	0	7	2009	53° 29' 43"W
2	torre1/caverna2- Guaritas-	2	2	2002	30° 50' 18"S/
	Caçapava do Sul- RS	0	10	2009	53° 29' 42"W
3	torre2/caverna3- Guaritas-	9	9	2002	30° 50' 12"S/
	Caçapava do Sul- RS*	0	8	2009	53° 30' 17"W
4	torre2/caverna4- Guaritas-	16	19	2002	30° 50' 13"S/
	Caçapava do Sul- RS*	6	8	2009	53° 30' 19"W
5	torre2/caverna5- Guaritas-				30° 50' 10"S/
	Caçapava do Sul- RS	7	7	2002	53° 30' 16"W
6	torre2/caverna6- Guaritas-				31° 50' 14"S/
	Caçapava do Sul- RS	10	0	2009	53° 30' 16"W
7	torre2/caverna7- Guaritas-				30° 50' 12"S/
	Caçapava do Sul- RS	9	0	2009	53° 30' 18"W
8	torre3/caverna8- Guaritas-	3	3	2002	30° 49' 55"S/
	Caçapava do Sul- RS	0	6	2009	53° 30' 09"W
9	torre3/caverna9- Guaritas-				30° 49' 51"S/
	Caçapava do Sul- RS	3	5	2002	53° 30' 08"W
10	torre3/caverna10- Guaritas-	7	6	2002	30° 49' 53"S/
	Caçapava do Sul- RS*	4	4	2009	53° 30' 10"W
11	torre3/caverna11- Guaritas-				30° 49' 55"S/
	Caçapava do Sul- RS	5	0	2009	53° 30' 11"W
12	torre3/caverna12- Guaritas-				30° 49' 56"S/
	Caçapava do Sul- RS	3	0	2009	53° 30' 12"
13	torre4/caverna13- Pedra da	14	16	2002	30° 53' 48"S/
	Cruz- Caçapava do Sul- RS*	7	8	2009	53° 25' 16"W
14	torre11/caverna14- Torrinhas-	4	4	2007	31° 13' 30"S/
	Pinheiro Machado- RS	3	2	2009	53° 29' 51"W
15	torre5/caverna15- Guaritas-	8	9	2007	30° 50' 18"S/
	Caçapava do Sul- RS	3	0	2008	53° 30' 39"W
		0	9	2009	
16	torre5/caverna16- Guaritas-				30° 50' 12"S/
	Caçapava do Sul- RS	2	0	2009	53° 30' 35"W
17	torre6/caverna17- Guaritas-				30° 50' 24"S/
	Caçapava do Sul- RS	6	7	2008	53° 30' 17"W
18	torre6/caverna18- Guaritas-				30° 50' 22"S/
	Caçapava do Sul- RS	6	6	2008	53° 30' 12"W
19	torre6/caverna19- Guaritas-	7	6	2008	30° 50' 26"S/
	Caçapava do Sul- RS	8	8	2009	53° 30' 20"W
20	torre7/caverna20- Guaritas-	6	3	2008	30° 50' 40"S/
	Caçapava do Sul- RS	8	7	2009	53° 31' 11"W

Tabela 1- (continuação)

21	torre7/caverna21- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	1	1	2008	30° 50' 41"S/
		0	9	2009	53° 31' 11"W
22	torre7/caverna22- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	7	0	2009	30° 50' 44"S/
					53° 31' 11"W
23	torre8/caverna23- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	8	6	2008	30° 50' 07"S/
					53° 30' 34"W
24	torre8/caverna24- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	5	0	2008	30° 50' 07"S/
					53° 30' 33"W
25	torre9/caverna25- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	9	9	2008	30° 50' 14"S/
					0
26	torre9/caverna26- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	8	0	2009	30° 50' 14"S/
					53° 30' 22"W
27	torre10/ caverna27- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	2	2	2008	30° 49' 56"S/
					53° 29' 47"W
28	torre12/caverna28 Torrinhos- Pinheiro Machado- RS	26	22	2008	31° 13' 39"S/
					8
29	torre13/caverna29- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	4	4	2008	30° 50' 09"S/
					0
30	torre14/caverna30- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	11	12	2008	30° 50' 05"S/
					0
31	torre14/caverna31- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	8	0	2009	30° 50' 04"S/
					53° 30' 01"W
32	torre15/caverna32- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	7	5	2009	30° 50' 17"S/
					53° 30' 00"W
33	torre15/caverna33- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	5	5	2009	30° 50' 18"S/
					53° 29' 58"W
34	torre17/caverna34- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	7	0	2009	30° 50' 15"S/
					53° 30' 31"W
35	torre17/caverna35- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	10	0	2009	30° 50' 13"S/
					53° 30' 34"W
36	torre17/caverna36- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	6	0	2009	30° 50' 23"S/
					53° 30' 37"W
37	torre18/caverna37- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	3	4	2009	30° 50' 20"S/
					53° 31' 18"W
38	torre18/caverna38- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	10	10	2009	30° 50' 21"S/
					53° 31' 18"W
39	torre18/caverna39- Guaritas- Caçapava do Sul- RS	8	7	2009	30° 50' 23"S/
					53° 31' 19"W
Total	39 populações	322	306		

*cavernas onde foram encontrados indivíduos classificados como híbridos por Lorenz-Lemke *et al.*(2006).

Tabela 2- Indivíduos de *Petunia axillaris* utilizados no trabalho e número de plantas genotipadas para cada marcador.

Pop.	Origem	Número de plantas Genotipadas		Ano de coleta	Coordenadas
		cloroplasto	CAPS		
Taim	Rio Grande- RS- Brasil	5	1	2009	32° 24' 06"S/ 52° 33' 31"W
Taim2	Rio Grande- RS- Brasil	5	0	2009	32° 09' 29"S/ 52° 23' 57"W
Pelotas	Pelotas- RS- Brasil	5	0	2009	31° 42' 09"S/ 52° 21' 47"W
Machado	Pinheiro Machado – RS- Brasil	9	4	2008	31° 41' 25"S/ 53° 01' 27"W
Hulha	Hulha Negra- RS- Brasil	5	3	2007	31° 23' 36"S, 53° 49' 17" W
Hulha2	Hulha Negra- RS- Brasil	5	2	2008	31° 23' 28"S/ 53° 50' 08"W
Bagé4	Bagé- RS- Brasil	8	2	2008	31° 21' 50"S/ 53° 55' 36"W
Bagé3	Bagé- RS- Brasil	1	1	2007	31° 21' 15"S/ 53° 56' 24"W
Bagé5	Bagé- RS- Brasil	6	0	2009	31° 16' 00"S/ 54° 08' 02"W
Bagé	Bagé- RS- Brasil	4	1	2002	31° 13' 03"S / 54° 16' 53"W
Bagé- 2	Bagé- RS- Brasil	6	1	2006	31° 09' 39"S / 54 21' 31" W
Pedrito	Dom Pedrito- RS- Brasil	6	2	2009	31° 05' 37"S/ 54° 27' 28"W
Aceguá	Aceguá- RS- Brasil	6	2	2009	31° 27' 17"S/ 54° 08' 25"W
Pedra5	Casa de Pedra- Bagé RS- Brasil	6	4	2009	30° 58' 38"S/ 53° 36' 19"W
Pedra	Casa de Pedra- Bagé RS- Brasil	5	3	2008	30° 58' 35"S/ 53° 36' 19"W
Pedra6	Casa de Pedra- Bagé RS- Brasil	6	0	2009	30° 58' 28"S/ 53° 36' 09"W
Pedra3	Casa de Pedra- Bagé RS- Brasil	11	4	2008	30° 58' 22"S/ 53° 36' 19"W
Pedra2	Casa de Pedra- Bagé RS- Brasil	5	2	2008	30° 58' 04"S/ 53° 35' 43"W
Pedra4	Casa de Pedra- Bagé RS- Brasil	5	0	2009	30° 58' 05"S/ 53° 35' 31"W
Pedra1	Casa de Pedra- Bagé RS- Brasil	8	2	2008	30° 58' 06"S/ 53°35' 22"W

Tabela 2- (continuação)

Caçapava	Caçapava do Sul- RS- Brasil	4	4	2002	30° 34' 05"S/ 53° 23' 18"W
Pantano2	Pantano Grande- RS- Brasil	7	2	2008	30° 12' 55"S/ 52° 33' 55"W
Pantano	Pantano Grande- RS- Brasil	8	3	2002	30° 12' 11"S / 52° 27' 23"W
Torre1/ caverna1	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	3	3	2002	30° 50' 19"S/ 53° 29' 43"W
Torre2/ caverna3	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	3	3	2002	30° 50' 12"S/ 53° 30' 17"W
Torre3/ caverna8	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	2	2	2002	30° 49' 55"S/ 53° 30' 09"W
Torre4/ caverna 13	Pedra da Cruz- Caçapava do Sul-RS- Brasil	10	9	2002	30° 53' 48"S/ 53° 25' 16"W
Torre5	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	5	0	2009	30° 50' 11"S/ 53° 30' 34"W
Torre7	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	6	2	2009	30° 50' 32"S/ 53° 31' 24"W
Torre9	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	5	10	2008	30° 50' 14" S/ 53° 30' 24"W
Torre14	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	6	0	2009	30° 50' 03"S/ 53° 29' 60"W
Torre15/ caverna32	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	4	4	2009	30° 50' 17"S/ 53° 30' 00"W
Torre15-2	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	6	5	2009	30° 50' 14"S/ 53° 29' 57"W
Torre16	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	6	0	2009	30° 50' 04"S/ 53° 30' 19"W
Torre 18/ caverna 38	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	5	5	2009	30 50' 21"S/ 53° 31' 18"W
Torre18- caverna 39	Guaritas- Caçapava do Sul-RS- Brasil	3	2	2009	30° 50' 23"S/ 53° 31' 19"W
Livrament2	Santana do Livramento- RS- Brasil	6	0	2009	30° 45' 07"S/ 55° 45' 10"W
Livramento	Santana do Livramento- RS- Brasil	8	4	2002	30° 36' 56"S/ 55° 56' 19"W
Livrament3	Santana do Livramento- RS- Brasil	9	2	2002	30° 34' 28"S/ 56° 03' 50"W
Quaraí	Quaraí- RS- Brasil	12	3	2002	30° 18' 41"S/ 56° 28' 43"W

Tabela 2- (continuação)

Alegrete2	Alegrete- RS- Brasil	7	2	2006	29° 51' 35"S/ 55° 56' 47"W
Alegrete	Alegrete- RS- Brasil	12	4	2006	29° 56' 13"S/ 56° 04' 20"W
Quaraí2	Quaraí- RS- Brasil	5	2	2006	30° 00' 50"S/ 56° 13' 07"W
Alegrete3	Alegrete- RS- Brasil	5	2	2009	30° 00' 55"S/ 56° 26' 02"W
Uruguai2	Uruguai- RS- Brasil	6	2	2009	29° 53' 10"S/ 56° 44' 53"W
Uruguai	Uruguai- RS- Brasil	5	2	2003	29° 50' 29"S/ 56° 56' 28"W
Negro S1	Uruguai- Departamento de Durazno	1	1	2009	33° 00' 03"S/ 56° 37' 36"W
Colonia 1	Uruguai- Departamento de Colônia	2	2	2008	34° 20' 09"S/ 57° 20' 05"W
Laplata	Uruguai- Departamento de Colônia	2	2	2008	34° 26' 06"S/ 57° 16' 27"W
Laplata2	Uruguai- Departamento de San José	2	2	2008	34° 45' 53"S/ 56° 24' 25"W
Piriapolis	Uruguai- Departamento de Maldonado	2	2	2007	34° 53' 13"S, 55° 11' 57"W
Ballena	Uruguai- Departamento de Maldonado	2	2	2007	34° 54' 48"S/ 55° 02' 45"W
Maldonado	Uruguai- Departamento de Maldonado	2	2	2007	34° 54' 35"S/ 54° 59' 58"W
Deleste1	Uruguai- Departamento de Maldonado	1	2	2007	34° 55' 04"S/ 54° 58' 29"W
Deleste2	Uruguai- Departamento de Maldonado	2	2	2007	34° 52' 20"S/ 54° 45' 05"W
Ignacio	Uruguai- Departamento de Maldonado	2	2	2007	34° 46' 35"S/ 54° 40' 59"W
Rocha	Uruguai- Departamento de Rocha	2	2	2007	34° 30' 57"S/ 54° 20' 43"W
Polonio	Uruguai- Departamento de Rocha	2	2	2007	34° 24' 09"S/ 53° 47' 01"W
Castillos	Uruguai- Departamento de Rocha	1	2	2007	34° 3' 18"S/ 53° 53' 27"W
Minas (19)	Uruguai- Departamento de Lavalleja	2	2	2007	34° 21' 46"S/ 55° 09' 50"W
Negro N	Uruguai- Departamento de Tucuarembó	2	2	2009	32° 39' 52"S/ 56° 28' 52"W
Tucuaremb	Uruguai- Departamento de Tucuarembó	1	1	2009	31° 48' 43"S/ 56° 12' 59"W

Tabela 2- (continuação)

Artigas1	Uruguai-Departamento de Artigas	0	2	2009	30° 34' 08"S/ 56° 36' 16"W
Salto 3	Uruguai- Departamento de Salto	1	2	2008	31° 18' 45"S/ 57° 05' 34"W
Salto 1	Uruguai- Departamento de Salto	2	2	2008	31° 27' 21"S/ 57° 54' 19"W
C 11	Argentina-Província de Corrientes	1	2	2008	29° 33' 44"S/ 57° 30' 40"W
C 10	Argentina-Província de Entre Ríos	0	2	2008	30° 31' 38"S/ 58° 32' 59"W
C 1	Argentina-Província de Corrientes	2	2	2008	30° 12' 08"S/ 58° 47' 21" W
C 9	Argentina-Província de Corrientes	2	2	2008	30° 10' 45"S/ 59° 00' 46"W
C 3	Argentina-Província de Entre Ríos	1	2	2008	30° 23' 24"S/ 58° 42' 52" W
C 8	Argentina-Província de Corrientes	2	2	2008	30° 19' 50"S/ 59° 14' 42"W
C 6	Argentina-Província de Corrientes	1	1	2008	30° 19' 00"S/ 59° 21' 49"W
C 2	Argentina-Província de Corrientes	1	2	2008	30° 13' 01"S/ 59° 23' 39"W
C 7	Argentina-Província de Corrientes	0	2	2008	30° 12' 45"S/ 59° 29' 26"W
C 5	Argentina-Província de Corrientes	2	2	2008	29° 48' 18"S/ 59° 23' 42"W
C 4	Argentina-Província de Corrientes	2	2	2008	29° 39' 53"S/ 59° 21' 40"W
CO 1	Argentina- Província de Córdoba	2	2	2008	30° 51' 58"S/ 64° 29' 30"W
CO 3	Argentina- Província de Córdoba	3	3	2008	30° 51' 21"S/ 64° 31' 47"W
CO 4	Argentina- Província de Córdoba	1	1	2008	31° 18' 47"S/ 65° 05' 40"W
C06	Argentina- Província de Córdoba	2	2	2009	31° 45' 03"S/ 64° 55' 51"W
CO 2	Argentina- Província de Córdoba	3	3	2008	31° 47' 49"S/ 65° 00' 23"W
Total	82 populações	333	181		

Para as análises genéticas foram coletadas folhas jovens, tomando-se o cuidado de não danificar os indivíduos amostrados de *P. exserta*. As folhas foram acondicionadas em sílica-gel para secagem e posterior extração de DNA. Foram coletadas amostras de todos os indivíduos presentes em cada população encontrada de *P. exserta*, inclusive sem flores, excluindo-se os indivíduos muito pequenos. Foram considerados pertencentes a uma mesma população todos os indivíduos observados dentro de um abrigo em cada torre ou, no caso de *P. axillaris*, quando as populações estavam em torres diferentes ou próximas a abrigos diferentes na mesma torre. Em locais fora da região das Guaritas, foram considerados como pertencentes a uma mesma população de *P. axillaris* os indivíduos que formavam agrupamentos claramente distintos geograficamente (coletados a mais de 10 km de distância). A amostragem utilizada de *P. axillaris* visa somente a comparação entre os componentes genéticos das duas espécies. Assim, um esforço de coleta maior foi feito nas populações da região das Guaritas, devido ao relato da ocorrência de hibridação com *P. exserta* nessa localidade (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Contudo, foram utilizadas populações de *P. axillaris* simpátricas e alopátricas a *P. exserta* para permitir uma melhor compreensão das relações evolutivas e eventos de hibridação entre as duas espécies.

3.2- Extração do DNA

Depois de secas em sílica-gel, as folhas coletadas foram pulverizadas com nitrogênio líquido em gral e o DNA foi extraído pela técnica de Roy *et al.* (1992), modificada e adaptada para espécies de *Petunia*, como será descrito a seguir:

- 20 mg de material macerado;
- Adição de 600 µl de tampão de extração (100 mM TRIS-HCl; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoetanol; 2% PVP), 10% de β-mercaptoetanol e 0,06 mg de Proteinase K ;
- Incubação a 65°C por 30 minutos;
- Emulsão com 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1);
- Centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm;
- Recolhimento da fase aquosa e estimativa do seu volume;
- Precipitação do DNA com um volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio;
- Armazenamento por 24 horas em freezer -18°C;
- Centrifugação por 20 minutos e descarte do sobrenadante;
- Lavagem do “pellet” com 200 µl de etanol 70% e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos;
- Eluição do “pellet” em 100 µl de água ultra-pura estéril e 0,01mg de RNase .

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

3.3- Marcadores CAPS

3.3.1- Caracterização

Os marcadores CAPS utilizados nesse trabalho foram desenvolvidos pelo grupo do Dr. Kuhlemeier, a partir de linhagens de *Petunia* mantidas em laboratório (Venail *et al.*, 2010). Para a realização do presente trabalho, primeiramente, foi realizada uma busca no banco de dados do grupo por marcadores que fossem polimórficos entre *P. axillaris* (todas as subespécies) e *P. exserta*, ou seja, apresentassem um padrão de bandas específico para cada uma dessas espécies (o banco de dados ainda não está disponível para consulta pública). Isso permitiria a diferenciação rápida entre indivíduos “puros” e híbridos. Os marcadores também foram selecionados pela possibilidade de fácil diferenciação em gel de agarose, visando minimizar os erros de genotipagem e, além disso, como os CAPS estão mapeados em *Petunia*, procurou-se abranger todos os sete cromossomos. Após essa etapa, foram selecionados 14 marcadores que foram testados em 15 amostras de populações naturais (oito *P. axillaris* e sete *P. exserta*). Para o restante das análises foram selecionados aqueles marcadores que apresentaram especificidade maior que 60%. Ou seja, mais de 60% dos indivíduos testados de uma espécie apresentavam padrões de bandas únicos da espécie quando comparadas as duas espécies utilizadas nesse trabalho. Dos 14 marcadores testados, cinco apresentaram especificidade maior que 60% e foram utilizados para genotipar um total de 487 indivíduos (Tabela 3). Essa amostragem abrangeu toda a distribuição conhecida da espécie *P. exserta* e foram utilizadas populações de *P. axillaris* simpátricas e alopátricas à distribuição da primeira espécie citada para uma melhor compreensão do compartilhamento dos alelos. Esta parte do trabalho foi iniciada em Berna, Suíça (Institute of Plant Sciences) e finalizada no Laboratório de Evolução Molecular (LEM), UFRGS.

O marcador HF1 está localizado do gene *Hf1* que participa da rota de síntese de antocianina em *Petunia* (Matsubara *et al.*, 2006). O marcador EPF1 se localiza no gene *EPF1*, uma provável proteína de ligação ao DNA, que atuaria em genes da rota de síntese de aminoácidos aromáticos e compostos secundários em *Petunia* (Takatsuji *et al.*, 1991). O CAPS MYBX está no gene descrito como *MYBX* de *Petunia*, um fator de transcrição cuja

função ainda não está totalmente esclarecida (Tornielli *et al.*, 2009). Os MYBs 75 e 60 apresentam identidade, em diferentes proporções, com fatores de transcrição de plantas (Cominelli *et al.*, 2005; Teng *et al.*, 2005).

Tabela 3- Marcadores CAPS, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para cada marcador e localização cromossômica.

Marcador	Sequências dos <i>primers</i>		Localização
HF1	B95(f)	TCCCTCATTAATTAACCATATCTC	Cromossomo 1
	B96(r)	CATGGATAGCTACCGAACG	
EPF1	B191(f)	GCTAGAGCAAGTGTAGTTGAAGG	Cromossomo 3
	B19(r)	ATCGATTGAGTCTTCGGAGAACTCC	
MYB75	B192(f)	GAATAGTGTTCAATTTCCAAC	Cromossomo 3
	B193(r)	GTCACTAACATCTGCAGCTAATTCC	
MYB60	B167(f)	CAATGGGAAAGGACACTTCA	Cromossomo 4
	B168(r)	ATTGGAATGTCACATCCTAA	
MYBX	MyBxF(f)	TCTCATCCACTACTAGTCTTTCAAAC	Cromossomo 6
	MyBxR(r)	AACTGATGACTAGGAATGAGCCTAA	

3.3.2- Amplificação e clivagem

As PCRs foram desenvolvidas em termociclador automático MJ Res. Inc., utilizando-se diferentes temperaturas de anelamento para cada marcador (Tabela 4). As condições de reação de PCR estão descritas no Quadro 1. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado com GelRed™ e visualizado em transiluminador de luz UV. A verificação do tamanho dos produtos de PCR foi realizada visualmente, comparando-se a banda obtida com o marcador de peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen). Após a verificação, os fragmentos amplificados foram clivados com enzimas de restrição FastDigest®- Fermentas (Tabela 4). A verificação da clivagem foi realizada em gel de agarose 2,5% corado com GelRed™ e visualizado em transluminador de luz UV. Os diferentes padrões de bandas foram considerados alelos diferentes, os quais foram determinados por leitura manual.

Tabela 4- Temperaturas de anelamento para cada conjunto de *primers* e enzimas de restrição utilizadas para cada marcador.

Marcador	<i>Primers</i>	Temperatura de anelamento	Enzima utilizada e modo de clivagem
HF1 (≈700pb)	B95 - B96	50°C	AluI (37°C-15min)
EPF1(≈360pb)	B191 - B19	56°C	MseI=TruII (65°C-15min)
MYB75(≈550pb)	B192 - B193	52°C	NsiI (37°C- 15min)
MYB60(≈600pb)	B167 - B168	52°C	AluI (37°C- 15min)
MYBX (≈820pb)	MybxF - MybxR	52°C	NsiI (37°C 15-min)

Reação	Concentração final
Tampão	1X
DNTP	0,2 mM
MgCl ₂	3 mM
Primer psbA F	0,16 µM
Primer trnH R	0,16 µM
Platinum® Taq (Invitrogen)	0,5 U
DNA	50 ng
Condições de amplificação	
	94°C por 3min
35 ciclos	{ 94°C por 30s X °C por 30s 72°C por 1min 72°C por 5min

Quadro 1- Condições para amplificação dos marcadores CAPS.

3.3.3- Análises dos dados

Cada padrão de bandas foi considerado como um alelo diferente, sendo codificado como 1, 2, 3, 4 para homozigotos e 1/2, 1/3, 1/4, 2/3, 2/4, 3/4 para heterozigotos (Figura 4).

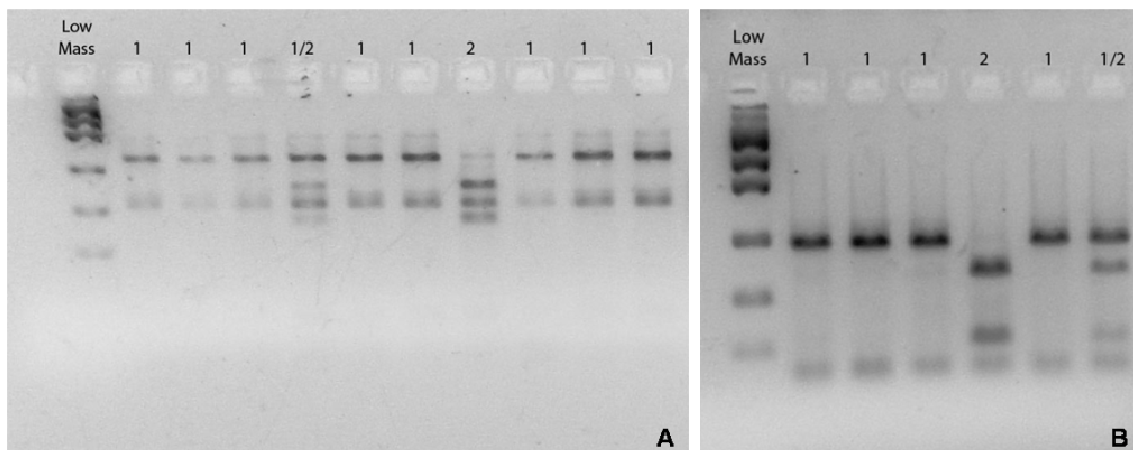


Figura 4- Exemplo do modo de genotipagem dos indivíduos (Low Mass- Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen); 1- alelo 1, 2- alelo 2, 1/2- heterozigoto) A) marcador MYB60; B) marcador EPF1.

Após a confecção da tabela com todos os alelos, foram calculadas as frequências alélicas e o número de alelos por *locus* com o programa Genepop 4.0.10 (Rousset, 2008). Esse programa também foi utilizado para calcular a diferenciação gênica entre as espécies de *P. exserta* e *P. axillaris* que foi testada pelo teste exato G (Goudet *et al.*, 1996).

O programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para estimar a constituição genética de cada indivíduo por inferência bayesiana. O programa calcula por verossimilhança a porcentagem do genoma de cada indivíduo que pertence a determinado grupo (número de grupos = K, esse dado deve ser fornecido ao programa), sem informações *a priori* (por exemplo, se o indivíduo pertence a uma população ou outra). Foram testados os valores de K de 1 a 5 e cinco corridas independentes com 500.000 simulações pelo método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) e 50.000 gerações *burn-in* foram usadas para cada valor de K. Foi utilizado o modelo de mistura (*admixture model*). O parâmetro alfa (α) para o grau de mistura foi inferido pelo programa, o parâmetro lambda (λ) que faz referência às frequências alélicas iniciais foi definido como um e não foram fornecidas informações sobre a procedência de cada indivíduo. O melhor valor de K foi determinado pelo método sugerido no manual do programa e pelo método

implementado por Evanno *et al.* (2005). Os dois métodos são baseados nas diferenças entre os valores de “Ln Prob of data” ($L(K)$) para cada K . Esse valor se refere à probabilidade de obter determinado resultado com os dados fornecidos ao programa. Segundo o manual do programa, quando ocorre um platô da distribuição dos valores de “Ln Prob of data”, o primeiro valor deve ser o melhor K , além disso, o melhor valor de K deve apresentar o menor desvio padrão entre os valores de $L(K)$. O método de Evanno *et al.* (2005) visa realçar o ganho nos valores de $L(K)$ que ocorre no verdadeiro valor de K através do cálculo de ΔK ($\Delta K = \text{média} (|L(K + 1) - 2 L(K) + L(K - 1)|) / s[L(K)]$).

Através da tabela com valores de ancestralidade inferida, fornecida pelo programa STRUCTURE 2.3.1, para cada indivíduo, foi calculada a probabilidade média dos indivíduos coletados em diferentes anos estarem em um grupo ou outro ($K=2$). A análise estatística desses dados foi realizada com o teste T de Wilcoxon no programa Bioestat 5.0 (disponível no sítio <http://www.mamiraua.org.br/>).

3.4- Marcadores Plastidiais

3.4.1- Amplificação e sequenciamento

Para a amplificação dos espaçadores intergênicos plastidiais *trnS-trnG* e *trnH-psbA* foram utilizados *primers* universais descritos por Hamilton (1999) e Sang *et al.* (1997), respectivamente. As PCRs foram realizadas em termociclador automático MJ Res. Inc., com protocolo padrão adaptado para cada marcador (Quadros 2 e 3). Estes marcadores foram escolhidos por serem os que melhor estimam a variabilidade genética em populações de espécies do gênero *Petunia*, incluindo *P. exserta* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). O marcador *psbB/psbH* apresentou-se pouco variável em trabalhos anteriores (somente dois sítios) e não foi utilizado. Os espaçadores intergênicos de cloroplasto *trnL-trnF* e *rps12-rpl20*, o íntron de *trnL* e marcadores nucleares ITS também apresentaram baixos níveis de variabilidade (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006), não sendo incluídos nesta análise.

Reação	Concentração final
Tampão	1X
DNTP	0,2 mM
MgCl ₂	3 mM
Primer <i>trnS</i> F	0,12 μM
Primer <i>trnG</i> R	0,12 μM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng
Condições de amplificação	
	94°C por 3min
30 ciclos	{ 94°C por 1min 58°C por 1min 72°C por 45s 72°C por 5min
Sequências dos <i>primers</i> para PCR e sequenciamento (Hamilton, 1999)	
Primer <i>trnS</i> (GCU) F	5' GCT TTA GTC CAC TCA GC 3'
Primer <i>trnG</i> (UCC) R	5' GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C 3'

Quadro 2 – Condições relacionadas às determinações do marcador *trnS-trnG*.

Reação	Concentração final
Tampão	1X
DNTP	0,2 mM
MgCl ₂	3 mM
Primer <i>psbA</i> F	0,16 µM
Primer <i>trnH</i> R	0,16 µM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng
Condições de amplificação	
35 ciclos	94°C por 3min 94°C por 45s 58°C por 1min 72°C por 2min 72°C por 10min
Sequências dos primers para PCR e sequenciamento (Sang <i>et al.</i> , 1997)	
Primer <i>psbA</i> F	5' GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C 3'
Primer <i>trnH</i> R	5' CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC 3'

Quadro 3- Condições relacionadas às análises envolvendo o marcador *psbA-trnH*.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ e visualizado em transiluminador de luz UV para a confirmação da amplificação. A verificação dos tamanhos dos produtos de PCR foi realizada comparando-se a banda obtida com o marcador de peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados segundo o protocolo de Dunn & Blattner (1987), descrito a seguir:

- Adição de igual volume de PEG 20% (p/v) ao produto de PCR e homogeneização;
- Incubação a 37 °C por 30min;
- Centrifugação a 14000 rpm por 20min;
- Descarte cuidadoso do sobrenadante;
- Adição de 125 µl de EtOH 80% gelado. Incubação por 1min e centrifugação por 2min;
- Descarte do sobrenadante;
- Repetição dos 5º e 6º passos com etanol absoluto;
- Evaporação do EtOH residual a 70 °C por 10min;
- Ressuspensão do produto de PCR em 15 µl de H₂O ultra-pura estéril e incubação à temperatura ambiente por 12 horas.

O sequenciamento do DNA foi realizado em equipamento automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences – GE Health Care), seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamic™ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente, de acordo com as especificações do fabricante. As condições da reação de sequenciamento estão descritas no Quadro 4.

Componentes da reação	Quantidade	Condições de amplificação
<i>DYEnamic™ET terminator sequencing premix</i>	4 µl	35 ciclos: 95°C por 20s
Produto de PCR purificado	40 ng	50°C por 15s
<i>Primer</i>	5 µM	60°C por 1min
Água milli-Q	completar 10 µl	

Quadro 4- Condições das reações de sequenciamento.

Antes do sequenciamento, cada amostra foi purificada diretamente nas placas do sequenciador, como segue:

- Adição de 75 μ M de acetato de amônia e 3X o volume inicial de etanol absoluto (temperatura ambiente);
- Mistura por 30 inversões;
- Centrifugação da placa por 45min a 1780 RCF a 20 °C;
- Descarte do sobrenadante por inversão;
- *Spin* a 500 RCF com a placa invertida e apoiada em papel toalha;
- Adição de 100 μ l de etanol 70% (temperatura ambiente);
- *Spin* a 1780 RCF;
- Descarte do sobrenadante;
- *Spin* a 750 RCF com a placa invertida;
- Adição de 10 μ l de *Loading Solution* e fechamento da placa com adesivo;
- Ressuspensão em vórtex por 5min;
- *Spin* a 1780 RCF;
- Encaminhamento ao sequenciador.

3.4.2- Análises das sequências

Os cromatogramas para as sequências obtidas foram verificados com o auxílio do programa Chromas 2.33 (disponível no sítio www.technelysium.com.au) e as sequências foram alinhadas manualmente com o auxílio do programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997). Os eventos de inserção e deleção e os dados faltantes foram removidos da análise, depois de uma pré-corrída com os dados completos, por se tratarem de caracteres de aparente evolução rápida, cuja verdadeira dinâmica mutacional não pode ser acessada (Aldrich *et al.*, 1988). Os sítios variáveis e os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica foram determinados com o programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2005).

Para inferir eventos como expansão populacional nas populações de *P. exserta* foram calculados os índices de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997) e a *pairwise mismatch distribution*, distribuição do número de diferenças observadas entre todos os haplótipos tomados par a par (Rogers & Harpending, 1992) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de *bootstrap* (programa Arlequin 3.11).

Os diferentes haplótipos foram detectados através do programa DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003). As relações evolutivas entre as sequências foram inferidas pelo método de *Median Joining Network* (Bandelt *et al.*, 1999) no programa Network 4.5 (disponível no sítio <http://www.fluxus-engineering.com>) com a construção de uma rede de haplótipos. Na construção de uma árvore filogenética, espécies que divergiram recentemente podem apresentar a persistência de nós ancestrais, multifurcação e reticulação. Nesse contexto, a construção de *networks* (rede de haplótipos) ao invés de filogenias é mais informativa (Posada & Crandall, 2001). A diferenciação genética entre as populações de *Petunia exserta* foi estimada através da análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) no intervalo de confiança de 95% após 1000 permutações, onde foi calculado o índice de fixação Φ_{ST} (programa Arlequin 3.11).

Foram utilizadas populações de *P. axillaris* simpátricas e alopátricas à distribuição de *P. exserta* para uma melhor compreensão do compartilhamento dos haplótipos (hibridação ou retenção de polimorfismo ancestral).

4- RESULTADOS

4. 1- Distribuição geográfica e morfologia de *P. exserta*

Até a realização do presente trabalho, a distribuição conhecida de *P. exserta* se restringia a quatro torres de arenito e conglomerado na região das Guaritas, município de Caçapava do Sul, sendo essa espécie considerada de distribuição muito restrita e com altas exigências de habitat (Stehmann, 1987; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Com esse trabalho, foram descobertas 30 novas populações, sendo 28 encontradas na região das Guaritas, enquanto que as duas restantes foram encontradas na localidade de Torrinhass, município de Pinheiro Machado. Sabia-se da possibilidade de existência da espécie em Torrinhass através de conversas com moradores locais. A localidade foi visitada em três primaveras (anos de 2007, 2008 e 2009), quando foram encontradas duas populações. Todas as populações encontradas estavam no habitat descrito como característico da espécie. As plantas são sempre encontradas em aberturas na rocha, ou muito próximas à rocha, em locais sombrios e úmidos, sem a incidência de luz direta ou chuva.

A amostragem utilizada nesse trabalho tem uma distribuição disjunta (Figura 5), mas durante as saídas de campo foi possível conhecer melhor a região da Serra do Sudeste. Nessa região, existe um número muito grande de formações rochosas com as mesmas características deposicionais de onde a espécie é encontrada. Assim, é muito provável que existam mais populações desconhecidas da espécie, inclusive no Uruguai, pois a Serra do Sudeste se estende até esse país.

Novas populações são difíceis de encontrar, uma vez que é necessário escalar as formações rochosas para verificar as reentrâncias na pedra. Tais formações estão localizadas em locais que não possuem acesso direto e são necessárias longas caminhadas, muitas vezes no meio do mato, até se chegar à rocha.

Em praticamente todas as populações, os indivíduos apresentavam variação na coloração da flor e essa variação nem sempre foi associada à hibridação (ver item seguinte). Até hoje, pensava-se que a espécie *P. exserta* era caracterizada por flores vermelhas e estames e estigma exsertos, mas tanto a coloração como a posição do aparelho reprodutivo parecem ter uma ampla variação, mesmo dentro de cada população. Assim, os

tamanhos dos estames e do estigma também variam, como descrito por Stehmann (1987), e parece não existir uma sincronia entre coloração e tamanho das estruturas reprodutivas (Figura 6).

Todas as vezes que encontramos populações de *P. axillaris* na região de simpatria entre as duas espécies, essas estavam fora dos abrigos, em cima das torres, ou mesmo bem próximas aos abrigos, mas em locais mais claros, onde *P. exserta* não era encontrada, como já havia sido descrito por Lorenz-Lemke *et al.* (2006).

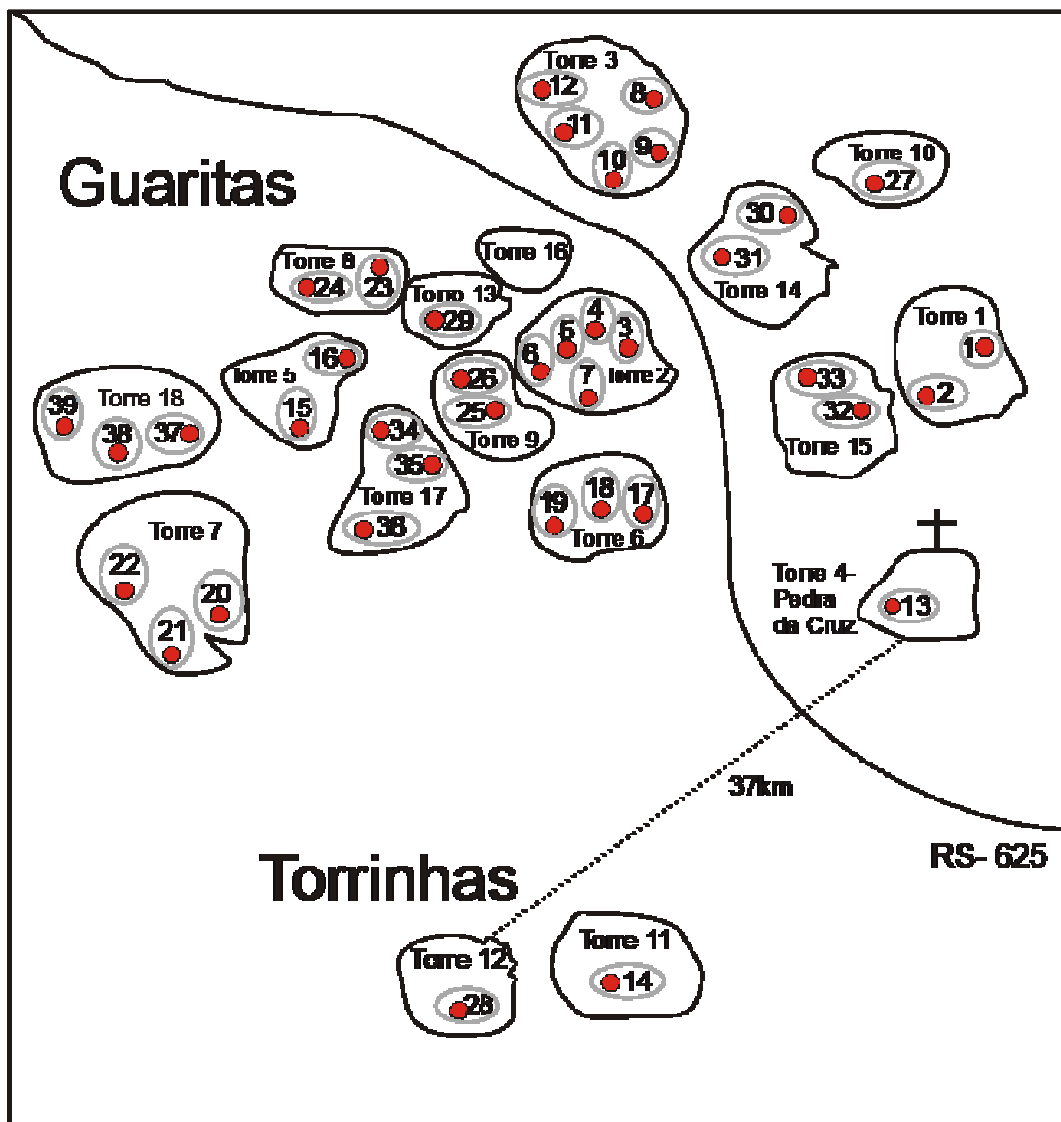


Figura 5- Distribuição conhecida da espécie *Petunia exserta*. Representação das torres e cada abrigo (ou caverna) em cinza. A localidade de Torrinhãs no município de Pinheiro Machado localiza-se a 37 km em linha reta da Pedra da Cruz. A torre 16 apresenta somente uma população de *P. axillaris*.

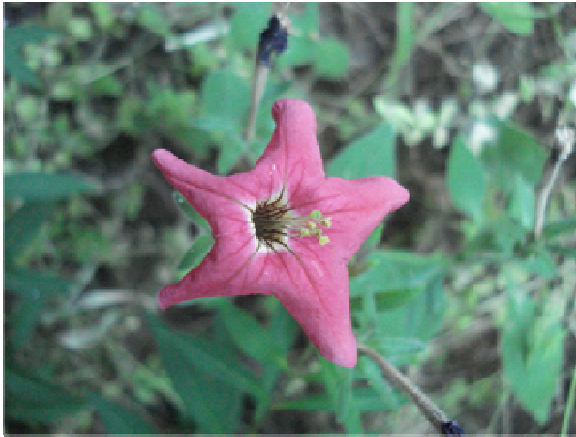


Figura 6- Variabilidade na coloração das flores encontrada nas populações de *Petunia exserta*.

4. 1- Especificidade dos marcadores CAPS

O número de alelos encontrados com os marcadores CAPS variou de um a quatro, sendo que apenas um marcador, MYB75, apresentou três alelos com frequência superior a 10%. Os demais *loci* apresentaram dois alelos com frequência acima desse limiar. Dois marcadores (HF1 e MYB75) apresentaram alelos raros, com frequência menor que 10%, encontrados em poucas plantas (Figura 7). Os alelos raros foram encontrados somente em populações de *P. axillaris*.

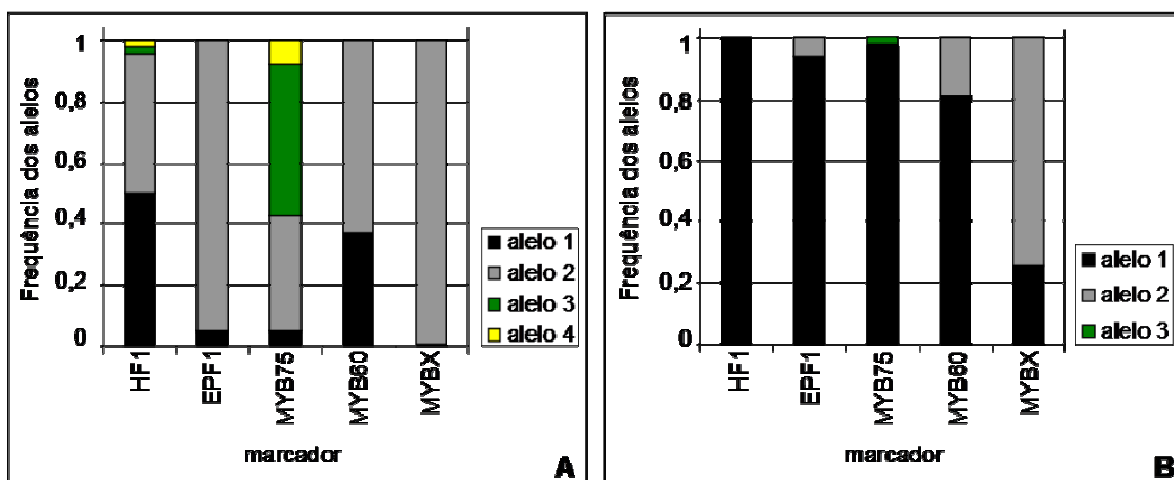


Figura 7- Frequências alélicas- marcadores CAPS.

A) Frequência dos alelos encontrados em *Petunia axillaris*; B) Frequência dos alelos encontrados em *Petunia exserta*.

A frequência dos alelos foi calculada para *P. axillaris* e *P. exserta*, separadamente, para verificar a identidade da variação entre as duas espécies (Figura 7). Para determinar a espécie, nesse caso, usou-se o critério da localização: foram classificadas como *P. exserta* todas as plantas encontradas nos abrigos nas torres e como *P. axillaris* as demais plantas. Mesmo que, nesse caso, algumas plantas possam ser híbridas, os marcadores mostraram uma diferenciação gênica significativa ($p < 0,01$ para todos os *loci*) entre os dois grupos. Os dados demonstram que apesar de não ser completa, existe uma boa correspondência dos diferentes alelos encontrados para cada marcador entre as duas espécies estudadas. Isso permite a utilização desses marcadores para classificar as plantas como *P. axillaris* e *P. exserta* ou híbridos entre essas duas espécies.

O programa Structure 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para calcular o grau de compartilhamento de ancestralidade entre as plantas das duas espécies. O melhor valor de K encontrado foi dois, tanto quanto pelo método de determinação de K sugerido no manual do programa como pelo método de Evanno *et al.*, (2005) (Figura 8). Os valores de ancestralidade encontrados nas 5 corridas com K=2 foram muito semelhantes. A divisão em dois grupos separou, de modo geral, os indivíduos de acordo com as duas espécies, com algumas plantas apresentando mistura entre os dois grupos (Figura 9).

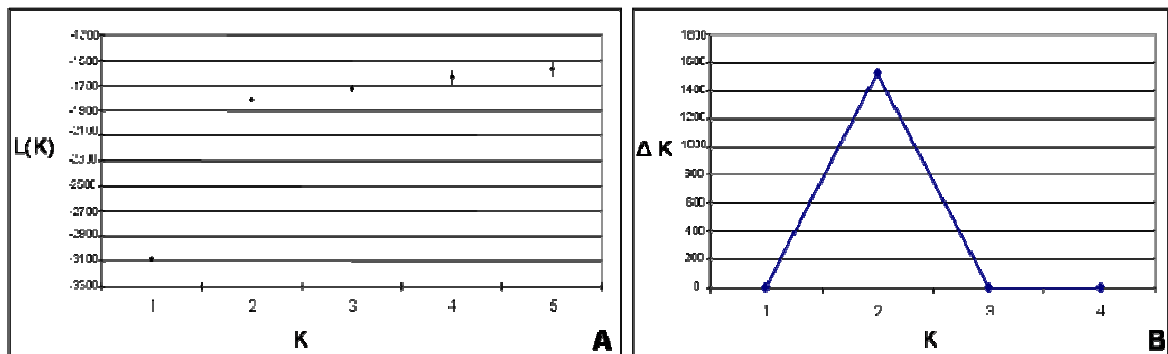


Figura 8- Determinação do melhor valor de K.

A) Método sugerido pelo manual do programa- formação de um platô a partir do valor de K=2; B) Método de Evanno *et al.* (2005)- pico no valor de K=2.

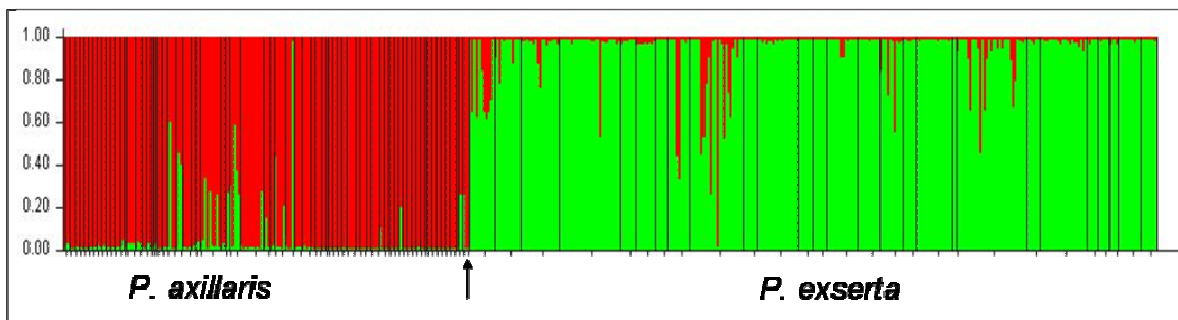


Figura 9- Resultado do programa Structure para K=2.

↑- Ponto onde terminam as amostras de *Petunia axillaris* e começam as amostras de *Petunia exserta*.

Entre as plantas de *P. axillaris* coletadas no Rio Grande do Sul, excluindo-se a região das Guaritas, apenas plantas coletadas na região da Casa de Pedra, no município de

Bagé, apresentaram valores de ancestralidade maiores que 20% para a o grupo onde está a maioria das plantas de *P. exserta* (Figura 10). As populações de *P. axillaris* encontradas nessa região crescem em torres semelhantes àquelas encontradas na região das Guaritas e Torrinhãs. Porém, as torres da região da Casa de Pedra apresentam uma composição predominantemente granítica, enquanto as outras formações visitadas são compostas, em sua maior parte, de arenito e conglomerado. Mesmo assim, todas fazem parte do mesmo ciclo de eventos deposicionais que caracteriza a Bacia do Camaquã (Leitão *et al.*, 2007). Em duas populações da região foram encontradas plantas de coloração rosada (populações Pedra 5- planta 1103 e Pedra). Levando em conta o resultado obtido com os marcadores CAPS e a morfologia, pode-se questionar a possibilidade de existirem populações de *P. exserta* nessa localidade, pois os locais visitados apresentam o habitat característico da espécie. Os habitats típicos de *P. exserta* são de difícil acesso e é impossível avistar as plantas do solo, sem escalar as pedras, o que torna mais complicado encontrar as populações.

Houve certo grau de ancestralidade compartilhada com *P. exserta* nas populações de *P. axillaris* da Argentina (Figura 11). Essa característica pode ser explicada por ancestralidade comum antiga. Estas populações estão localizadas a uma grande distância (cerca de 500 km da região das Guaritas) e podem apresentar uma constituição genética diferente, devido a polimorfismo ancestral. O fato das populações de *P. axillaris* do Rio Grande do Sul, fora da região das Guaritas e Casa de Pedra, não apresentarem essa ancestralidade compartilhada reforça a ideia de que esses marcadores são uma boa ferramenta para estimar a ancestralidade compartilhada por hibridação na região de simpatria. Assim, foi utilizado um critério geográfico e genético para diferenciar a ancestralidade compartilhada principalmente por hibridação ou principalmente por polimorfismo ancestral. Levando em conta esse fato e para minimizar erros de genotipagem, além de garantir uma maior confiabilidade dos resultados, considerou-se como híbrida, ou como resultante de hibridação em gerações anteriores, apenas a planta que apresentou mais que 20% de ancestralidade atribuível à espécie diferente da qual foi determinada taxonomicamente. Seguindo esse critério, 40 plantas foram classificadas como híbridos (14 plantas classificadas taxonomicamente como *P. axillaris* e 26 plantas como *P. exserta*, das quais 11 haviam sido classificadas como híbridos em 2002 e descritos por Lorenz-Lemke *et al.*, 2006).

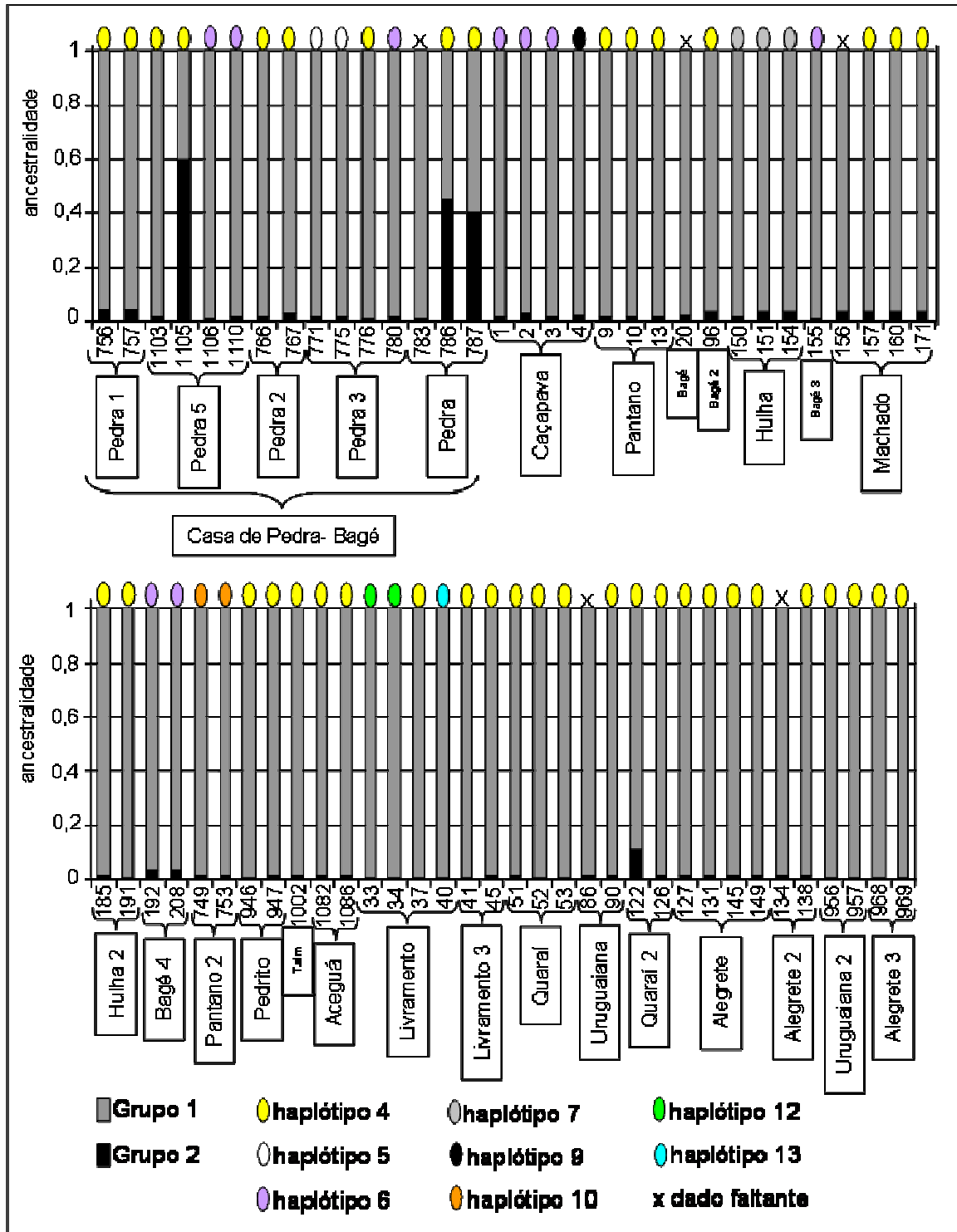


Figura 10- Ancestralidade inferida pelo programa Structure 2.3.1 e haplótipos de cpDNA para cada indivíduo de *Petunia axillaris* coletado no Rio Grande do Sul, excluindo-se a região das Guaritas. Cada coluna representa um indivíduo, com sua localização indicada abaixo. Em cinza está a parte da ancestralidade correspondente ao grupo 1 (onde está a maioria dos indivíduos de *Petunia axillaris*) e em preto ao grupo 2 (onde está a maioria dos indivíduos de *Petunia exserta*). Os haplótipos determinados pelos marcadores de cpDNA estão indicados acima do gráfico pelas elipses.

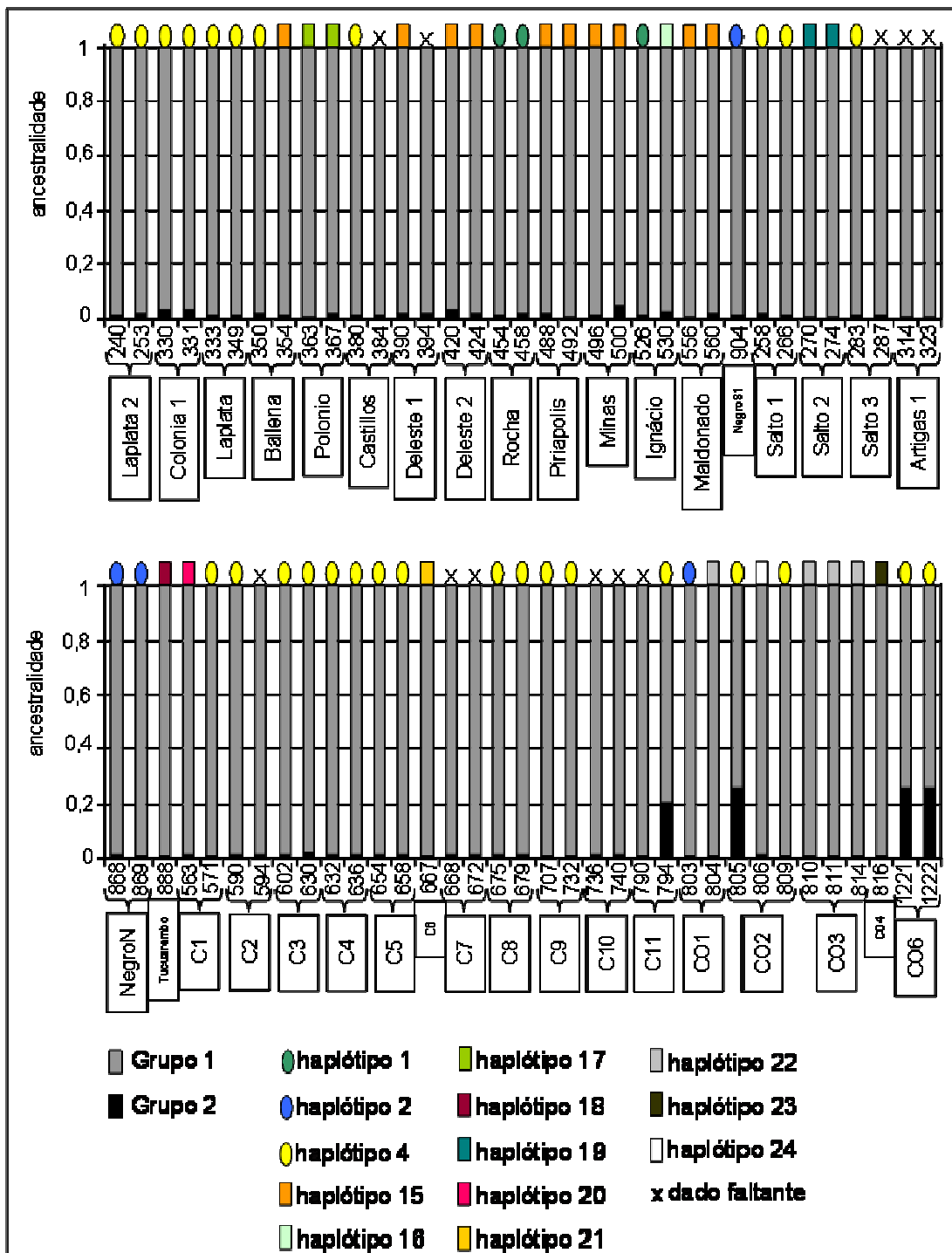


Figura 11- Ancestralidade inferida pelo programa Structure 2.3.1 e haplótipos de cpDNA para cada indivíduo das populações de *Petunia axillaris* do Uruguai e Argentina. Cada coluna representa um indivíduo, com sua localização indicada abaixo. Em cinza está a parte da ancestralidade correspondente ao grupo 1 (onde está a maioria dos indivíduos de *Petunia axillaris*) e em preto ao grupo 2 (onde está a maioria dos indivíduos de *Petunia exserta*). Os haplótipos determinados pelos marcadores de cpDNA estão indicados acima do gráfico pelas elipses e retângulos, cada forma ou cor diferente representa um haplótipo.

4.2- Caracterização dos marcadores de cloroplasto

Para uma caracterização geral dos haplótipos presentes nas amostras das duas espécies, as plantas foram classificadas pelo critério de localização (fora ou dentro dos abrigos). A análise de 655 indivíduos resultou em um alinhamento concatenado de 1069 pares de bases dos marcadores *trnS/trnG* e *trnH/psbA*, com 29% de conteúdo de CG (guaninas e citosinas). Foram identificados 20 sítios polimórficos, excluindo-se eventos de inserção e deleção (*indels*) e dados faltantes (12 na porção correspondente ao marcador *trnH/psbA* e 8 na porção do marcador *trnS/trnG*). Foram identificadas nove transições e doze transversões, sendo que um mesmo sítio apresentou uma transição e uma transversão. Nesse sítio, a transversão ocorreu em um indivíduo de *P. axillaris* coletado em Córdoba, Argentina. A diversidade nucleotídica (π) verificada foi de $0,001594 \pm 0,001032$, e a diversidade haplotípica (Hd) foi de $0,7013 \pm 0,0117$. Entre os 24 haplótipos encontrados, dois apresentaram maior frequência, um é mais frequente nas plantas classificadas como *P. axillaris* e o outro é mais frequente nas plantas classificadas como *P. exserta* (Figura 12).

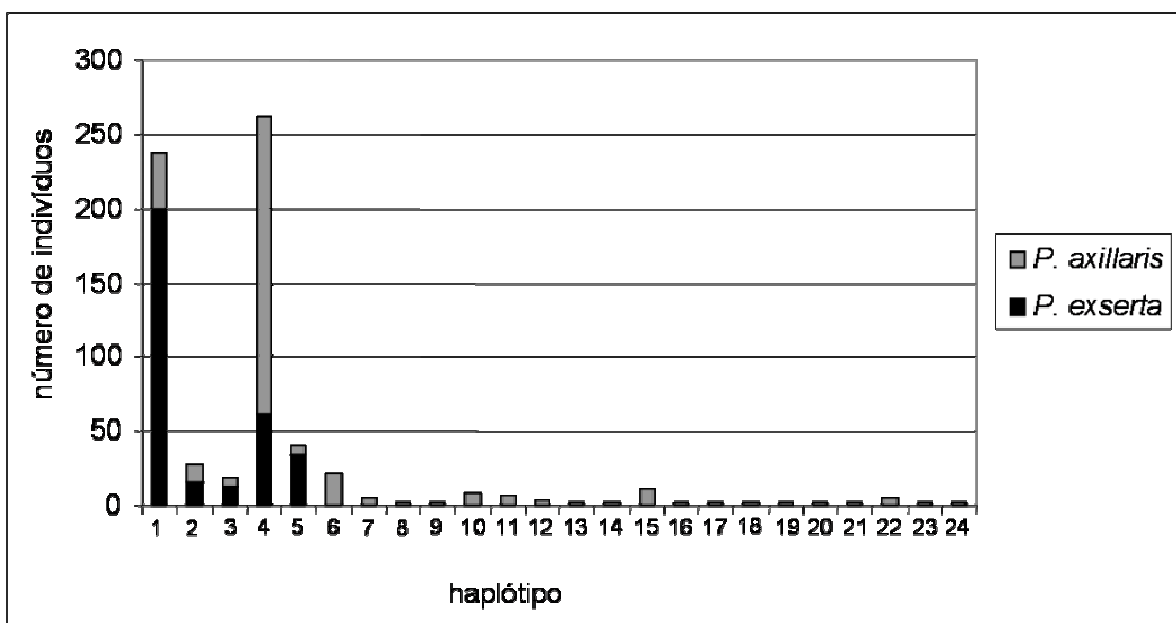


Figura 12- Número de indivíduos encontrados em cada haplótipo com a amostragem total. Análise dos marcadores *trnH/psbA* e *trnG/trnS*. Foram analisados 322 indivíduos de *Petunia exserta* e 333 indivíduos de *Petunia axillaris* do Brasil, Uruguai ou Argentina.

O haplótipo 1 foi encontrado em populações das duas espécies nas Guaritas. Este é o haplótipo mais frequente na região e não foi detectado em outras populações do Rio

Grande do Sul, apenas em duas populações do sul do Uruguai. O haplótipo 2 foi encontrado nas populações das Guaritas, em uma população do Taim, em duas populações do Uruguai e em uma população da Argentina. O haplótipo 3 parece ser exclusivo da região das Guaritas e foi encontrado em populações das duas espécies na torre 3 e na torre 16. Nessa última torre, não foram encontradas populações de *P. exserta*, provavelmente devido à não ocorrência de reentrâncias na rocha nessa formação. As populações de *P. exserta* e *P. axillaris* da Pedra da Cruz e uma população de *P. exserta* de Torrinhãs apresentaram o haplótipo 4, que é o mais comum em *P. axillaris* (C. Turchetto, comunicação pessoal). O haplótipo 5 ocorre em uma população de *P. exserta* de Torrinhãs e uma população de *P. axillaris* da Casa de Pedra. As populações de *P. axillaris* da Casa de Pedra são as mais próximas das populações de *P. exserta* de Torrinhãs (aproximadamente 30 km em linha reta) encontradas, seguidas das populações Hulha e Hulha2 localizadas a aproximadamente 35 km em linha reta. Os demais 19 haplótipos foram encontrados em diferentes populações de *P. axillaris*. A distribuição geográfica dos haplótipos pode ser vista na Figura 13.

A frequência dos haplótipos se manteve estável ao longo dos anos de coleta em cada população, o que provavelmente está relacionado à baixa dispersão das sementes (Figuras 22-C, 23- C e 24).

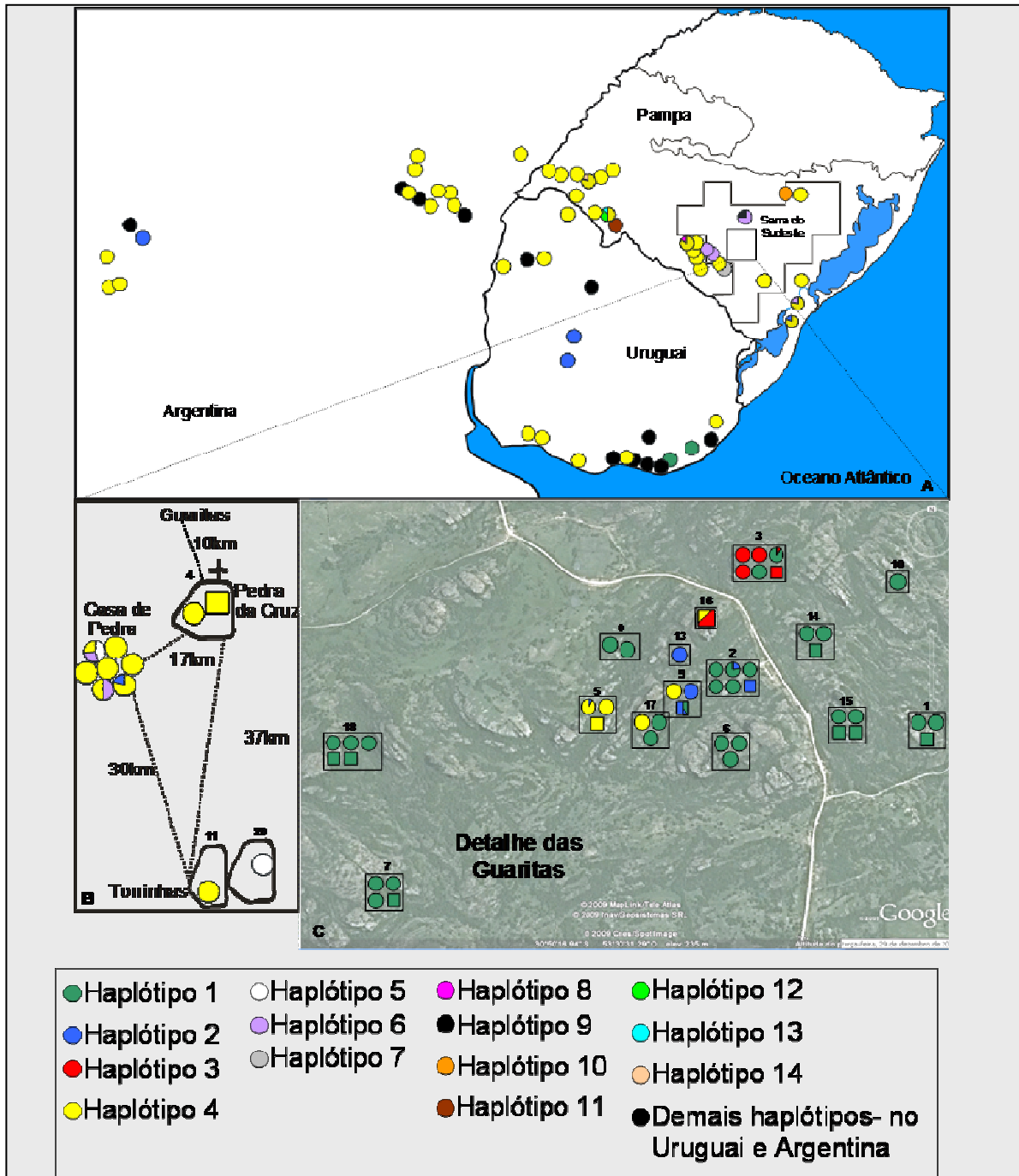


Figura 13- Distribuição geográfica dos 24 haplótipos encontrados. Quando ocorrem populações simpátricas de *Petunia axillaris* e *Petunia exserta*, essas são representadas diferentemente por quadrados (*Petunia axillaris*) ou círculos (*Petunia exserta*), as cores são correspondentes à legenda dos haplótipos. A) Populações de *Petunia axillaris*. Os haplótipos encontrados no Uruguai e Argentina que não são compartilhados com plantas do Rio Grande do Sul estão em preto; B) Desenho esquemático mostrando os haplótipos encontrados em Torrinhos (*Petunia exserta*), na região da Casa de Pedra (*Petunia axillaris*) e na Pedra da Cruz (*Petunia. exserta* e *Petunia axillaris*); C) Mapa com os haplótipos encontrados nas populações de *Petunia axillaris* e *Petunia exserta* das Guaritas. Cada torre está representada separadamente com o seu número indicado.

A rede de haplótipos foi construída apenas com as plantas coletadas do Rio Grande do Sul, devido ao pequeno número de indivíduos analisados em cada população tanto na Argentina quanto no Uruguai. Foi possível verificar uma tendência à estruturação geográfica nas populações de *P. exserta* e *P. axillaris* da região das Guaritas. Nessa região, quando foram encontradas populações das duas espécies em localidades próximas, os mesmos haplótipos foram compartilhados.

Petunia exserta não apresentou nenhum haplótipo único da espécie, enquanto *P. axillaris*, além de apresentar haplótipos únicos, apresentou vários haplótipos raros encontrados em um ou poucos indivíduos (Figura 14-A). Uma segunda rede de haplótipos foi construída somente com as plantas que foram genotipadas para os dois tipos de marcadores (espaçadores de cloroplasto e CAPS) e que ocorrem no Rio Grande do Sul (Figura 14-B). Com essa abordagem é possível diferenciar na rede de haplótipos as plantas que foram classificadas como híbridas segundo os marcadores CAPS. Esse alinhamento resultou em 312 indivíduos (98 *P. axillaris* e 214 *P. exserta*). Foram encontrados 11 haplótipos e 12 sítios polimórficos, excluindo-se os eventos de inserção e deleção e dados faltantes, quatro transições e oito transversões. Sete sítios estão localizados na parte do alinhamento correspondente ao marcador *trnH/psbA* e cinco na parte do marcador *trnS/trnG*. A diversidade nucleotídica (π) verificada foi de $0,001567 \pm 0,001020$, e a diversidade haplotípica (Hd) foi de $0,6684 \pm 0,0195$. O conteúdo de CG foi 29%. Os indivíduos classificados como híbridos estão distribuídos ao longo de todos os haplótipos que *P. exserta* apresenta. Comparando-se esses resultados com os obtidos na análise realizada utilizando todos os indivíduos coletados das duas espécies, ocorreu uma diminuição no número de haplótipos, mas os índices de diversidade permaneceram muito semelhantes.

Os resultados obtidos demonstram que os marcadores de cpDNA utilizados não são uma boa ferramenta para diferenciar compartilhamento de polimorfismo ancestral e hibridação entre essas duas espécies.

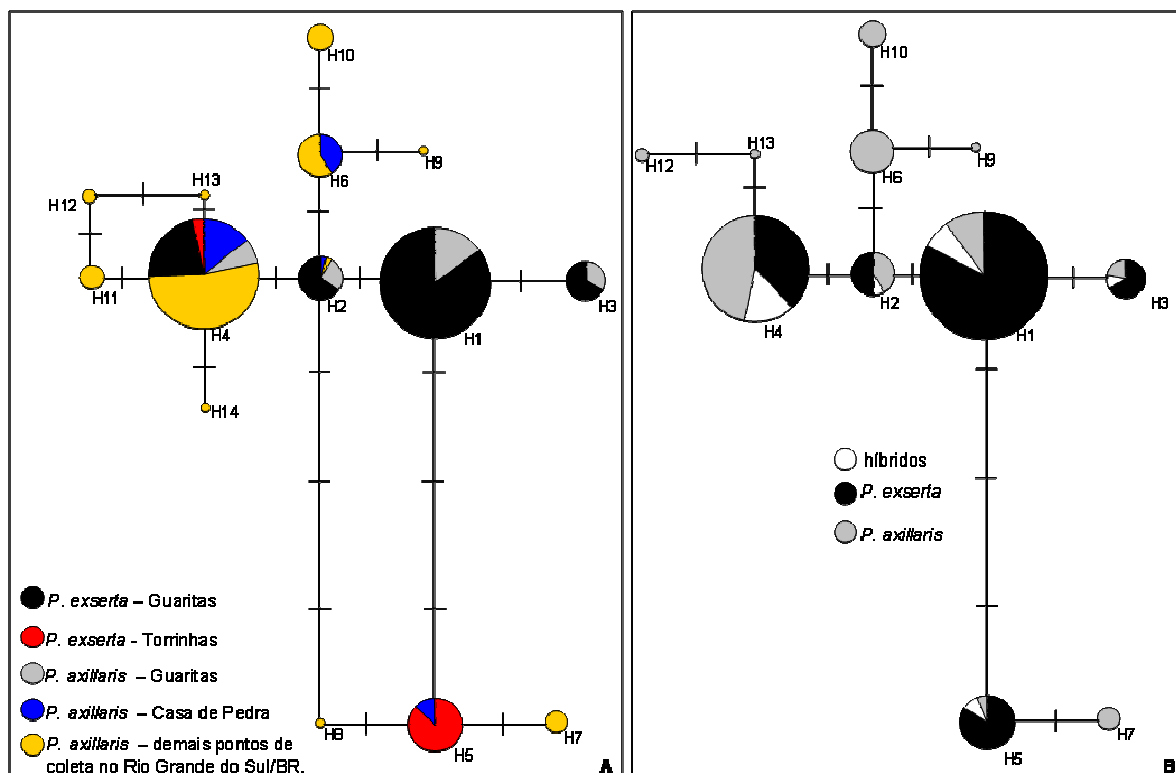


Figura 14- Rede de haplótipos- *Network*. Os números dos haplótipos são os mesmos utilizados na Figura 13. A) Rede de haplótipos construída com todas as populações de *Petunia exserta* e as populações de *Petunia axillaris* do Rio Grande do Sul; B) *Network* construída apenas com os indivíduos analisados para marcadores plastidiais e nucleares. O tamanho dos círculos corresponde à frequência dos haplótipos e os sites polimórficos que separam as sequências estão respresentados pelas linhas transversais.

4.3- Caracterização das populações de *P. exserta*

As populações de *P. exserta* geralmente são compostas por poucas plantas e somente em duas populações foram encontrados mais de 30 indivíduos. As plantas encontradas em um mesmo abrigo apresentaram um único haplótipo em 36 dos 39 abrigos estudados. Muitas vezes, em cavernas onde não foi encontrado nenhum sinal de hibridação, as plantas apresentavam coloração variada ou, onde encontramos sinal de hibridação, as plantas não apresentavam tanta variação (Figuras 15 a 20).

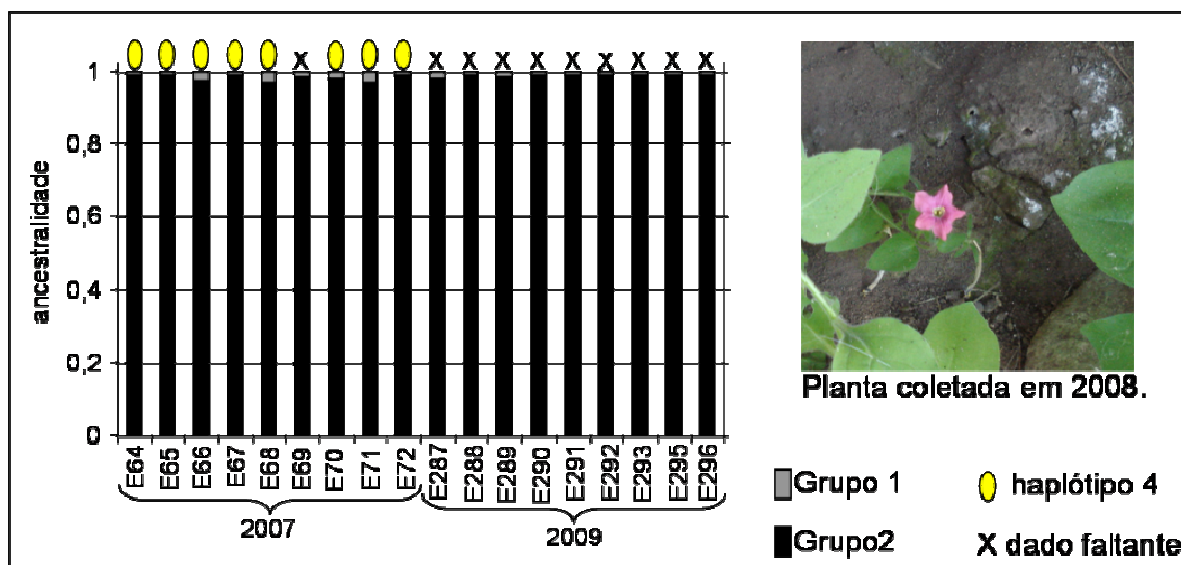


Figura 15- Plantas coletadas na torre 5 caverna 15.

Ancestralidade inferida pelo programa Structure 2.3.1 e haplótipos de cpDNA para cada indivíduo. Cada coluna representa um indivíduo, E = *Petunia exserta*. O ano de coleta está indicado abaixo das colunas. Em cinza está a parte da ancestralidade correspondente ao grupo 1 (onde está a maioria dos indivíduos de *Petunia axillaris*) e em preto ao grupo 2 (onde está a maioria dos indivíduos de *Petunia exserta*). Os haplótipos determinados pelos marcadores de cpDNA estão indicados acima do gráfico pelas elipses.

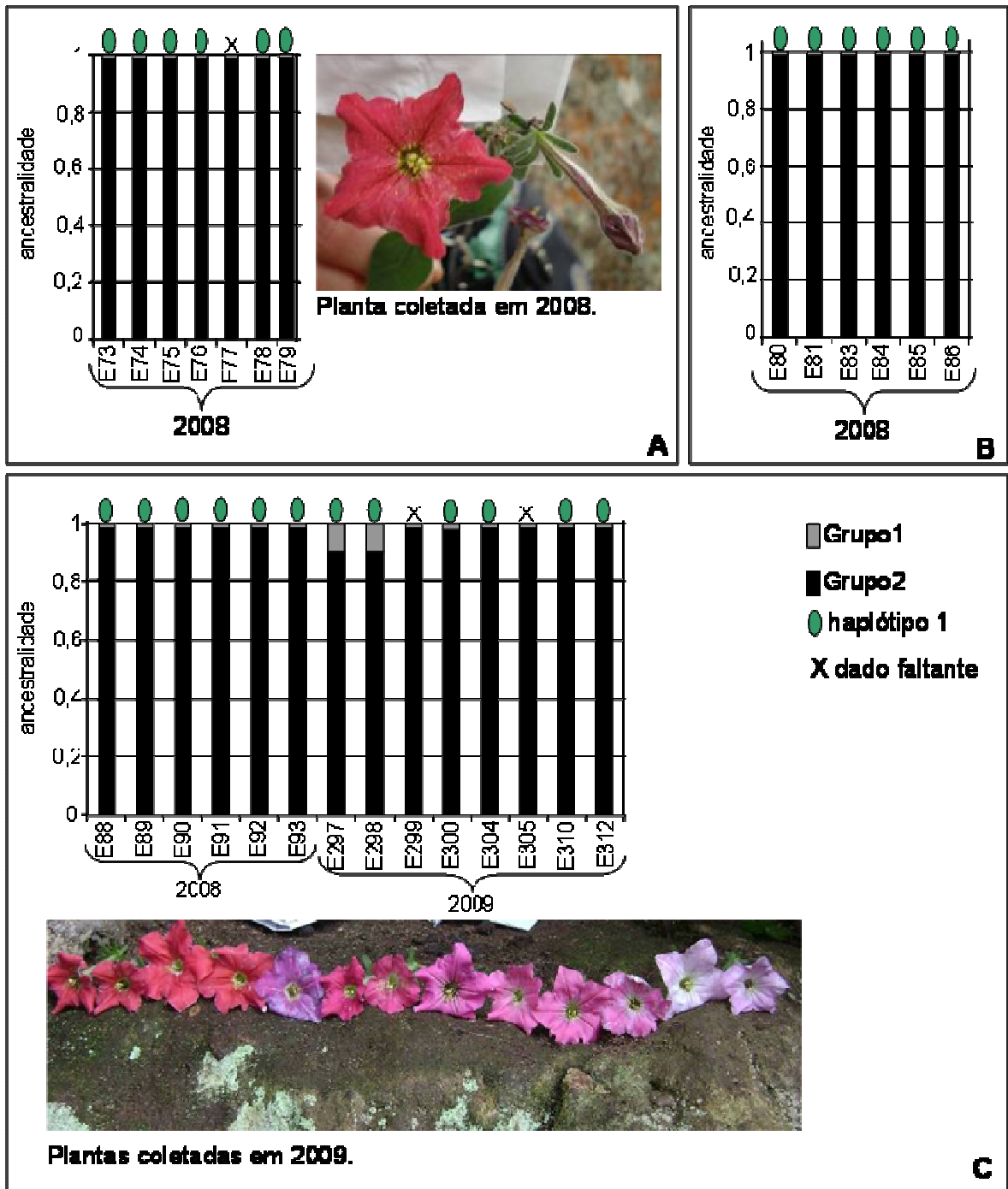


Figura 16- Plantas coletadas na torre 6. E- *Petunia exserta*.
 A) Caverna 17; B) Caverna 18; C) Caverna 19. (Ver legenda da figura 15)

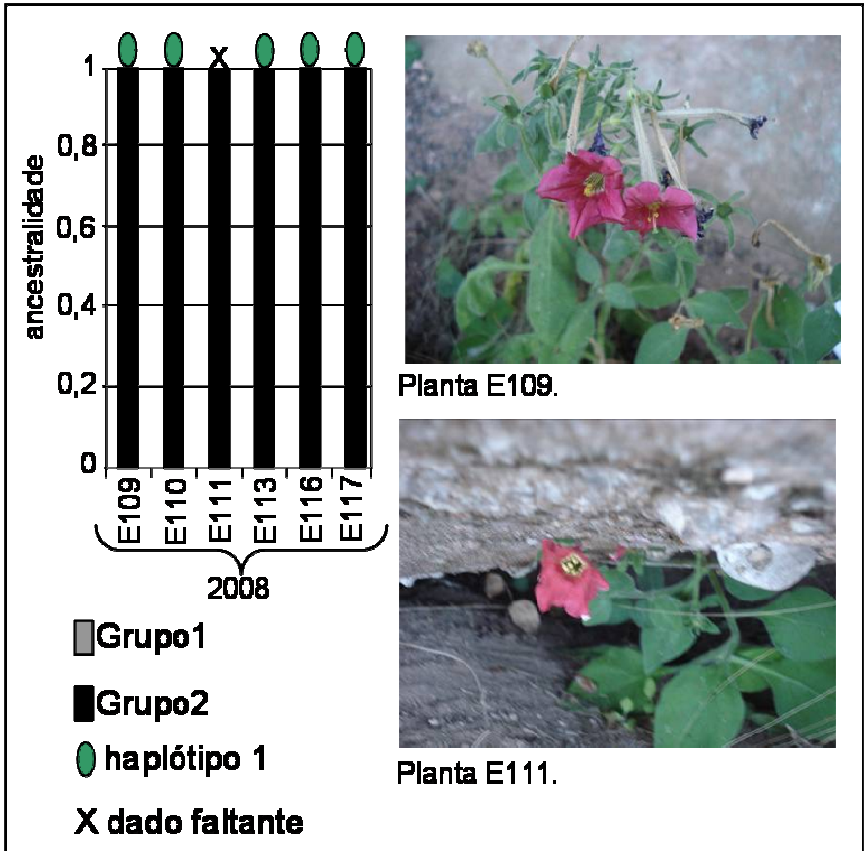


Figura 17- Plantas coletadas na torre 8, caverna 23.
E- *Petunia exserta*. (Ver legenda da figura 15)

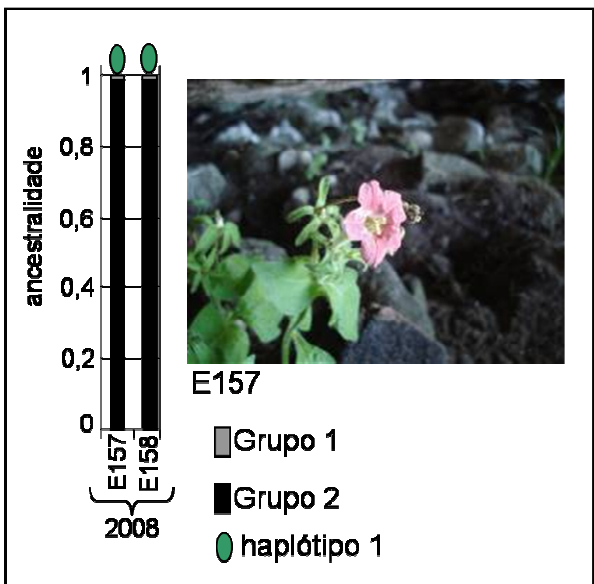


Figura 18- Plantas coletadas na torre 10,
caverna 27. E- *Petunia exserta*.
(Ver legenda da figura 15)

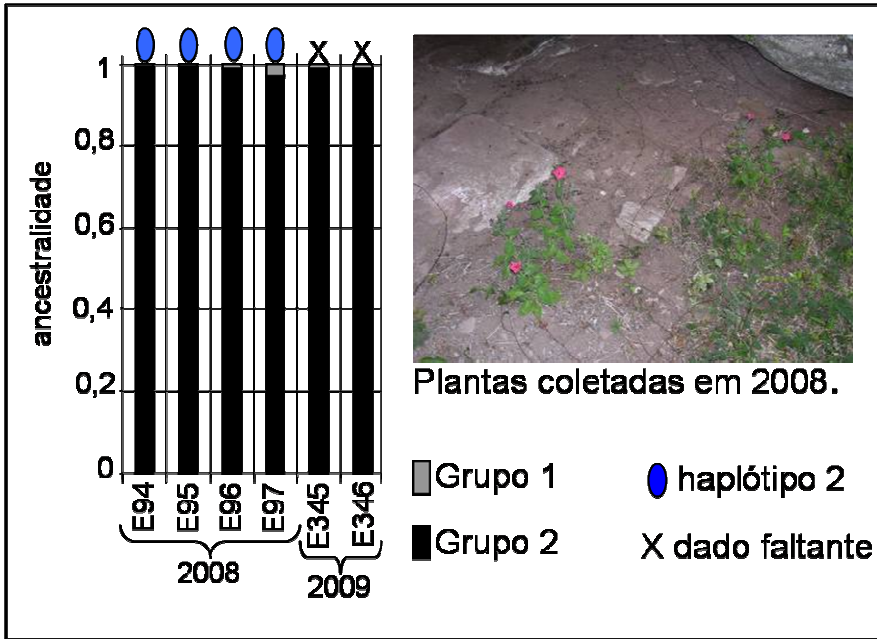


Figura 19- Plantas coletadas na torre 13, caverna 29. E- *Petunia exserta*. (Ver legenda da figura 15)

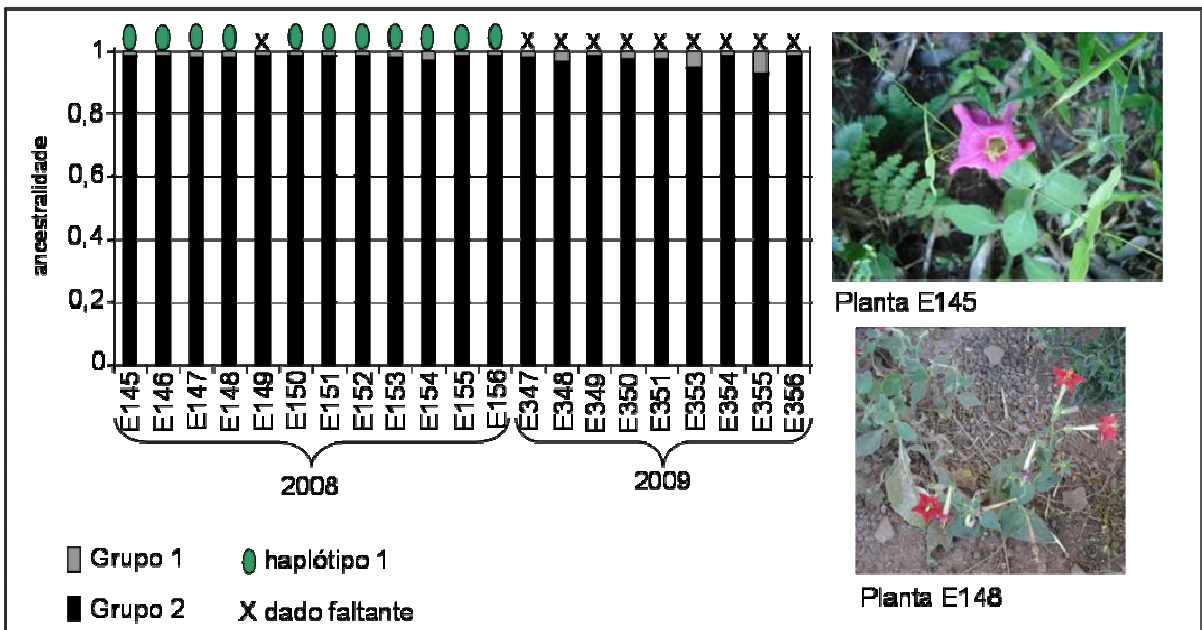


Figura 20- Plantas coletadas na torre 14, caverna 30. E- *Petunia exserta*. (Ver legenda da figura 15)

As plantas encontradas dentro das cavernas que apresentaram sinal de hibridação, seguindo o critério descrito para os marcadores CAPS, estão localizadas nas torres 1, 2, 3, 4, 7 e 12; na torre 4, plantas classificadas como *P. axillaris* também apresentaram sinal de hibridação (Figuras 21 a 26). Dentre essas torres, a única em que não foram encontradas populações próximas de *P. axillaris* foi a torre 12, que se localiza em Torrinhãs, Pinheiro Machado. Durante as coletas, acreditava-se que as populações de Torrinhãs (torres 11 e 12) não apresentavam hibridação, uma vez que nenhuma população de *P. axillaris* é conhecida a menos de 30 km dessas torres. As duas populações de Torrinhãs não apresentaram haplótipos exclusivos e a população da torre 12 apresentou sinal de introgressão. Uma possível explicação é a ocorrência de extinção das populações locais de *P. axillaris* e a manutenção dos alelos introgrididos por endocruzamento. A população da torre 11 de Torrinhãs foi a que apresentou as plantas com a morfologia mais característica de *P. exserta*, como essa foi descrita, e que não apresentou coloração variada (Figura 27). Porém, só foram encontrados sete indivíduos em dois anos de coleta, os quais provavelmente são descendentes de uma mesma planta. As populações encontradas nas demais torres não apresentaram sinal de hibridação maior que 20%.

As torres 15 e 18 nas Guaritas foram visitadas somente no ano de 2009, e nas cavernas 32, 38 e 39 foram encontradas plantas nos abrigos classificadas primeiramente como *P. exserta* e plantas bem próximas, fora da caverna, que foram classificadas como *P. axillaris*. Para essas torres, nenhum sinal de hibridação foi encontrado nas plantas crescendo no interior das cavernas, mas sim, nas plantas encontradas fora do abrigo, em locais mais claros e secos (Figuras 28 e 29). Próximo às cavernas 32 e 38, as plantas classificadas como *P. axillaris* tinham um aspecto morfológico diferenciado, com flores rosadas, aparelho reprodutivo interno e a parte vegetativa semelhante a *P. exserta*. Já as plantas encontradas próximas à caverna 39 da torre 18, aparentemente apresentavam a morfologia típica de *P. axillaris*. Esse mesmo fenômeno também ocorreu na torre 9. A população de *P. exserta* coletada em dois anos seguidos não apresentou nenhum sinal de hibridação, mas as plantas de *P. axillaris* coletadas em cima da torre, com morfologia típica desta espécie, a alguns metros da caverna, apresentaram sinal de hibridação (Figura 30).

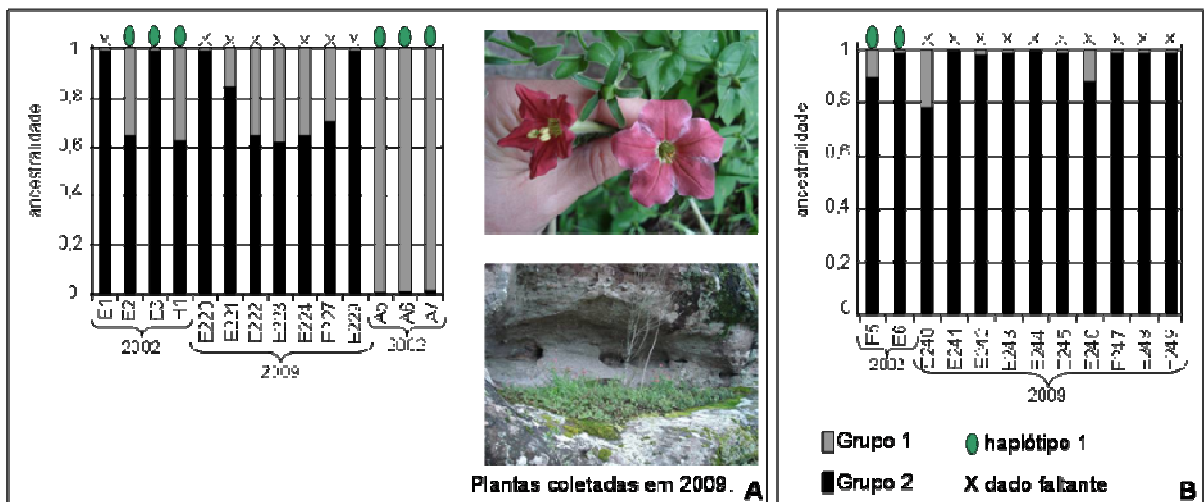


Figura 21- Plantas coletadas na torre 1. E- *Petunia exserta*; A- *Petunia axillaris*; H- indivíduos classificados como híbridos por Lorenz-Lemke *et al.* (2006).
 A) Caverna 1. População de *Petunia exserta* dentro do abrigo e *Petunia axillaris* muito próxima, mas fora do abrigo. B) Caverna 2. (Ver legenda da figura 15)

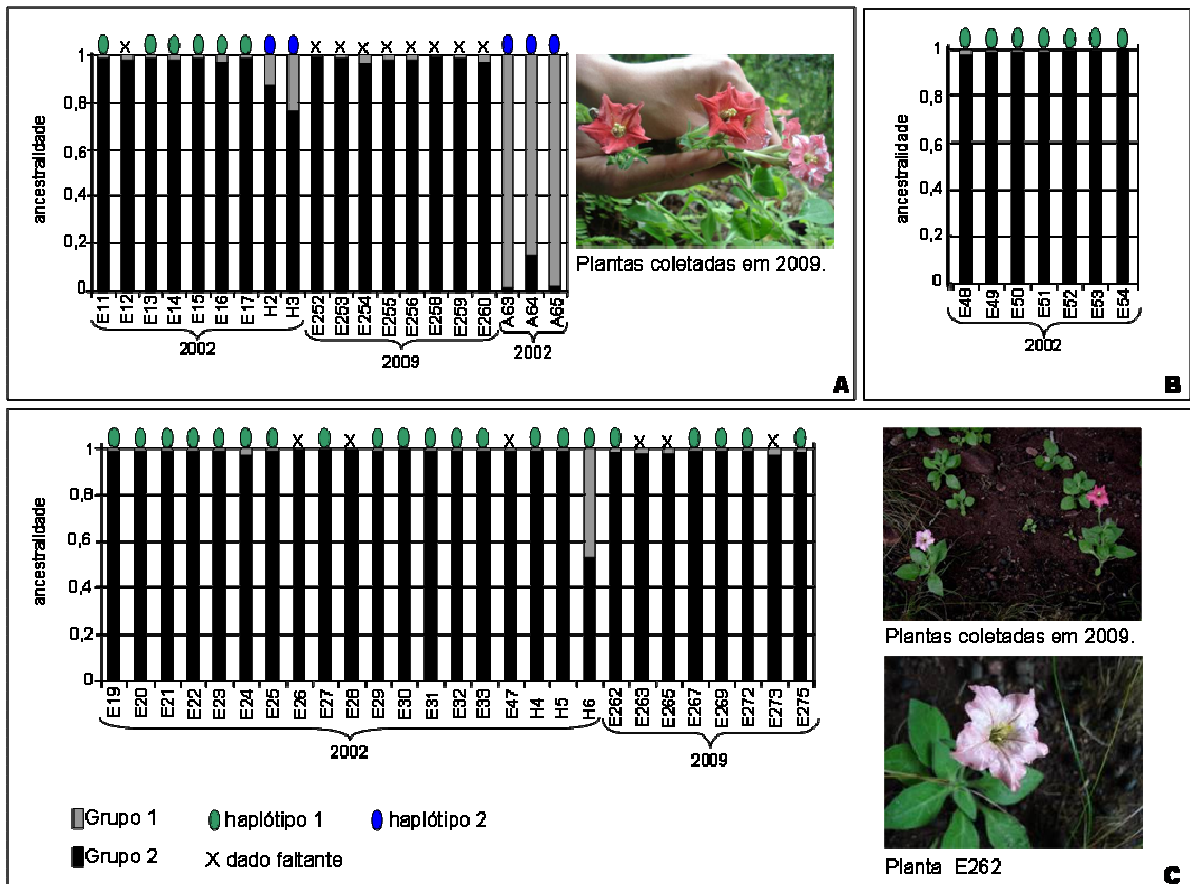


Figura 22- Plantas coletadas na torre 2. E- *Petunia exserta*; A- *Petunia axillaris*; H- indivíduos classificados como híbridos por Lorenz-Lemke *et al.* (2006). A) Caverna 3. População de *Petunia exserta* dentro do abrigo e *Petunia axillaris* muito próxima, mas fora do abrigo; B) Caverna 5; C) Caverna 4. (Ver legenda da figura 15)

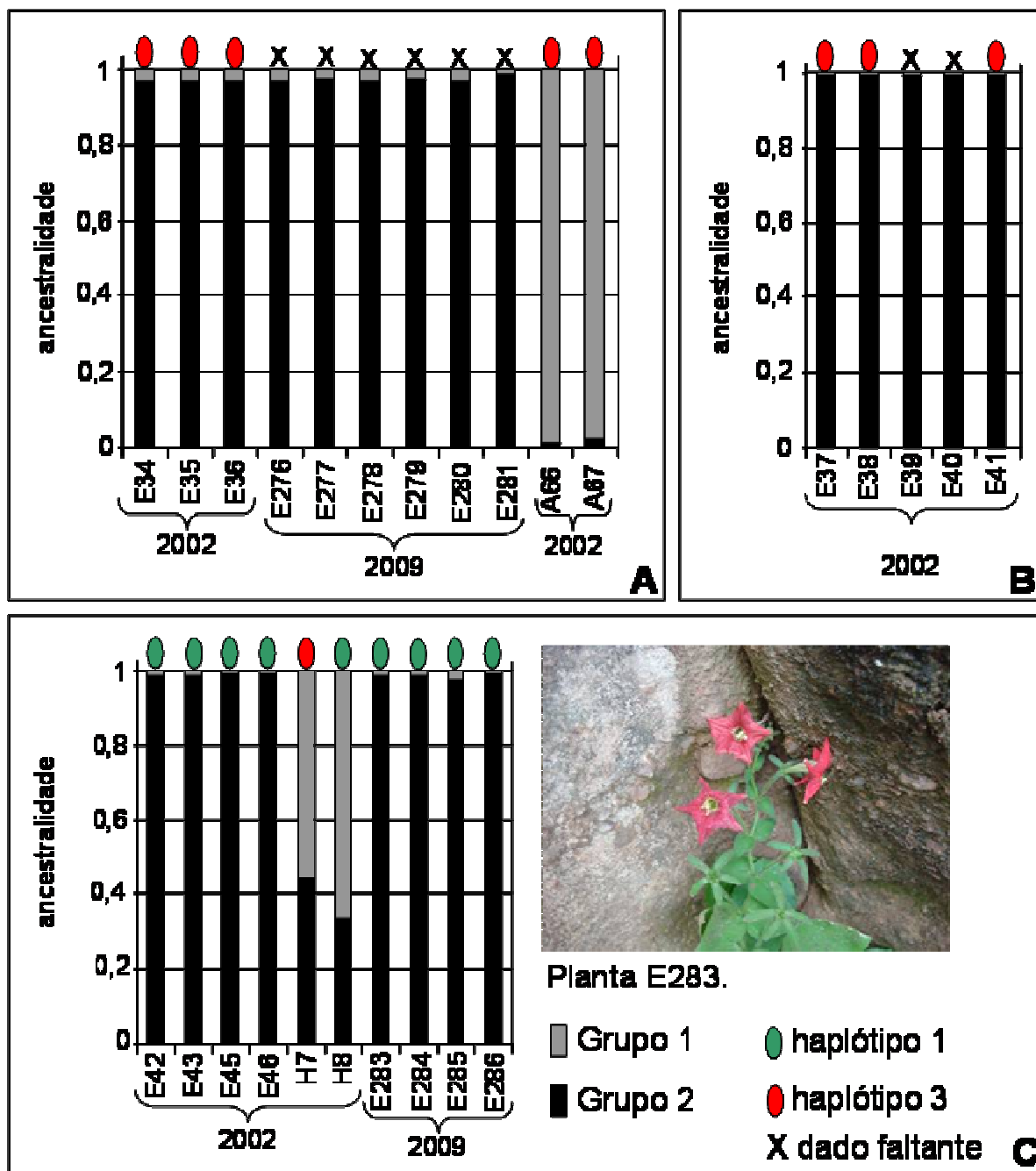


Figura 23- Plantas coletadas na torre 3. E- *Petunia exserta*; A- *Petunia axillaris*; H- indivíduos classificados como híbridos por Lorenz-Lemke *et al.* (2006). A) Caverna 8. População de *P. exserta* dentro do abrigo e *P. axillaris* muito próxima, mas fora do abrigo; B) Caverna 9; C) Caverna 10. (Ver legenda da figura 15)

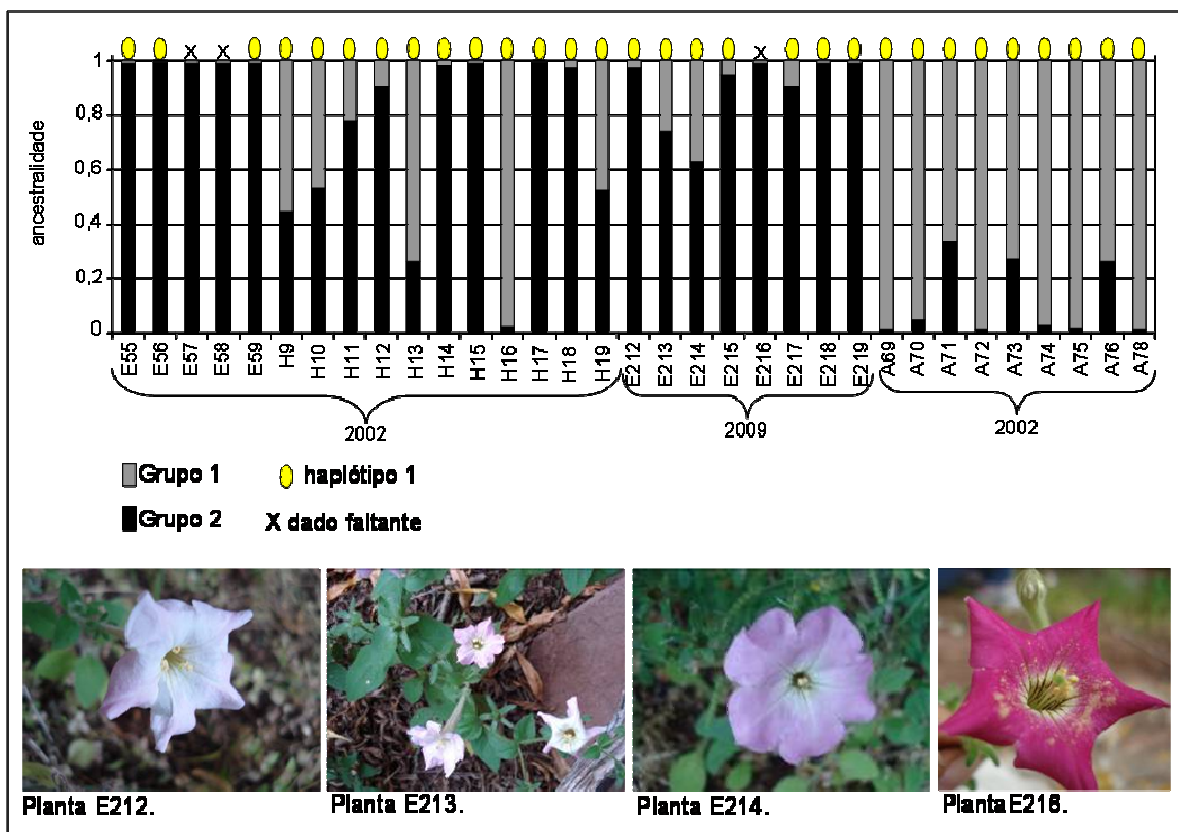


Figura 24- Plantas coletadas na torre 4, caverna 13. E- *Petunia exserta*; A- *Petunia axillaris*; H- indivíduos classificados como híbridos por Lorenz-Lemke *et al.* (2006). População de *Petunia exserta* dentro do abrigo e *Petunia axillaris* muito próxima, mas fora do abrigo. (Ver legenda da figura 15)

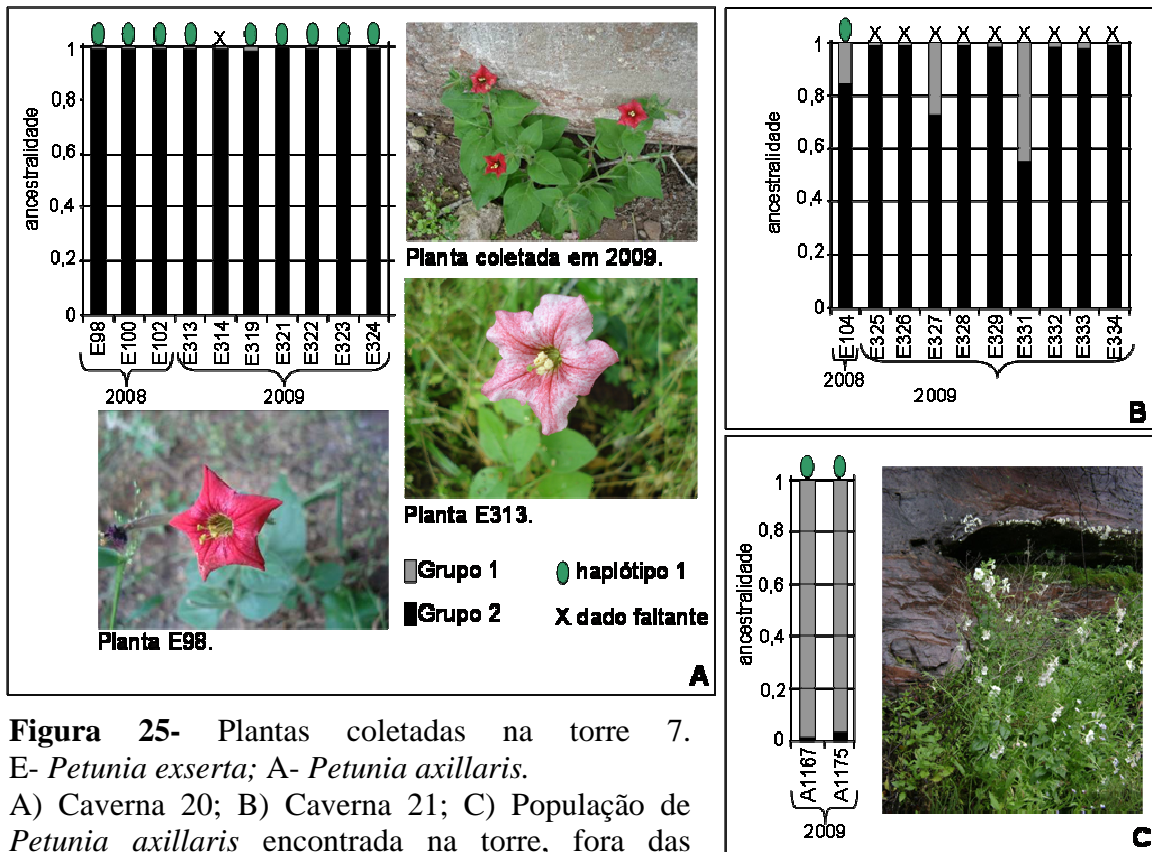


Figura 25- Plantas coletadas na torre 7. E- *Petunia exserta*; A- *Petunia axillaris*. A) Caverna 20; B) Caverna 21; C) População de *Petunia axillaris* encontrada na torre, fora das cavernas, distante de *Petunia exserta*. (Ver legenda da figura 15)

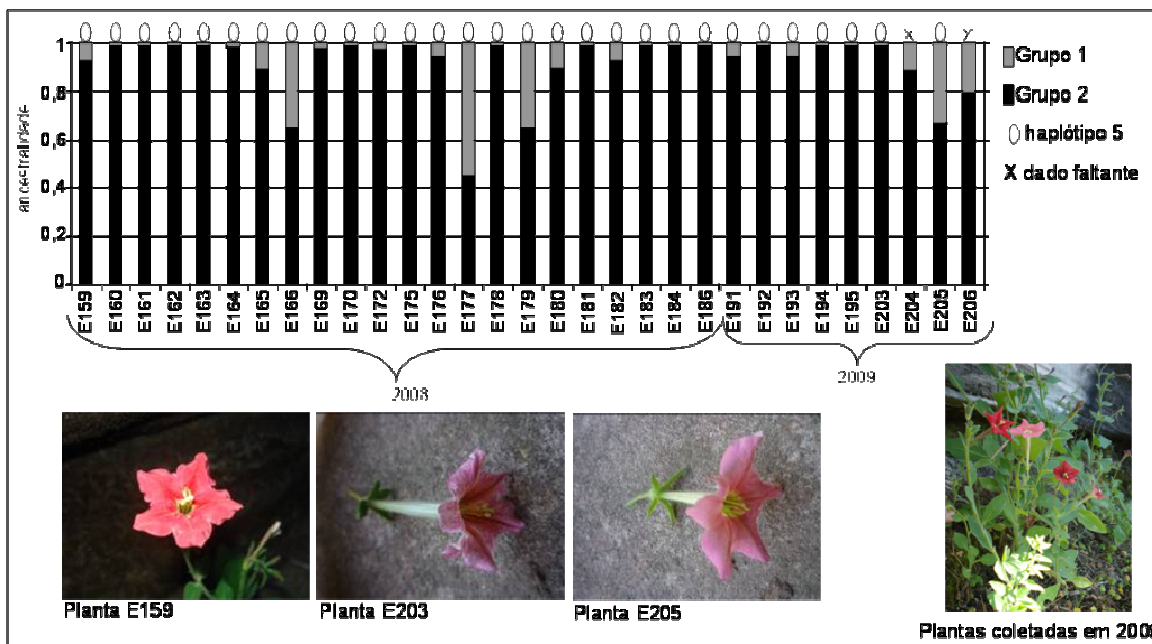


Figura 26- Plantas coletadas na torre 12. E- *Petunia exserta*. (Ver legenda da figura 15)

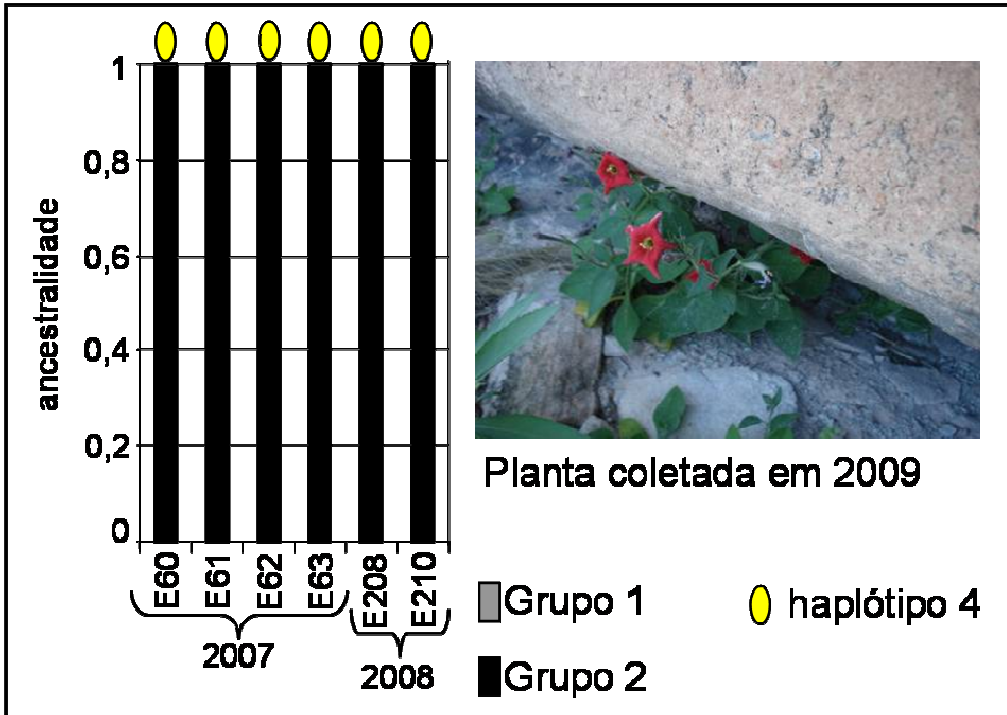
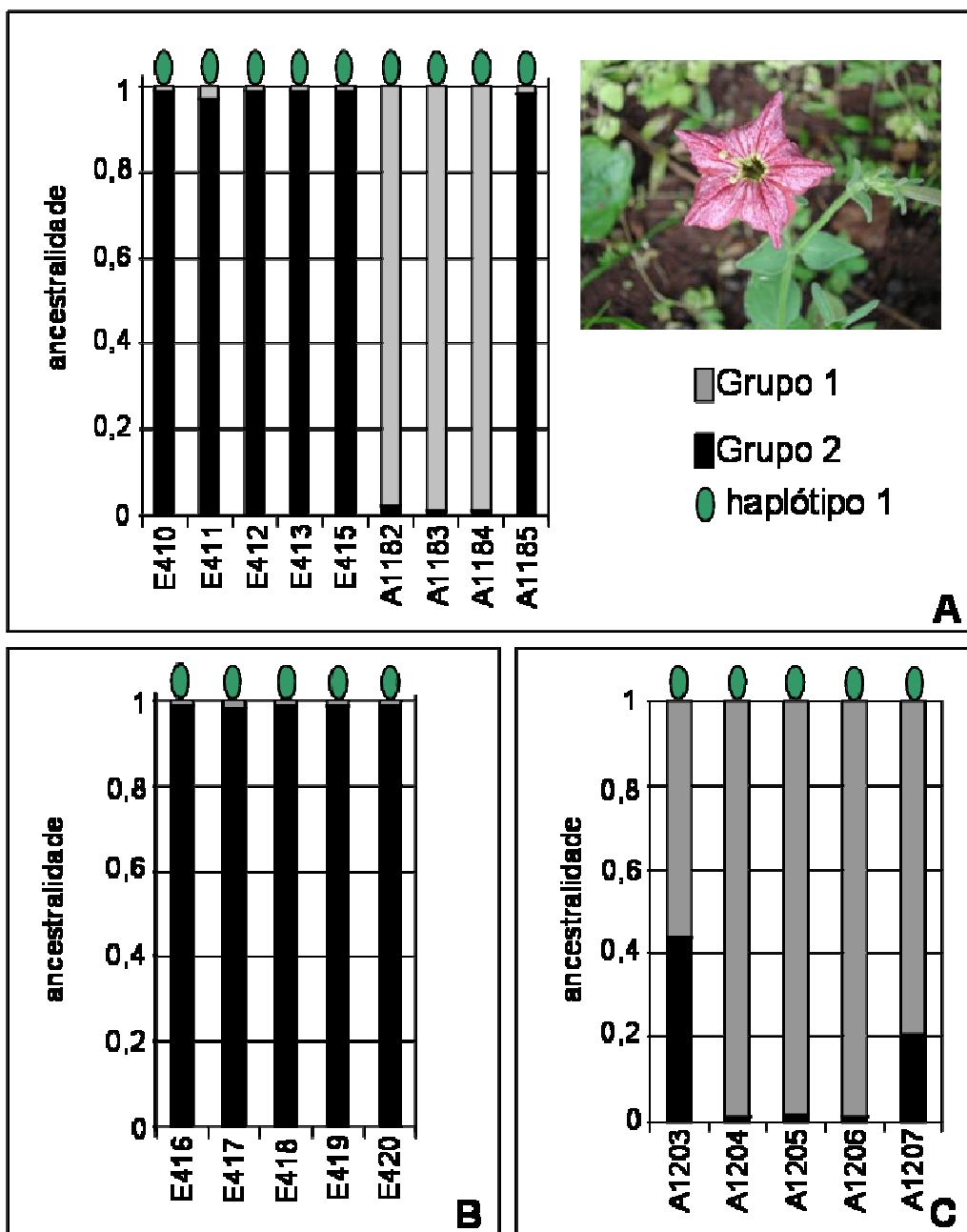


Figura 27- Plantas coletadas na torre 11. E- *Petunia exserta*.
(Ver legenda da figura 15)



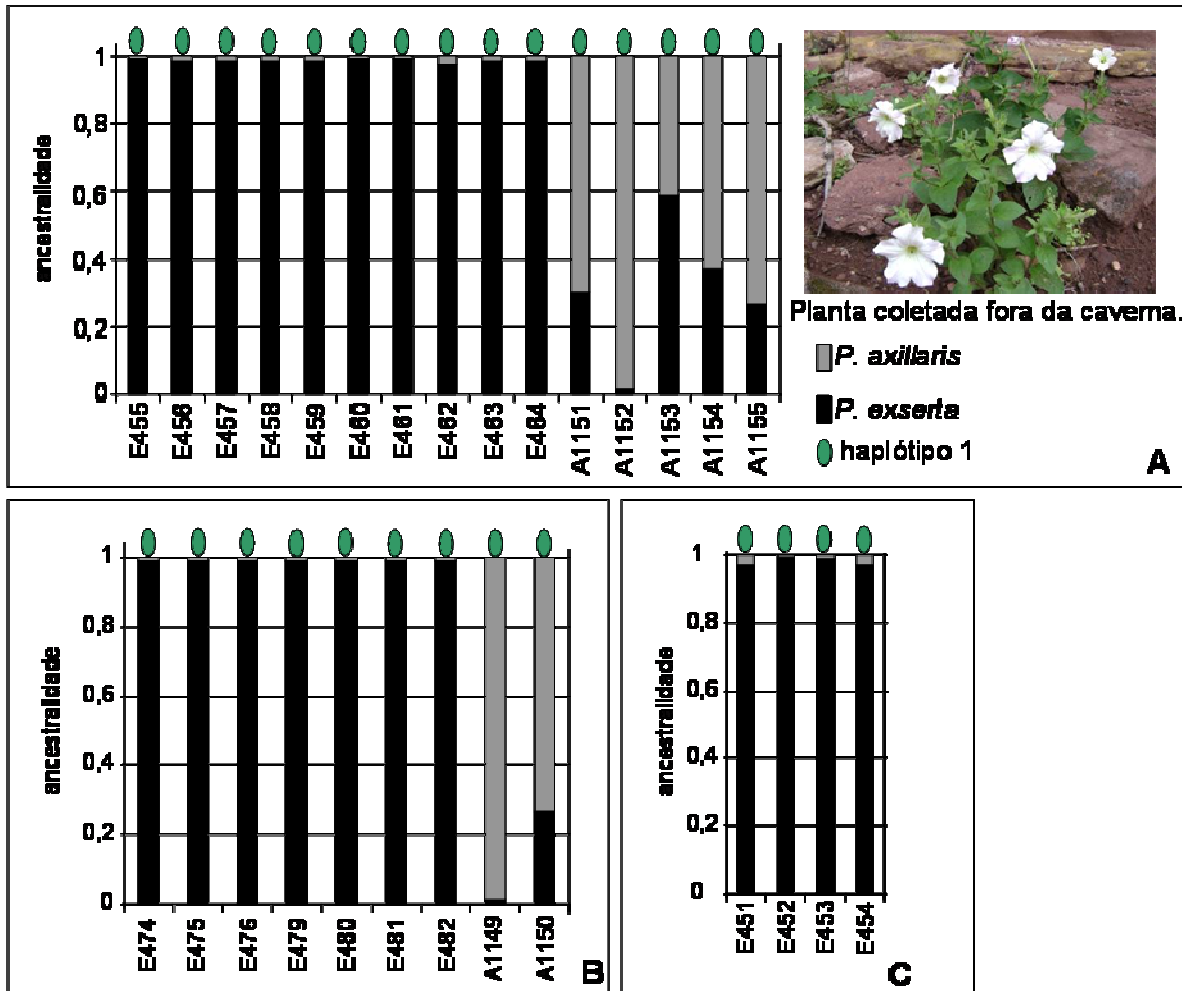


Figura 29- Plantas coletadas na torre 18. E- *Petunia exserta*; A- *Petunia axillaris*.
 A) Caverna 38. População de *Petunia exserta* dentro do abrigo e *Petunia axillaris* muito próxima, mas fora do abrigo; B) Caverna 39. População de *Petunia exserta* dentro do abrigo e *Petunia axillaris* muito próxima, mas fora do abrigo; C) Caverna 37.
 (Ver legenda da figura 15)

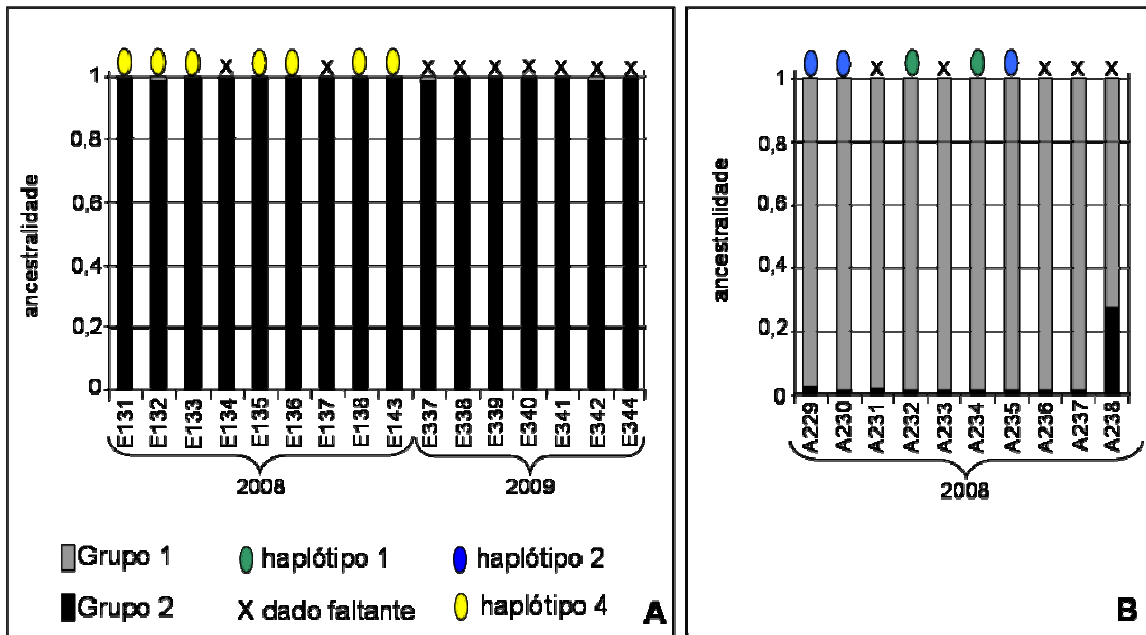


Figura 30- Plantas coletadas na torre 9. E- *Petunia exserta*; A- *Petunia axillaris*. A) Caverna 25; B) População de *Petunia axillaris* encontrada na torre, fora das cavernas, longe de *Petunia exserta*. (Ver legenda da figura 15)

A comparação dos níveis de ancestralidade de *P. exserta* entre os diferentes anos de coleta não resultou em diferença estatisticamente significativa pelo teste T de Wilcoxon. Existe uma tendência de diminuição da ancestralidade compartilhada com *P. axillaris* que está representada no gráfico comparando os sete abrigos que tiveram plantas coletadas em 2002 e 2009, mas não no gráfico que compara as sete cavernas que tiveram plantas coletadas em 2008 e 2009 (Figura 31).

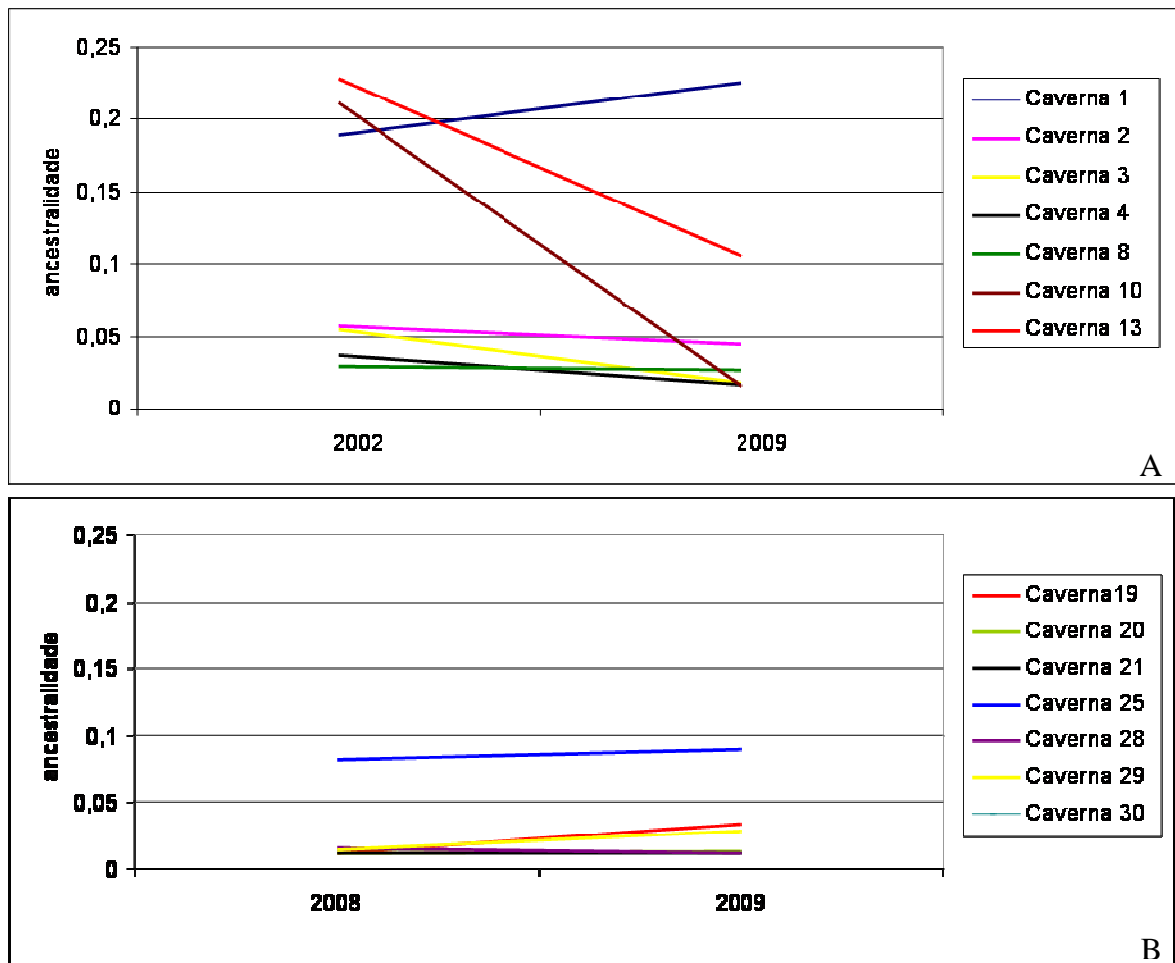


Figura 31- Comparação dos níveis de ancestralidade de *Petunia exserta* entre os diferentes anos de coleta. A) Comparação entre os anos de 2002 e 2009; B) Comparação entre os anos de 2008 e 2009.

A partir das plantas de *P. exserta* classificadas como “puras” através dos marcadores CAPS obteve-se um alinhamento de 197 plantas e 1069 pares de bases, para o qual a diversidade haplotípica (H_d) foi de $0,5449 \pm 0,0349$ e nucleotídica (π) foi de $0,001269 \pm 0,000872$, valores menores do que aqueles obtidos quando estão incluídas as plantas de *P. axillaris*. Esse padrão é esperado visto que *P. exserta* é uma espécie de distribuição restrita. Fenômeno semelhante ocorre com *Petunia mantiqueirensis* (A. Lorenz-Lemke, comunicação pessoal). Ocorreram seis sítios polimórficos, sendo três transições e três transversões. Os testes de neutralidade não apresentaram valores significativos para esse conjunto de dados: D de Tajima: $0,65999$ ($P = 0,778$); F_s de Fu: $2,15375$ ($P = 0,841$). A *mismatch distribution* também não apresentou nenhum sinal de expansão demográfica (Figura 32). Assim, pode-se concluir que não existem indícios de alterações demográficas quando considerados haplótipos de cpDNA. Valores positivos nos testes de neutralidade podem indicar subdivisão populacional, o que provavelmente ocorre em *P. exserta* devido à grande homogeneidade dos haplótipos em cada caverna.

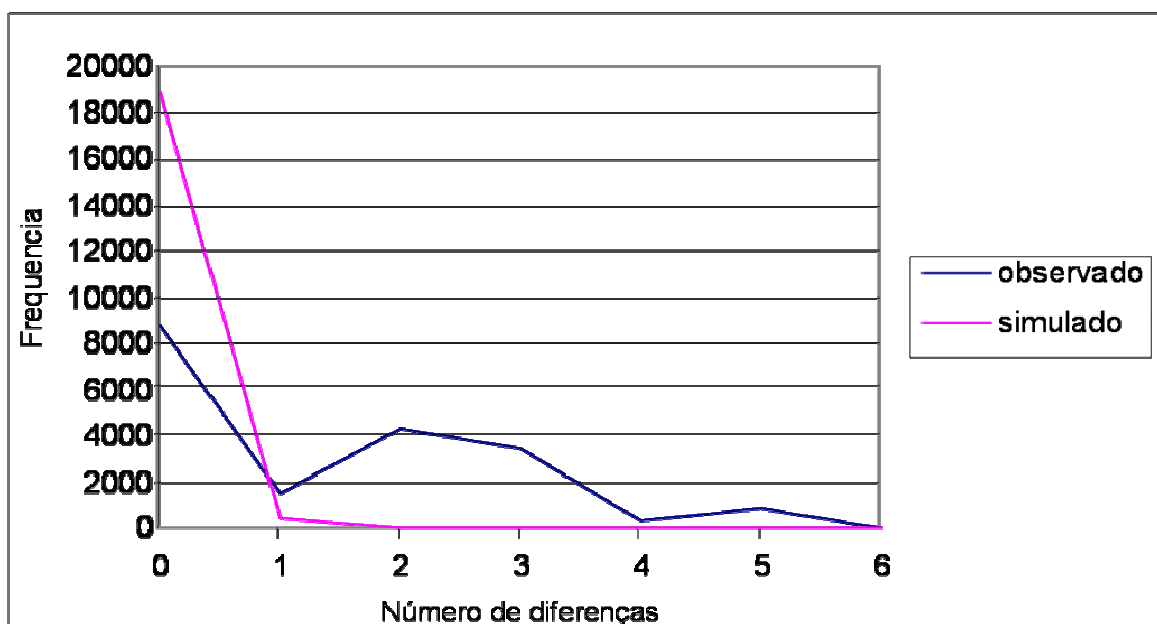


Figura 32- *Mismatch distribution* para as amostras de *P. exserta* classificadas como puras através da análise dos marcadores CAPS.

A *network* obtida a partir dessas sequências apresenta uma estrutura onde os haplótipos derivados são relativamente frequentes. Isso pode ser interpretado como um

indício de estruturação e subdivisão populacional (Figura 33). Na Análise de Variância Molecular (AMOVA) com o cálculo do índice Φ_{ST} , observou-se que 99,26% da variação encontrada nas sequências corresponde à variação entre os indivíduos encontrados em cavernas diferentes (Tabela 5). As populações um e 28 foram retiradas da análise porque apresentaram somente um indivíduo.

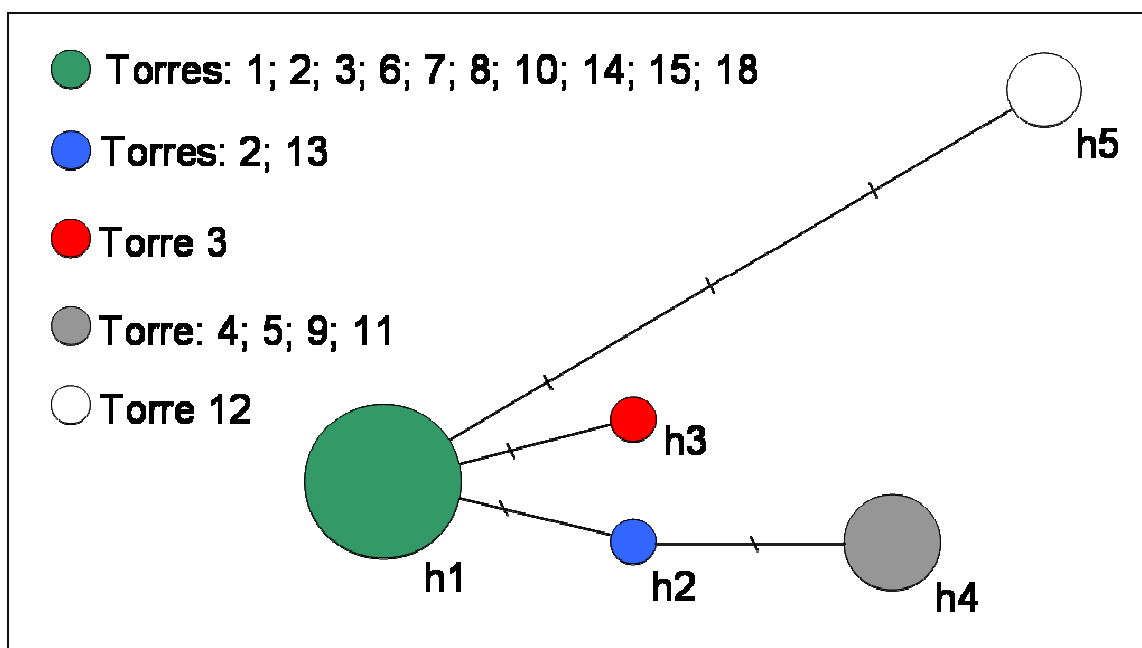


Figura 33- Rede de haplótipos construída somente com indivíduos classificados como puros através dos marcadores CAPS (*Petunia exserta*). O tamanho dos círculos corresponde a frequência dos haplótipos e os sites polimórficos que separam as sequências estão representados pelas linhas transversais.

Tabela 5- AMOVA entre as populações amostradas de *P. exserta*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual de variação
Entre populações	24	124,769	0,69745	99,26
Dentro das populações	165	0,857	0,00519	0,74
total	189	125,626	0,70264	
Φ_{ST}	0,99261			
Valor de P	<0,001			

5- DISCUSSÃO

5.1- Níveis de introgressão

P. exserta e *P. axillaris* são espécies muito próximas evolutivamente e por isso apresentam um grande compartilhamento genético por polimorfismo ancestral (Ando. *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006). Os marcadores nucleares utilizados nesse trabalho não apresentaram 100% de especificidade, isto é, podem existir plantas que não são híbridos entre essas duas espécies, mas que possuem alelos compartilhados para esses marcadores. Os marcadores de cloroplasto também não apresentaram especificidade e para esses marcadores o compartilhamento de haplótipos é encontrado em todas as populações. Levando em conta que não existem, até o momento, marcadores diagnósticos para essas duas espécies, os marcadores CAPS são a melhor ferramenta molecular para estimar a introgressão existente entre *P. axillaris* e *P. exserta*. A união de informações geográficas, morfológicas e moleculares permitiu uma estimativa da amplitude do compartilhamento de ancestralidade e hibridação entre as duas espécies estudadas.

A partir da análise com os marcadores CAPS, somente 8,5% das 306 plantas de *Petunia exserta* genotipadas apresentaram sinal de introgressão maior que 20%. No entanto, esse fenômeno é registrado ao longo de toda a distribuição conhecida dessa espécie. A introgressão deve ocorrer nos dois sentidos, uma vez que 27% dos 181 indivíduos de populações próximas de *Petunia axillaris* apresentaram sinal de mistura de ancestralidade maior que 20%.

Polimorfismo ancestral e introgressão podem resultar em um mesmo cenário, com compartilhamento de alelos e presença de indivíduos com morfologia intermediária (Edwards *et al.*, 2008). As duas espécies estudadas nesse trabalho compartilham alelos mais frequentemente na região de simpatria. Além disso, não existem barreiras reprodutivas intrínsecas ao cruzamento entre as diferentes espécies de *Petunia*. O isolamento entre as diferentes espécies é geográfico e ecológico (Watanabe *et al.*, 1996). Essas duas características podem ser usadas para justificar a presença de hibridação. O isolamento geográfico não é completo entre essas duas espécies e o isolamento ecológico provavelmente também não, uma vez que beija-flores foram vistos visitando plantas de *P.*

axillaris em populações do Uruguai (Gübitz *et al.*, 2009; C. Turchetto, comunicação pessoal), populações de *P. exserta* nas Guaritas (C. Schlindwein, comunicação pessoal) e populações das duas espécies e híbridos na Pedra da Cruz (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Abelhas (*Pseudagapostemon sp.*, Halictidae) também foram vistas nos abrigos nas Guaritas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006) e sabe-se que *Petunia axillaris* é efetivamente polinizada por polinizadores noturnos (mariposas) e diurnos (abelhas solitárias) (Hoballah *et al.*, 2007; Gübitz *et al.*, 2009).

Examinando a habilidade do beija-flor *Selasphorus rufus* forragear em flores esfingófilas e ornitófilas de *Ipomopsis* e *Aquilegia*, Grant & Temeles (1992) concluíram que beija-flores fazem visitas exploratórias a diferentes espécies e aprendem rapidamente as que são fontes satisfatórias de néctar e as que não são. Schemske & Bradshaw (1999) relatam a pouca preferência de beija-flores pela coloração vermelha em *Mimulus* e demonstram que eles podem encontrar fontes ricas em néctar e retornar frequentemente a elas independentemente da cor das flores. Segundo Grant (1992), mariposas têm dificuldade em localizar as flores de coloração escura e sem odor que são típicas da polinização por beija-flores. Assim, é possível que beija-flores sejam responsáveis pela transferência de pólen entre flores das duas espécies estudadas nesse trabalho, sendo responsáveis pela maioria dos eventos de hibridação.

Apesar de ser um fenômeno de ampla distribuição geográfica, a introgressão entre *P. exserta* e *P. axillaris* não está implicando na perda do isolamento reprodutivo entre essas duas espécies, nem de sua integridade taxonômica.

Uma possível explicação para a ocorrência de *P. exserta* exclusivamente dentro dos abrigos e *P. axillaris* fora destes pode ser a seleção contra componentes genéticos de *P. axillaris* dentro dos abrigos e contra componentes genéticos de *P. exserta* fora dos abrigos. Esse fato pode ser visto nas torres 15, 18 e na torre 9 pela presença de indivíduos híbridos nas populações classificadas primeiramente como *P. axillaris* (fora do abrigo) e não nas populações de *P. exserta* (dentro do abrigo). Nas torres 1, 2, 3 e 7, acontece o contrário, presença de indivíduos híbridos nas populações classificadas primeiramente como *P. exserta* e não nas populações próximas de *P. axillaris*. A torre 4, Pedra da Cruz, é o único local onde populações das duas espécies apresentam indivíduos com ancestralidade compartilhada segundo a análise realizada com os marcadores CAPS. O número de indivíduos híbridos encontrados dentro das cavernas parece ter uma tendência à

diminuição entre os anos de 2002 e 2009, embora não estatisticamente significativa, que não é verificada no intervalo de um ano (2008-2009). Um possível fator que poderia ter levado ao baixo índice de introgressão seria uma escolha tendenciosa dos marcadores sofrendo seleção negativa, uma vez que o padrão de variação fenotípica não é correspondente aos resultados genéticos na maioria das vezes (Senn *et al.*, 2010). Isso é pouco provável, porque os marcadores CAPS são utilizados em mapeamento genético de genes envolvidos com as modificações florais relacionadas aos diferentes polinizadores em *Petunia*. Assim, se existisse qualquer indício de seleção as plantas com características intermediárias deveriam ser intermediárias também nos níveis de introgressão.

A hibridação entre essas duas espécies poderia ser muito mais extensiva devido à sobreposição geográfica e compartilhamento parcial de polinizadores, o que não ocorre provavelmente devido à formação de uma zona de hibridação bimodal ou zona de tensão, onde a integridade das espécies é mantida por seleção de habitat. Como não existem estudos de biologia floral nesses locais, ainda não é possível quantificar a extensão do compartilhamento de polinizadores e o quanto a diferença nas síndromes florais impede a homogeneização dessas duas espécies. Um fato interessante é que as populações de *P. axillaris* encontradas próximas à *P. exserta* apresentam uma porcentagem maior de indivíduos com ancestralidade compartilhada, sugerindo que a seleção pode ser mais efetiva dentro das cavernas.

O fluxo de pólen entre dentro e fora das cavernas deve ser substancialmente maior que o fluxo de sementes, uma vez que não existe qualquer mecanismo de dispersão de sementes nas espécies de *Petunia*. Assim, o compartilhamento de haplótipos de cloroplasto deve refletir, em grande parte, o efeito fundador e a diferenciação recente dessas duas espécies. Mesmo no caso dos marcadores de cpDNA, deve existir, no cenário encontrado, uma mistura entre hibridação e polimorfismo ancestral.

5.2- *P. exserta* como uma espécie derivada de *P. axillaris*

Os indícios de seleção indicam um processo não estocástico de introgressão e levam a inferir que *P. exserta* é provavelmente uma espécie derivada de *P. axillaris*, sendo que elas devem ter existido em simpatria por muito tempo e a hibridação deve ser um fator antigo entre essas duas espécies.

Petunia exserta é encontrada em um habitat diferenciado dentro da região de ocorrência de *P. axillaris*, que é uma espécie de ampla distribuição e variabilidade (C. Turchetto, comunicação pessoal). Todos os alelos raros encontrados nos marcadores CAPS pertenceram a *P. axillaris*, indicando um maior tempo de divergência dessa espécie quando comparada com *P. exserta*. Além disso, o alelo de maior frequência na segunda espécie sempre foi encontrado na primeira, inclusive em populações geograficamente distantes da região de simpatria. Nenhum haplótipo plastidial foi exclusivo da espécie *P. exserta* e apenas um haplótipo não foi encontrado fora da Serra do Sudeste.

Todas essas características são típicas de divergência de uma espécie a partir de outra, como a grande similaridade entre as espécies, redução na variabilidade da espécie derivada, alelos e haplótipos encontrados são um subgrupo da espécie progenitora, distribuição restrita de *P. exserta*, e hibridação (Perron *et al.*, 2000; Aldridge & Campbell 2009).

Tanto mariposas esfingídeas quanto beija-flores se alimentam de néctar diluído e rico em açúcar em flores com tubos longos e não seriam necessárias grandes mudanças para alterar a síndrome de polinização (Gübitz *et al.*, 2009). As principais alterações são a perda do cheiro, acúmulo de antocianina vermelha e aparelho reprodutivo exserto. Bradshaw & Schemske (2003) demonstraram através de experimentos com *Mimulus lewisii* (flores rosa, polinizadas por abelhas solitárias) e *M. cardinalis* (flores vermelhas, polinizadas por beija-flores) que a divergência adaptativa da preferência dos polinizadores pode ser iniciada por uma única mutação de grande efeito na coloração das flores. Uma situação parecida foi observada em experimentos com *Petunia axillaris* (flores brancas, polinizadas por mariposas) e *P. integrifolia* (flores púrpura, polinizadas por abelhas) envolvendo linhagens de *P. axillaris* introgrididas para o gene *AN2*, um fator de transcrição da família MYB (Hoballah *et al.*, 2007). Esse mesmo estudo concluiu que as

flores de *P. axillaris* não produzem antocianina no limbo devido a mutações de perda de função no gene *AN2* que teriam ocorrido independentemente pelo menos cinco vezes.

5. 3- Caracterização da espécie *P. exserta*

As populações de *P. exserta* são pequenas, muito provavelmente determinadas pelo tamanho da abertura na rocha onde elas se localizam, mas o número de populações parece ser maior do que se imaginava. Assim, esta espécie pode ser descrita como endêmica da Serra do Sudeste, mas ela provavelmente não apresenta uma distribuição tão restrita como se pensava.

Lorenz-Lemke *et al.*, (2006) classificaram as plantas presentes em cada caverna como *P. exserta* ou híbridos de acordo com a coloração, a forma do limbo e a posição do estigma e estames das flores. Ao visitar novas cavernas, no ano de 2008, mesmo aquelas nas quais não foram encontradas populações de *P. axillaris* próximas, foi verificada uma grande variação na coloração das flores e nenhuma ou poucas plantas apresentando o fenótipo descrito como típico de *P. exserta*. A partir dessas visitas, passou-se a classificar todas as plantas que estavam dentro dos abrigos, protegidas da luz, como *P. exserta*.

A variabilidade na coloração poderia ser explicada por três fatores: (1) hibridação; (2) efeito de um processo de especiação em andamento ou; (3) variabilidade fenotípica. No caso de *P. exserta*, as três hipóteses são igualmente prováveis. A hibridação pode desempenhar um papel nesse aspecto. No caso de polimorfismo ancestral, como se trata de uma espécie de diferenciação recente, a coloração pode não estar sofrendo grande pressão seletiva e apresentar variação. Em contraste, pode existir alguma vantagem seletiva em apresentar variabilidade fenotípica. A variação na coloração das flores, ou mesmo a mudança na coloração da flor ao longo da antese até a senescência, é uma característica comum nas angiospermas e é frequentemente associada a estratégias para a polinização. As plantas retêm flores velhas que geralmente perdem a capacidade reprodutiva e oferecem pouca recompensa de néctar (Kudo *et al.*, 2007). Essa estratégia estaria ligada ao fato de alguns polinizadores não distinguirem a coloração das flores à distância e a manutenção dos indivíduos velhos levaria a uma falsa idéia de abundância. Quando o número de plantas é pequeno, em populações polinizadas por abelhas, a retenção de flores velhas aumenta o número de visitas (Kudo *et al.*, 2007). Mutações causadas por transposição (comum em muitas solanáceas) também podem provocar alteração de coloração, e características do solo, como o pH, podem influenciar a cor das flores (Zufall & Rausher, 2003; Quattrocchio *et al.*, 2006).

As populações de *P. exserta* são muito estruturadas geneticamente quando se analisa marcadores de cloroplasto, o que é explicado pelo fato da herança ser predominantemente materna e por não existirem mecanismos de dispersão de sementes. O processo de deriva genética, que é mais acelerado nesse tipo de marcador, também influencia nesses resultados. Quando comparada ao conjunto total dos dados, a análise separada das sequências de *P. exserta* demonstrou uma redução nos valores de diversidade nucleotídica e haplotípica, o que já havia sido relatado por Lorenz-Lemke *et al.*, (2006). Os testes de neutralidade apresentaram valores positivos, embora não significativos, o que pode ser mais um indício de subdivisão populacional. A AMOVA também revelou grande estruturação nas cavernas. A *network* também pode ser interpretada como indicando um processo de subdivisão e estruturação populacional. Uma menor variabilidade também pode ser vista em *P. exserta* quando se leva em conta os marcadores nucleares CAPS (Figura 7).

A hibridação com a espécie *P. axillaris* parece não afetar a identidade genética de *P. exserta* em larga escala, sendo provavelmente um processo antigo, mantido restrito por seleção. Além disso, eventos de hibridação não devem ocorrer em todas as populações e nem em todas as estações reprodutivas.

Além do fato da hibridação, *P. exserta* é uma espécie de variabilidade genética reduzida e com altos índices de endocruzamento nas populações. Dois fatores reduzem a variabilidade em espécies endêmicas, as mudanças ao acaso na frequência dos alelos (deriva genética e efeito fundador) e a seleção natural direcional devido a um habitat limitado (Barrett & Kohn, 1991). *Petunia exserta* é autocompatível, o que pode aumentar o endocruzamento mas, no caso dessa espécie, esse fenômeno pode ser útil para manter as adaptações e eliminar genes deletérios, se a pressão de seleção for maior que o efeito da deriva (Ellstrand & Elam 1993). A baixa variabilidade genética dessa espécie está relacionada com sua história evolutiva e não com redução populacional, as populações provavelmente sempre foram pequenas. Ela possivelmente está adaptada ao endocruzamento, o que não ocorre quando uma espécie que tinha uma ampla distribuição sofre redução rapidamente (Rydin *et al.*, 2008). Contudo, espécies endêmicas em geral são pouco competitivas e não tolerantes a estresses (Lavergne *et al.*, 2004).

A região da Serra do Sudeste foi mais fortemente povoada a partir de 1870, quando começaram as extrações de cobre na região. Hoje as principais atividades econômicas são a

bovinocultura, ovinocultura e caprinocultura. As cabras geralmente escalam as rochas e podem ter um papel importante na redução das populações de *P. exserta*. Os animais usam as cavernas como abrigo e muitas vezes se alimentam ou mesmo esmagam as plantas quando se deitam sobre elas. Uma questão que permanece é se as mudanças provocadas pelo povoamento da região influenciaram de alguma forma a dinâmica populacional dessa espécie, provocando, por exemplo, o aumento das taxas de hibridação.

No bioma Pampa, são raras as áreas de preservação ambiental (Figura 34). A Serra do Sudeste é uma importante região a ser preservada dentro desse bioma, uma vez que, além de *P. exserta*, pelo menos 30 outras espécies, somente de plantas, são endêmicas da região. A área de ocorrência da espécie *P. exserta* já é considerada de extremamente alta prioridade de conservação pelo Ministério do Meio Ambiente (Figura 35). Segundo o Ministério do Meio Ambiente, existe uma área estadual de conservação denominada Parque Camaquã, mas essa não foi efetivamente implementada. A sugestão do próprio Ministério é o aumento dessa área de conservação já existente. De acordo com os dados obtidos nesse trabalho, uma região importante para a conservação da espécie *P. exserta* seria a região das Guaritas em Caçapava do Sul.

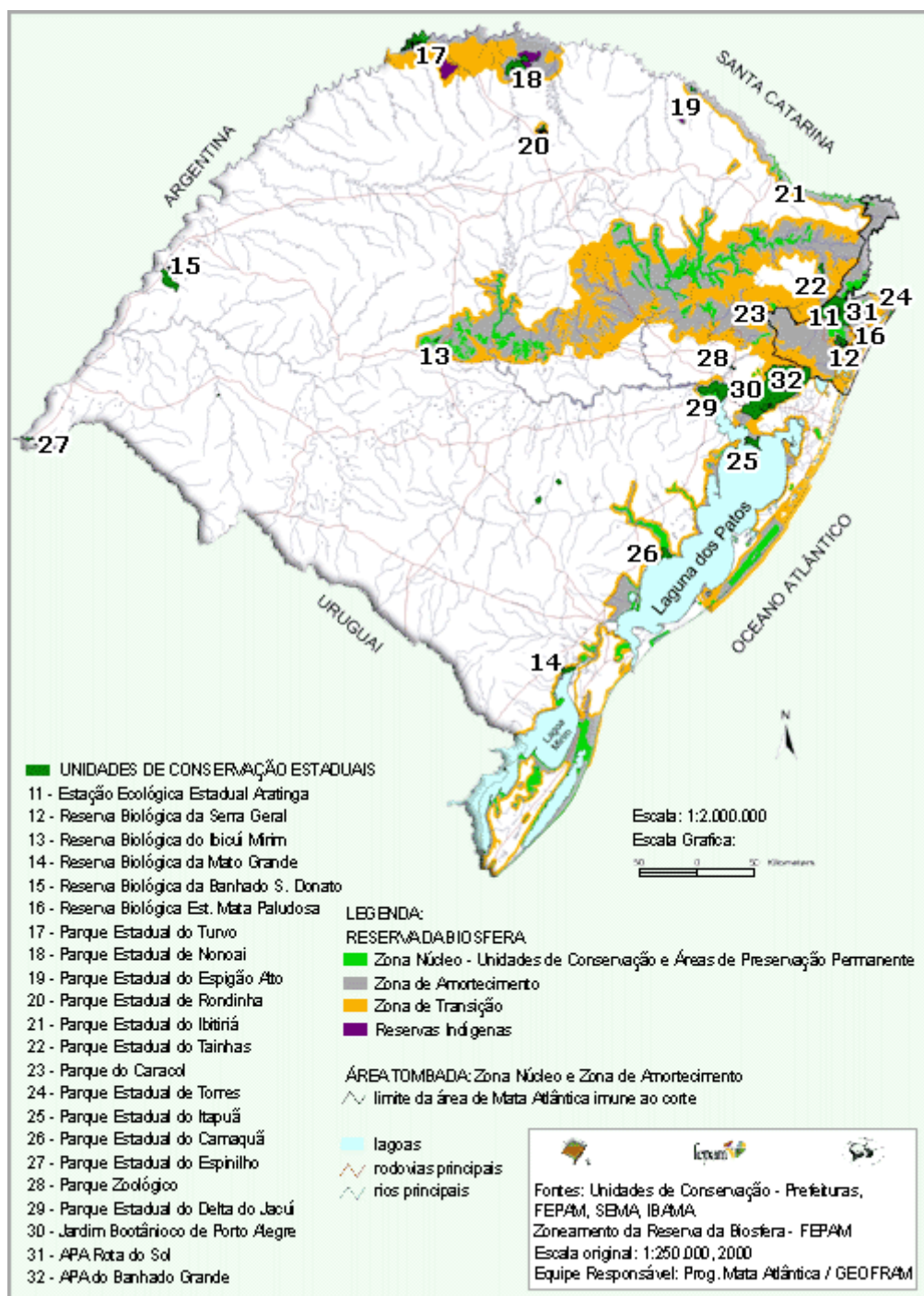


Figura 34- Unidades de Conservação existentes no Rio Grande do Sul.
 Fonte: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/bio.htm>.

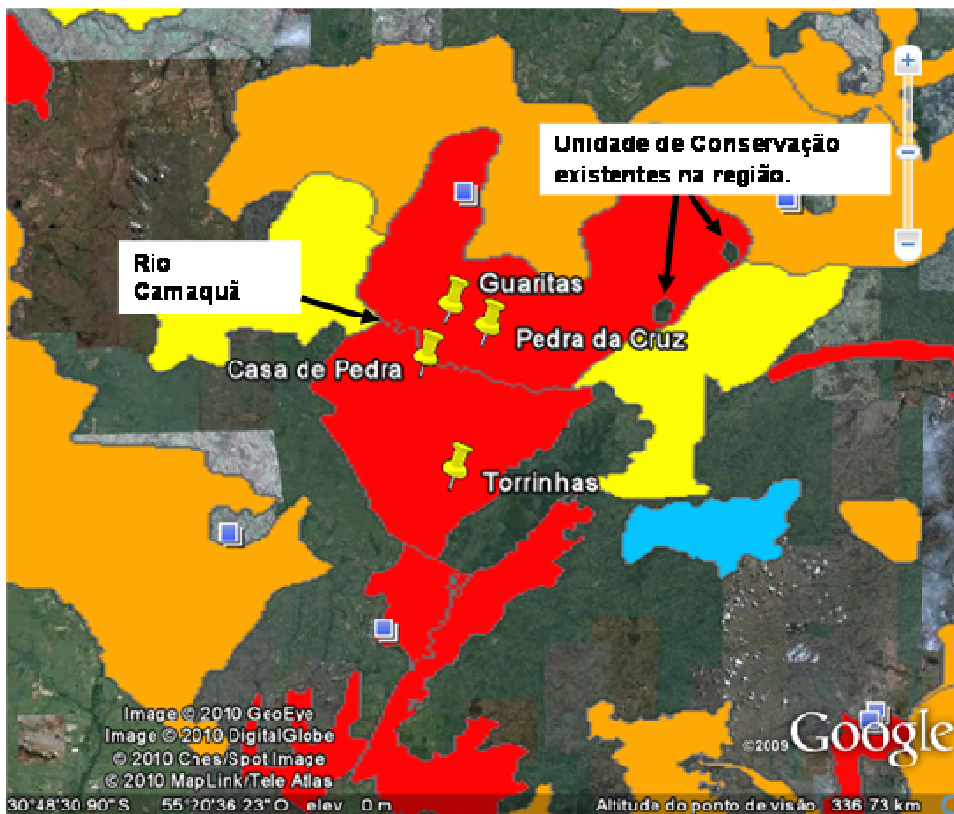


Figura 35- Áreas prioritárias para a biodiversidade segundo o Ministério do Meio Ambiente. Em vermelho as áreas classificadas como de extremamente alta prioridade para a conservação. Modificado de: <http://www.mma.gov.br>.

6- CONCLUSÕES

6. 1- *Petunia exserta* é uma espécie endêmica da região da Serra do Sudeste, com altas restrições de habitat. A coloração das flores e posição do aparelho reprodutivo são características de grande variabilidade fenotípica na espécie. Além do efeito da hibridação e polimorfismo ancestral, outros fatores podem estar envolvidos. Mais estudos são necessários para entender os motivos da variação desses fenótipos.

6.2- A introgressão entre *P. exserta* e *P. axillaris* é restrita, possivelmente devido à seleção. O habitat diferenciado certamente desempenha um papel importante nesse aspecto. Estudos de biologia floral são necessários para estimar o papel dos polinizadores na manutenção da integridade das espécies estudadas, assim como a utilização de marcadores com 100% de especificidade seria importante para uma estimativa mais exata dos níveis de introgressão.

6.3- *Petunia exserta* apresenta características que permitem inferir que ela é uma espécie derivada de *P. axillaris*.

6.4- A espécie *P. exserta* é caracterizada por uma grande estruturação populacional e pouca variabilidade genética, sendo que essas são possivelmente características próprias da espécie.

6.5- A criação de Unidades de Conservação é essencial para a preservação dessa espécie que depende da preservação do seu habitat restrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott RJ & Comes HP (2007) Blowin' in the wind- the transition from ecotype to species. *The New Phytologist* 175: 195- 197.
- Abbott RJ, Ritchie MG, Hollingsworth PM (2008) Introduction. Speciation in plants and animals: pattern and process. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 363: 2965-2969.
- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E, Christopherson L (1988) The role of insertions/deletions in the evolution of intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics* 14: 137- 146.
- Aldridge G & Campbell DR (2009) Genetic and morphological patterns show variation in frequency of hybrids between *Ipomopsis* (Polemoniaceae) zones of sympatry. *Heredity* 102: 257- 265.
- Allendorf FW & Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Second Edition. Blackwell Publishing, Montana, 642 pp.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 613-622
- 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, Saito N, Tatsuzawa F, Kakefuda T, Yamakage K, Ohtani E, Koshi-ishi M, Matsusake Y, Kokubun H, Watanabe H, Tsukamoto T, Ueda Y, Hashimoto G, Marchesi E, Asakura K, Hara R, Seki H (1999) Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 623- 650.
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E, Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany* 96: 289- 297.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105- 121.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Massachusetts, 447 pp.
- Avice JC (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*. Second Edition. Sinauer & Associates, Massachusetts, 541 pp.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37- 48.
- Barton NH & Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 113- 148.
- Barrett SCH & Kohn JR (1991) Genetic and evolution consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk DAI & Holsinger KE (eds) *Genetics and Conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, pp 3-86.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17: 3754- 3774.

- Behling H, Pillar VDP, Bauermann SG (2005) Late quaternary grasslands (campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). *Review of Palaeobotany and Palynology* 133: 235- 248.
- Behling H, Pillar VD, Müller SC, Overbeck GE (2007) Late- Holocene fire history in a forest- grassland mosaic in southern Brasil: implications for conservation. *Applied Vegetation Science* 10: 81- 90.
- Boldrini II (2009) A flora dos Campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar V, Müller SC, Castilhos ZMS, Jacques AVA (eds) *Campos Sulinos- conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 63- 77.
- Bradshaw HD & SchemskeWD (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkey flowers. *Nature* 426: 176- 178.
- Buckley TR, Cordeiro M, Marshall DC, Simon C (2006) Differentiating between hypotheses of lineage sorting and introgression in New Zealand Alpine Cicadas (*Maoricicada* Dugdale). *Systematic Biology* 55: 411- 425.
- Caporal FJM & Boldrini II (2007) Florística e fitossociologia de um campo manejado na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 37- 44.
- Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta SL, Tonelli C (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current Biology* 15: 1196- 1200.
- Cozzolino S & Scopece G (2008) Specificity in pollination and consequences for postmating reproductive isolation in deceptive mediterranean orchids. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B* 363: 3037–3046.
- 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.
- 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.
- Edwards CE, Soltis DE, Soltis PS (2008) Using patterns of genetic structure based on microsatellite loci to test hypotheses of current hybridization, ancient hybridization and incomplete lineage sorting in *Conradina* (Lamiaceae). *Molecular Ecology* 17: 5157- 5174.
- 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.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of cluster of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611- 2620.
- Excoffier LGL, Smouse PE, Quattro M (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics online* 1: 47-50.
- Fitzpatrick BM, Placyk JS, Niemiller ML, Casper GS, Burghardt GM (2008) Distinctiveness in the face of gene flow: hybridization between specialist and generalist gartersnakes. *Molecular Ecology* 17: 4107- 4117.

- Fitzpatrick BM, Fordyce JA, Gavrillets S (2009) Pattern, process and geographic modes of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 2342- 2347.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto- SP, 280 pp.
- Fries RE (1911) Die arten der gattung *Petunia*. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 46: 1- 72.
- Fu Y-X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915- 925.
- Genovart M (2009) Natural hybridization and conservation. *Biodiversity and Conservation* 18: 1435- 1439
- Girardi-Deiro AM, Mota AF, Gonçalves JON (1994) Efeito do corte de plantas lenhosas sobre o estrato herbáceo da vegetação da Serra do Sudeste, RS, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 29: 1823- 1832.
- Goudet J, Raymond M, Meeüs T, Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 1933- 1940
- Grant PR, Grant BR, Petren K (2005) Hybridization in the recent past. *The American Naturalist* 166: 56- 67.
- Grant V (1992) Floral isolation between ornithophilous and sphingophilous species in *Ipomopsis* and *Aquilegia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 11828- 11831.
- Grant V & Temeles EJ (1992) Foraging ability of rufous hummingbirds on hummingbirds flowers and hawkmoth flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 9400- 9404.
- Griesbach RJ, Stehmann JR, Meyer F (1999) Anthocyanins in the “red” flowers of *Petunia exserta*. *Phytochemistry* 51:525- 528.
- Guadagnin DL, Larocca J, Sobral M (2000) Flora vascular de interesse para a conservação na bacia do arroio João Dias: avaliação ecológica rápida. In: Ronchi LH e Lobato AOC (eds) Minas do Camaquã, um estudo multidisciplinar. UNISINOS, São Leopoldo, pp 71- 84.
- Gübitz T, Hoballah ME, Dell’Olivo A, Kuhlemeier C (2009) *Petunia* as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Second edition. Springer, New York, pp 29- 49.
- Hamilton MB (1999) Four primers 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 insertions/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the *Lecythidaceae*. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1710- 1721.
- Harrison, RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. In: Futuyma D. and Antonovics J. (eds) *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Volume 7. Oxford University Press, New York, pp 69- 128.
- Harrison RG & Bogdanowicz SM (1997) Patterns of variation and linkage disequilibrium in a field cricket hybrid zone. *Evolution* 51: 493- 505.
- Hartl D (2008) Princípios de genética de populações. Terceira edição. FUNPEC-Editora, São Paulo, 217 pp.
- Hoballah ME, Gübitz T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell’Olivo A, Arnold M, Kuhlemeier C (2007) Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *The Plant Cell* 19: 779–790.

- Holz M (1999) Do mar ao deserto- a evolução do Rio Grande do Sul no tempo geológico. Primeira edição. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 142 pp.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) Nota Técnica do Mapa de Biomas do Brasil. http://ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm#MAPAS.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2009) Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. Terceira edição. Artmed, São Paulo, 612 pp.
- Jussieu AL (1803) Sur le *Petunia*, genre nouveau de la famille des plantes solanées. Annales Muséum National D'Histoire Naturelle 2:1347- 1349.
- Knapp S (2010) On 'various contrivances': pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. Philosophical Transactions of the Royal Society B 365: 449- 460.
- Konieczny A & Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. The Plant Journal 4: 403-410.
- Kudo G, Ishii HS, Hirabayashi Y, Ida TY (2007) A test of the effect of floral color change on pollination effectiveness using artificial inflorescences visited by bumblebees. Oecologia 154: 119- 128.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). Genetica 126: 3- 14.
- Lavergne S, Thompson JD, Garnier E, Debussche M (2004) The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. OIKOS 107: 505-518.
- Leitão ACF, Janikian L, Almeida RP, Fragoso-Cesar ARS, Figueiredo FT (2007) Proveniência de arenitos da Formação Cerro da Angélica (Grupo Bom Jardim, Ediacarano do RS) na porção sul da sub-bacia Camaquã central e suas implicações tectônicas. Revista Brasileira de Geociências. 37: 677- 692 dezembro de 2007. (disponível no sítio em www.sbgeo.org.br).
- Levin DA, Ortega JF, Jansen RK (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. Conservation Biology 10: 10- 16.
- Lexer C & Widmer A (2008) The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 363: 3023- 3036.
- Liston A, Parker-Defeniks M, Syring JV, Willyard A, Cronn R (2007) Interspecific phylogenetic analysis enhances intraspecific phylogeographical inference: a case study in *Pinus Lambertiana*. Molecular Ecology 16: 3926- 3937.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. Molecular Ecology 15: 4487- 4497.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH (2008) The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 363: 3009-3021.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. Trends in Ecology & Evolution 20: 229- 237.
- Mallet J (2008) Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 363: 2971- 2986.

- 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.
- Mason-Gamer RJ, Holsinger KE, Jansen RK (1999) Chloroplast DNA variation in *Coreopsis nuecensoides* and *C. nuecensis* (Asteraceae), a presumed progenitor-derivative species pair. *Plant Systematics and Evolution* 218:5- 12.
- Matsubara K, Chen S, Lee J, Kodama H, Kokubum H, Watanabe H, Ando T (2006) PCR-based markers for the genotype identification of flavonoid-3',5'-hydroxylase genes governing floral anthocyanin biosynthesis in commercial petunias. *Breeding Science* 56: 389- 397.
- McCracken KG & Sorenson MD (2005) Is homoplasy or lineage sorting the source of incongruent mtDNA and nuclear gene trees in the stiff-tailed ducks (*Nomonyx-Oxyura*)? *Systematic Biology* 54: 35- 55.
- Ministério do Meio Ambiente (2009) Áreas prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira: Atualização-Portaria MMA N° 09, de 23 de janeiro de 2007, http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/portaria%209%20areas%20priorit.pdf (18 de fevereiro de 2010).
- Muir G & Schlötterer C (2005) Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus spp.*). *Molecular Ecology* 14: 549- 561.
- Nicholas KB & Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. www.psc.edu/biomed/genedoc.
- Olmstead RG & Palmer JD (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationship and character evolution. *Annals of Missouri Botanical Garden* 79: 346- 360.
- Olmstead RG, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L, Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee N, Symon DE, Lester RN, Jessop JP (eds) *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization*. Royal Botanic Garden, Kew, pp. 111- 137.
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, Boldrini II, Both R, Forneck ED (2007) Brazil's neglected biome: The south Brazilian *Campos*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9: 101- 116.
- Paim PSG, Lopes RC (2000) Geologia da região das Minas do Camaquã. In: Ronchi LH & Lobato AOC (eds) *As Minas do Camaquã*. São Leopoldo, Editora UNISINOS, 132pp. http://www.unisinos.br/graduacao/bacharelado/geologia/minas_camaqua/cap05.pdf.
- Paim PSG (2002) Minas do Camaquã, RS: Marco da história da mineração de cobre no Brasil. In: Schobbenhaus C, Campos DA, Queiroz ET, Winge M, Berbert-Born MLC (eds) *Sítios geológicos e paleontológicos do Brasil*. DNPM/CPRM- Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), Brasília, pp 501- 510. <http://www.ig.unb.br/sigep/sitio064/sitio064.pdf>.
- Paz ALG, Romanowski HP, Morais ABB (2008) Nymphalidae, Papilionidae e Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea) da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotropical* 8: 141- 149.
- Perron M, Perry DJ, Andalo C, Bousquet J (2000) Evidence from sequence-tagged-site markers of a recent progenitor-derivative species pair in conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 21: 11331- 11336.

- Petit C, Fréville H, Mignot A, Colas B, Riba M, Imbert E, Hurtrez-boussés S, Virevaire M, Olivier I (2001) Gene flow and local adaptation in two endemic plant species. *Biological Conservation* 100: 21- 34.
- Pillar VP & Quadros F (1997) Grassland- forest boundaries in Southern Brazil. *Coenoses* 12: 119- 126
- Posada D. & Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*. 16: 37- 45.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data *Genetics* 155: 945- 959.
- Purps DML & Kadereit JW (1998) RAPD evidence for a sister group relationship of the presumed progenitor-derivative specie pair *Senecio nebrodensis* and *S. viscosus* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 211: 57- 70.
- Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R (2006) PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *The Plant Cell* 18: 1274- 1291.
- Rambo B (1956) A fisionomia do Rio Grande do Sul. Terceira edição. UNISINOS, São Leopoldo, 473 pp.
- 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.
- Rieseberg LH & Wills JH (2007) Plant speciation. *Science* 317: 910- 914.
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation *Heredity* 83: 363- 372.
- Rogers AR & Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552- 569.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103- 106.
- 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
- Rydin C, Razafimandimbison SG, Bremer B (2008) Rare and enigmatic genera (*Dunnia*, *Schizocolea*, *Colletocema*), sisters to species-rich clades: Phylogeny and aspects of conservation biology in the coffee family. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 74- 83.
- Sang T (2002) Utility of low- copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37: 121-147.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120- 1136.
- Schemske WD, Bradshaw HD (1999) Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 11910- 11915.

- Schiestl FP & Schlüter P (2009) Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. *Annual Review of Entomology* 54: 425- 46.
- SEMA- Secretaria Estadual do Meio Ambiente (2010) <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especies-ameacadas.pdf> (6 de fevereiro de 2010).
- Senn HV, Barton NH, Goodman SJ, Swanson GM, Abernethy KA, Pemberton M (2010) Investigating temporal changes in hybridization and introgression in a predominantly bimodal hybridizing population of invasive sika (*Cervus nippon*) and native red deer (*C. elaphus*) on the Kintyre Peninsula, Scotland. *Molecular Ecology* 19: 910- 924.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142- 166.
- Souza VC & Lorenzi H (2008) *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII*. Segunda edição. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 704 pp.
- 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. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB, Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Second edition. Springer, New York, pp 1- 28.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585- 595.
- Takatsuji H, Mori M, Benfey PN, Ren L, Chua N(1991) Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in *Petunia* petals and seedlings. *The EMBO Journal* 11: 241- 249.
- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens (2005) Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology* 139:1840- 1852.
- Tornielli G, Koes R, Quattrocchio F, (2008) The genetics of flower color. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Second edition. Springer, New York, pp 269- 300.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, Hashimoto G, Marchesi E, Kao T (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 49: 115- 133.
- Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E, Kao T (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiology* 131: 1903- 1912.
- Tsumura Y & Tomaru N (1999) Genetic diversity of *Cryptomeria japonica* using co-dominant DNA markers based on sequence-tagged sites. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 396- 404.
- Venail J, Dell’Olivo A, Kuhlemeier C (2010) Speciation genes in the genus *Petunia*. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 365: 461- 468.

- Watanabe H, Ando T, Iida S, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 65: 625- 634.
- Watanabe H, Ando T, Nishino E, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E (1999) Three groups of species in *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) inferred from the intact seed morphology. *American Journal of Botany* 86: 302- 305.
- Wijnands DO & Bos JJ (1986) Proposal to conserve 7436 *Petunia* with *P. nyctaginiflora* as Typ. Cons. (Solanaceae). *Taxon* 35: 748- 749.
- Wijsman HJW & De Jong JH (1985) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Botanica Neerlandica* 34: 337- 349.
- Wolf PG, Murray RA, Sipes SD (1997) Species- independent, geographical structuring of chloroplast DNA haplotypes in a montane herb *Ipomopsis* (Polemoniaceae). *Molecular Ecology* 6: 283- 291.
- Wu CI (2001) The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 851- 865.
- Zufall RA & Rausher MD (2003) The genetic basis of a flower color polymorphism in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). *Journal of Heredity* 94:442–448.