

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



**Diversidade genética de espécies microendêmicas de *Calibrachoa* Cerv. (Solanaceae)**

**Ana Laura de Wallau John**

Orientador: Loreta Brandão de Freitas

Coorientador: Geraldo Mäder

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Porto Alegre, maio de 2017

### CIP - Catalogação na Publicação

John, Ana Laura de Wallau  
Diversidade genética de espécies microendêmicas  
de Calibrachoa Cerv. (Solanaceae) / Ana Laura de  
Wallau John. -- 2017.  
68 f.

Orientadora: Loreta Brandão de Freitas.  
Coorientador: Geraldo Mäder.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências,  
Programa de Pós-Graduação em Botânica, Porto Alegre, BR-  
RS, 2017.

1. Diversidade genética. 2. Calibrachoa. 3.  
Solanaceae. 4. Biologia molecular. I. de Freitas,  
Loreta Brandão, orient. II. Mäder, Geraldo, coorient.  
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS:**

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS
- Programa de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS
- Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## AGRADECIMENTOS

Minha família merece, com toda a certeza, ser agradecida primeiro. Obrigada aos meus pais e minha irmã, por sempre me ajudarem, me darem apoio, por trabalhar tanto para me dar o que precisei ou o que quis ao longo da vida toda, por me aturarem teimosa e “eloquente” do jeito que sou, por nunca terem me dito que não aceitavam minha profissão e ao contrário, se entusiasmarem com minha escolha e com as coisas que fui aprendendo ao longo do curso; obrigada do fundo do coração! Obrigada aos meus avós que sempre me deram muito amor e carinho, comidas e histórias maravilhosas; minha vida tem sido preenchida sempre de alegrias com a ajuda de vocês! Obrigada aos meus tios e em especial ao Tio Lolo e a Tia Rose (e meus primos, João e Ana) que tantas vezes me acolheram e ficaram comigo nesses dois anos, sempre estando presentes, muito muito obrigada! Amo vocês todos!

Obrigada a prof<sup>a</sup> Loreta por me aceitar como orientada mesmo sem me conhecer e sem eu ter experiência prévia na área, obrigada pelos dois anos de mestrado e por todo o aprendizado que veio junto com essa vaga! Muito obrigada por tudo!

Obrigada aos colegas maravilhosos do LEM! Vocês agora vão estar sem a adolescente do grupo e não vai mais dar para fazer piada dizendo que não conheço certas coisas porque não era nascida ainda! Obrigada Geraldo por me aturar esses dois anos, por sentar comigo e me ensinar os protocolos, os programas e tantas outras coisas; obrigada por me deixar te abraçar sempre que eu quis mesmo quando tu fazias caretas; obrigada por me acompanhar/levar ao campo, foi uma das melhores experiências que já tive; vou sentir falta de poder gritar “GERAAAALDO!” por aí! Obrigada Gii por dividir o cantinho da salinha comigo (♥); obrigada por me incluir na tua vida e compartilhar tantas coisas comigo; obrigada por cuidar de mim e, por fim, obrigada por ser minha amiga (♥♥♥)! Obrigada Mãe Alice por entrar na zueira e ser minha mãe postiça; obrigada pela amizade e pelo carinho; obrigada por toda a ajuda durante os experimentos, por dividir o mate e por cuidar de mim! Obrigada Dani (Big Bird) por me deixar ser teu passarinho também; obrigada por compartilhar tanto comigo e ser minha amiga; obrigada por me ajudar com coisas diversas do lab e me cuidar, obrigada pelas conversas de sempre no meio da tarde no lab; e obrigada pelo nosso curso de escalada e pela trilha no viaduto, estou ansiosa pela nossa próxima aventura! Obrigada Carol pela amizade e por tudo que me ensinou, espero que o sucesso chegue logo pra acompanhar a tua pessoa que já é incrível e é meu exemplo de profissional! Obrigada Maikel por também dividir o cantinho da salinha comigo; obrigada pela amizade e pelas conversas, e por toda a ajuda! Obrigada Sara por ter vindo para o LEM, foi maravilhoso te conhecer melhor e virar tua amiga; a vizinha do E.T. Bilu estará sempre comigo agora, bem como teu exemplo, que

assim como o da Carol espero que me guie pela vida! Obrigada Marcelo pelas conversas e piadas sempre a postos, tenebroso tu guri! Obrigada Lina pelo convívio e por se preocupar comigo! Obrigada Gustavo por ter me recebido e por ter me ensinado a pulverizar as plantas, eu me lembro! Obrigada Ana Lúcia pela ajuda e pelo que me disse quando entrei no LEM! Obrigada aos demais colegas de laboratório! Obrigada Clênio!

Obrigada aos colegas e amigos da genética, em especial ao Tiago! Obrigada Mindu por tudo nesses dois anos, pela amizade, pelas comidas, pelos presentes e por ser sempre direto e carinhoso quando eu estava perdida na vida! Obrigada por me deixar te abraçar infinitamente! Obrigada aos funcionários da Genética, principalmente o Elmo pela ajuda quando precisei! Obrigada prof<sup>o</sup> Nelson pela ajuda em diversos momentos!

Obrigada aos amigos e pessoas maravilhosas que conheci na Botânica, em cada cadeira, viagem de campo ou passeios pelo corredor! Muito obrigada a todos, sempre lembrarei a Botânica com vocês todos junto! Muito obrigada em especial ao Jonas e ao Guilherme, não tenho nem por onde começar. Obrigada por serem meus amigos nesses dois anos (obrigada por acreditar que foram vocês que me aceitaram quando na verdade eu me enfiei na vida de vocês e não saí mais!); obrigada por todo o apoio e todos os abraços; obrigada pelos almoços no RU e por todos os momentos de descontração! Obrigada por me ouvirem quando precisei, obrigada por estarem sempre presentes! Prometo que estaremos juntos de novo um dia! Obrigada por tudo! Amo vocês.

Obrigada aos professores e funcionários do PPGBot, em especial a coordenação e a secretaria que sempre tiraram minhas dúvidas e me ajudaram de forma muito eficiente! Obrigada em especial para a professora Silvia Miotto e ao professor João Iganci, foi um prazer ter sido aluna de vocês!

Obrigada aos amigos de Santa Maria e meus colegas maravilhosos (♥)! Estiveram presentes desde a graduação, me dando apoio, amor, risadas e ajudando de todas as formas possíveis, inclusive me cedendo suas casas e chuveiros quando eu fui passear em SM! Obrigada especialmente para Thay, Bru, Livia, Gigi, Kadu, Cris, Lari, Brubru e Julie! Um gigantesco MUITO OBRIGADA para ti miga Julie, porque né, não teria conseguido se tu não estivesse comigo esses dois anos em POA, obrigada do fundo do coração, e que seja até a poeira cósmica! Amo vocês!

Obrigada as minhas amigas em Giruá por sempre termos nossos momentos de mate e bolo para fazer eu me sentir em casa, vocês estão sempre no meu coração! Obrigada João Paulo pela amizade e companhia em POA e por me acolher quando eu não tinha um

apartamento para morar! Obrigada Nídia, minha professora, minha colega Bióloga e minha amiga; obrigada por ter contribuído tanto para minha escolha de ser Bióloga; obrigada pelo apoio e auxílio nesses anos todos; obrigada por me receber como uma entidade mista de filha postiça/afilhada/pupila/colega/amiga! Muito obrigada! Obrigada Felipe pela amizade e apoio transoceânico, por me ajudar a levantar e colocar a cabeça no lugar quando precisei!

Obrigada Caleb de Lima Ribeiro, pelo carinho e cuidado, por se importar tanto comigo, por também ser tão empolgado com Botânica, e por ter entrado na minha vida de forma providencial! Muito obrigada sempre!

Obrigada a todos os funcionários da UFRGS que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada a todas as pessoas e entidades que financiaram este trabalho e/ou cederam infraestrutura para que fosse realizado.

E por fim, obrigada ao Universo. Obrigada por sempre me atender quando pedi, obrigada por não me dar as coisas impossíveis que clamei, pois assim pude crescer e aprender como lidar com elas com minhas próprias mãos. No mundo, tudo se resume a energias e ponto de vista.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | 9  |
| ABSTRACT.....  | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 11 |
| 1.1. Variabilidade genética e conservação de espécies endêmicas.....                             | 11 |
| 1.2 Caracterização das espécies-alvo.....  | 12 |
| 1.3 Estudos moleculares com <i>Petunia</i> e <i>Calibrachoa</i> .....                            | 20 |
| 1.4 O Planalto Sul Brasileiro.....   | 22 |
| 1.5 Outras espécies de <i>Calibrachoa</i> nos campos de altitude do Planalto Sul Brasileiro..... | 24 |
| 2. OBJETIVOS.....  | 26 |
| 2.1. Objetivo geral.....   | 26 |
| 2.2. Objetivos específicos.....  | 26 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 27 |
| 3.1 Coletas e observações em campo.....  | 27 |
| 3.2. Pulverização das amostras, extração e quantificação do DNA.....                             | 29 |
| 3.3. Marcadores plastidiais (Amplificação, Sequenciamento e Análises).....                       | 30 |
| 3.4. Marcadores nucleares (Amplificação, Genotipagem e Análises).....                            | 32 |
| 4. RESULTADOS.....   | 36 |
| 4.1 Observações em campo.....  | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2 Marcadores plastidiais.....                           | 37 |
| 4.3 Marcadores nucleares.....                             | 42 |
| 5. DISCUSSÃO.....   | 51 |
| 5.1 Variabilidade genética das espécies-alvo.....         | 51 |
| 5.2 Relacionamento entre as espécies-alvo.....            | 53 |
| 5.3 Estrutura e diversidade genética intraespecífica..... | 55 |
| 5.4 Implicações para a conservação.....                   | 58 |
| 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....                         | 60 |
| 7. REFERÊNCIAS.....                                       | 62 |

## RESUMO

Plantas endêmicas ou raras tendem a apresentar baixa variabilidade genética devido à área restrita de distribuição ou ao baixo tamanho populacional efetivo, situações algumas vezes causadas por interferência humana. Diversos estudos vão ao encontro de tais expectativas, mas também se pode encontrar espécies que apresentam alta variabilidade genética sendo classificadas como naturalmente raras. *Calibrachoa* é um gênero de Solanaceae com 27 espécies, altamente diversificado em regiões de campos de altitude no Sul do Brasil. *Calibrachoa eglandulata*, *C. sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* são espécies microendêmicas restritas a poucas localidades nos estados de Santa Catarina e Paraná. Pouco se sabe a respeito de sua variabilidade genética e não existem estudos sobre fluxo gênico e estruturação populacional para estas espécies, sendo o objetivo deste estudo quantificar a diversidade genética utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares, bem como apurar a existência e a força da estruturação populacional e do fluxo gênico. Seis *loci* de microssatélites e dois espaçadores intergênicos plastidiais (*trnH-psbA* e *trnS-trnG*) foram amplificados para acessar essas informações, e fatores e eventos evolutivos responsáveis pelos padrões encontrados. *Calibrachoa eglandulata* apresentou os menores valores para diversidade genética dentre todas as quatro espécies, associados a fluxo gênico restrito e alta estruturação populacional. *Calibrachoa sendtneriana* e *C. spathulata* apresentaram valores similares para diversidade genética, com ausência de estruturação populacional para a primeira e a última se mostrou fortemente estruturada. *Calibrachoa serrulata* apresentou valores moderados de diversidade genética e estruturação populacional. Fatores como a história de vida, a especificidade do hábitat, o tipo de polinização e eventos de hibridação podem explicar os padrões encontrados neste estudo. Os dados genéticos gerados neste estudo são extremamente importantes para determinar o *status* de conservação preciso ou atualizar as definições já existentes e também contribuem para o conhecimento a respeito destas espécies endêmicas do Brasil.

Palavras-chave: campos de altitude, endemismo, espécies herbáceas, variabilidade genética

## ABSTRACT

Endemic (or rare) plant species are expected to have low genetic variability because their small range or effective size, situations sometimes caused by human interference. Several studies agree to this expectation, but also one can find species that show high genetic diversity, even being classified as naturally rare. *Calibrachoa* is a Solanaceae genus with 27 species, highly diversified in highland grasslands in Southern Brazil. *Calibrachoa eglandulata*, *C. sendtneriana*, *C. serrulata*, and *C. spathulata* are narrow endemic species, restricted to few localities in Santa Catarina and Paraná states. Little is known about their genetic diversity and no studies have been made about gene flow and population structure for these species, being the objective of this study to quantify the genetic diversity using different types of molecular marker, . Six microsatellite *loci* and two plastid intergenic spacers (*trnH-psbA* and *trnS-trnG*) were amplified in order to access the genetic variability, population structure, and gene flow for each of these species as well as factors and evolutionary events driving the patterns found. *Calibrachoa eglandulata* presented the lowest genetic diversity indices among the four species, associated with restricted gene flow and high population structure. *Calibrachoa sendtneriana* and *C. spathulata* showed similar values for genetic diversity but the former showed no population structure while the latter was found to be strongly structured. *Calibrachoa serrulata* presented moderate values of genetic diversity and population structure. Factors such as life history, habitat specificity, pollination syndrome, and putative interspecific hybridization events could explain the patterns found here. The genetic data generated in this study are extremely important for accurately determine the conservation status of these species or updating existing ones and contribute to the knowledge on these endemic Brazilian species.

Keywords: endemism, genetic diversity, herbaceous species, highland grasslands

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Variabilidade genética e conservação de espécies endêmicas

Em geral, acredita-se que espécies raras (de distribuição restrita e/ou pequeno tamanho populacional) apresentem baixa variabilidade genética e grande diferenciação entre suas populações (Binks *et al.*, 2015), características decorrentes do fluxo gênico restrito entre as poucas populações existentes e altos índices de endocruzamento dentro delas (Ellstrand & Elam, 1993). O fluxo gênico é capaz de homogeneizar as frequências alélicas/genotípicas entre e dentro das populações, com isso, espécies que apresentam fluxo gênico restrito em geral apresentam sinal de estruturação populacional (não considerando outros fatores). A estruturação populacional dentro de espécies está ligada a fatores ecológicos e históricos como o tempo de vida da espécie, o tipo de reprodução, o tipo de polinização e a biologia dos polinizadores, eventos de extinção e recolonização, entre outros (Loveless *et al.*, 1984).

Pequenas populações tendem a servir de repositórios quando existem populações próximas com maior tamanho populacional, consideradas como populações “fonte” (Ellstrand & Elam, 1993). O fluxo gênico unidirecional pode comprometer a sobrevivência das pequenas populações ao expô-las à depressão exogâmica, a perda de aptidão dos indivíduos ao serem inseridos na população alelos não adaptados localmente. A depressão exogâmica pode surgir após eventos de hibridação, sendo a hibridação de congêneres ou entre gêneros distintos eventos comuns em plantas (Ellstrand & Elam, 1993).

A hibridação seguida de introgressão pode ser um mecanismo para a incorporação de alelos não próprios em populações ou espécies. A introgressão, em termos genéticos, é o movimento de genes entre populações ou espécies através do cruzamento repetido entre híbridos interespecíficos ou pelo retrocruzamento recorrente de um híbrido interespecífico com uma ou ambas populações/espécies parentais (Rhymer & Simberloff, 1996; Harrison, 2014). Em *Petunia* Juss., a introgressão foi sugerida como possível mecanismo responsável pelo compartilhamento de polimorfismos plastidiais entre espécies distintas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Porém a existência de haplótipos compartilhados entre espécies ou populações isoladas de *Petunia* pode também ser devida ao compartilhamento de polimorfismos ancestrais (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Segatto *et al.*, 2014a,b).

O intercâmbio genético entre indivíduos de uma mesma ou diferentes populações de uma espécie pode ser evidenciado através da análise de marcadores do tipo microssatélites, considerando que estes refletem uma história mais recente (alguns milhares de anos) da demografia da espécie. Os microssatélites, ou polimorfismos de sequências repetidas simples

(*simple sequence repeats* - SSRs), são elementos abundantes no genoma dos eucariotos e consistem de pequenos motivos de DNA repetidos, compostos por um a seis nucleotídeos *en tandem*. Estes marcadores são caracterizados como fragmentos que exibem variação de tamanho de acordo com a expansão ou contração da região repetida. Além disso, estas sequências apresentam características adequadas para abordagens populacionais, evidenciando eventos históricos como o efeito fundador, gargalo de garrafa e deriva genética (Li *et al.*, 2002) em contrapartida aos eventos tidos como recentes.

Em contrapartida, marcadores de sequência plastidiais, que são mais conservados quando comparados com os microsatélites, já se mostraram eficientes na interpretação histórica de espécies de *Calibrachoa* Cerv. e *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Mäder *et al.*, 2013; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015). Devido à herança materna do cloroplasto (Derepas & Dulieu, 1992) e à dispersão limitada de sementes (são dispersas de forma gravitacional, caindo junto à planta mãe) observada nestas espécies (Van der Pijl, 1982), a análise das sequências plastidiais permite interpretar os padrões que moldaram a diversidade genética histórica dessas espécies desde sua origem até o presente (Mäder *et al.*, 2013).

A variabilidade genética pode ser apresentada através de índices, comumente calculados em estudos de genética de populações, que servem como base para projetos de manejo e conservação de espécies. Sabendo que a perpetuação das espécies depende da manutenção de um número mínimo de indivíduos para que ocorra reprodução e a formação de descendentes (Frankham, 2014), o conhecimento do *pool* gênico de cada população é fundamental a fim de manter a viabilidade da prole ao detectar quais espécies ou populações devem ser prioritariamente manejadas (Ciésłak *et al.*, 2015). O conhecimento sobre a diversidade genética deve, então, ser aliado a outros como a área de distribuição da espécie, o hábitat dos indivíduos, o número total de indivíduos conhecidos da espécie, o tipo de reprodução, condições ecológicas e ambientais necessárias para o desenvolvimento da espécie, entre outros, na proposição de programas visando à conservação de espécies. A baixa diversidade genética pode representar uma ameaça à sobrevivência da espécie, diminuindo seu poder adaptativo frente a alterações (graduais ou não) no meio ambiente, ao surgimento de doenças/parasitas, ou eventos estocásticos (Ellstrand & Elam, 1993; Binks *et al.*, 2015).

### **1.2 Caracterização das espécies-alvo**

Solanaceae é uma família de plantas cosmopolita, não encontrada apenas no continente Antártico. Com origem na América do Sul e posterior dispersão para o Velho Mundo (Olmstead *et al.*, 2008), a família possui 102 gêneros e 2460 espécies (Angiosperm

Phylogeny Group - <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>). As espécies de Solanaceae são conhecidas por apresentarem alcaloides e pela importância econômica de diversos gêneros como *Capsicum* L., *Solanum* L. e *Physalis* L., com representantes entre plantas alimentícias; *Cestrum* L., *Brunfelsia* L. e *Petunia*, com espécies ornamentais (Judd *et al.*, 2009). Estes dois últimos gêneros pertencem ao clado Petunieae, grupo que contém ainda *Calibrachoa* e outros seis gêneros (Olmstead, 2013).

Em meados de 1980, *Calibrachoa* foi separado de *Petunia* devido a numerosas características conspícuas de cada *taxon* (Tabela 1). Atualmente *Calibrachoa* compreende 27 espécies (Fregonezi *et al.*, 2012) de ervas a sub-arbustos perenes, que apresentam tricomas, caule lenhoso (relacionado ao ciclo de vida perene), folhas sésseis, flores infundibuliformes com pétalas de coloração que vai do branco ao magenta ou purpúreo e predominantemente polinizadas por abelhas, originando um fruto do tipo cápsula (Stehmann, 1999). Não há qualquer mecanismo especializado para dispersão de sementes em *Calibrachoa*, as sementes caem próximas das plantas-mãe por ação da gravidade (barocoria) (Stehmann, 1999). Tsukamoto *et al.* (2002) avaliou a autocompatibilidade de 32 morfotipos de *Calibrachoa* e verificou que, com exceção de *Calibrachoa parviflora* (Jussieu) D'Arcy, todas os demais são autoincompatíveis. Existem diferentes relatos de hibridação natural entre as espécies de *Calibrachoa*, mas pouco se sabe a respeito da viabilidade e capacidade reprodutiva de tais híbridos (Stehmann, 1999; Fregonezi, 2009).

As espécies de *Calibrachoa* são comumente encontradas em campos arenosos ou rochosos (Stehmann, 1999). Com a exceção de *C. parviflora*, *Calibrachoa* ocorre exclusivamente no sudeste da América do Sul e se distribui do Rio Grande do Sul até Minas Gerais (no Brasil), e países vizinhos como Argentina, Uruguai e Paraguai (Fregonezi, 2009). A grande maioria das espécies de *Calibrachoa* possui distribuição contínua, associada a uma determinada região fisionômica e restrita a uma condição edáfica característica (Stehmann, 1999). Segundo Stehmann & Semir (2005), no Brasil as espécies podem ser divididas em dois principais centros de diversidade: um nos planaltos de Curitiba e Ponta Grossa (Paraná); outro nos campos de altitude da borda oriental do planalto sul brasileiro (Santa Catarina). Ainda segundo os mesmos autores, existe um terceiro, porém menos expressivo centro de diversidade na província Pampeana, fronteira entre Brasil e Uruguai. Nas regiões correspondentes aos principais centros de diversidade de *Calibrachoa* ocorre a maioria dos endemismos do gênero. Nos campos de altitude do planalto sul brasileiro são encontradas três espécies endêmicas de áreas relativamente pequenas: *Calibrachoa eglandulata* Stehmann & Semir, *Calibrachoa sendtneriana* (R.E.Fr.) Stehmann & Semir e *Calibrachoa serrulata*

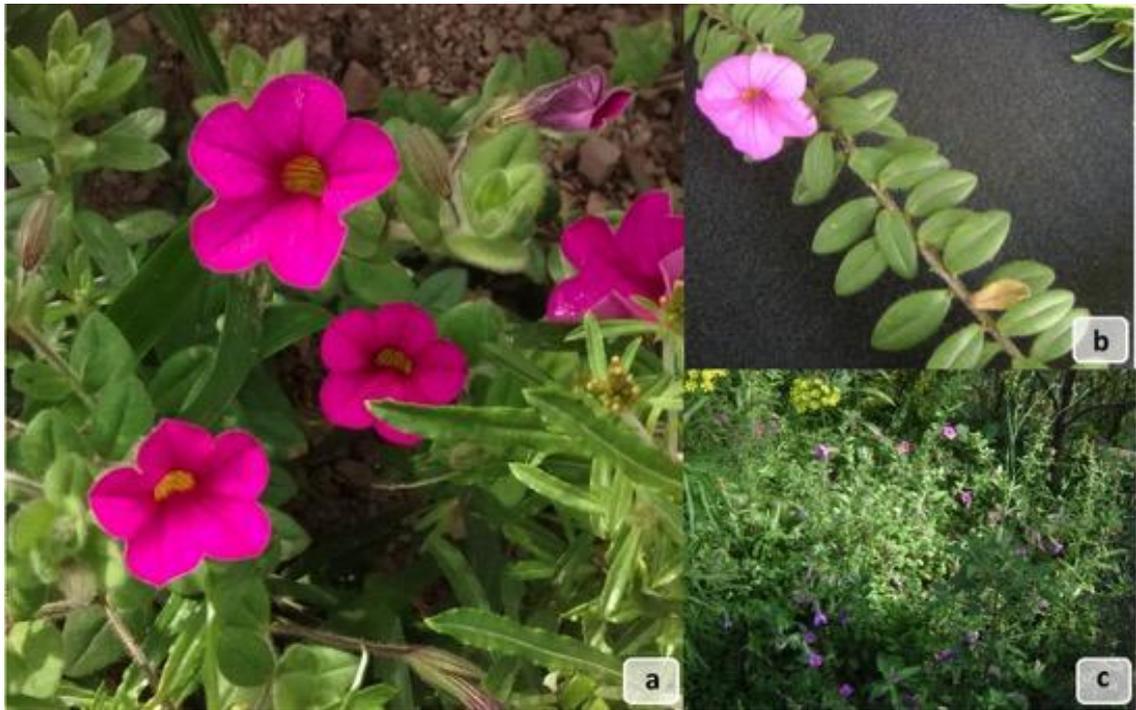
(L.B.Sm. & Downs) Stehmann & Semir. Um pouco mais ao norte, na divisa entre SC e PR, ocorre a espécie *Calibrachoa spathulata* (L.B.Sm. & Downs) Stehmann & Semir.

**Tabela 1** Comparação de alguns caracteres utilizados para diferenciar *Petunia* e *Calibrachoa*. Fontes: Wijzman & Jong, 1985; Stehmann, 1999

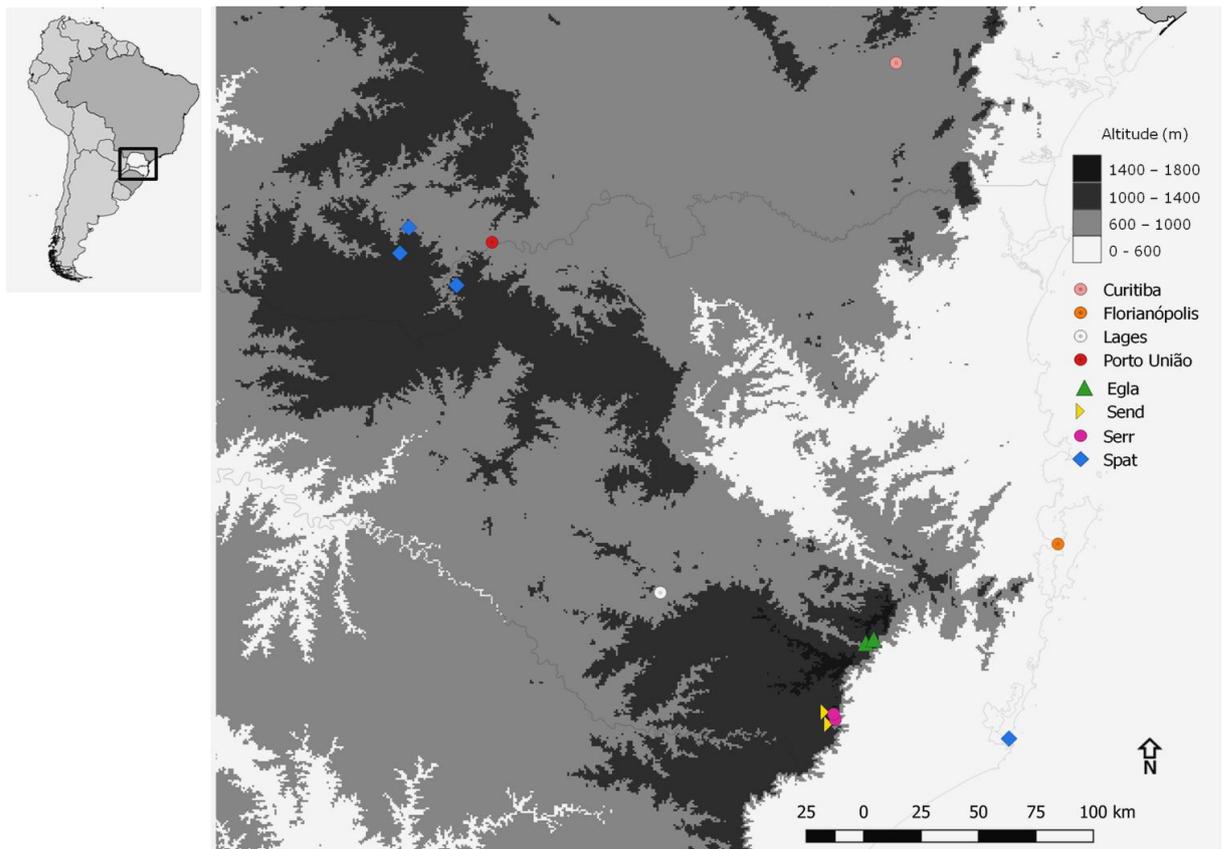
| Caracteres              | <i>Calibrachoa</i>                           | <i>Petunia</i>                                    |
|-------------------------|--|---|
| Número cromossômico (n) | 9  | 7   |
| Hábito                  | Subarbustivo ou herbáceo                     | Herbáceo  |
| Pré-floração            | Conduplicada                                 | Imbricada   |
| Corola                  | Infundibuliforme (exceto <i>C. pygmaea</i> ) | Infundibuliforme, campanulada ou hipocrateriforme |
| Anteras                 | Amarelas                                     | Amarelas ou Violáceas                             |
| Tempo de vida           | Perenes                                      | Anuais  |

### ***Calibrachoa eglandulata* Stehmann & Semir**

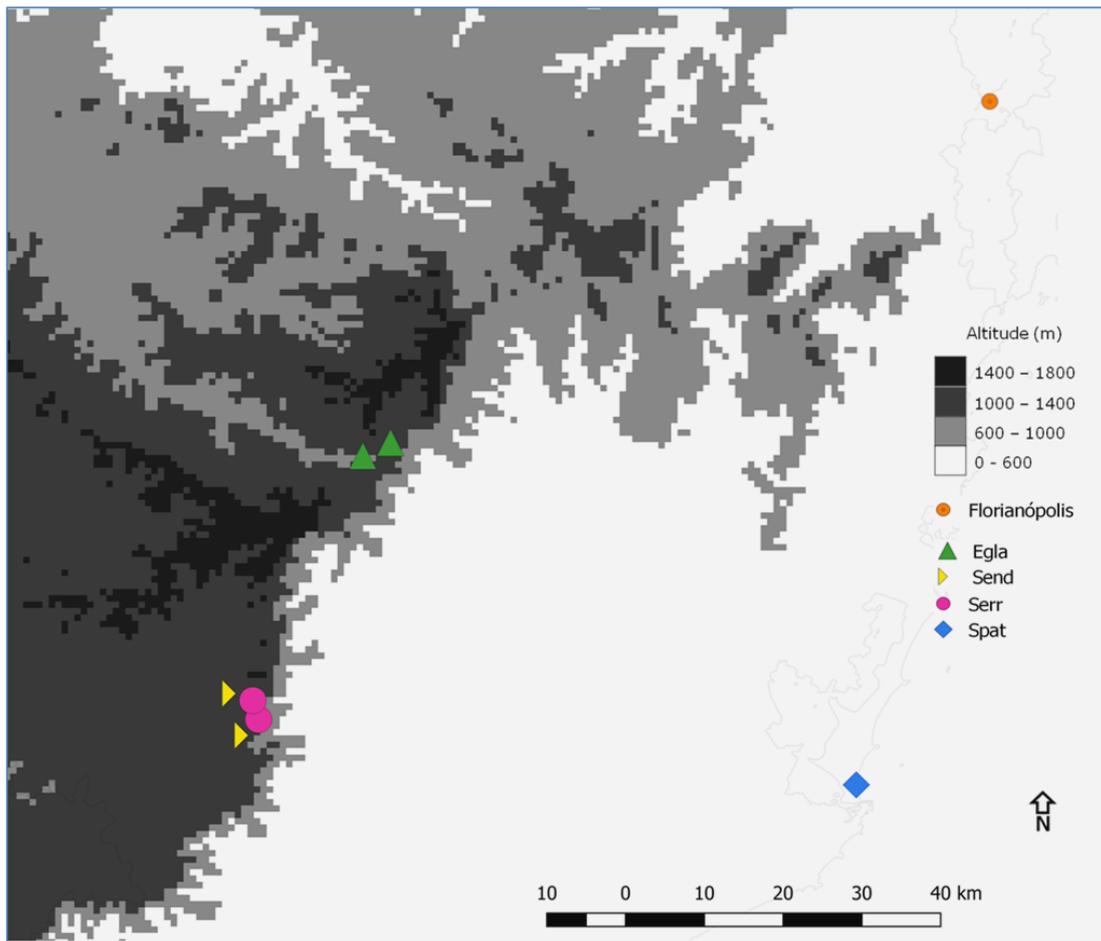
*Calibrachoa eglandulata* (Figura 1) é um subarbusto decumbente que ocorre em afloramentos rochosos em paredões entre a vegetação arbórea da Floresta Ombrófila Mista, tolerando viver em locais sombreados. Apresenta folhas sésseis ou subsésseis, de lâmina elíptica, mais raramente ovada ou obovada; cálice esverdeado, de 13-19 mm de comprimento; corola tubuloso-infundibuliforme, com limbo rosa (observação em campo) de 23-27 mm de diâmetro, tubo de coloração amarela tanto interna quanto externamente, de 18-20 mm de comprimento; fruto do tipo cápsula, com 6-8 mm de comprimento por 3-3,5 mm de diâmetro (Stehmann, 1999). É a única representante do gênero a não apresentar glândulas secretoras nos tricomas. As características florais indicam polinização por abelhas (melitofilia), hipótese suportada pela observação de abelhas visitando flores durante a expedição de campo em 2015. Descrita em 1997, a espécie é encontrada no município de Urubici, estado de Santa Catarina (SC), em altitudes acima de 1200 m (Stehmann, 1999) e considerada endêmica desta região (Figuras 2 e 3). Listada no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli & Moraes, 2013), *C. eglandulata* se enquadra na categoria “Em Perigo” de acordo com os critérios [B1ab(iii)] da IUCN (International Union for Conservation of Nature). Estar classificada em tal categoria deve-se à área de ocorrência restrita na qual esta espécie é encontrada, provavelmente, devido à destruição de seu hábitat pela urbanização, principalmente construção de estradas, agricultura e pecuária (observação em campo).



**Figura 1.** *Calibrachoa eglandulata*: a = flores em diferentes estágios; b = folhas; c = hábito em beira de estrada.



**Figura 2.** Localização das populações estudadas referente às quatro espécies-alvo deste trabalho. As espécies *Calibrachoa sendtneriana* (Send) e *Calibrachoa serrulata* (Serr) apresentam sobreposição nas suas distribuições. Para *Calibrachoa eglandulata* (Egla) só há registros no município de Urubici (SC), enquanto que *Calibrachoa spathulata* (Spat) está mais bem distribuída em áreas de altitude na divisa entre SC e PR, e ainda possui uma população disjunta no litoral catarinense (Laguna).



**Figura 3.** Detalhe da localização de *Calibrachoa eglandulata* (Eglá), *Calibrachoa sendtneriana* (Send) e *Calibrachoa serrulata* (Serr). Também é visível no mapa a população disjunta de *Calibrachoa spathulata* (Spat).

### ***Calibrachoa sendtneriana* (R.E.Fr.) Stehmann & Semir**

Subarbusto ereto com até 1,2 m de altura. Esta espécie é associada a campos, bordas de mata (mata nebulosa) e turfeiras (Stehmann, 1999). Possui folhas sésseis, de lâmina elíptica ou obovada; cálice verde e piloso, 8-10 mm de comprimento, partido até a metade; corola tubuloso-infundibuliforme de coloração vermelha, limbo com 19-21 mm de diâmetro, tubo amarelo interna e externamente, com 14-17 mm de comprimento; fruto do tipo cápsula, com 5-6 mm de comprimento por 3-4 mm de diâmetro (Stehmann, 1999). *Calibrachoa sendtneriana* (Figura 4) se destaca na paisagem mesmo em meio à vegetação mais alta de borda de mata devido à cor das flores que, com a luz do Sol, adquirem tonalidades alaranjadas e douradas (observação em campo). A cor da corola, seu formato e a presença de estames alongados são características associadas à polinização por aves (ornitofilia), provavelmente beija-flores (Stehmann, 1999; Fregonezi, 2009).

A espécie, descrita em 1997, é encontrada em altitudes acima de 1200 m nos municípios de Bom Jardim da Serra e Bom Retiro (SC) sendo endêmica da região (Figuras 2 e

3). Não há registro desta espécie em listas que avaliam o *status* de conservação, mas sua área de ocorrência restrita e a interferência humana no hábitat (queimadas, uso dos campos como pastagem) poderiam justificar a sua inclusão em alguma categoria de ameaça (observação em campo).

A existência de prováveis híbridos naturais de *C. sendtneriana* com *Calibrachoa sellowiana* (Sendt.) Wijsman (Fregonezi, 2009) pode também ser considerada como um risco para a sobrevivência da espécie. O cruzamento com *C. sellowiana* pode alterar o *pool* gênico da prole através da inserção e/ou alteração da frequência de alelos caso os híbridos sejam tão adaptados quanto os parentais e a geração de híbridos seja um acontecimento frequente. Cruzamentos interespecíficos e/ou com os híbridos ao longo de muitas gerações podem acarretar na perda da integridade genética da espécie.



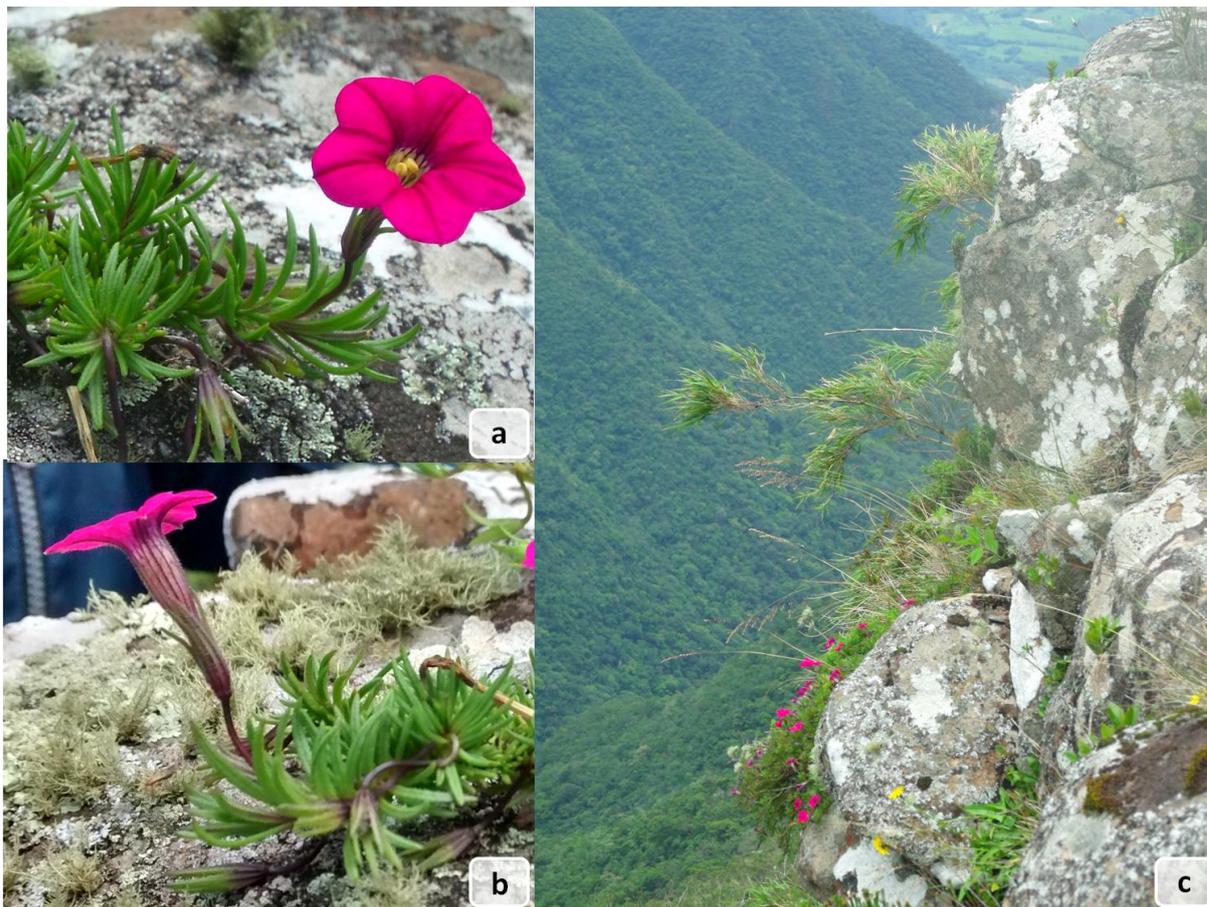
**Figura 4.** *Calibrachoa sendtneriana*: a = flor aparentando coloração alaranjada/dourada devido ao sol, b = folhas e vista lateral da flor; c = hábito em borda de mata nebulosa; d = hábito entre rochas. Fotos b e d: Marcelo Costa Teixeira.

### ***Calibrachoa serrulata* (L.B.Sm. & Downs) Stehmann & Semir**

Subarbusto subereto com muitos ramos, *C. serrulata* (Figura 5) cresce sobre afloramentos ou paredões rochosos. Apresenta folhas sésseis, congestas, de lâmina linear ou subulada e ápice agudo, com as folhas reunidas em direção ao ápice dos ramos; cálice de 12-14 mm de comprimento, fendido até a metade ou cerca de 2/3 do comprimento; corola tubuloso-infundibuliforme, limbo magenta (observação em campo) com 19-20 mm de diâmetro, fendido até a metade, com lobos arredondados de ápice apiculado, tubo subcilíndrico, medindo de 20-21 mm de comprimento, pouco ampliado em direção ao ápice; fruto do tipo cápsula (Stehmann, 1999). Bem como *C. sendtneriana*, *C. serrulata* apresenta caracteres associados à ornitofilia: cor da corola e altura dos estames e do estigma. Além disso, Stehmann (1999) e Fregonezi (2009) relataram a observação de beija-flores nas proximidades de ambas as espécies.

A espécie foi descrita em 1997 para os municípios de Bom Jardim da Serra e Lauro Müller (SC), em altitudes superiores a 1400 m (Stehmann, 1999) (Figuras 2 e 3). De acordo com o Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli & Moraes, 2013), a espécie está listada como Deficiente de Dados quanto ao estado de conservação, situação que pode ser compreendida, uma vez visitados os pontos de coleta da espécie. O crescimento de indivíduos e eventuais populações na beira dos paredões, nos paredões em si e em proeminências dos paredões (em alturas que variam a partir da borda) dificultam muito a coleta e estimativa do número de indivíduos existentes. Também existem populações crescendo em colunas de rocha destacadas do paredão, no entanto suas identidades não podem ser confirmadas devido à distância e a mata fechada que as circunda.

Fregonezi (2009) e observações feitas durante as recentes expedições a campo apontam a existência de prováveis híbridos entre *C. serrulata* e *C. sellowiana*. Indivíduos apresentando morfologia intermediária foram encontrados na borda dos paredões, sozinhos ou próximos dos prováveis parentais. Características morfológicas intermediárias entre as duas espécies, principalmente no formato das folhas, tamanho e cor da corola, tornam fácil reconhecer que existe certo nível de mistura genética. Embora seja uma observação interessante para futuros estudos, a ocorrência de hibridação natural em *C. serrulata* pode representar uma ameaça para esta espécie, assim como para *C. sendtneriana*. Eventuais e/ou subsequentes cruzamentos com *C. sellowiana* podem resultar na perda da identidade genética de *C. serrulata*, colocando em risco a sobrevivência da espécie.



**Figura 5.** *Calibrachoa serrulata*: a = flor e folhas, b = folhas e vista lateral da flor; c = hábitat no paredão rochoso.

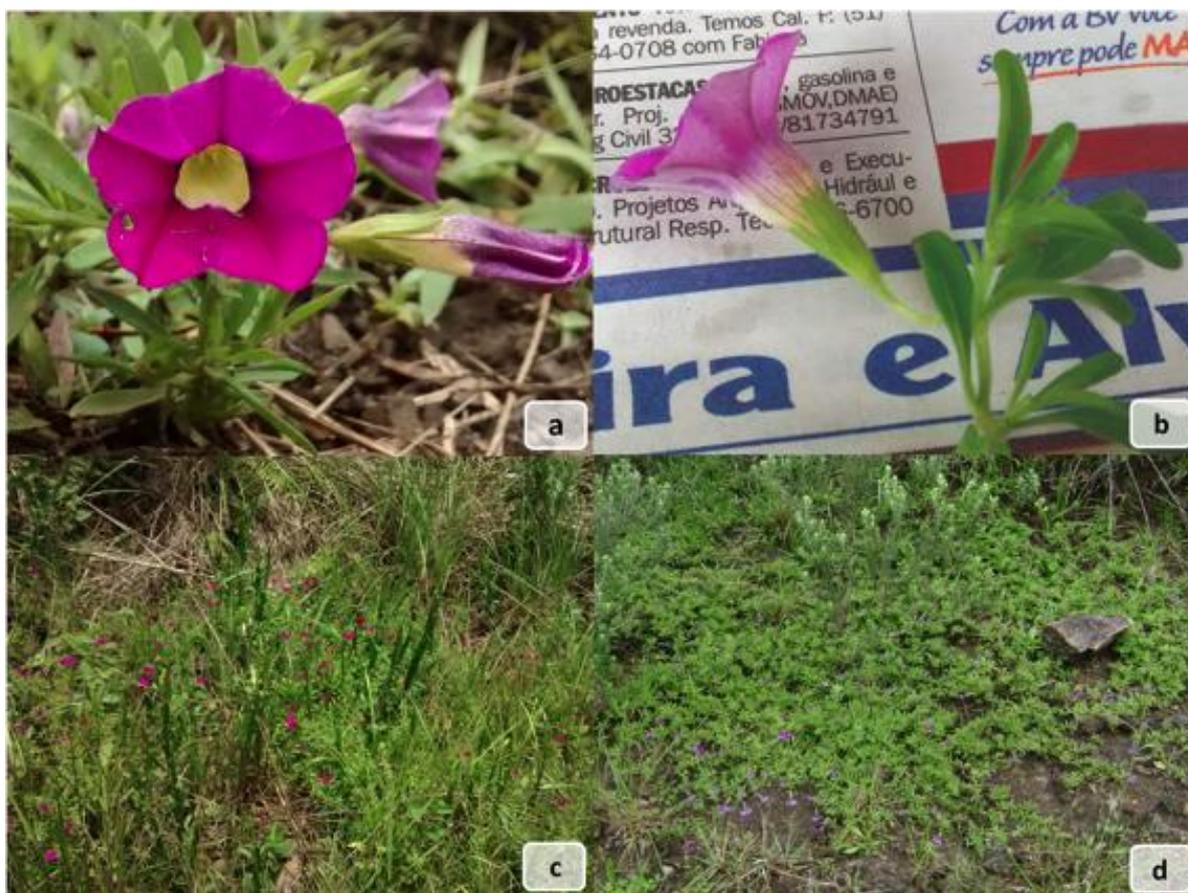
### ***Calibrachoa spathulata* (L.B.Sm. & Downs) Stehmann & Semir**

Ervas repentis e ramosas, com folhas sésseis, lâmina obovada, ápice obtuso ou arredondado; cálice 7,5 a 11 mm, verde ou ocre, pubérulo, fendido até a metade do comprimento; corola infundibuliforme, externamente pilosa, tubo amarelo interna e externamente, com 9-12 mm de comprimento, limbo magenta ou púrpureo de 13-20 mm de diâmetro; fruto do tipo cápsula, formato globoso ou elipsoide, 6-7 mm de comprimento por 3-4 mm de diâmetro (Stehmann, 1999). As características da flor sugerem polinização por abelhas, sendo a polinização cruzada supostamente o único método de reprodução sexuada possível, visto que a espécie é considerada autoincompatível (Tsukamoto *et al.*, 2002).

*Calibrachoa spathulata* (Figura 6) foi descrita em 1997 para a região dos municípios de Bituruna, Palmas e General Carneiro no estado do Paraná (PR), e Matos Costa, Água Doce e Laguna em Santa Catarina (Figuras 2 e 3). Com exceção para Laguna, a espécie ocorre em “ilhas” de campo de altitude dentro da Floresta Ombrófila Mista, em alturas que vão de 1000 a 1300 m, na Serra do Espigão Mestre e outras adjacentes (Stehmann, 1999); os indivíduos

crecem em ambientes desnudos como barrancos e beiras de estrada (Figura 6). A população encontrada no município de Laguna provavelmente se trata de introdução acidental, considerando a disjunção e diferença ambiental das áreas de ocorrência (Fregonezi, 2009), com os indivíduos crescendo em afloramentos rochosos próximos do mar.

A urbanização da região de ocorrência da espécie pode ser um dos motivos para sua classificação como “Vulnerável” {critério [B1ab(iii)]}, listada no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli & Moraes, 2013).



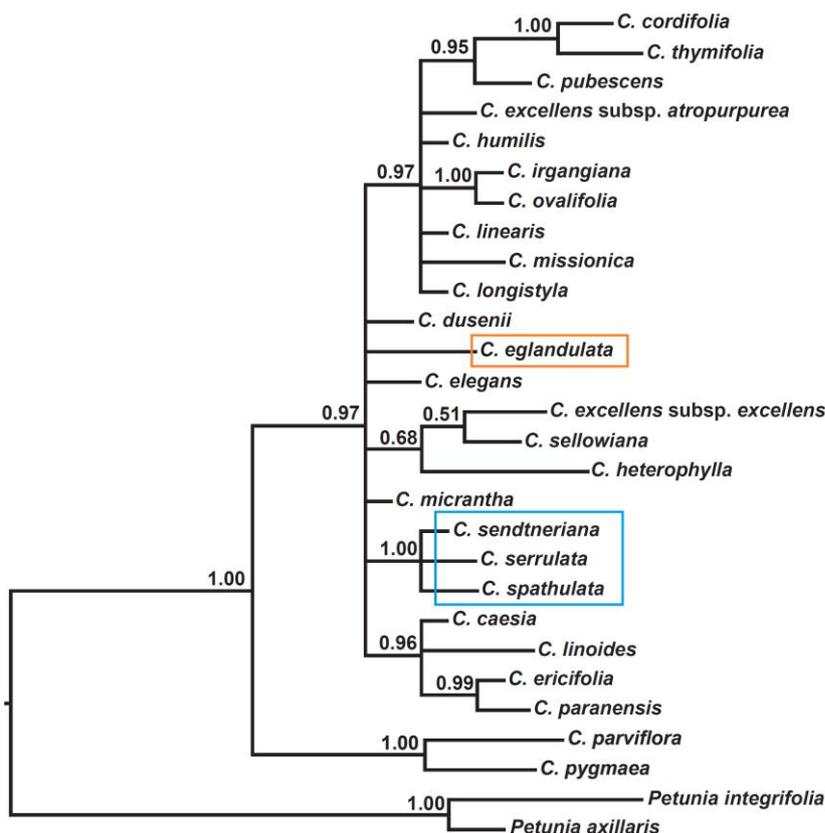
**Figura 6.** *Calibrachoa spathulata*: a = flor, b = folhas e vista lateral da flor; c = hábito em beira de estrada; d = hábito sobre afloramento rochoso em beira de estrada.

### **1.3 Estudos moleculares com *Petunia* e *Calibrachoa***

Estudos de diferentes áreas do conhecimento já foram realizados abrangendo os gêneros *Calibrachoa* e *Petunia*, como: a filogenia da família Solanaceae (Olmstead *et al.* 2013), no estudo da pigmentação de flores de solanáceas (Ng & Smith, 2015); e na identificação de possíveis mecanismos ambientais associados com padrões de diversificação em plantas (Barros *et al.*, 2015).

Diversos trabalhos utilizando dados moleculares já foram publicados com espécies de *Petunia* por nosso grupo de pesquisa, gerando grande quantidade de informações a respeito da história evolutiva e diversificação do gênero, por exemplo: Lorenz-Lemke *et al.* (2010), Reck-Kortmann *et al.* (2014), Ramos-Fregonezi *et al.* (2015), Turchetto *et al.* (2016), Longo *et al.* (2014), Reck-Kortmann *et al.* (2015). Estudos similares foram conduzidos para *Calibrachoa*, tais como: Fregonezi *et al.* (2012; 2013), Mäder *et al.* (2013).

Na mais recente filogenia molecular do gênero *Calibrachoa* (Fregonezi *et al.*, 2012), três marcadores plastidiais foram utilizados (*trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *trnL-trnF*) para 26 espécies (Figura 7), incluindo as quatro espécies-alvo deste estudo. *Calibrachoa sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* (retângulo azul na Figura 7) pertencem ao mesmo ramo com alta probabilidade posterior (1.00), embora *C. spathulata* apresente distribuição e síndrome floral distintas das outras duas espécies. *Calibrachoa eglandulata* é a única das espécies microendêmicas de altitude que ocorrem em SC (retângulo laranja na Figura 7), que não se mostrou agrupada com as demais.



**Figura 7.** Árvore filogenética de *Calibrachoa* obtida através de análise Bayesiana, utilizando espécies de *Petunia* como grupo externo. *Calibrachoa sendtneriana*, *Calibrachoa serrulata* e *Calibrachoa spathulata* formam uma politomia (retângulo azul) completamente suportada (PP = 1.00). *Calibrachoa eglandulata* (retângulo laranja) não apresenta posicionamento definido. Modificado de Fregonezi *et al.* (2012).

#### 1.4 O Planalto Sul Brasileiro

No Sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) encontramos o Planalto Sul Brasileiro, uma região fisiográfica com altitudes que variam de 500 a mais de 1200 m, cujos pontos mais altos são formados pela Serra Geral e pela Serra do Mar (Pillar *et al.*, 2009). A Serra Geral se originou a partir de derramamentos vulcânicos que ocorreram entre os períodos Jurássico e Cretáceo (135 a 120 milhões de anos atrás – Pillar *et al.*, 2009), e é composta por rochas basálticas que se sobrepõem aos arenitos da Formação Botucatu (Reis *et al.*, 2014).

O Planalto Sul Brasileiro apresenta quatro tipos de vegetação: Campos, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa e Floresta Estacional Semidecidual (Iriarte & Behling, 2007). A Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), cuja área de ocorrência inclui a Serra Geral, apresenta mosaicos de vegetação com áreas de campo, ocupando solos pobres, ácidos e mal drenados (Boldrini *et al.*, 2009) em zonas de altitude superiores a 800 m. A vegetação campestre desses mosaicos é conhecida como Campos de Cima da Serra (*Subtropical Highland Grasslands*) ou Campos de Altitude e a maioria das espécies apresenta porte herbáceo a arbustivo, como plantas das famílias Asteraceae, Poaceae e Fabaceae (Boldrini *et al.*, 2009) que pelo grande número de espécies encontradas são apontadas como as principais famílias. O levantamento feito por Boldrini *et al.* (2009) estimou 1161 espécies e Iganci *et al.* (2011) estimaram 296 endemismos para os campos de altitude. *Calibrachoa sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* integram a lista de espécies endêmicas para os campos de Santa Catarina. *Calibrachoa eglandulata* consta como endêmica em Boldrini *et al.* (2009).



**Figura 8.** Campos de Cima da Serra em Bom Jardim da Serra (SC).

A dinâmica das alterações climáticas na região foi responsável pela formação dos Campos de Cima da Serra sendo considerados formações relictuais datadas do final do Pleistoceno e início do Holoceno (Boldrini *et al.*, 2009). Behling (2002) e Overbeck *et al.* (2007) afirmaram que entre 42.000 e 10.000 anos atrás (aa) os campos dominavam a região, provavelmente associados a um clima frio e seco. Em torno de 4.000 aa, o clima teria se tornado mais úmido, possibilitando a expansão das florestas, e há 1.100 aa ocorreu um aumento na velocidade de expansão das mesmas sobre os campos. Visto que a região possui clima propício para a existência de florestas, os autores concluíram que provavelmente o fogo e/ou o pastejo seriam os responsáveis pela manutenção dos campos e impedimento da expansão das florestas (Overbeck *et al.*, 2007).

Atualmente os Campos de Cima da Serra encontram-se ameaçados pela introdução de espécies exóticas, pelo avanço das monoculturas e outras práticas agrícolas, como queimadas e florestamento com *Pinus taeda* (Boldrini *et al.*, 2009), atividades que podem comprometer principalmente as espécies endêmicas da região.

### **1.5 Outras espécies de Calibrachoa nos campos de altitude do Planalto Sul Brasileiro**

O gênero *Calibrachoa* apresenta outras espécies ocorrendo nos Campos de Cima da Serra, como *Calibrachoa linooides* (Sendtn.) Wijsman, que ocorre de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, destacando-se coletas em Bom Jardim da Serra (SC) e Bituruna (PR); *Calibrachoa excellens* (R.E.Fr.) Wijsman subsp. *excellens*, que ocorre do Paraná ao centro do Rio Grande do Sul, com destaque para uma coleta em Bom Retiro (SC); e *Calibrachoa sellowiana*, que ocorre do sul do Paraná ao nordeste do Rio Grande do Sul, com coletas para Bom Retiro, Bom Jardim da Serra e Urubici (SC) (Stehmann, 1999).

*Calibrachoa sellowiana* (Figura 9) habita afloramentos rochosos dos campos de altitude, afloramentos em meio à vegetação florestal e beiras de estrada. Encontrada em altitudes que variam de 650 a 1800 m, possui hábito decumbente, folhas lineares a oblanceoladas; corola magenta ou purpúrea de lobos obtusos, tubo interna e externamente amarelo com venação purpúrea, polinizada por abelhas (Stehmann, 1999). Esta espécie apresenta variações facilmente observadas em caracteres como o comprimento das folhas, tamanho e formato do limbo da corola, tamanho da flor como um todo, e a presença ou não de uma mancha roxa no centro do limbo (ápice) do tubo floral.

Os relatos e observações de prováveis híbridos de *C. sellowiana* com *C. sendtneriana* e com *C. serrulata* (e com pelo menos mais uma espécie do gênero), tornam necessária a apresentação desta espécie embora não seja alvo dos estudos conduzidos neste trabalho.



**Figura 9.** *Calibrachoa sellowiana*. a = detalhe das flores e folhas, b = hábito sobre afloramento rochoso.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva e da história evolutiva das espécies de *Calibrachoa* microendêmicas dos campos de altitude do Planalto Sul Brasileiro.

### **2.2 Objetivos específicos**

- A) Determinar a variabilidade genética das espécies-alvo.
- B) Avaliar a estrutura populacional das quatro espécies estudadas.
- C) Avaliar o fluxo gênico entre as populações das espécies-alvo.
- D) Identificar os eventos evolutivos responsáveis pelo padrão genético observado nas espécies estudadas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coletas e observações em campo

Amostras e exemplares-testemunho das espécies investigadas foram coletadas durante novembro e dezembro de 2015 nos municípios de Bom Jardim da Serra, Matos Costa e Urubici, localizados em Santa Catarina (SC) e no município de Bituruna, no Paraná (PR), como mostrado nas Figuras 2 e 3. Folhas jovens foram retiradas dos indivíduos e armazenadas em sílica gel para desidratação. Os exemplares-testemunho foram herborizados e depositados no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN-UFRGS). Coordenadas geográficas dos pontos de coleta foram obtidas utilizando GPS (Global Positioning System). Este trabalho foi conduzido sob a licença MP 2.186/16 do Governo Federal para o acesso de informação genética vegetal para desenvolver estudos evolutivos ou taxonômicos. Não foram exigidas licenças de coleta específicas porque nenhum dos taxa analisados foi coletado dentro de áreas protegidas ou parques de preservação.

A Tabela 2 traz informações a respeito das espécies-alvo. O número de pontos de coleta foi abreviado, devido a grande quantidade de pontos muito próximos, apresentando para cada espécie, coordenadas geográficas representativas de cada conjunto de pontos dentro da distribuição; juntamente com as coordenadas do ponto estão o município e o estado de ocorrência. Somadas às amostras coletadas em 2015, coletas realizadas em anos anteriores (2005-2007 e 2009) por membros do Laboratório de Evolução Molecular (LEM) também foram incluídas para as análises moleculares deste trabalho e são apresentadas na Tabela 2. As duas últimas colunas da Tabela 2 contém o número de indivíduos analisados para cada tipo de marcador molecular utilizado neste trabalho.

**Tabela 2** Informações sobre as espécies-alvo

| Espécie                | Identidade da população | Coordenadas geográficas                                  | Ano de coleta | Código da exsiccata | Nº de indivíduos sequenciados ( <i>trnH-psbA</i> : <i>trnS-trnG</i> ) | Nº de indivíduos genotipados |
|------------------------|-------------------------|--|---------------|---------------------|---|------------------------------|
| <b>C. eglandulata</b>  | SC-370                  | 28 02' 34,7"S<br>49 24' 30,5"W<br>Urubici/SC             | 2007<br>2015  | BHCB104869          | 9:27  | 54                           |
|                        | Pousada                 | 28 01' 32"S<br>49 22' 21"W<br>Urubici/SC                 | 2006<br>2015  | BHCB104877          |   |                              |
| <b>C. sendtneriana</b> | BNDT                    | 28 21' 13,8"S<br>49 34' 25,1"W<br>Bom Jardim da Serra/SC | 2007          | BHCB116972          | 44:46   | 54                           |
|                        | EcoEólico               | 28 24' 30,8"S<br>49 33' 27,4"W<br>Bom Jardim da Serra/SC | 2015          | ICN184926           |   |                              |
| <b>C. serrulata</b>    | BNDT                    | 28 21' 46,5"S  | 2007          | ICN184945           | 17:26   | 30                           |
|                        |                         | 49 33' 05,2"W  | 2015          |                     |   |                              |

|                          |             |                                |              |            |     |    |
|--------------------------|-------------|--------------------------------|--------------|------------|-----|----|
|                          |             | Bom Jardim da Serra/SC         |              |            |     |    |
|                          | Mirante     | 28 23' 16"S<br>49 32' 38,3"W   | 2005<br>2015 | ICN184944  |     |    |
|                          |             | Bom Jardim da Serra/SC         |              |            |     |    |
| <b>C.<br/>spathulata</b> | Matos Costa | 28 25' 52,6"S<br>51 14' 10,6"W | 2005<br>2015 | ICN160333  | 9:5 | 52 |
|                          |             | Matos Costa/SC                 |              |            |     |    |
|                          | PR170       | 26 17' 11,7"S<br>51 29' 23,9"W | 2005<br>2015 | ICN184918  |     |    |
|                          |             | PR-170                         |              |            |     |    |
|                          | New         | 26 10' 18,9"S<br>51 26' 56,7"W | 2015         | ICN184920  |     |    |
|                          |             | PR-446                         |              |            |     |    |
|                          | Laguna      | 28 28' 24,1"S<br>48 46' 03,5"W | 2009         | BHCB151099 |     |    |
|                          |             | Laguna/SC                      |              |            |     |    |

Indivíduos que apresentaram morfologia intermediária entre *C. sellowiana* e *C. sendtneriana* (Figura 10) ou *C. serrulata* (Figura 11) foram identificados como prováveis híbridos e integraram as análises como pertencentes às respectivas espécies microendêmicas parentais. Ao longo das expedições realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, foram encontrados cinco indivíduos considerados híbridos entre *C. sellowiana* e *C. serrulata* e três entre *C. sellowiana* e *C. sendtneriana*.

Eventuais registros de possíveis polinizadores foram feitos durante as expedições de campo, mas sem seguir uma metodologia específica. Tais registros bem como a confirmação de informações taxonômicas (cor da flor das espécies e seus hábitat) são acrescentados à este trabalho visando agregar mais informações a respeito destas espécies.



**Figura 10.** *Calibrachoa sendtneriana* (coluna da esquerda, de a1 a a3), provável híbrido (coluna do meio, de b1 a b3) e *Calibrachoa sellowiana* (coluna da direita, de c1 a c3).



**Figura 11.** *Calibrachoa serrulata* (coluna da esquerda, de a1 a a3), provável híbrido (coluna do meio, de b1 a b3) e *Calibrachoa sellowiana* (coluna da direita, de c1 a c3).

### 3.2 Pulverização das amostras, extração e quantificação do DNA

As amostras coletadas foram pulverizadas utilizando nitrogênio líquido e o material resultante armazenado a -20° C. As amostras coletadas em 2015 quando somadas às coletas realizadas em anos anteriores totalizaram 73 indivíduos de *C. eglandulata*, 120 de *C. sendtneriana*, 30 de *C. serrulata* e 151 de *C. spathulata*. Tanto para amostras coletadas em 2015, quanto para as obtidas em excursões anteriores, foi realizada extração de DNA seguindo o protocolo sugerido por Fregonezi *et al.* (2012), modificado de Roy *et al.* (1992) e adaptado para espécies de *Calibrachoa*.

Amostras de DNA resultantes da extração foram coradas com 0.001 % de GelRed (Biotium, Fremont, CA, EUA), aplicadas em gel de agarose 1% e visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (UV) para verificar a qualidade do DNA extraído. Posteriormente, verificou-se a pureza e a concentração do DNA extraído (ng/μl) utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop 1000 spectrometer, Thermo Scientific Corp., San Jose, CA, EUA).

### **3.3. Marcadores plastidiais (Amplificação, Sequenciamento e Análises)**

Os espaçadores intergênicos plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG* foram amplificados em termociclador automático Veriti Applied Biosystems (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA), respectivamente, para 79 e 104 indivíduos no total (na Tabela 2 estão indicados os valores por espécie para cada espaçador). O tamanho esperado dos fragmentos amplificados para cada espaçador, condições e componentes necessários para a PCR estão descritos na Tabela 3. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank e podem ser acessadas através dos seguintes códigos: KY630252-KY630333 (*trnH-psbA*) e KY630334-KY630440 (*trnS-trnG*).

**Tabela 3** Componentes e condições necessários para a reação de amplificação por PCR dos marcadores plastidiais.

| <b>Marcador</b>  | <b>Comp. (pb)*</b>               | <b>Referência dos primers</b> | <b>Reação de PCR</b>   | <b>Condições de PCR</b>   |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------|--|---|
| <i>trnH-psbA</i> | 456 (Mäder <i>et al.</i> , 2013) | Sang <i>et al.</i> , 1997     | Tampão - 1x<br>dNTP – 0,2μM<br>Primer F – 0,16μM<br>Primer R - 0,16μM<br>MgCl <sub>2</sub> - 2mM | 94° C por 5 min<br><br>35 ciclos de:<br>94° C por 1 min<br>55° C por 1 min<br>72° C por 1,5 min |
| <i>trnS-trnG</i> | 784 (Mäder <i>et al.</i> , 2013) | Hamilton, 1999                | Taq - 1U<br>DNA – 5ng  | 72° C por 10 min  |

\*Comp. = comprimento em pares de bases (pb).

O resultado da reação de amplificação foi verificado através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Gel Red (0,001 %) e visualizado em transiluminador de UV. Os produtos obtidos foram purificados segundo o protocolo de Dunn & Blattner (1987) usando PEG 20% (polietileno glicol) e posteriormente enviados para sequenciamento na empresa *Macrogen Inc.* (Seul, Coreia do Sul).

As sequências foram visualizadas no software Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty Ltd, disponível em <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) para verificar a qualidade do sequenciamento e corrigir eventuais nucleotídeos atribuídos erroneamente. Todas as sequências, depois de revisadas, foram exportadas para o software MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), onde foram alinhadas manualmente para cada espaçador. Eventos de inserção e deleção maiores que um par de bases foram codificados de forma a serem tratados como um único evento de mutação. Além das sequências das quatro espécies-alvo, foram incluídas nos alinhamentos sequências obtidas no GenBank para as seguintes espécies utilizadas como grupo externo em algumas análises: *C. sellowiana* (KY630261- KY630263, KY694969, KY694970; KY630361- KY630363, KY694967, KY694968), *Calibrachoa pygmaea* (R. E. Fr.) Wijsman (JN565840; JX178656), *Calibrachoa ovalifolia* (Miers) Stehmann & Semir (JN565837; JX178652) e *Petunia integrifolia* (Hook) Schinz & Thell (KF280760; KF280816). Dos cinco indivíduos de *C. sellowiana* inseridos nos alinhamentos, dois foram coletados em Bom Jardim da Serra (SC) (pontos de coleta muito próximos aos de *C. serrulata* e *C. sendtneriana*), dois em Santa Cecília (SC) e um em Tainhas (RS).

Com exceção do programa Network 5.0.0.1 (Fluxus Technology Ltc, disponível em <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>), as análises a seguir foram conduzidas somente para o alinhamento com ambos os espaçadores concatenados. O software DnaSP 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) foi utilizado para converter os alinhamentos para os formatos necessários para os programas indicados a seguir. O programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) foi utilizado para calcular os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica e a Análise da Variância Molecular (AMOVA, em inglês – Excoffier *et al.*, 1992). O Network foi utilizado para estimar o relacionamento evolutivo entre os haplótipos através do método de *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999), analisando tanto o alinhamento concatenado quanto os alinhamentos de cada espaçador individualmente.

Uma árvore filogenética do relacionamento entre os haplótipos foi inferida através do programa Beast 1.6.1 (Drummond *et al.*, 2012), utilizando o método de Inferência Bayesiana e os seguintes parâmetros: modelo de substituição HKY, atribuído como melhor modelo pelo jModelTest 2.1 (Darriba *et al.*, 2012); relógio molecular estrito; o processo de Yule como

*prior* para a árvore de espécies; taxa de substituição de  $2,8 \times 10^{-9}$  ( $\pm 5,4 \times 10^{-11}$ ) substituições por sítio por ano (Lorenz-Lemke *et al.* 2010);  $10^7$  gerações, amostrando uma árvore a cada  $10^3$  gerações. A convergência das Cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC, em inglês) e o tamanho amostral efetivo adequado (EES > 200) foram verificados usando o Tracer 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014). Todas as árvores geradas pelo Beast foram sumarizadas em uma única árvore com máxima credibilidade utilizando o TreeAnnotator 1.6.1, que faz parte do pacote Beast. O programa FigTree 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) foi utilizado para visualização e edição da árvore obtida.

Índices de diversidade para outras espécies de *Calibrachoa* e *Petunia* foram retirados da literatura e serão apresentados na Discussão para comparação com os resultados obtidos neste estudo.

### **3.4 Marcadores nucleares (Amplificação, Genotipagem e Análises)**

Foram testados inicialmente 25 *loci* de microssatélites isolados por nosso grupo de trabalho a partir de bibliotecas genômicas, 16 de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Silva-Arias *et al.*, 2015) e nove de *C. pygmaea* (dados não publicados). Dos 16 *loci* de *C. heterophylla* (abreviados a partir de agora como “Che”), quatro não lograram sucesso na amplificação, os demais foram amplificados com relativo sucesso para as quatro espécies e enviados para a MacroGen Inc para análise do tamanho dos fragmentos e a variabilidade dentro de cada *locus*. Sete dos 12 *loci* restantes apresentaram baixa qualidade na genotipagem ou muitas falhas de amplificação quando o número de amostras foi expandido e consequentemente não puderam ser utilizados neste trabalho. Dos nove *loci* de *C. pygmaea* (abreviados a partir de agora como “Cpy”) testados nas espécies-alvo, três não tiveram sucesso na amplificação e para os seis *loci* restantes com relativo sucesso nos testes iniciais apenas um apresentou sucesso e qualidade na amplificação quando o número de amostras foi expandido.

Desta forma, cinco *loci* Che e um *locus* Cpy foram utilizados neste estudo e são apresentados na Tabela 4, conforme descritos para *C. heterophylla* e *C. pygmaea*.

**Tabela 4** Informações sobre os *loci* de microssatélites de *C. heterophylla* (Silva-Arias *et al.*, 2015) e *C. pygmaea* (dados não publicados) utilizados neste trabalho.

| <i>Loci</i> | Motivo              | Comp. (pb) | Adesão GenBank |
|-------------|---------------------|------------|----------------|
| Che 18      | (CTT) <sub>21</sub> | 149-179    | KP091702       |
| Che 46      | (GA) <sub>28</sub>  | 223-249    | KP091703       |
| Che 59      | (CT) <sub>7</sub>   | 110-120    | KP091704       |
| Che 34      | (TC) <sub>10</sub>  | 216-226    | KP091707       |
| Che 48      | (GAA) <sub>6</sub>  | 139        | KP091715       |
| Cpy 58      | (AG) <sub>10</sub>  | 154-194    | ND             |

Comp. = comprimento em pares de bases. ND= Não disponível

Depois de definidos os *loci* a serem utilizados nesse trabalho, os mesmos foram amplificados para 54 indivíduos de *C. eglandulata*, 54 indivíduos de *C. sendtneriana*, 52 indivíduos de *C. spathulata*, e 30 indivíduos de *C. serrulata*, conforme apresentado anteriormente na Tabela 2. As reações de PCR, com volume total de 10µl, seguiram o protocolo de Silva-Arias *et al.* (2015) modificado conforme Tabela 5, sendo realizadas em termociclador automático (*Applied Biosystem*). Após a amplificação, os produtos resultantes, corados com GelRed, foram checados com eletroforese em gel de agarose 2,5% e visualizados em transiluminador de UV; posteriormente os produtos foram purificados com Isopropanol (60,1 g/mol) e Etanol 70%, e eluídos em água ultra pura. Assim como os indivíduos utilizados nos testes de transferibilidade dos iniciadores, a análise automatizada do tamanho dos fragmentos foi realizada pela empresa MacroGen Inc.

**Tabela 5.** Condições de PCR e reagentes utilizados para os *loci* de Che e Cpy selecionados.

| Reagentes                | Condições de PCR | <i>Loci</i> | Temperatura de anelamento (Ta) |
|--------------------------|------------------|-------------|--------------------------------|
| Água Ultra Pura          |                  |             |                                |
| 10x PCR Rxn Buffer       | 94°C por 3 min   | Che 18      | 54°C                           |
| dNTP – 2mM               | 35 ciclos de:    | Che 46      | 54°C                           |
| Primer Forward - 2mM     | 94°C por 20s     | Che 59      | 54°C                           |
| Primer Reverse – 2mM     | Ta por 45s       | Che 34      | 50°C                           |
| MgCl <sub>2</sub> – 50mM | 72° por 1 min    | Che 48      | 54°C                           |
| Fluorescência – 2mM      | 72°C por 10 min  | Cpy 58      | 55°C                           |
| Taq Polimerase 5U        |                  |             |                                |
| DNA – 10 ng/µl           |                  |             |                                |

O software GeneMarker 2.2.0 (SoftGenetics LCC., State College, PA, USA; disponível em <http://www.softgenetics.com/GeneMarker.php>) foi utilizado para visualizar a qualidade da genotipagem, tamanho dos alelos e o genótipo de cada indivíduo. Planilhas com

os alelos encontrados para cada *locus* foram criadas por espécie e por populações, e também foi feita uma planilha contendo as quatro espécies. O software Convert 1.31 (Glaubitz, 2004) foi usado para gerar, a partir de cada planilha, os arquivos de entrada para outros quatro softwares: Arlequin, F-Stat 2.9.3.2 (Goudet, 1995), Cervus 3.07 (Marshall *et al.* 1998; Kalinowski *et al.* 2007) e STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). O Arlequin foi utilizado para calcular a AMOVA e as heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), estas últimas testadas para verificar se populações e espécies estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O F-Stat foi utilizado para calcular o número de alelos por *locus*, a riqueza alélica, a diversidade genética e o coeficiente de endocruzamento ( $F_{is}$ ), este último índice testado para verificar se os valores desviam ou não do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O Cervus foi utilizado para calcular a frequência de alelos nulos e o conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) para cada *locus*.

O programa STRUCTURE foi utilizado para verificar a existência de distintos *clusters* genéticos na amostragem a partir dos seguintes parâmetros: período de *burnin* de  $10^5$  MCMC,  $10^6$  repetições de MCMC, 10 iterações para cada cluster (K), com o número máximo de K testados diferindo para cada conjunto de dados. Os intervalos de K foram: K = 1-6 para *C. eglandulata*, K = 1-5 para *C. sendtneriana* e *C. serrulata*, K = 1-8 para *C. spathulata* e K = 1-15 para as quatro espécies reunidas. O melhor número de *clusters* foi definido através do  $\Delta K$  (Evanno *et al.*, 2005) e da Probabilidade por K (ProbK; Pritchard *et al.*, 2000), através do programa CLUMPAK ONLINE (<http://clumpak.tau.ac.il/contact.html>). A ProbK é estimada calculando primeiramente a probabilidade logarítmica dos dados a cada passo das Cadeias de Markov-Monte Carlo; a seguir, a média dessas probabilidades é calculada e dela é subtraída metade de sua variância, e isso resulta no  $\ln P(D)$  ou  $\Pr(X|K)$ ; o melhor K é identificado como o maior valor de  $\ln P(D)$  (Evanno *et al.*, 2005). O  $\Delta K$  por sua vez é a média dos valores absolutos de  $L''(K)$  [função de segunda ordem da taxa de alteração das probabilidades por K – “second order rate of change of the likelihood function with respect to K (Evanno *et al.*, 2005)]. O  $\Delta K$  realiza uma comparação entre as probabilidades para os Ks e sendo assim, não é possível para o programa comparar a probabilidade de K = 1 com a probabilidade do K anterior, visto que não existe K = 0. A opção “Main Pipeline” do CLUMPAK ONLINE foi utilizada para sumarizar as 10 iterações do melhor K obtido para as espécies individualmente e para as quatro espécies reunidas, gerando um único *barplot* para cada análise.

O programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) foi utilizado para realizar Análises de Coordenadas Principais (PCoA, em inglês) a partir de uma matriz de distância (proporção de alelos compartilhados) gerada no programa MSA 4.05 (Dieringer & Schlötterer, 2003) obtida da planilha de alelos dos microsatélites. A PCoA é um método

alternativo para averiguar a estruturação e agrupamento de indivíduos, populações e/ou espécies. A análise foi realizada tanto para as quatro espécies em conjunto quanto para cada espécie individualmente a fim de melhor observar todos os possíveis níveis de estruturação genética em complemento às análises de agrupamento Bayesiano.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Observações em campo

Alguns detalhes e eventos presenciados durante as expedições de campo merecem ser relatados visando ajudar outros pesquisadores em futuros estudos. O primeiro ponto diz respeito à coloração das flores de *Calibrachoa serrulata* e *C. sendtneriana*, ambas descritas como de limbo vermelho (Stehmann, 1999). *Calibrachoa sendtneriana* realmente possui limbo vermelho, mas seria mais apropriado dizer que a coloração é vermelho alaranjado (Figura 4 a e b; Figura 10, a1 a a3). *Calibrachoa serrulata* por sua vez não possui limbo vermelho, como pode ser visto na Figura 11 (a1 a a3) e na Figura 5 (a e b), mas sim de cor rosa.

O segundo ponto diz respeito ao hábitat das espécies. *Calibrachoa serrulata* foi encontrada, na maioria das vezes, durante nossas expedições, crescendo no paredão rochoso, sendo visível somente quando o pesquisador fica próximo da borda dos cânions e olha para baixo; em poucos pontos observamos a espécie crescendo na borda ou sobre as rochas no topo das escarpas. *Calibrachoa sendtneriana* foi encontrada nos campos e próxima de matas nebulares, exatamente como está descrito para a espécie, porém, nos campos encontramos a espécie em afloramentos rochosos, onde ela cresce em espaços entre as rochas. Expedições anteriores confirmam esse hábitat nas rochas, e são apenas nesses locais onde prováveis híbridos foram registrados durante as coletas de 2015.

O último ponto diz respeito a visitantes florais e possíveis polinizadores. Não era objetivo deste trabalho buscar e/ou observar polinizadores das espécies-alvo. Temos apenas algumas observações a relatar:

- 1) Uma abelha foi vista pousada em *C. eglandulata* (Figura 12);
- 2) Beija-flores foram avistados voando próximos de um ponto de *C. serrulata*, mas não pousados ou rondando as flores;
- 3) Uma abelha foi registrada em *C. sellowiana* visitando várias flores (Figura 13), e este indivíduo se encontrava próximo de *C. sendtneriana* e de um provável híbrido;
- 4) Uma abelha com pólen nas patas e uma borboleta foram registradas em flores de *C. spathulata* (Figura 14);



**Figura 12.** Abelha em *Calibrachoa eglandulata*.



**Figura 13.** Abelha em *Calibrachoa sellowiana*.



**Figura 14.** Observações de possíveis polinizadores/visitantes florais em *Calibrachoa spathulata*. a1 = abelha, b1 e b2 = borboleta (mesmo indivíduo, apenas ângulos distintos).

#### **4.2 Marcadores plastidiais**

Os alinhamentos de *trnH-psbA* e *trnS-trnG* apresentaram 434 e 748 pares de base para 79 e 104 indivíduos, respectivamente. O alinhamento concatenado de *trnH-psbA/trnS-trnG*

continha 1182 pares de base com 71 indivíduos. Os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica para o alinhamento concatenado estão expostos na Tabela 6. A Tabela 7 apresenta os percentuais de variação existente entre e dentro das espécies obtidos através da AMOVA do alinhamento concatenado.

**Tabela 6** Índices de diversidade, haplótipos encontrados por espécie e número de adesão no GenBank.

| Espécie                | Haplótipos marcadores concatenados (FA)  | Haplótipos <i>trnH-psbA</i> (FA)  | Haplótipos <i>trnS-trnG</i> (FA) | $\pi$ % (DP)    | $h$ (DP)        |
|------------------------|--|---|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>C. eglandulata</i>  | H1(5), H2(1)   | Ha1 (9)   | Hg1(25), Hg2(1), Hg3 (1)         | 0,0283 (0,0372) | 0,3333 (0,2152) |
| <i>C. sendtneriana</i> | H3(5), H4(1), H5(2), H6(14), H7(1), H8(1), H9(8), H10(1), H11(2), H12(1), H13(1) | Ha2(7), Ha3(1), Ha4(3), Ha5(16), Ha6(1), Ha7(1), Ha8(10), Ha9(4), Ha10(1) | Hg1(42), Hg4(2), Hg5 (2)         | 0,2295 (0,1387) | 0,8033 (0,0480) |
| <i>C. serrulata</i>    | H3(6), H5(5), H9(2), H14(2)  | Ha2(7), Ha4(7), Ha8(2), Ha11(1)   | Hg1(8), Hg4(15), Hg6 (3)         | 0,4524 (0,2581) | 0,7750 (0,0678) |
| <i>C. spathulata</i>   | H15(1), H16(1), H17(1), H18(1), H19(1)   | Ha12(6), Ha13(1), Ha14(1), Ha15(1)  | Hg1(2), Hg7(2), Hg8 (1)          | 0,2373 (0,1752) | 1,0000 (0,1265) |

FA= (frequência absoluta);  $\pi$  = Diversidade nucleotídica % (Desvio padrão);  $h$ = Diversidade haplotípica (Desvio padrão)

*Calibrachoa eglandulata* apresentou os menores valores de  $\pi$  (0,0283) e de  $h$  (0,3333), enquanto o maior valor para  $\pi$  foi de *C. serrulata* (0,4524) e para  $h$  (1,0000) foi de *C. spathulata*.

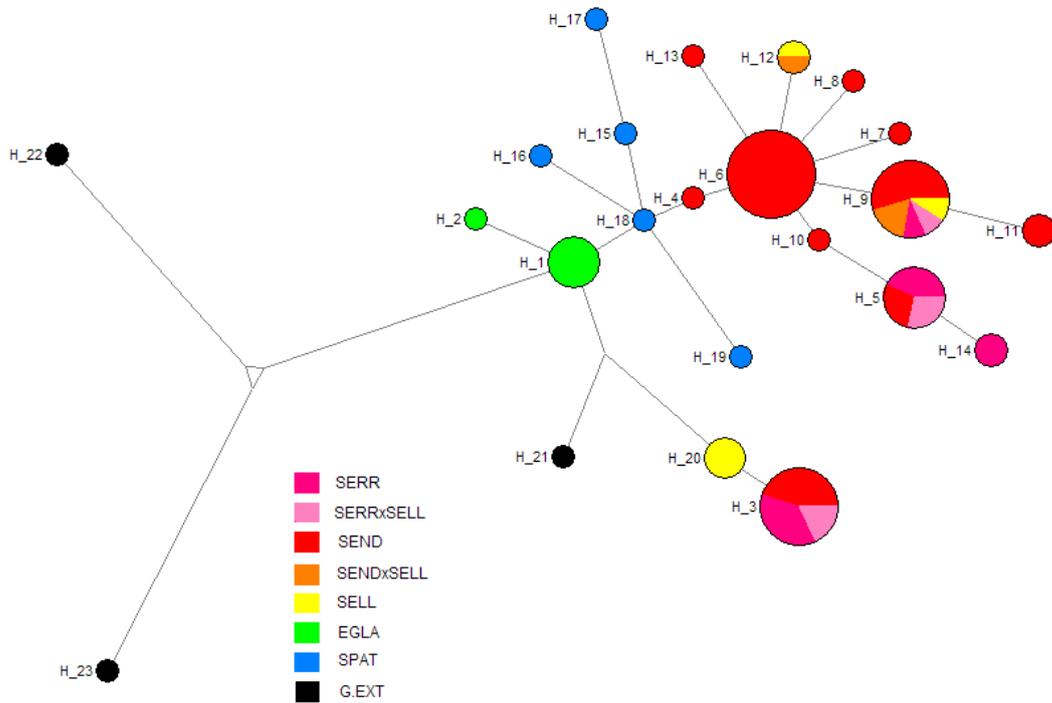
**Tabela 7** Percentual de variação encontrado em diferentes níveis, para os marcadores plastidiais e nucleares

| Fonte de variação                    | cpDNA  | SSR    |
|--------------------------------------|--------|--------|
| Entre espécies                       | 29,21% | 22,20% |
| Dentro das espécies                  | 70,79% | 77,80% |
| Entre populações dentro das espécies |        |        |
| <i>C. eglandulata</i>                |        | 18,02% |
| <i>C. sendtneriana</i>               |        | 1,61%  |
| <i>C. serrulata</i>                  |        | 9,29%  |
| <i>C. spathulata</i>                 |        | 25,83% |

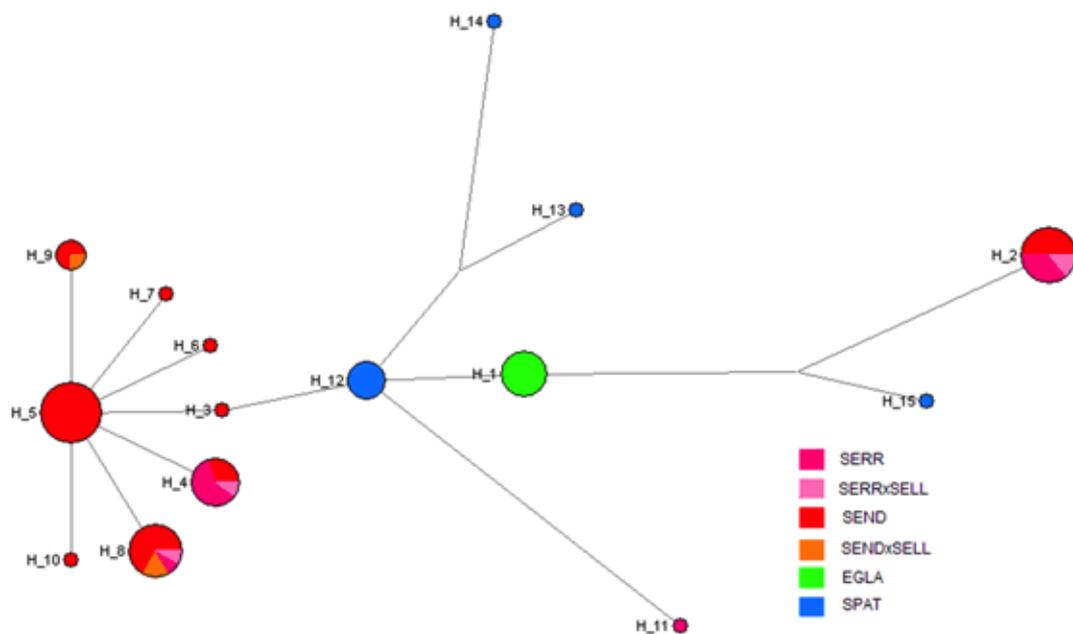
O maior percentual de variação para os marcadores plastidiais concatenados está dentro das espécies (70,79%; Fst: 0,292).

As redes de haplótipos geradas para os espaçadores plastidiais separados e concatenados são mostradas nas Figuras 15, 16 e 17. Os haplótipos encontrados em cada espécie e a quantidade de indivíduos (Frequência Absoluta) para cada haplótipo são apresentados na Tabela 6. As espécies, prováveis híbridos e o grupo externo foram assim abreviados: G. EXT = Grupo externo; SPAT = *C. spathulata*; EGLA = *C. eglandulata*; SELL

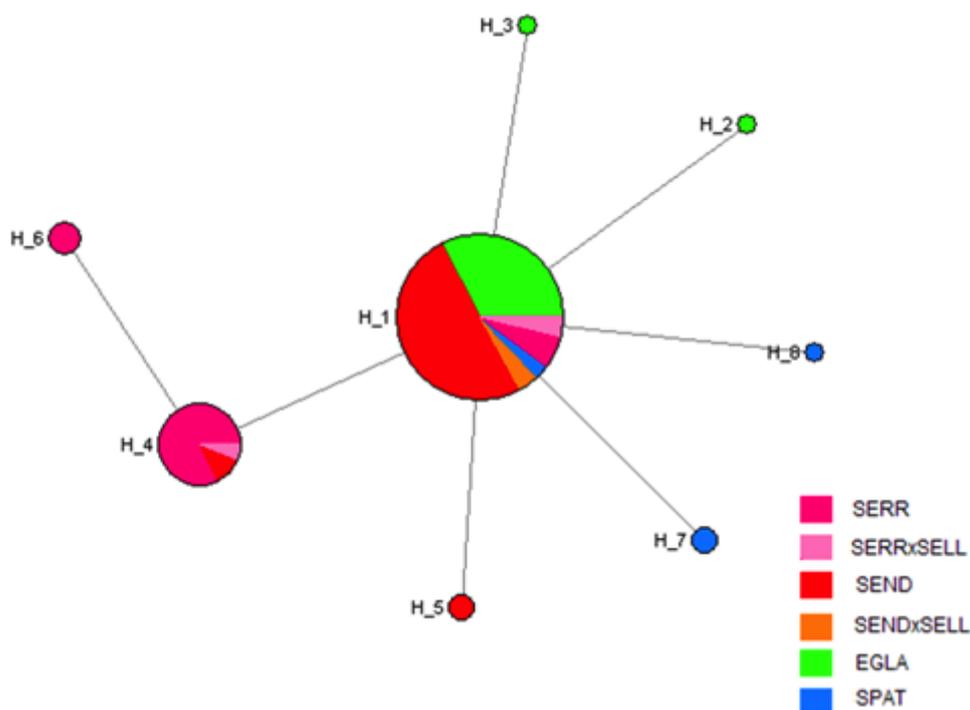
= *C. sellowiana*; SENDxSELL = prováveis híbridos entre *C. sendtneriana* e *C. sellowiana*; SEND = *C. sendtneriana*; SERRxSELL = prováveis híbridos entre *C. serrulata* e *C. sellowiana*; SERR = *C. serrulata*. As redes para os marcadores isolados não possuem o grupo externo nem os indivíduos de *C. sellowiana*.



**Figura 15.** Relacionamento evolutivo (método de *median-joining*) entre os haplótipos resultantes do alinhamento concatenado. Haplótipos e espécies estão relacionados na legenda, abreviada da seguinte forma: G. EXT = Grupo externo; SPAT = *C. spathulata*; EGLA = *C. eglandulata*; SELL = *C. sellowiana*; SENDxSELL = prováveis híbridos entre *C. sendtneriana* e *C. sellowiana*; SEND = *C. sendtneriana*; SERRxSELL = prováveis híbridos entre *C. serrulata* e *C. sellowiana*; SERR = *C. serrulata*.



**Figura 16.** Relacionamento evolutivo (método de *median-joining*) entre os haplótipos encontrados para o espaçador *trnH-psbA*. Haplótipos e espécies estão relacionados na legenda, abreviada da seguinte forma: SPAT = *C. spathulata*; EGLA = *C. eglandulata*; SENDxSELL = prováveis híbridos entre *C. sendtneriana* e *C. sellowiana*; SEND = *C. sendtneriana*; SERRxSELL = prováveis híbridos entre *C. serrulata* e *C. sellowiana*; SERR = *C. serrulata*.

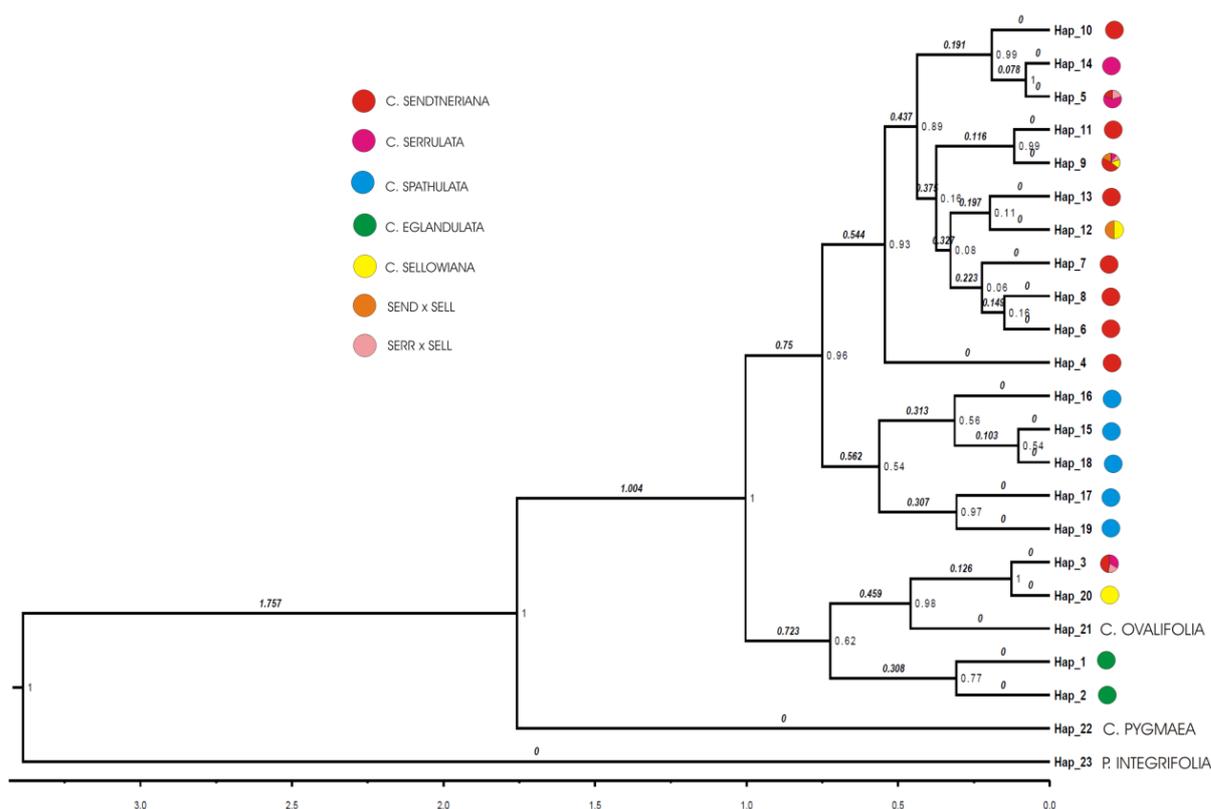


**Figura 17.** Relacionamento evolutivo (método de *median-joining*) entre os haplótipos encontrados para o espaçador *trnS-trnG*. Haplótipos e espécies estão relacionados na legenda, abreviada da seguinte forma: SPAT = *C. spathulata*; EGLA = *C. eglandulata*; SENDxSELL = prováveis híbridos entre *C. sendtneriana* e *C. sellowiana*; SEND = *C. sendtneriana*; SERRxSELL = prováveis híbridos entre *C. serrulata* e *C. sellowiana*; SERR = *C. serrulata*.

*Calibrachoa eglandulata* e *C. spathulata* apresentaram haplótipos exclusivos em duas das três redes de haplótipos mostradas, a exceção foi a rede de haplótipos para o espaçador *trnS-trnG* que apresentou um haplótipo (H1) de alta frequência absoluta (77) incluindo indivíduos de todas as espécies e os prováveis híbridos. *Calibrachoa serrulata* apresentou um único haplótipo exclusivo em cada rede, o restante de seus indivíduos apresentaram haplótipos compartilhados, na maioria das vezes com *C. sendtneriana*. Por fim, *C. sendtneriana* apresentou haplótipos compartilhados e exclusivos em todas as redes de haplótipos, contando com o maior número de haplótipos exclusivos quando os espaçadores são concatenados ou quando analisamos apenas *trnH-psbA*.

A árvore filogenética para os haplótipos do alinhamento concatenado é apresentada na Figura 18. *C. ovalifolia*, *C. pygmaea* e *Petunia integrifolia* representam grupos externos, embora *C. ovalifolia* apareça formando um grupo dentro da filogenia junto com haplótipos de *C. sellowiana* e *C. serrulata*. A idade dos ramos (em milhões de anos) encontra-se em negrito

sobre os mesmos à esquerda dos nós, com a escala do tempo mostrada abaixo da filogenia. O suporte dos nós é dado pelos valores de probabilidade posterior (à direita dos nós).



**Figura 18.** Árvore filogenética para o alinhamento concatenado dos marcadores plastidiais gerada através de análise bayesiana. Haplótipos e espécies estão relacionados na legenda. O grupo externo é composto pelos haplótipos 21, 22 e 23. A datação dos nós (valores em negrito) encontra-se em milhões de anos. Suporte dos nós dado pela probabilidade posterior (à direita dos nós).

Em concordância com o que se observa nas Figuras 15 e 16, *C. eglandulata* e *C. spathulata* possuem haplótipos exclusivos e formam clados contendo apenas indivíduos das respectivas espécies na filogenia. As demais espécies-alvo não apresentaram clados específicos com suporte considerável. Os haplótipos H3 (SEND, SERR e SERRxSELL) e H20 (SELL) mostraram-se relacionados com alto suporte (pp=1). Esses haplótipos mostraram-se distantes dos demais de SEND e SERR, estando eles mais relacionados com *C. ovalifolia* e *C. eglandulata*.

De acordo com a árvore, a diversificação de *Calibrachoa* ocorreu por volta de 1,8 milhões de anos, no início do Pleistoceno. Já a divergência das espécies-alvo ocorreu há cerca de 1 milhão de anos. Os haplótipos de *C. eglandulata* e *C. spathulata* se encontram em ramos exclusivos da árvore, com o início da diversificação dos haplótipos datada para 308 e 562 mil de anos atrás, respectivamente. A diversificação do clado que conta com a maior parte dos haplótipos de *C. serrulata* e *C. sendtneriana* ocorreu há cerca de 540 mil anos.

### 4.3 Marcadores nucleares

O tamanho dos fragmentos amplificados dos microssatélites são apresentados na Tabela 7. O *locus* Che 48 foi excluído das análises por ser monomórfico. Também são apresentados na Tabela 8 o número de alelos e a riqueza alélica, o conteúdo médio de informação polimórfica (PIC, em inglês) e o percentual de alelos nulos. O *locus* Che 46 apresentou o maior número de alelos, a maior riqueza alélica e o maior PIC.

**Tabela 8.** Caracterização da variabilidade por *loci*

| <i>Locus</i> | Comp. (pb) | Número de alelos | Riqueza alélica | PIC   | Alelos nulos (%) |
|--------------|------------|------------------|-----------------|-------|------------------|
| <b>Che18</b> | 115-199    | 24               | 14,53           | 0,890 | 0,608            |
| <b>Che34</b> | 215-233    | 10               | 8,226           | 0,813 | 0,249            |
| <b>Che46</b> | 195-301    | 48               | 26,454          | 0,965 | 0,089            |
| <b>Che59</b> | 89-117     | 8                | 5,664           | 0,652 | 0,251            |
| <b>Cpy58</b> | 159-253    | 11               | 7,652           | 0,707 | 0,198            |

Comp. = comprimento em pares de bases. PIC= Conteúdo médio de informação polimórfica

Os percentuais da análise da variância molecular para os *loci* de microssatélites (77,80% de variação dentro das espécies) apresentaram valores semelhantes aos obtidos para os marcadores plastidiais (Tabela 7). A AMOVA também mostrou diferentes níveis de estruturação populacional para cada espécie, sendo que *C. eglandulata* e *C. spathulata* apresentaram os maiores percentuais de variação entre as populações (18,02% e 25,83%, respectivamente). Em contrapartida, *C. sendtneriana* não apresentou níveis de estruturação consideráveis (1,61% de variação entre populações). *Calibrachoa serrulata* apresentou um percentual de estruturação intermediário em comparação com as outras espécies (9,29% de variação entre populações).

Informações sobre as espécies e as respectivas populações, índices de diversidade e indicadores demográficos são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Indicadores demográficos e de diversidade das espécies-alvo e suas populações.

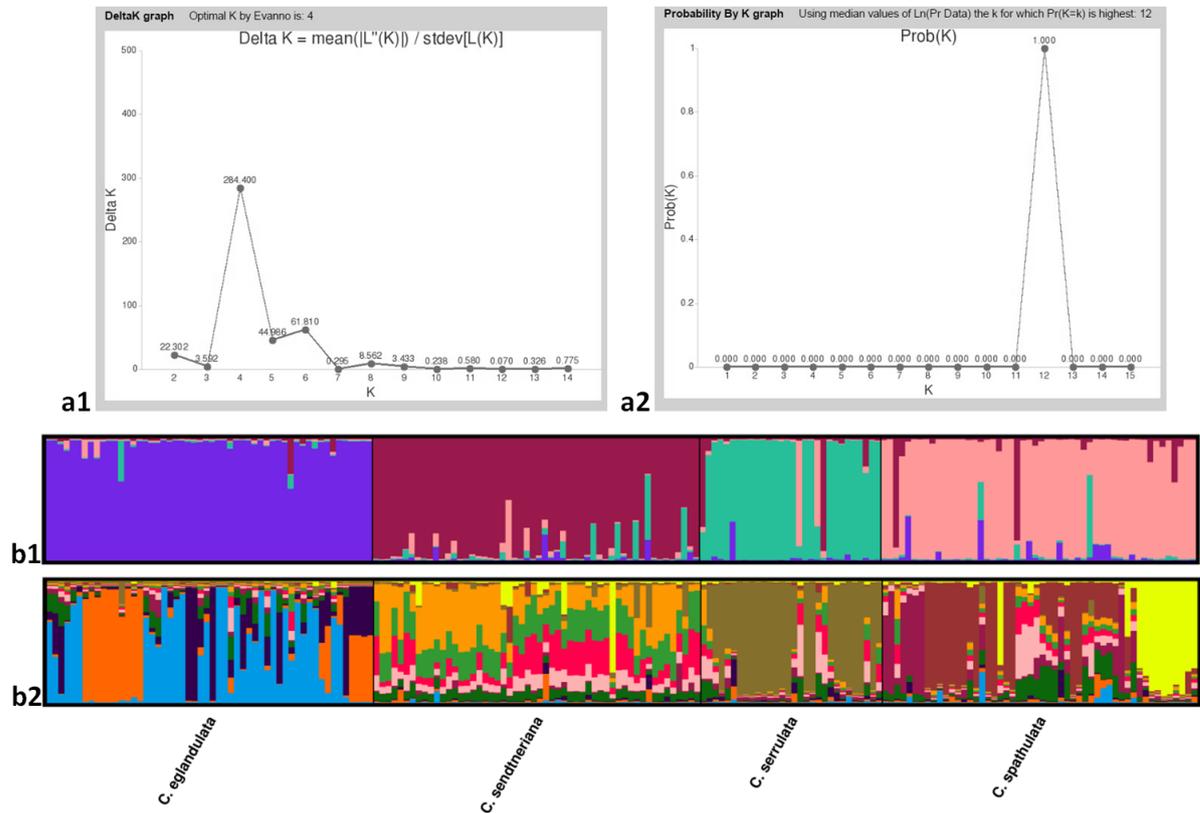
| Espécie                | Identidade da população | N         | A/L         | Riqueza alélica | Diversidade genética | $H_o$        | $H_E$        | $F_{IS}$     | Alelos privados # |
|------------------------|-------------------------|-----------|-------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| <i>C. eglandulata</i>  |                         | <b>54</b> | <b>9,2</b>  | <b>7,66</b>     | <b>0,595</b>         | <b>0,480</b> | <b>0,594</b> | <b>0,194</b> | <b>9</b>          |
|                        | SC-370                  | 40        | 8,2         | 6,20            | 0,553                | 0,463        | 0,552        | 0,163        | 9 (29)            |
|                        | Pousada                 | 14        | 3,4         | 3,40            | 0,540                | 0,529*       | 0,539        | 0,020*       | 0 (5)             |
| <i>C. sendtneriana</i> |                         | <b>54</b> | <b>12,6</b> | <b>10,39</b>    | <b>0,759</b>         | <b>0,596</b> | <b>0,757</b> | <b>0,214</b> | <b>15</b>         |
|                        | BNDT                    | 31        | 9,8         | 9,22            | 0,771                | 0,596        | 0,768        | 0,227        | 9 (19)            |
|                        | EcoEólico               | 23        | 9           | 8,77            | 0,730                | 0,593        | 0,726        | 0,186        | 2 (14)            |
| <i>C. serrulata</i>    |                         | <b>30</b> | <b>8,2</b>  | <b>7,82</b>     | <b>0,646</b>         | <b>0,444</b> | <b>0,642</b> | <b>0,314</b> | <b>8</b>          |
|                        | BNDT                    | 10        | 5,2         | 4,85            | 0,593                | 0,497        | 0,588        | 0,163*       | 0 (6)             |
|                        | Mirante                 | 20        | 7           | 5,12            | 0,622                | 0,417        | 0,616        | 0,330        | 3 (15)            |

|                      |           |           |             |              |              |              |              |          |
|----------------------|-----------|-----------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| <i>C. spathulata</i> | <b>52</b> | <b>11</b> | <b>9,05</b> | <b>0,701</b> | <b>0,414</b> | <b>0,697</b> | <b>0,409</b> | <b>9</b> |
| PR-170               | 12        | 5         | 3,08        | 0,635        | 0,441        | 0,620        | 0,305        | 3 (7)    |
| New                  | 9         | 3,6       | 2,55        | 0,496        | 0,441*       | 0,595        | 0,289*       | 2 (5)    |
| Matos Costa          | 27        | 6,8       | 2,89        | 0,584        | 0,402        | 0,578        | 0,311        | 2 (12)   |
| Laguna               | 4         | 3,4       | 3,04        | 0,691        | 0,600*       | 0,667        | 0,133*       | 0 (6)    |

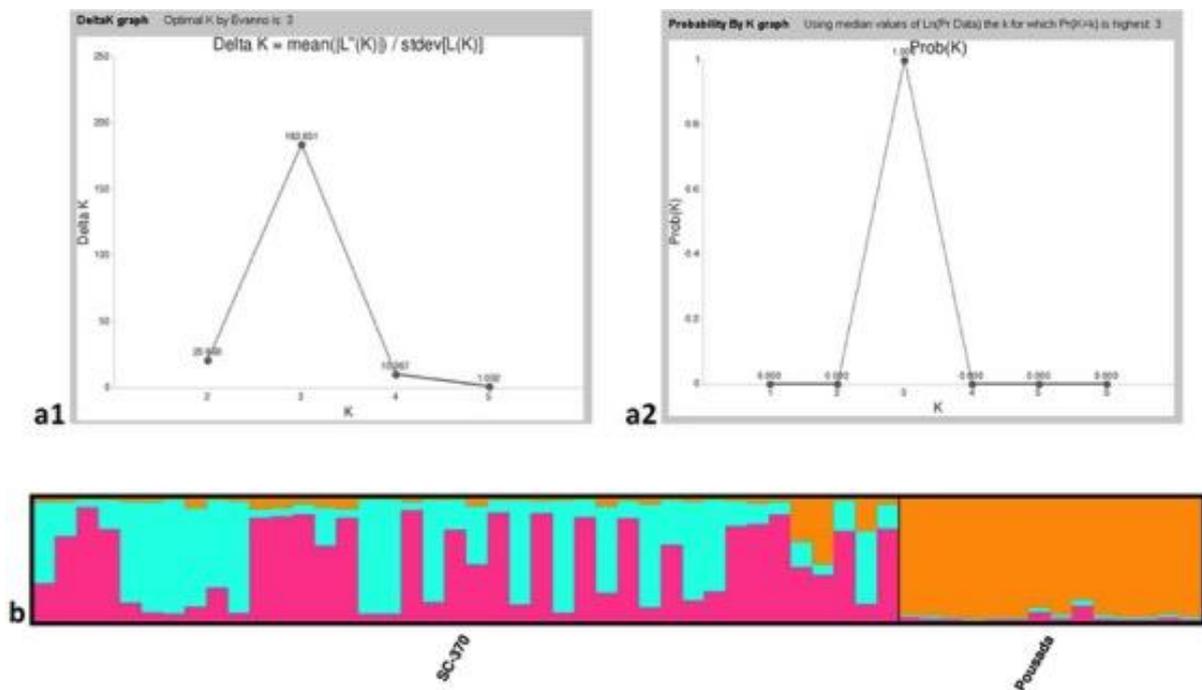
N=número de indivíduos; A/L=Alelos por *locus*; H<sub>O</sub>=Heterozigosidade observada; H<sub>E</sub>= heterozigosidade esperada; F<sub>IS</sub>= coeficiente de endocruzamento; \* Em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para a coluna de Alelos privados: valor total por espécie (em negrito); para cada população o valor fora dos parêntesis corresponde aos alelos privados da população em questão comparada com todas as populações de todas as espécies, e o valor dentro dos parêntesis se refere ao número de alelos privados da população em questão comparada com as outras populações da espécie.

*Calibrachoa sendtneriana* apresentou os maiores valores em todos os índices relacionados à variabilidade genética (alelos por *locus*, riqueza alélica, diversidade genética e alelos privados). Por outro lado, *C. eglandulata* e *C. serrulata* foram as espécies que demonstraram menor variabilidade genética com os *locus* de microssatélites utilizados. Quando analisamos as populações, a média de alelos por *locus* variou de 3,4 (Pousada, *C. eglandulata*) a 9,8 (BNDT, *C. sendtneriana*), a riqueza alélica de 2,55 (New, *C. spathulata*) a 9,22 (BNDT, *C. sendtneriana*) e a diversidade genética de 0,496 (New, *C. spathulata*) a 0,771 (BNDT, *C. sendtneriana*). A heterozigosidade observada foi menor que a esperada para as quatro espécies (todas em desequilíbrio de Hardy-Weinberg). Na análise das populações o mesmo padrão foi observado, com exceção para: “Pousada” (*C. eglandulata*), New e Laguna (*C. spathulata*) que se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O coeficiente de endocruzamento variou de 0,194 e 0,409 entre as espécies e de 0,020 a 0,409 entre as populações. Quando observados os valores de F<sub>IS</sub>, a maioria das populações encontra-se em desequilíbrio com exceção para: “Pousada” (*C. eglandulata*), New e Laguna (*C. spathulata*) e BNDT (*C. serrulata*).

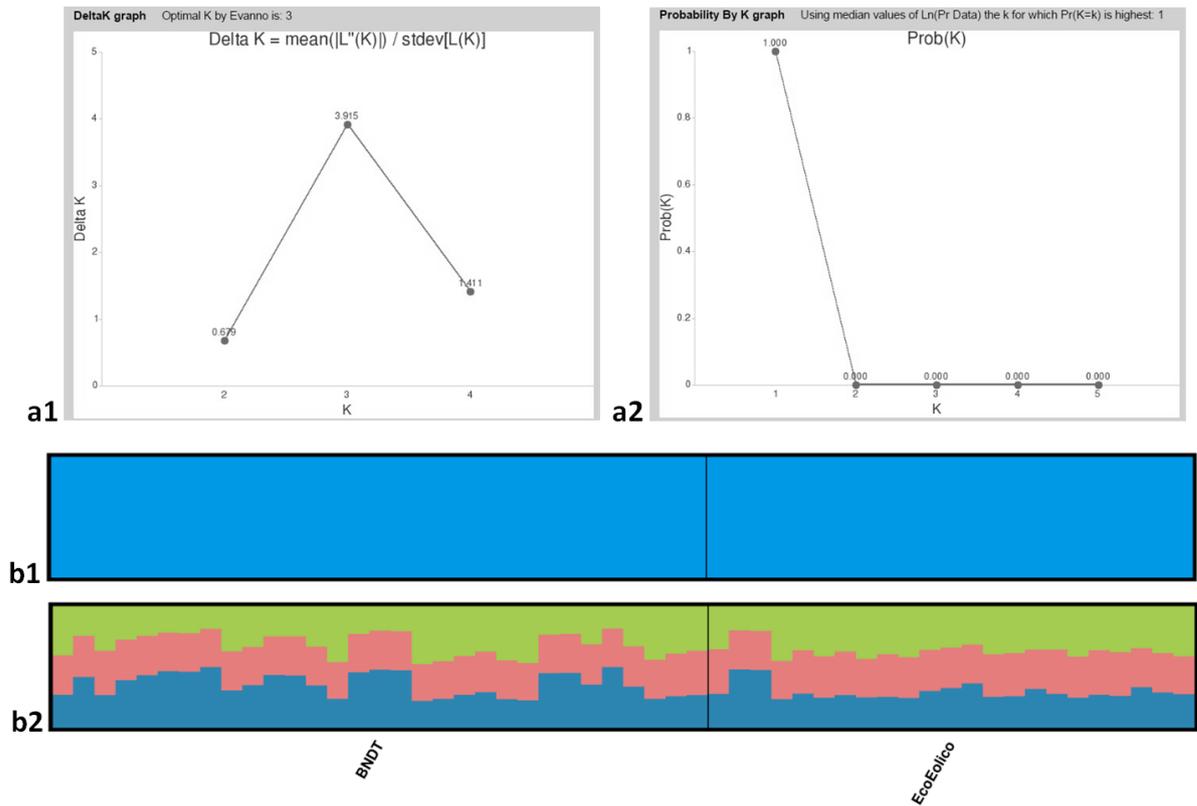
Os *barplots* obtidos nas análises com o programa STRUCTURE e estimativas de melhor K são apresentados abaixo (Figuras 19 a 23). Cada figura a seguir contém os gráficos de  $\Delta K$  e da Probabilidade por K mais o(s) respectivo(s) *barplot*(s). As análises foram conduzidas individualmente para cada espécie e para o seu conjunto.



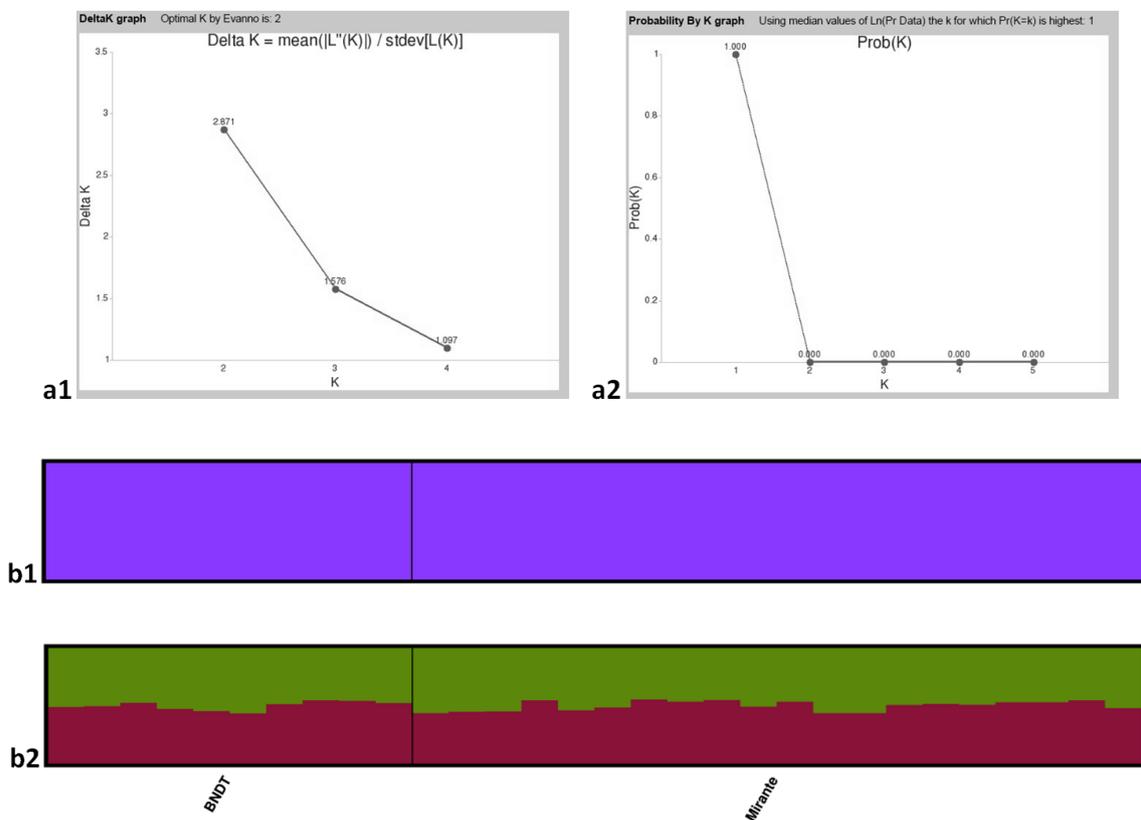
**Figura 19.** Estimativas para o melhor K e respectivos *barplots*, analisando as quatro espécies em conjunto. a1 = gráfico para  $\Delta K$ ; a2 = gráfico para a probabilidade por K; b1 = *barplot* para k = 4; b2 = *barplot* para K = 12



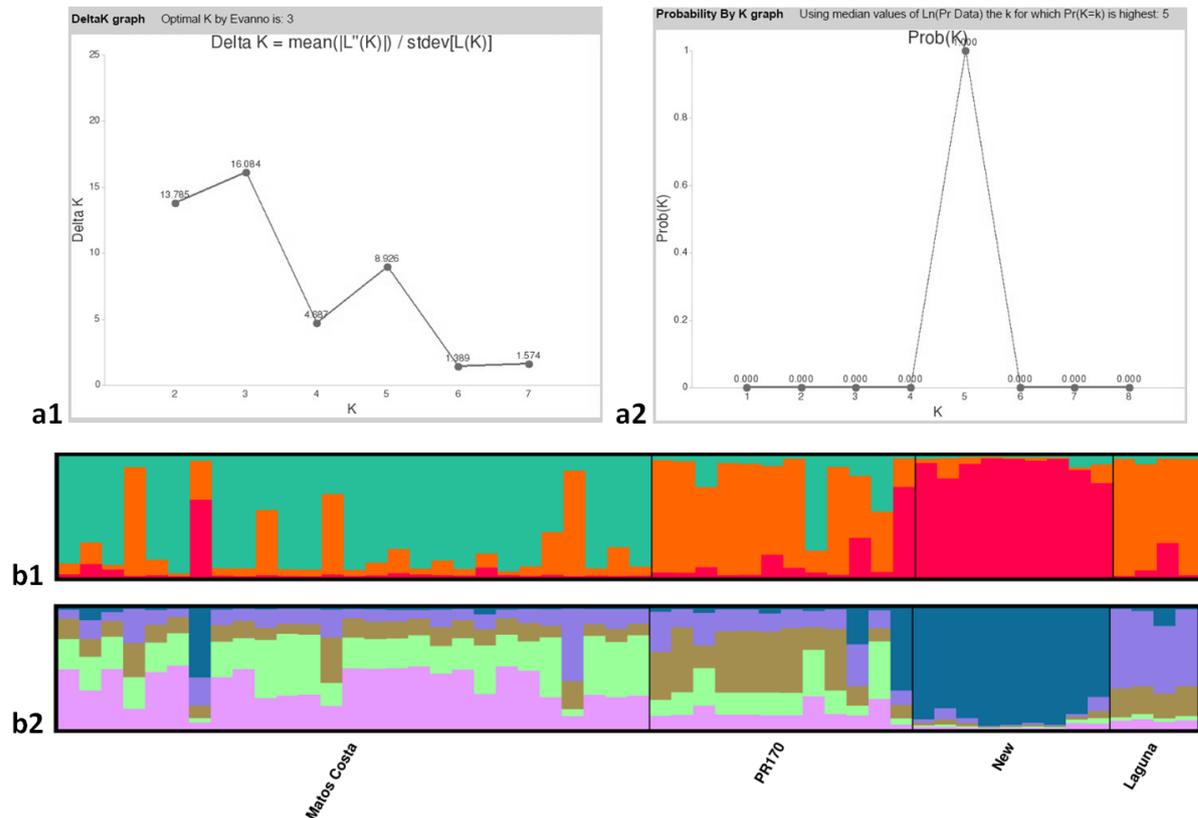
**Figura 20.** Estimativas para o melhor K e *barplot* para *Calibrachoa eglandulata* e populações. a1 = gráfico para  $\Delta K$ ; a2 = gráfico para a probabilidade por K; b = *barplot* para k = 3



**Figura 21.** Estimativas para o melhor K e respectivos *barplots* para *Calibrachoa sendtneriana* e populações. a1 = gráfico para  $\Delta K$ ; a2 = gráfico para a probabilidade por K; b1 = *barplot* para k = 1; b2 = *barplot* para K = 3



**Figura 22.** Estimativas para o melhor K e respectivos *barplots* para *Calibrachoa serrulata* e populações. a1 = gráfico para  $\Delta K$ ; a2 = gráfico para a probabilidade por K; b1 = *barplot* para k = 1; b2 = *barplot* para K = 2



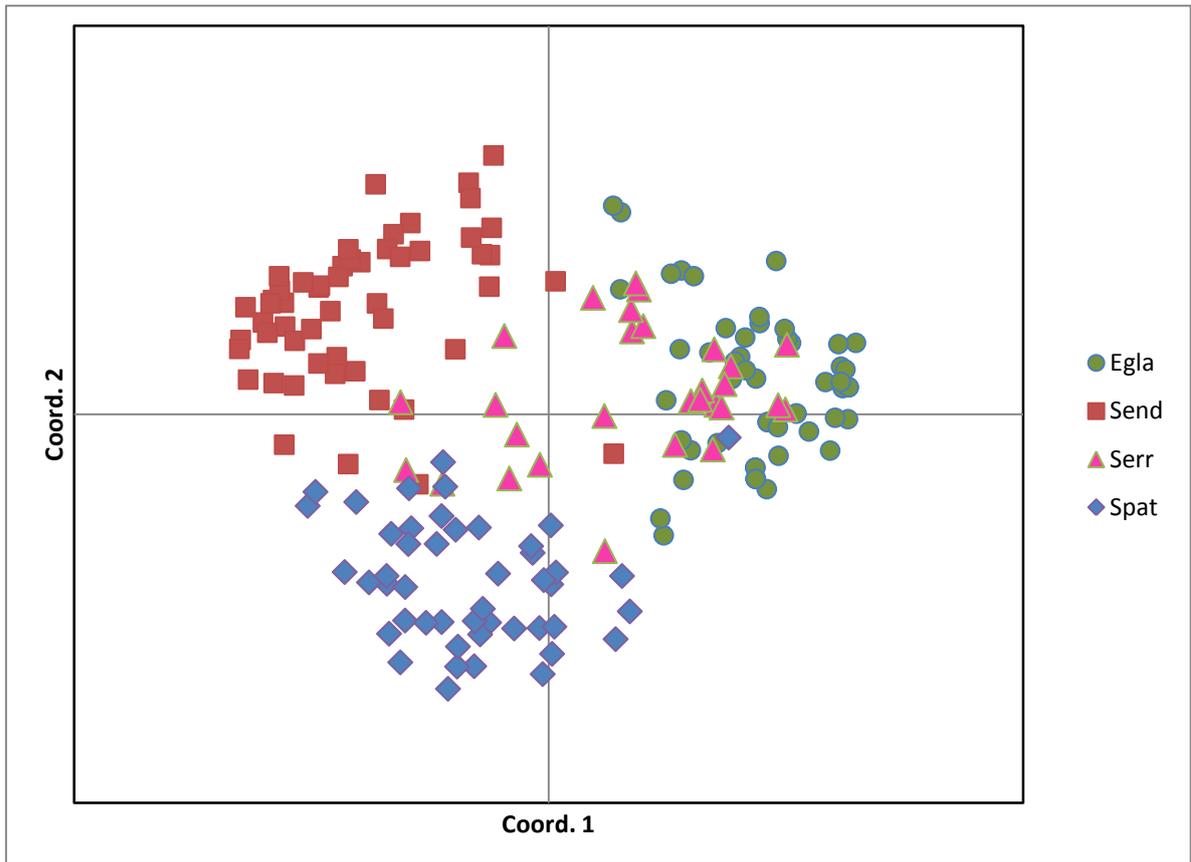
**Figura 23.** Estimativas para o melhor K e respectivos *barplots* para *Calibrachoa spathulata* e populações. a1 = gráfico para  $\Delta K$ ; a2 = gráfico para a probabilidade por K; b1 = *barplot* para k = 3; b2 = *barplot* para K = 5

Na análise do conjunto total de dados (as quatro espécies e suas populações) foram encontrados diferentes valores de melhor K utilizando os métodos de  $\Delta K$  e Probabilidade por K (ProbK) (Figura 19 – a1 e a2). O  $\Delta K$  para a análise forneceu melhor K = 4 (Figura 19 – b1), sendo cada um dos quatro clusters referente a uma espécie com um pequeno grau de mistura entre os clusters. *Calibrachoa eglandulata* teve indivíduos com menor nível de mistura com outras espécies. *Calibrachoa sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. spathulata* apresentaram alguns indivíduos com nível de mistura de clusters pronunciado (Figura 19 – b1). A ProbK atribuiu K = 12 (Figura 19 – b2) como o melhor K, possibilitando discernir as espécies (*C. eglandulata* com o componente predominantemente azul, *C. serrulata* com o componente verde-escuro e *C. spathulata* com o componente vermelho-escuro) e algumas populações dentro das espécies (o componente laranja dentro de *C. eglandulata* para a população “Pousada” e o componente amarelo em *C. spathulata* para a população “Laguna”).

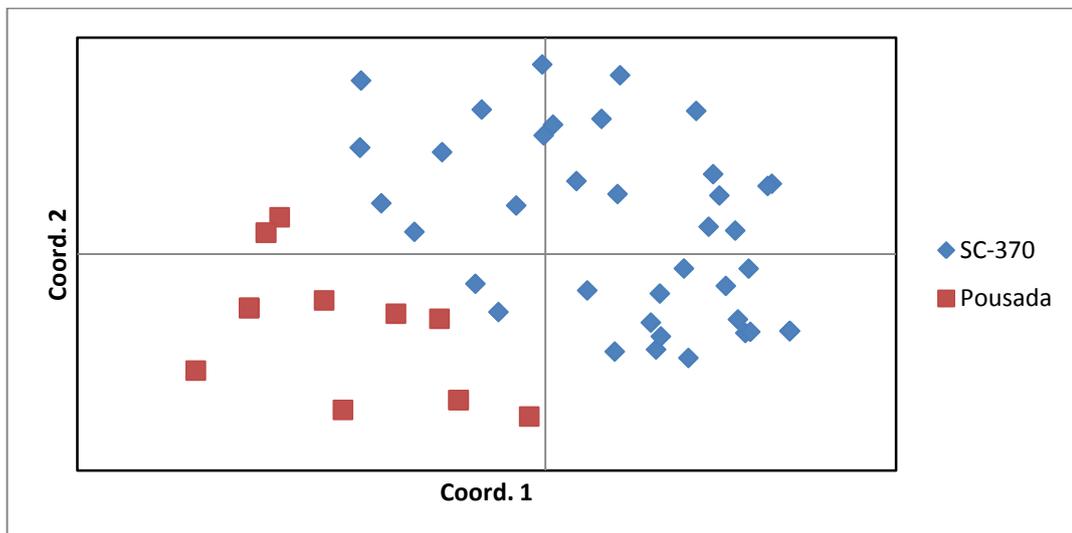
Na análise específica de *C. eglandulata* ambas as metodologias de escolha de melhor K atribuíram K=3 como melhor número de *clusters* para os dados (Figura 20 – a1 e a2). Dos três distintos clusters genéticos, um componente é praticamente exclusivo de uma das populações (laranja, “Pousada”), e outros dois são referentes à diversidade genética dentro da

população “SC-370” (azul e rosa). Para *C. sendtneriana* os valores encontrados para melhor K foram:  $\Delta K = 3$  (Figura 21- a1) e ProbK = 1 (Figura 21 –a2). No *barplot* para K = 3, os componentes genéticos encontram-se distribuídos de forma proporcional entre os indivíduos da espécie, independente da população. De maneira similar, *C. serrulata* também recebeu valores distintos para o melhor K (Figura 22 – a1 e a2), com  $\Delta K$  sinalizando o melhor K como K = 2 e a ProbK atribuindo K = 1. No *barplot* para K = 2 (Figura 22 – b2), podemos ver os componentes genéticos dispostos de maneira quase homogênea, fazendo com que nenhum indivíduo da análise seja atribuído a um ou outro cluster. Na análise para *C. spathulata*, os melhores valores de K foram K=3 ( $\Delta K$ ) e K=5 (ProbK) (Figura 23 – a1 e a2). No *barplot* para K=3 é possível verificar algum grau de estruturação nas populações: uma população com prevalência do componente verde (Matos Costa), outra com componente predominantemente vermelho (New) e duas com o componente laranja (PR170 e Laguna) (Figura 23 – b1). Com K=5 a estruturação é menos clara, pois os componentes adicionais estão relacionados à variabilidade genética intrapopulacional (Figura 23 – b2).

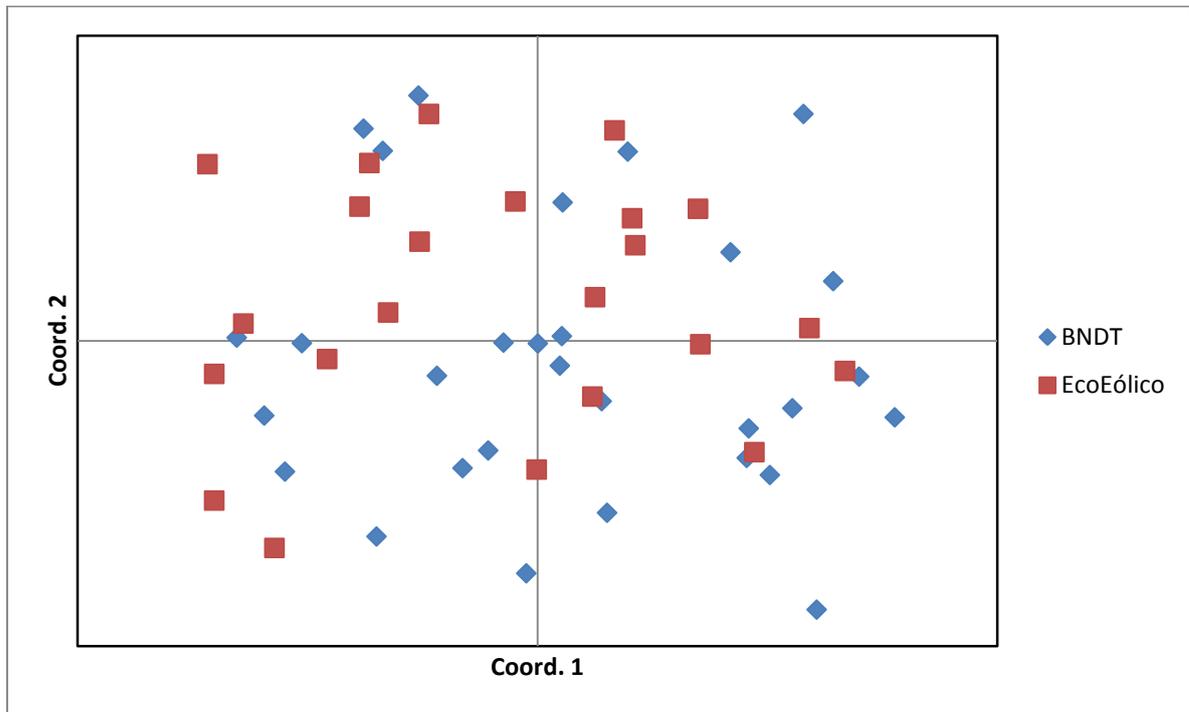
A PCoA para as quatro espécies em conjunto é mostrada na Figura 24. Todas as espécies com exceção de *C. serrulata* têm a maioria de seus indivíduos agrupados de acordo com uma ou outra coordenada. Alguns indivíduos de *C. serrulata* estão sobrepostos aos indivíduos das outras espécies, principalmente *C. eglandulata*. As análises para cada uma das espécies e suas populações são mostradas nas Figuras 25 a 28. *Calibrachoa eglandulata* e *C. spathulata* apresentam evidente estruturação populacional. *Calibrachoa sendtneriana* não apresenta agrupamentos diferenciados entre as populações, indicando apenas um único *cluster* genético compondo a espécie. Por fim, *C. serrulata* apresenta certa estruturação populacional discernível na PCoA quando analisado o eixo da Coordenada 2.



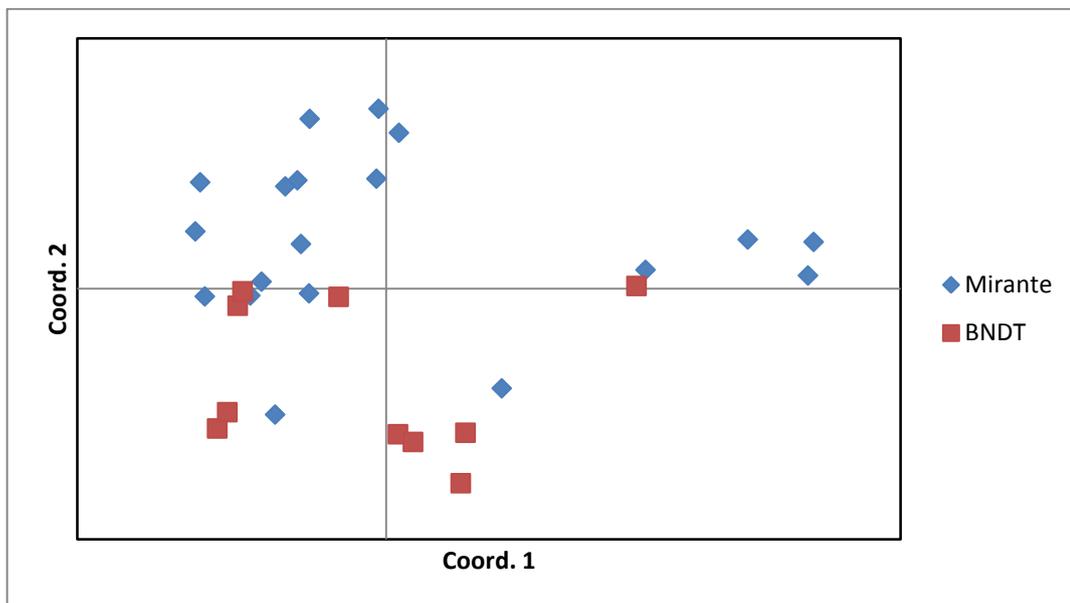
**Figura 24.** Análise de Coordenadas Principais para as quatro espécies microendêmicas em conjunto. A simbologia utilizada para cada espécie é mostrada na legenda. Egla = *Calibrachoa eglandulata*; Send = *Calibrachoa sendtmeriana*; Serr = *Calibrachoa serrulata*; Spat = *Calibrachoa spathulata*.



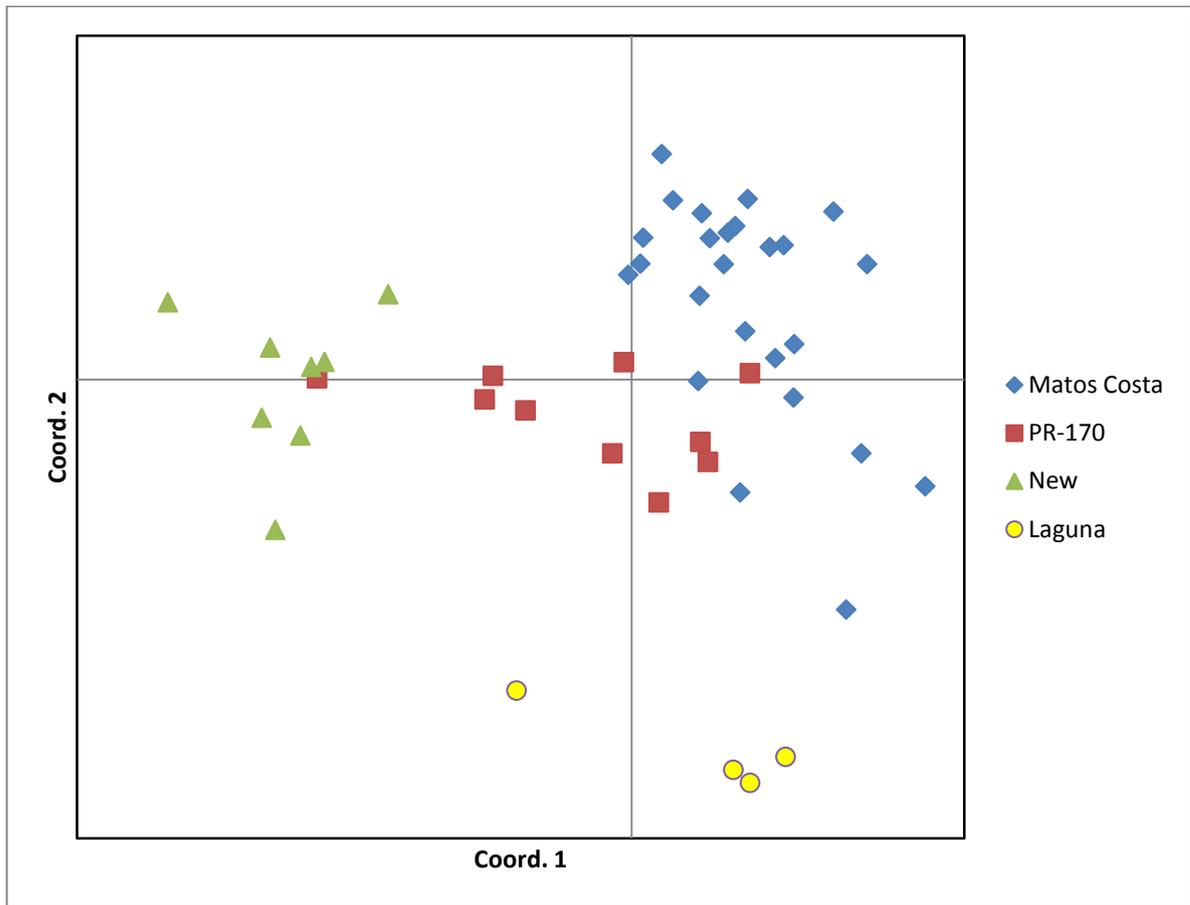
**Figura 25.** Análise de Coordenadas Principais para *Calibrachoa eglandulata*. A simbologia utilizada para cada população é mostrada na legenda.



**Figura 26.** Análise de Coordenadas Principais para *Calibrachoa sendtneriana*. A simbologia utilizada para cada população é mostrada na legenda.



**Figura 27.** Análise de Coordenadas Principais para *Calibrachoa serrulata*. A simbologia utilizada para cada população é mostrada na legenda.



**Figura 28.** Análise de Coordenadas Principais para *Calibrachoa spathulata*. A simbologia utilizada para cada população é mostrada na legenda.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Variabilidade genética das espécies-alvo

Os índices de diversidade calculados para as duas classes de marcadores (plastidiais e nucleares) contam histórias distintas, com exceção para *C. eglandulata*. Analisando os índices obtidos com os marcadores nucleares, *C. eglandulata* apresenta os menores valores dentre as quatro espécies para Riqueza Alélica e Diversidade Genética, enquanto *C. serrulata* apresentou valores similares, no entanto ligeiramente maiores. Já o número de alelos por locus foi menor em *C. serrulata* bem como o número de alelos privados e novamente valores similares aos de *C. eglandulata* foram observados. Por outro lado, *C. sendtneriana* foi a espécie que apresentou os maiores índices referentes à variabilidade genética com os marcadores nucleares, seguida por *C. spathulata* que apresentou valores relativamente inferiores. De outra maneira, os dados plastidiais mostraram que *C. serrulata* tem o maior valor para diversidade nucleotídica dentre as quatro espécies estudadas, seguida por *C. spathulata* e *C. sendtneriana* (com valores similares) e por *C. eglandulata* (menor diversidade observada). Índices de diversidade para diferentes espécies foram retirados da literatura (Tabela 10) para comparação com os resultados obtidos neste estudo. A utilização de dados provenientes de espécies do mesmo gênero ou de taxa filogeneticamente próximos possibilita comparações apropriadas, pois são realizadas entre espécies com história evolutiva e a biologia similares (Gitzendanner & Soltis, 2000). É necessário destacar que embora os marcadores utilizados sejam os mesmos, existe uma grande variação no número de indivíduos utilizados para cada espécie. O número de indivíduos utilizados pode afetar o cálculo dos índices de diversidade nucleotídica visto que pode haver uma sub-representação da diversidade existente nas espécies/populações.

**Tabela 10.** Índices de diversidade para espécies de *Calibrachoa* e *Petunia*, retirados da literatura. Marcadores utilizados, número de indivíduos, número de haplótipos e a origem dos valores são apresentados na tabela.

| Espécie   | Marcador | N   | H  | $\pi$ % (DP)    | Estudo                             |
|---|----------|-----|----|-----------------|------------------------------------|
| <i>Calibrachoa heterophylla</i>                     | HA/SG    | 247 | 27 | 0,409 (0,220)   | Mader <i>et al.</i> 2013           |
| <i>Calibrachoa elegans</i>                          | SG       | 67  | 2  | 0,0040 (0,0137) | Fregonezi, 2009                    |
| <i>Calibrachoa sellowiana</i>                       | SG       | 65  | 4  | 0,0878 (0,0763) | Fregonezi, 2009                    |
| <i>Petunia integrifolia</i> var. <i>depauperata</i> | HA/SG    | 289 | 25 | 0,13 (0,09)     | Ramos-Fregonezi <i>et al.</i> 2015 |
| <i>Petunia integrifolia</i> spp <i>integrifolia</i> | HA/SG    | 24  | 9  | 0,40 (0,2)      | Longo <i>et al.</i> 2014           |
| <i>Petunia riograndensis</i>                        | HA/SG    | 7   | 6  | 0,20 (0,2)      | Longo <i>et al.</i> 2014           |
| <i>Petunia inflata</i>                              | HA/SG    | 34  | 12 | 0,26 (0,16)     | Segatto <i>et al.</i> 2014a        |
| <i>Petunia interior</i>                             | HA/SG    | 89  | 23 | 0,34 (0,19)     | Segatto <i>et al.</i> 2014a        |

|                                     |       |     |    |             |                              |
|-------------------------------------|-------|-----|----|-------------|------------------------------|
| <i>Petunia hybrida</i>              | HA/SG | 22  | 3  | 0,35 (0,20) | Segatto <i>et al.</i> 2014a  |
| <i>Petunia exserta</i>              | HA/SG | 322 | 6  | 0,10 (0,1)  | Segatto <i>et al.</i> 2014b  |
| <i>Petunia secreta</i>              | HÁ/SG | 65  | 9  | 0,17 (0,11) | Turchetto <i>et al.</i> 2016 |
| <i>Petunia axillaris</i><br>complex | HÁ/SG | 614 | 35 | 0,22(0,13)  | Turchetto <i>et al.</i> 2014 |

HÁ-SG = espaçadores concatenados *trnH-psbA/trnS-trnG*; SG = apenas o espaçador *trnS-trnG*; N = número de indivíduos; H = número de haplótipos;  $\pi$  = Diversidade nucleotídica % (Desvio padrão)

*Calibrachoa serrulata* apresentou o maior índice de diversidade nucleotídica (0,4524) entre as quatro espécies-alvo e entre todas as espécies da Tabela 10. *Calibrachoa sendtneriana* apresentou diversidade nucleotídica intermediária quando comparada com as outras espécies da Tabela 10 (0,2295 – Tabela 6), sendo similar a *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. (0,22) e *Petunia riograndensis* T. Ando & Hashim. (0,20). *Petunia axillaris* apresenta três subespécies e é tratada como um complexo, sendo uma espécie de ampla distribuição, ocorrendo no sul da América do Sul (Turchetto *et al.*, 2014). *Petunia riograndensis* é encontrada apenas no sul do Rio Grande do Sul e sua classificação quanto ao nível taxonômico apresenta controvérsias (Longo *et al.*, 2014). A alta diversidade genética observada nos dados plastidiais em *C. serrulata* pode ser fruto de *incomplete lineage sorting* (Jakob & Blattner, 2006), algo frequentemente observado na análise de dados plastidiais de espécies que divergiram recentemente (a diversificação das espécies-alvo ocorreu no Pleistoceno, há cerca de 1 milhão de anos - Figura 18). Alternativamente, a alta diversidade genética plastidial, especialmente em *C. serrulata*, pode ser resultado de captura de cloroplasto a partir de eventos de hibridação, como discutiremos mais adiante.

*Calibrachoa eglandulata* apresentou os menores valores para diversidade nucleotídica dentre as espécies-alvo. Quando comparada com as espécies da Tabela 10, *C. eglandulata* só não apresenta valores menores que os de *Calibrachoa elegans* (Miers) Stehmann & Semir, ( $\pi = 0,0040$ ). *Calibrachoa elegans* também é uma espécie microendêmica de altitude, nativa das serras próximas de Belo Horizonte (Minas Gerais) (Stehmann, 1999). *Calibrachoa spathulata* e *C. sendtneriana* apresentaram valores intermediários de diversidade nucleotídica quando comparamos com os valores expostos na Tabela 10

Enquanto *C. sendtneriana* e *C. spathulata* foram as espécies com os maiores tamanhos populacionais (observação no campo) e maior número de pontos de coleta, *C. eglandulata* e *C. serrulata* mostraram-se mais restritas, fator relacionado com aumento da deriva genética e endocruzamento, e estes por sua vez podem acarretar diminuição da diversidade genética (Ellstrand & Ellam, 1993). Sendo as espécies autoincompatíveis, elas dependem da ação dos polinizadores para sua reprodução (fecundação cruzada), então fatores como o número, a densidade e distribuição das populações se tornam importantes na formação e manutenção da

diversidade das espécies. Em experimentos controlados, Kunin (1997) observou que populações menos densas (com indivíduos mais espaçados entre si) apresentaram taxas menores de visitação de polinizadores (em sua maioria espécies de abelhas), independente do tamanho (número de indivíduos) da população, com o número total de flores influenciando o número de flores visitadas. Beija-flores tendem a visitar menos flores da mesma planta em populações com altas densidades, indicando que uma maior densidade populacional favorece o intercâmbio de pólen e a fecundação cruzada entre as plantas (Franceschinelli & Bawa, 1999).

As espécies-alvo *C. eglandulata* e *C. spathulata* apresentaram populações com densidades consideradas altas, onde muitos indivíduos foram observados próximos na mesma área (observação em campo); indivíduos de *C. spathulata* formavam manchas de até dezenas de metros de comprimento. No entanto, embora polinizadores visitem um maior número de flores entre plantas distintas em populações densas, se as plantas próximas apresentam grau de parentesco, existe uma alta probabilidade de que os indivíduos apresentem os mesmos alelos para um determinado *locus*. Em *Calibrachoa* as sementes são dispersas pela gravidade (Stehmann, 1999), caindo próximas das plantas-mãe. Sendo assim, mesmo via fecundação cruzada haverá um aumento na endogamia e o surgimento de forte estruturação populacional, como pode ser visto para *C. eglandulata* e *C. spathulata* (Tabela 7; Figuras 20 – b, e 23 – b1 e b2). Em termos de relevo do hábitat, *C. eglandulata* e *C. spathulata* são encontradas em locais planos como beiras de estrada, ao contrário de *C. serrulata* e indivíduos de *C. sendtneriana* que são encontrados na borda de paredões rochosos. A interrupção abrupta do relevo pode estar interferindo no tamanho das populações de *C. sendtneriana* e *C. serrulata*.

### **5.2 Relacionamento entre as espécies-alvo**

Analisando a rede de haplótipos e a árvore filogenética para os espaçadores concatenados (Figura 15 e 18) vê-se que *C. eglandulata* e *C. spathulata* têm seus haplótipos exclusivos e agrupados. Entretanto, *C. sendtneriana* e *C. serrulata* apresentam haplótipos exclusivos, mas também compartilhados. Estas espécies ocorrem de forma parcialmente sobreposta na mesma região do município de Bom Jardim da Serra (SC), em habitats distintos, mas com uma distância que varia de 1,4 a 3,5 km entre pontos de coleta das duas espécies. Não há indícios de cruzamento ou de híbridos entre elas, mas na filogenia do gênero (Fregonezi *et al.* 2012) estas espécies se apresentam intimamente relacionadas (vide Figura 7). A diversificação do clado que conta com a maior parte dos haplótipos de *C. serrulata* e *C. sendtneriana* é recente, há cerca de 540 mil anos, no Pleistoceno (Figura 18). Desta forma, duas situações podem explicar o compartilhamento de haplótipos entre essas espécies:

polimorfismos ancestrais resultantes de *incomplete lineage sorting* e/ou uma consequência de eventual hibridação com outra espécie. A ocorrência de hibridação entre *C. sendtneriana* e *C. serrulata* com *C. sellowiana*, já foi sugerida (Stehmann, 1999; Fregonezi, 2009) e também verificada neste trabalho a partir da coleta de amostras com morfologias intermediárias entre as espécies. No caso da ocorrência de híbridos naturais, o compartilhamento de haplótipos, então, seria uma consequência da captura de cloroplasto (Tsitrone *et al.*, 2003). Polimorfismos ancestrais compartilhados foram sugeridos como explicação para similaridade genética encontrada em espécies de *Petunia* (Segatto *et al.*, 2014a; Reck-Kortmann *et al.*, 2014) e eventos de hibridação natural também foram relatados para o gênero, em espécies filogeneticamente relacionadas (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Turchetto *et al.*, 2015). Dentro de *Calibrachoa* também há relatos de híbridos encontrados na natureza (Stehmann, 1999; Fregonezi, 2009), com *C. sellowiana* figurando como possível parental em pelo menos mais um cenário [*C. sellowiana* x *Calibrachoa linoides* (Sendtn.) Wijsman], além dos sugeridos aqui, e outros possíveis híbridos entre diferentes espécies de *Calibrachoa*. Como mencionado anteriormente, *C. sellowiana* é uma espécie de ampla distribuição, ocorrendo em afloramentos rochosos juntamente de *C. sendtneriana* e de *C. serrulata*, encontrada florescendo no mesmo período e aparentemente apresentando um número maior de flores por indivíduo que as espécies microendêmicas (observação em campo), podendo gerar um aporte maior de pólen sobre *C. sendtneriana* e *C. serrulata*, aumentando as chances da formação de híbridos.

Quatro haplótipos compartilhados entre as diferentes espécies são encontrados na rede de haplótipos para os marcadores concatenados e na árvore Bayesiana (Figura 15 e 18): **H9** com indivíduos de *C. sendtneriana* (dois deles considerados possíveis híbridos), indivíduos de *C. serrulata* (um de morfologia típica e outro de morfologia intermediária) e um indivíduo de *C. sellowiana*; **H5** com indivíduos de *C. sendtneriana* e *C. serrulata* (com um provável híbrido); **H3** Com indivíduos de *C. sendtneriana* e de *C. serrulata* (um com morfologia intermediária) e **H12** com um indivíduo de *C. sendtneriana* com morfologia híbrida e outro de *C. sellowiana*. Os haplótipos compartilhados com membros de três espécies somados os indivíduos com morfologia intermediária, indicam fortemente a ocorrência de hibridação entre essas espécies de *Calibrachoa*. O fato do haplótipo H3, por exemplo, estar fortemente relacionado com haplótipos de espécies mais distantes (morfologicamente e geograficamente) como *C. ovalifolia*, *C. glandulata* e, principalmente, *C. sellowiana*, indica que H3 pode ser caso de captura de cloroplasto. Nesse caso, H3 seria um haplótipo de *C. sellowiana* encontrado em *C. serrulata* e *C. sendtneriana* por meio de captura de cloroplasto via hibridação natural (recente ou antiga). Não necessariamente híbridos têm morfologia intermediária, por exemplo: em um cruzamento entre *C. sellowiana* e *C. serrulata* que

ocorreu há muitas gerações e cujos descendentes cruzaram novamente com *C. serrulata* por várias gerações podemos não perceber o híbrido através da morfologia, mas ele pode conter um cloroplasto oriundo de *C. sellowiana*. Foram encontrados em campo indivíduos com diferentes morfologias híbridas, podendo se tratar de híbridos de diferentes gerações e/ou com diferentes percentuais do genótipo de cada espécie parental, resultantes de eventos de introgressão com parentais (Rhymer & Simberloff, 1996) ou de cruzamento entre híbridos.

A partir da análise dos dados nucleares é possível verificar um padrão geneticamente mais estruturado quando comparamos as quatro espécies. O *barplot* produzido a partir da análise do STRUCTURE mostra componentes específicos para as quatro espécies com reduzido grau de mistura (Figura 19 -b1). Enquanto os resultados das análises plastidiais não permitiram a separação genética de *C. serrulata* e *C. sendtneriana* o mesmo não ocorreu com os dados de microssatélites. Quando analisados os dados de microssatélites para verificar a existência de distintos *clusters* genéticos no conjunto de dados das quatro espécies (Figura 19 – a1 e a2) foram encontrados diferentes valores de melhor K utilizando os métodos de  $\Delta K$  e Probabilidade por K (ProbK). Essa incongruência na escolha do melhor K pode estar relacionada ao fato de que a análise realizada no STRUCTURE parte da premissa de que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Pritchard *et al.*, 2000), característica não observada em nosso conjunto de dados como discutiremos a seguir. A PCoA a partir da matriz alelos compartilhados das quatro espécies não apresentou resolução suficiente para a separação de todas as espécies, sobretudo de *C. serrulata*.

### **5.3 Estrutura e diversidade genética intraespecífica**

A diversidade genética de *C. eglandulata* foi similar nas duas populações analisadas, enquanto “Pousada” apresentou menor número de alelos por *locus* e riqueza alélica, comparados com os de “SC-370”. Os dados provenientes de SSR mostram que 18,02% da variação genética em *C. eglandulata* foi encontrada entre as populações, estruturação que se mostrou também na identificação de três *clusters* genéticos distintos (Figura 20 - b), um deles (identificado com a cor laranja no *barplot*) praticamente exclusivo de uma das populações (“Pousada”), sugerindo fluxo gênico restrito. O agrupamento nas duas populações designadas também foi recuperado pela PCoA (Figura 25), corroborando a existência de estruturação populacional. A população “Pousada” trata-se do ponto de coleta mais distante encontrado para a espécie, estando separado dos outros pontos (agrupados na população “SC-370”) por aproximadamente 3,5 km. Os outros dois *clusters* são referentes à diversidade genética dentro da população “SC-370”, formada por pontos de coleta próximos, que a julgar pelas proporções dos *clusters* azul e rosa, pode ser tratada como uma população contínua que se

estende por aproximadamente 1 km, apresentando alto fluxo gênico. “SC-370” é uma população densa (observação em campo), facilitando o fluxo gênico entre esses indivíduos (Franceschinelli & Bawa, 1999), contribuindo para estruturação das populações (diferenciação entre “SC-370” e “Pousada”) e para o nível de endogamia encontrado (fruto do tipo de dispersão das sementes – Stehmann, 1999). “Pousada” é uma das únicas populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A heterozigosidade observada para a população é praticamente idêntica à esperada, com o  $F_{IS}$  sugerindo que não existe um nível significativo de endocruzamento. Isso provavelmente é resultante da reprodução via fecundação cruzada (Tsukamoto *et al.*, 2002), que de alguma forma, apesar do tamanho populacional reduzido, não origina um número preocupante de homozigotos.

*Calibrachoa sendtneriana* apresentou o menor percentual de variação entre as populações dentre as espécies-alvo, com 1,61% da diversidade dos marcadores nucleares encontrada entre as populações. A ausência de estruturação populacional na espécie embasou a escolha entre os valores encontrados para melhor K (Figura 21 – a1 e a2). Essa situação sugere a existência de um fluxo gênico responsável por homogeneizar as frequências alélicas e genotípicas nas populações, como demonstram os valores de  $F_{IS}$ ,  $H_O$  e  $H_E$  (Tabela 9) obtidos para as populações, com valores similares e em desequilíbrio. O número de alelos por *locus*, a riqueza alélica e a diversidade genética para as populações também foram similares. Sendo assim,  $K = 1$  (Figura 21 – b1) é o número de *clusters* que melhor explica a diversidade encontrada em *C. sendtneriana*, resultado suportado pela disposição dos indivíduos no gráfico para a PCoA (Figura 26). O fluxo gênico responsável pela existência de um único *cluster* genético deve ser resultante da ação de polinizadores (Franceschinelli & Bawa, 1999) visto que a dispersão dos frutos e sementes é limitada (Stehmann, 1999).

Na AMOVA a partir dos dados de microssatélites obteve-se um percentual de 9,29% de variação entre as populações de *C. serrulata*, porém, como acontece com *C. sendtneriana*, a estruturação populacional não é grande o suficiente para ser evidenciada em diferentes *clusters* com significado biológico ou geográfico na análise do STRUCTURE. *Calibrachoa serrulata* também recebeu valores distintos para o melhor K (Figura 22 – a1 e a2), com  $\Delta K$  sinalizando o melhor K como  $K = 2$  e a ProbK atribuindo  $K = 1$  como o melhor número de *clusters* genéticos. Assim como verificamos para *C. sendtneriana*, devido ao método utilizado para calcular  $\Delta K$ ,  $K = 1$  não é incorporado na análise. Considerando o baixo percentual de variação encontrado entre as populações, a proximidade dos pontos de coleta para a espécie, e a suposição de que beija-flores polinizam as flores da espécie,  $K = 1$  aparenta corresponder à biologia de *C. serrulata* considerando o que existe em nosso universo amostral. Apenas 30 indivíduos foram empregados nas análises devido à dificuldade de coleta proporcionada pelo

hábitat da espécie, mas outros indivíduos foram avistados mais abaixo nos paredões rochosos em nossos pontos de coleta, e uma grande população (que ainda carece de confirmação taxonômica) existe em um rochedo distante da borda da serra. O gráfico de PCoA também não demonstra evidente diferenciação entre as populações analisadas, no entanto, há um certo grau de separação entre as duas populações compatível com o resultado da AMOVA. Ambas as populações BNDT e Mirante desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg. “BNDT” não apresentou um nível significativo de endocruzamento ( $F_{IS} = 0,163$ ). “Mirante” possui valores maiores que “BNDT” para o número alelos por *locus* (5,2 e 7, respectivamente) e a riqueza alélica (4,85 e 5,12, respectivamente). No entanto essas diferenças podem estar relacionadas ao baixo número amostral.

O maior percentual de variação entre as populações dentre as espécies estudadas foi de *C. spathulata*, 25,83% da variação dos marcadores nucleares encontra-se entre as quatro populações da espécie, o que também pode ser verificado com a análise de *clusters*, que mostrou a existência de estruturação populacional correlacionada (em parte) com a distribuição geográfica das populações (Figura 23 – b1 e b2). Acredita-se que a divergência entre os valores para o melhor K seja decorrente do fato das populações de *C. spathulata* não se encontrarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Como o gráfico para  $\Delta K$  também mostra um pico em  $K = 5$ , será utilizado o *barplot* b2 da Figura 23 para discutir a estruturação populacional em *C. spathulata*. Um *cluster* genético praticamente exclusivo foi atribuído população “New”, um componente genético distinto também é designado para a população “Laguna”, aparecendo em quantidades menores nas populações “Matos Costa” e “PR-170”. Estas por sua vez são compostas pelos três *clusters* restantes com proporções distintas de cada. A análise de coordenadas principais mostrou a existência de diferentes agrupamentos dentro de *C. spathulata* (Figura 28), recuperando quatro grupos discretos, e sugerindo uma divisão dentro do grupo “Matos Costa” se considerarmos o eixo da Coordenada 2. O ponto “New” foi descoberto em 2015, e está distante 13 km do ponto mais próximo (PR-170), provavelmente a razão de “New” apresentar um *cluster* genético distinto e o motivo de um indivíduo em “PR-170” apresentar uma proporção considerável do *cluster* azul-marinho. A existência de um indivíduo em “Matos Costa” com grande proporção do componente genético de “New” sugere que a frequência do componente em “New” é resultante de um efeito fundador, visto que o componente está presente nas outras populações. Outras populações foram procuradas em áreas próximas, mas nada foi encontrado, fazendo com que o “New” esteja aparentemente isolado das demais populações. A estruturação geográfica apontada pelos *clusters* e pela AMOVA também está presente na rede de haplótipos, com H18 (haplótipo central) e H19 pertencentes à população “Matos Costa”, H16 a NEW e H15 e H17

a “PR-170, sugerindo que a dispersão de *C. spathulata* na região pode ter se dado a partir de indivíduos de “Matos Costa”, em um gradiente Sul→Norte, muitas gerações atrás. As populações “PR-170” e “Matos Costa” desviaram significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentando déficits consideráveis de heterozigotos. Ao contrário destes resultados, “New” e “Laguna” não apresentaram um nível de endogamia significativo nem diferença significativa no número de heterozigotos. “New” de maneira geral apresentou a menor variabilidade genética conforme os índices mostrados na Tabela 9 e isso pode ser fruto de efeito fundador e isolamento geográfico (Shirk *et al.*, 2014).

#### **5.4 Implicações para a conservação**

*Calibrachoa eglandulata* encontra-se na situação mais preocupante dentre as espécies analisadas neste estudo. A baixa diversidade genética para ambos os tipos de marcadores utilizados e a ameaça antropogênica ao seu hábitat natural somados a uma área de ocorrência restrita fazem dela uma espécie preferencial para conservação. *Calibrachoa sendtneriana* apresentou índices de diversidade moderados comparados com outras espécies do gênero (restritas ou amplamente distribuídas), associados a uma população geneticamente homogênea ao longo de sua distribuição. Somado a isso há a ameaça de erosão genética devido à hibridação com *C. sellowiana* ao longo das gerações, e a alteração de seu hábitat por queimadas e pastejo.

*Calibrachoa serrulata* pode, assim como *Petunia secreta* Stehmann & Semir (Turchetto *et al.*, 2016), tratar-se de uma espécie naturalmente rara, com ocorrência restrita e pequeno tamanho populacional, mas com alta diversidade genética. Devido ao local de difícil acesso no qual se desenvolve, *C. serrulata* apresenta menor risco de perder seu hábitat, quando comparada com as outras espécies-alvo, visto que não existem atividades (agrícolas, pecuárias, turismo, etc.) desenvolvidas nos paredões rochosos onde a espécie cresce. As maiores ameaças à espécie são o endocruzamento e a possível perda de sua identidade genética devido ao cruzamento com outras espécies.

Embora *C. spathulata* tenha apresentado nível significativo de endocruzamento (relacionado à dispersão das sementes, à densidade das populações e à interação com os polinizadores) e déficit de heterozigotos, nenhuma de suas populações visitadas em 2015 apresentou poucos indivíduos se comparadas com as outras espécies, mesmo sendo encontradas em ambientes degradados como beiras de estrada e até mesmo barrancos revolvidos e aparados.

A existência dos híbridos e a probabilidade de que híbridos ocorram há várias gerações torna mais real o risco de perda de identidade e variabilidade genética via introgressão (“genetic swarm” como apresentado por Rhymer & Simberloff, 1996) em *C. sendtneriana* e *C. serrulata*. A captura de cloroplasto via hibridização e introgressão pode ser mais frequente em espécies simpátricas (Acosta & Premoli, 2010), principalmente dentro das populações/espécies de tamanho populacional menor, pois estas estão sujeitas a um maior aporte de pólen proveniente da espécie com maior tamanho populacional (Ellstrand & Elam, 1993), com indivíduos híbridos servindo também como uma nova fonte de pólen externo (Levin *et al.*, 1996), fazendo com que indivíduos dentro de populações pequenas e esparsas apresentem maiores dificuldades de encontrar membros da mesma espécie para cruzamento (Rhymer & Simberloff, 1996).

Nada foi inferido a respeito dos híbridos além de sua existência, caracteres morfológicos e seus alelos para os marcadores utilizados neste estudo. Não se pode afirmar que os híbridos produzam descendentes capazes de sobreviver e se reproduzir, quer com eles mesmos ou com as espécies parentais. *Calibrachoa* é um gênero de espécies perenes (Stehmann, 1999), com os híbridos formados supostamente indivíduos perenes também, podendo então existir como parte das populações. Assumindo que os híbridos sejam compatíveis com o polinizador, se os híbridos encontrados são estéreis, o maior risco para *C. sendtneriana* e *C. serrulata* é o desperdício de seus gametas (Rhymer & Simberloff, 1996; Allendorf *et al.*, 2001) quando investidos na formação de híbridos, não produzindo descendentes para a perpetuação das espécies (Levin *et al.*, 1996). Se os híbridos são capazes de originar uma prole viável, então hibridização seguida de introgressão se torna um fator preocupante para a conservação das espécies (Rhymer & Simberloff, 1996; Allendorf *et al.*, 2001). Pequenas populações com baixa diversidade genética são mais suscetíveis à influência de propágulos externos (Loveless *et al.*, 1984; Levin *et al.*, 1996), quer sejam pólen ou sementes. Isto pode resultar em depressão exogâmica se os alelos/genótipos inseridos afetarem a capacidade da população local de se adaptar ao meio (Rhymer & Simberloff, 1996).

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo foi um dos primeiros a descrever a variabilidade genética intraespecífica de espécies de *Calibrachoa* para marcadores plastidiais e nucleares. As quatro espécies aqui envolvidas são endêmicas, com pequenas populações e diferentes níveis de diversidade genética e estruturação populacional. A variabilidade genética, o fluxo gênico e a estrutura genética para as quatro espécies foram acessadas através do uso de marcadores plastidiais e nucleares, bem como a diagnose de eventos evolutivos possivelmente responsáveis por tais informações inerentes às espécies.

*Calibrachoa eglandulata* é encontrada apenas no município de Urubici (SC) e apresentou os menores valores para os índices de diversidade calculados neste estudo. Apresenta estruturação populacional com três *clusters* genéticos distintos, resultado do fluxo gênico restrito e distância geográfica entre as populações. O hábitat desta espécie é o mais perturbado dentre as analisadas (observação em campo), com a maior de suas populações encontrada na beira de uma estrada em vias de asfaltamento. A realização de um estudo futuro com mais marcadores para reavaliar a diversidade genética da espécie seria um excelente estudo de caso com espécies nativas sob o efeito da interferência humana no hábitat. Também se sugere avaliar a existência de híbridos entre *C. eglandulata* e *C. sellowiana*. Indivíduos de *C. sellowiana* são encontrados na população “SC-370” lado a lado com *C. eglandulata*. Devido aos diferentes relatos de possíveis híbridos em *Calibrachoa* (Fregonezi, 2009), essa investigação é válida. Finalmente, uma avaliação do grau de ameaça da espécie se faz necessária considerando a baixa diversidade, o tamanho populacional reduzido e a destruição de seu hábitat.

*Calibrachoa sendtneriana* necessita de uma estimativa refinada de seu tamanho populacional para que seu status de ameaça seja revisto (atualmente Deficiente de Dados), incluindo os dados obtidos neste trabalho na avaliação do status. A espécie possui populações e indivíduos esparsamente distribuídos na borda dos cânions da Serra do Rio do Rastro, em Bom Jardim da Serra e Bom Retiro, apresentando alto fluxo gênico e um único *cluster* genético. Com quase a totalidade da variação encontrada na espécie distribuída dentro e não entre as populações, é aconselhável que diversas populações sejam preservadas visando a retenção da diversidade (Ellstrand & Elam, 1993), caso um plano de manejo seja sugerido para a espécie no futuro. Um levantamento populacional preciso e estudos sobre os polinizadores e mecanismos de polinização para esta espécie se fazem extremamente necessários para a compreensão de como se dá a manutenção e distribuição de sua diversidade.

*Calibrachoa serrulata* requer principalmente maiores esforços na busca, identificação e coleta de novos indivíduos e populações, em específico a população do rochedo que, especula-se, tratar de *C. serrulata*. Como *C. sendtneriana*, a espécie apresenta apenas um *cluster* genético, com a variação genética encontrada distribuída dentro das populações, fazendo com que também seja dada prioridade para a preservação do maior número de populações caso um plano de manejo venha a ser sugerido. Estudos detalhados sobre a polinização e germinação dessa espécie são de extremo interesse considerando seu crescimento nos paredões rochosos. Uma revisão de seu status de ameaça deve ser feita englobando os dados aqui adquiridos.

*Calibrachoa spathulata* aparenta ser a espécie menos ameaçada dentre as quatro. Suas populações foram as que apresentaram os maiores números de indivíduos (observação em campo), mesmo em locais muito antropizados (beiras de estrada, barrancos, estradas de chão). Estudos sobre sua ecologia devem ser realizados para contribuir para o conhecimento a respeito da espécie, bem como maiores esforços de busca por novas populações e a revisão taxonômica da população encontrada em Laguna.

Com relação aos supostos híbridos encontrados em Bom Jardim da Serra, diferentes estudos devem ser realizados buscando elucidar sua origem: a morfologia dos híbridos deve ser descrita, bem como a viabilidade de sua prole e a capacidade de cruzar entre si e com os parentais; um estudo de polinização, buscando identificar qual polinizador é responsável pela formação dos híbridos; análise de um maior número de marcadores polimórficos biparentais como os microssatélites e compatíveis com as espécies analisadas, para tentar identificar as espécies parentais (Rhymer & Simberloff, 1996) e acessar a diversidade genética dos híbridos; o sequenciamento extensivo de amostras de *C. sellowiana* de Bom Jardim da Serra e de populações de regiões distintas, para caracterizar a diversidade genética desta espécie.

Espera-se que este estudo contribua para o estudo da diversidade genética em espécies endêmicas e restritas, servindo principalmente como fonte de informação para futuras investigações dentro do gênero *Calibrachoa*.

## 7. REFERÊNCIAS

- Acosta, M. C., Premoli, A. C. (2010). Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54: 235–242.
- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., Wenburg, J. K. (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*. 16(11): 613-622.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37–48.
- Barros, M. J. F., Silva-Arias, G. A., Fregonezi, J. N., Turchetto-Zolet, A. C., Iganci, J. R. V., Diniz-Filho, J. A. F., Freitas, L. B. (2015). Environmental drivers of diversity in subtropical highland grasslands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 17: 360-368.
- Behling, H. (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 177: 19-27
- Binks, R. M., Millar, M. A., Byrne, M. (2015). Not all rare species are the same: contrasting patterns of genetic diversity and population structure in two narrow-range endemic sedges. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 114: 873-886.
- Boldrini, I. I., Eggers, L., Mentz, L. A., Miotto, S. T. S., Matzenbacher, N. I., Longhi-Wagner, H. M., Trevisan, R., Schneider, A. A., Setúbal, R. B. (2009). Flora. In: Boldrini I, ed. *Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 39–94.
- Ciéslak, E.; Ciéslak, J.; Szelag, Z., Ronikier, M. (2015). Genetic structure of *Galium cracoviense* (Rubiaceae): a naturally rare species with an extremely small distribution range. *Conservation Genetics*. 16: 929-938,
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772.
- 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.
- Dieringer, D., Schlötterer, C. (2003). MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*. 3: 167–169.

- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. **29**: 1969-1973
- Dunn, I. S., Blattner, F.R. (1987). Charons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*. **15**: 2677-2698.
- Ellstrand, N.C., Elam, D.R. (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 clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. **14**: 2611–2620.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.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., Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. **10**: 564-567.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J. A., Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*. **170**: 53-63.
- Franceschinelli, E. V., Bawa, K. S. (2000). The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity*. **80**: 116-123.
- Fregonezi, J. N. História evolutiva do gênero *Calibrachoa* (La Llave & Lex.) Cerv. (Solanaceae). (2009). 197 p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Fregonezi, J. N., Freitas, L. B., Bonatto, S. L., Semir, J., Stehmann, J. R. (2012). Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence. *Taxon*. **61**: 120-130.
- Fregonezi, J. N., Turchetto, C., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2013). Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas Grassland. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **171**: 140–153.
- Gitzendanner, M. A., Soltis, P. S. (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*. **87**: 783-792.

- Glaubitz, J.C. (2004). CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*. 4: 309-310.
- Goudet, J. (1995). FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 86: 485–486.
- Hamilton, M. B. (1999). Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*. 8: 513-525.
- Harrison, R. (2014). Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. *Journal of Heredity*. 105: 795–809.
- Iganci, J. R. V., Heiden, G., Miotto, S. T. S., Pennington, R. T. (2011). Campos de Cima da Serra: the Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 167: 378–393
- Iriarte, J., Behling, H. (2007). The expansion of *Araucaria* forest in the southern Brazilian highlands during the last 4000 years and its implications for the development of the Taquara/Itararé tradition. *Environmental Archaeology*. 12: 115-127.
- Jakob, S. S., Blattner, F. R. (2006). A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): Long-term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction, and the consequences for phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*. 23: 1602–1612.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellog, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. *Sistemática Vegetal – Um enfoque filogenético*. Porto Alegre, Artmed, 3<sup>a</sup> ed., 2009, 632 p.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 16: 1099–1106.
- Kunin, W. (1997). Population size and density effects in pollination: pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. *Journal of Ecology*. 85: 225-234.
- Levin, D. A., Francisco-Ortega, J., Jansen, R. K. (1996). Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology*. 10: 10-16.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology*. 11: 2453-2465.

- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452
- Longo, D., Lorenz-Lemke, A. P., Mäder, G., Bonatto, S. L., Freitas, L.B. (2014). Phylogeography of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 174: 199-213.
- Lorenz-Lemke, A. P., Mäder, G., Muschner, V. C., Stehmann, J. R., Bonatto, S. L., Salzano, F. M., Freitas, L. B. (2006). Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): A molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology*. 15: 4487-4497.
- Lorenz-Lemke, A. P., Togni, P. D., Mäder, G., Kriedt, R. A., Stehmann, J. R., Salzano, F. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2010). Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: A phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology*. 19: 5240–5251.
- Loveless, M. D., Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15: 65-95
- Mäder, G., Fregonezi, J. N., Lorenz-Lemke, A. P., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2013). Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evolutionary Biology*. 13: 178.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 7: 639–655.
- Martinelli, G., Moraes, M. A. (Orgs.) Livro Vermelho da Flora do Brasil. Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1ª. ed., 2013, 1100 p.
- Ng, J., Smith, S. D. (2016). Widespread flower color convergence in Solanaceae via alternate biochemical pathways. *New Phytologist*. 209: 407-417.
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Abdel-Migid, H., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*. 57: 1159-1181.
- Olmstead, R. G. (2013). Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 171: 80–102.

- Overbeck, G. E., Müller, S. C., Fidelis, A., Pfadenhauer, J., Pillar, V. D., Blanco, C. C., Boldrini, I. I., Both, R., Forneck, E. D. (2007). Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 9: 101–116
- Peakall, R., Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- Pillar, V. P., Müller, S. C., Castilhos, Z. M. S., Jacques, A. V. A. (Editores) Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2009. 403 p.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945–959.
- Ramos-Fregonezi, A. M. C., Fregonezi, J. N., Cybis, G., Fagundes, N. J. R., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2015). Were sea level changes during the Pleistocene in the South Atlantic Coastal Plain a driver of speciation in *Petunia* (Solanaceae)? *BMC Evolutionary Biology*. 15: 92.
- Reck-Kortmann, M., Silva-Arias, G. A., Segatto, A. L. A., Mäder, G., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2014). Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 81: 19-28
- Reck-Kortmann, M., Silva-Arias, G. A., Stehmann, J. R., Greppi, J. A., Freitas, L. B. (2015) Phylogenetic relationships of *Petunia patagonica* (Solanaceae) revealed by molecular and biogeographical evidence. *Phytotaxa*. 222: 17-32.
- Reis, G. S., Mizusaki, A. M., Roisenberg, A., Rubert, R. R. (2014). Formação Serra Geral (Cretáceo da Bacia do Paraná): um análogo para os reservatórios ígneo-básicos da margem continental brasileira. *Pesquisas em Geociências*. 41: 155-168.
- Rhymer, J. M., Simberloff, D. (1996). Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 27: 83-109.
- 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.
- Sang, T., Crawford, D. J., Stuessy, T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*. 84: 1120-1136.

- Segatto, A. L. A., Ramos-Fregonezi, A. M. C., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2014a) Molecular insights into the purple-flowered ancestral of garden petunias. *American Journal of Botany*. 101: 119-127.
- Segatto, A. L. A., Cazé, A. L. R., Turchetto, C., Klahre, U., Kuhlemeier, C., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2014b) Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 70: 504-512.
- Shirk, R. Y., Hamrick, J. L., Zhang, C., Qiang, S. (2014). Patterns of genetic diversity reveal multiple introductions and recurrent founder effects during range expansion in invasive populations of *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). *Heredity*. 112: 497-507.
- Stehmann, J. R. 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. 1999. 230 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Stehmann, J. R., Semir, J. (2005). New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. In: R. C. Keating, V. C. Hollowell and T. B. Croat (Eds.) *Festschrift for William G. Darcy: The Legacy of a Taxonomist*. Missouri Bot. Garden Press, Missouri, pp. 341-348.
- Silva-Arias, G. A., Mäder, G., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2015). Novel microsatellites for *Calibrachoa heterophylla* (Solanaceae) endemic to the South Atlantic Coastal Plain of South America. *Applications in Plant Sciences*. 3: 1500021.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729
- Tsitrone, A., Kirkpatrick, M., Levin, D. A. (2003). A model for chloroplast capture. *Evolution*. 57: 1776-1782
- Tsukamoto, T., Ando, T., Watanabe, H., Kokubun, H., Hashimoto, G., Sakazaki, U., Suárez, E., Marchesi, E., Oyama, K., Kao, T. (2002). Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). *Journal of Plant Research*. 115: 185-193.
- Turchetto, C., Fagundes, N. J. R., Segatto, A. L. A., Kuhlemeier, C., Neffa, V. G. S., Speranza, P. R., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2014). Diversification in the South

- American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology*. 23: 374-389.
- Turchetto, C., Segatto, A. L. A., Beduschi, J., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2015). Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants*. 7: plv084.
- Turchetto, C., Segatto, A. L. A., Mäder, G., Rodrigues, D. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2016). High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: implications for conservation. *AoB Plants*. 8: plw002.
- Van der Pijl, L. (1982). Principles of dispersal in higher plants. Springer-Verlag, New York. 3<sup>rd</sup>. Edition. 153 p.
- Wijsman, H. J. W. & Jong, J.H. (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. IV. Hybridization and nomenclatural consequences in the *Petunia* group. *Acta Botanica Neerlandica*. 34: 337-349.