

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESTUDOS FILOGENÉTICOS E FILOGEOGRÁFICOS NOS GÊNEROS
ATHENAEA Sendtn. E *AURELIANA* Sendtn. (SOLANACEAE)

PRISCILLA MENA ZAMBERLAN

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

Orientação: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre, fevereiro de 2012.

Instituições e fontes financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com apoio financeiro do CNPq; Programa Especial em Taxonomia CNPq-CAPES-MCT; CAPES; FAPERGS; PROPESQ-UFRGS e PPGBM. Os sequenciamentos e as genotipagens foram conduzidos no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Para a minha família.

Agradecimentos

Agradeço à professora Loreta Brandão de Freitas pela orientação e apoio ao longo dos últimos anos. Agradeço também ao professor João Renato Stehmann pela ideia do projeto e por toda a ajuda durante o desenvolvimento da tese.

Agradeço a Gloria Barboza, Julie Dulith, Pedro Laje Viana, Leandro Giacomini, Geraldo Mäder, Verônica Thode, Izabella Martins Costa Rodrigues, Jéferson Fregonezi, Aline Fregonezi, Ana Lúcia Segatto e Juarez Zamberlan, meu pai, pelo auxílio na realização das coletas.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Evolução Molecular da UFRGS pela ajuda, amizade e incentivo durante estes anos, em especial a Ana Luiza Cazé, Raquel Kriedt, Aline Fregonezi, Jéferson Fregonezi, Verônica Thode, Michele Silveira da Silva, Luana Castro, Geraldo Mäder, Ana Lúcia Segatto, Caroline Turchetto e Maickel Reck.

Agradeço à Michele Silveira da Silva e Luana Castro, alunas de iniciação científica que participaram deste projeto, por todo o auxílio prestado.

Agradeço ao professor Richard Olmstead pelo envio de amostras e pelo incentivo para a execução do projeto.

Agradeço aos professores Eduardo Eizirk, Maurício Bogo e Sandro Bonatto, da PUCRS, pelo apoio durante a fase de redação da tese.

Agradeço aos órgãos financiadores, aos funcionários e professores Programa do Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e à UFRGS.

Agradeço à minha família por tudo, sempre. Pai, Piu, mãe Zoila, João: amo vocês. Agradeço também à família do João pelo incentivo e amizade ao longo dos últimos anos.

Aos amigos da Bio para sempre, Luciana Fusinato, Melina Grassotti, Juliano Morales, Adriana Leonhard, Marcelo Ganzella, Lucas Dedavid, Paloma Menguer, Marcos Daruy, Ana Pressi, Fabi Schneck, Ana Paula Moraes e Ana Cristina Arend, meu agradecimento pela amizade e pedido de desculpas pela ausência no último ano. Saudade imensa de todos vocês. Aos amigos Marcelo Kiefer e Janaína Dalarosa, Izabella Martins Costa Rodrigues, a outra “aureliánóloga” do Brasil, e aos novos amigos da PUCRS, em especial Taiana Haag, Tiago Ferraz e Adriana Giongo, obrigada também por todo o apoio.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	
A família Solanaceae Juss.	9
Os gêneros da subtribo Withaninae	12
Os gêneros <i>Athenaea</i> e <i>Aureliana</i>	13
A Mata Atlântica	21
Filogenias de plantas a partir de dados moleculares	23
Análises filogeográficas	27
Justificativa	28
Objetivos	29
Artigo 1. “First insights into <i>Aureliana</i> and <i>Athenaea</i> (Solanaceae) phylogeny: subtribe position and diversification age”	30
Artigo 2. “The phylogeography of the Atlantic Forest shrub <i>Aureliana fasciculata</i> (Solanaceae)”	60
Artigo 3. “Microsatellites in <i>Aureliana fasciculata</i> var. <i>fasciculata</i> (Solanaceae), a shrub that inhabits Atlantic Rainforest”	90
Discussão Geral	
Análise filogenética	99
Biogeografia	101
Análise filogeográfica	102
Taxonomia	103
Referências Bibliográficas	105

Resumo

Os gêneros *Athenaea* e *Aureliana* (Solanaceae) são compostos por sete e oito espécies, respectivamente, e os mesmos são distintos pela presença do cálice acrescente, que envolve o fruto, nas espécies de *Athenaea*. Suas plantas são arbustos com flores brancas com máculas esverdeadas ou roxas. A espécie mais abundante do grupo é *Aureliana fasciculata*, que ocorre ao longo de toda a Mata Atlântica. As demais espécies são raras. *Athenaea* e *Aureliana* são considerados gêneros irmãos, de acordo com a mais recente análise filogenética da família Solanaceae, e pertencem à subtribo Withaninae. Esta subtribo apresenta uma distribuição intrigante, pois é composta por apenas sete gêneros que ocorrem na América do Sul, Eurásia, norte da África e Ásia, além do arquipélago do Havaí, da Ilha de Santa Helena e das Ilhas Canárias. O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o conhecimento das relações evolutivas entre as espécies dos gêneros *Aureliana* e *Athenaea*. Para isso, foram realizadas a análise filogenética e a datação a partir de dados moleculares dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana*, incluindo os demais gêneros da subtribo Withaninae, além da análise filogeográfica de *Aureliana fasciculata*. Para as análises filogenéticas foram sequenciadas cinco regiões do genoma plastidial (gene *ndhF*, intron *trnL* e os espaçadores plastidiais *trnL-trnF*, *psaI-accD* e *trnC-ycf6*). Os resultados obtidos indicam que a diversificação das espécies dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana* a partir de um ancestral comum ocorreu cerca de 3,9 milhões de anos atrás. Não foram detectados clados correspondentes a cada um dos gêneros. Para a análise filogeográfica de *Aureliana fasciculata* foram sequenciados os espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*. Foram detectados quatorze haplótipos em 112 indivíduos da espécie, que também apresentou sinais de estruturação geográfica, com moderado isolamento por distância. Uma putativa barreira Norte/Sul entre os haplótipos, localizada ao sul do rio Doce (Espírito Santo, Brasil) também foi inferida. Uma expansão populacional há cerca de 50–60 mil anos atrás foi detectada, o que coincide com registros palinológicos de expansão da área florestal na Mata Atlântica. Os eventos históricos que moldaram a distribuição e demografia atual de *Aureliana fasciculata* são anteriores ao último máximo glacial e parecem estar relacionados a eventos climáticos do Pleistoceno. Por último, foi construída e validada uma biblioteca enriquecida em microssatélites de *Aureliana fasciculata*. Foram descritos sete pares de “primers” polimórficos, com três alelos por locus, em média, e

heterozigosidade observada entre 0,05 e 1,00. A ampliação da amostragem e a utilização de marcadores moleculares de evolução mais rápida poderão trazer informações ainda mais completas sobre a taxonomia e história evolutiva dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana*.

Abstract

Athenaea and *Aureliana* (Solanaceae) genera are composed by seven and eight species, respectively. The character that distinguishes both genera is the presence of accrescent calyx, which involves the fruit, in *Athenaea* species. The plants are shrubs with white flowers and green or purple stains. The most abundant species of the group is *Aureliana fasciculata*, which occurs along the Atlantic Rainforest. All remaining species are rare. Both genera are considered as sister groups, according to the most recent phylogenetic analysis of Solanaceae family, and they both belong to subtribe . This group presents a puzzling distribution. It is composed by seven genera that occur in South America, Eurasia, North of Africa and Asia, plus Hawaiian Archipelago and St. Helena and Canary Islands. The main goal of the present study is to contribute to the knowledge of the evolutive relationship among the species of *Athenaea* and *Aureliana*. In order to do this, a phylogenetic analysis and molecular dating based on molecular data was performed, including *Athenaea* and *Aureliana* species, plus subtribe Withaninae representatives. The phylogeography of *Aureliana fasciculata* was also investigated. Five plastidial genomic regions (*ndhF* gene, *trnL* intron, and *trnL-trnF*, *psaI-accD* and *trnC-ycf6* intergenic spacers) were employed to the phylogenetic analysis. The obtained result indicates that the diversification of *Athenaea* and *Aureliana* species from their common ancestor occurred circa 3.9 million years ago. Clades corresponding to each genus were not detected. The *trnH-psbA* and *trnS-trnG* plastidial spacers were employed to perform phylogeographic analysis of *Aureliana fasciculata*. Fourteen haplotypes were detected among 112 individuals. The species displayed signs of geographic structure and moderate isolation by distance. A putative barrier among North/South haplotypes, located south of the Doce River (Espírito Santo, Brazil), was also inferred. A populational expansion circa 50 – 60 thousand years ago was detected, which agrees with palinological information regarding forest area expansion at the same period at the Atlantic Rainforest. The historical events that shaped the present geographic pattern and demography are older than the Last Glacial Maximum, and they seem to be related to Pleistocene climatic events. At last, a microsatellite-enriched library was constructed and validated to *Aureliana fasciculata*. Seven pairs of polymorphic microsatellite primers were described, which displayed three alleles per locus, on average, and observed heterozygosity that ranged from 0.05 to 1.00. A broader sampling and the use of rapidly evolving molecular markers may provide more

complete information about the taxonomy and evolutive history of *Athenaea* and *Aureliana* genera.

Introdução

A Família Solanaceae Juss.

A família Solanaceae, inserida na ordem Solanales ex Bercht. & J. Presl, pertence ao grupo das plantas eudicotiledôneas (Judd *et al.* 1999, Soltis *et al.* 2005, APG III 2009). A família compreende aproximadamente 100 gêneros e cerca de 2500 espécies, dispersas em quase todas as regiões do mundo (D'Arcy 1991, Hunziker 2001, Olmstead & Bohs 2007, Olmstead *et al.* 2008).

A importância econômica da família Solanaceae é amplamente reconhecida. Diversas espécies são cultivadas para alimentação humana (Hawkes 1999). A batata (*Solanum tuberosum* L.), por exemplo, é a planta comestível da família Solanaceae mais cultivada no mundo (FAO 2010). Também são plantas alimentícias cultivadas as pimentas e pimentões (do gênero *Capsicum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e a berinjela (*Solanum melongena* L.), entre outras. O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) tem grande importância econômica, tanto pelos dividendos gerados no seu cultivo e industrialização, como pelos gastos dedicados aos tabagistas na área de saúde pública (ver, por exemplo, Pinto & Ugá 2010). Algumas plantas da família produzem compostos secundários tóxicos, como o tropano, e alcaloides esteroidais (Wink 2003, Eich 2008). Diversas de suas espécies têm uso medicinal (Pio Corrêa 1974) e há plantas de amplo uso ornamental, como as dos gêneros *Brunfelsia* L., *Cestrum* L., *Datura* L., *Petunia* Juss., *Calibrachoa* La Llave & Lex e *Physalis* L. (Heiser Jr. 1984, Roddick 1991, Hawkes 1999).

As plantas da família Solanaceae são ervas, arbustos, árvores ou lianas, geralmente com floema interno. As folhas são alternas e simples, às vezes com lobos profundos e, geralmente, distribuídas aos pares. As flores são frequentemente pentâmeras, bissexuadas e apresentam simetria radial, atraindo diversas espécies de abelhas, vespas, moscas, borboletas e mariposas, que atuam como polinizadores (Judd *et al.* 1999). Os gêneros mais especiosos são *Solanum* L. (com 1400 espécies), *Lycianthes* (Dunal) Hassl. (200), *Cestrum* L. (175), *Nicotiana* L. (100) e *Physalis* L. (100).

A família Solanaceae é consideravelmente mais diversificada na América do Sul do que em outros continentes e subcontinentes. Há cerca de 50 gêneros descritos para a região, sendo ao menos 10 considerados endêmicos (Hunziker 1979, Hunziker 2001). A flora brasileira também é rica em espécies de Solanaceae. Estima-se que ocorram pelo

menos 34 gêneros e cerca de 460 espécies no país (Stehmann *et al.* 2012). Existem registros de ocorrência de apenas oito gêneros da família no continente africano, sendo um endêmico. Para a Ásia constam registros de ocorrência de nove gêneros, somente um endêmico também. Na Austrália ocorrem sete gêneros endêmicos, e 18 espécies de *Nicotiana* (que apresenta também uma espécie na África e mais de 40 na América).

A idade média estimada para a família Solanaceae, através de datação molecular, é de 38 milhões de anos (Bell *et al.* 2010). Essa idade é mais recente que os eventos de separação de Gondwana, que ocorreu entre 220 e 200 Ma (milhões de anos) (Lavina & Fauth 2010). Além disso, o fóssil mais antigo de Solanaceae do qual há conhecimento, *Cantisolanum daturoides* EM Reid and MEJ Chandler, é atribuído ao Eoceno (33,9 – 55,8 Ma) (Collinson *et al.* 1993). Olmstead *et al.* (2008) indicaram que os eventos de dispersão de sementes a longa distância, embora de difícil comprovação, podem explicar, associados a outros elementos, a biogeografia de Solanaceae. Esses eventos são mais comuns em relevos terrestres abertos, e são atribuídos à ação de grandes animais terrestres migratórios, fenômenos meteorológicos extremos, correntes oceânicas e transporte por humanos (revisado por Nathan *et al.* 2008 e Gillespie *et al.* 2012). Eventos desse tipo já foram inferidos com relativa confiança para plantas das famílias Brassicaceae Burnett (Devaux *et al.* 2005), Gentianaceae Juss. (Yuan *et al.* 2005) e Orobanchaceae Vent. (Tank & Olmstead 2009), entre diversas outras.

Uma relevante sinopse da família Solanaceae foi publicada no ano de 2001 pelo pesquisador argentino Armando Teodoro Hunziker. A título de comparação, a monografia anterior da família havia sido publicada em 1891 (Wettstein 1891). Hunziker reconheceu 92 gêneros e enumerou seis subfamílias: Cestroideae Burnett (oito tribos, 23 gêneros, ca. 480 espécies), Juanolloideae (Hunz.) Hunz. (uma tribo, nove gêneros, ca. 40 espécies), Solanoideae Kostel. (nove tribos, 50 gêneros, cerca de 1730 espécies), Salpiglossoideae (Benth.) Hunz. (uma tribo, um gênero, seis espécies), Schizanthoideae (Miers.) Hunz. (uma tribo, um gênero, 12 espécies) e Anthocercidoideae (G. Don) Tétényi (uma tribo, sete gêneros, 31 espécies), totalizando ca. 2300 espécies. Anteriormente, as espécies de Solanaceae eram classificadas em duas grandes subfamílias, conforme a morfologia do embrião e das sementes: Cestroideae e Solanoideae (Hunziker 1979). Uma subfamília adicional, Nolanoideae, foi elevada à categoria de família, Nolanaceae Bercht. & J. Presl, por alguns taxonomistas (Cronquist 1981, Hunziker 2001).

Alguns gêneros da família Solanaceae já foram alvo de estudos filogenéticos detalhados, entre os quais se destacam *Calibrachoa* (Fregonezi 2009, Fregonezi *et al.* 2012), *Lycium* L. (Miller 2002, Levin & Miller 2005), *Nicotiana* (Aoki & Ito 2000, Clarkson *et al.* 2004), *Nierembergia* Ruiz & Pav. (Tate *et al.* 2009), *Nolana* L.f. (Dillon *et al.* 2007, Tu *et al.* 2008) *Petunia* (Ando *et al.* 2005, Kulcheski *et al.* 2006, Chen *et al.* 2007), além de *Capsicum* L. (Reifschneider 2000, Walsh & Hoot 2001, Moscone *et al.* 2007, Perry *et al.* 2007) e *Solanum* (Bohs & Olmstead 1997, Olmstead & Palmer 1997, Van den Berg *et al.* 1998, Spooner *et al.* 2000, Volkov *et al.* 2003, Levin *et al.* 2005, Levin *et al.* 2006, Bohs 2007, Weese & Bohs 2007, Mercedes & Spooner 2010, Tepe & Bohs 2010, entre outros), este último bastante estudado devido a grande importância econômica. Também foram publicados trabalhos com análises filogenéticas visando o entendimento da biogeografia de grupos de Solanaceae, como o dos gêneros *Lycium* (Fukuda *et al.* 2001), *Physalis* e *Witheringia* L'Hér. (Paape *et al.* 2008), da seção *Suaveolentes* Goodsp. do gênero *Nicotiana* (Ladiges *et al.* 2011) e o das tribos Hyoscyameae Endl. e Mandragoreae (Wettst.) Hunz. & Barboza (Tu *et al.* 2010).

No ano de 2008, foi publicada uma filogenia molecular da família Solanaceae gerada a partir de sequências de duas regiões do DNA plastidial, o gene que codifica a subunidade F da enzima NADH desidrogenase (*ndhF*) e a região conhecida por *trnLF*, que compreende o gene de RNA transportador de leucina (*trnL*) mais o espaçador entre este e o gene do RNA transportador de fenilalalina (*trnF*) (Olmstead *et al.* 2008). A filogenia incluiu representantes de 89 gêneros da família. Os resultados deste trabalho evidenciaram que os gêneros das famílias Goetzeaceae Miers, Duckeodendraceae Kuhl., Nolanaceae e Sclerophylaceae Miers, na verdade fazem parte de Solanaceae. A subfamília Solanoideae mostrou-se monofilética também. Foi descrita neste trabalho a subtribo Withaninae Bohs & Olmstead. As espécies deste grupo são ervas, arbustos ou árvores, primariamente do Velho Mundo. As flores se apresentam em fascículos axilares, e o pedúnculo é ausente. As corolas são campanuladas, urceoladas, rotadas ou salveformes. A subtribo inclui os gêneros *Withania* Pauq., *Athenaea* Sendtn., *Aureliana* Sendtn., *Discopodium* Hochst., *Nothoestrum* A. Gray, *Mellissia* Hook e *Tubocapsicum* Makino.

Os gêneros da Subtribo Withaninae

O gênero *Withania* é composto por aproximadamente 20 espécies, que ocorrem na Europa, Ásia e África (Hunziker 2001). Apesar de não ser muito especioso, a taxonomia do gênero ainda não é clara. Hepper (1991) considerou o gênero como composto por nove espécies, todas de ocorrência restrita a áreas secas. Hunziker (1995) expandiu o gênero, adicionando mais nove espécies, consideradas anteriormente membros de *Mellissia* ou de *Physalium* Makino. *Mellissia* é um gênero monotípico, endêmico da Ilha de Santa Helena, que havia sido considerado extinto e foi recoletado recentemente (Fay *et al.* 2007). Embora o gênero *Mellissia* seja considerado como válido por Olmstead *et al.* (2008), esses autores reconhecem sua proximidade com *Withania* e deixam a questão de sua inclusão no mesmo em aberto. O gênero *Withania* é bem conhecido pelos numerosos compostos secundários, withanolídeos e alcaloides, que foram isolados das folhas e raízes de *Withania somnifera* (L.) Dunal, planta medicinal popularmente utilizada na África, Índia e Paquistão (Kulkarni & Dhir 2007, Kumar *et al.* 2007). Diversos estudos estão em andamento para validar seu uso como fármaco na medicina ocidental (Davis & Kuttan 2000, Teixeira *et al.* 2006, Ahmad *et al.* 2010, entre outros).

As plantas do gênero *Nothocestrum* são arbustos e árvores com até 6 m de altura. O gênero é endêmico do arquipélago do Havaí (Hunziker 2001, Baldwin & Wagner 2010). Conforme Hunziker (2001), são cinco ou seis as espécies do gênero. Olmstead *et al.* (2008) consideram quatro espécies para o grupo. Seu relacionamento com outros gêneros não foi esclarecido até o momento. Há contagem cromossômica publicada para apenas uma espécie do gênero, *Nothocestrum longifolium* A. Gray, com $n = ca. 24$ (Carr 1985). Hunziker (2001) relatou que *Nothocestrum* foi incluído na subtribo Witheringinae considerando similaridades na morfologia do androécio. Em 2008 o gênero foi incluído na nova subtribo Withaninae (Olmstead *et al.* 2008), a partir de análises filogenéticas de sequências do genoma plastidial.

A única espécie do gênero *Discopodium* é *Discopodium penninervium* Hochst. Sua ocorrência é restrita a montanhas com florestas na região tropical da África (Etiópia, Tanzânia, Quênia, Uganda), em altitudes de 2.000 a 3.000 m. As plantas apresentam de 1 a 2 m altura e podem chegar até 6 m quando árvores. Estudos fitoquímicos registram a presença de withanolídeos também neste gênero (Habtermariam 1997, Habtermariam *et al.* 2000). O gênero *Discopodium* foi incluído na subtribo Witheringinae por Hunziker (2001)

principalmente porque os filamentos não são dilatados na base, na sua inserção na corola. Segundo o mesmo autor, os gêneros *Acnistus* Schott e *Witheringia* parecem ser relacionados a *Discopodium*, embora não próximos.

O gênero *Tubocapsicum* foi considerado por Hunziker (2001) como o único gênero estritamente asiático da família Solanaceae: sua ocorrência é restrita ao leste da Ásia. De acordo com D'Arcy *et al.* (2001), há duas espécies descritas para o gênero, *Tubocapsicum anomalum* (Franch & Sav.) Makino e *Tubocapsicum obtusum* (Makino) Kitamura. É digno de nota o fato de que A. T. Hunziker, em sua monografia sobre a família (2001), considera o gênero monoespecífico. Essa posição também foi adotada por Olmstead *et al.* em seu trabalho de 2008. *T. anomalum* distribui-se por todo leste asiático, enquanto *T. obtusum* estaria restrito ao Japão. As plantas de *Tubocapsicum* são ervas de 0,5 a 1 m de altura (D'Arcy *et al.* 2001, Hunziker 2001). *Tubocapsicum anomalum* se parece muito com os gêneros *Aureliana*, *Capsicum* e *Witheringia* (D'Arcy *et al.* 2001). De acordo com a classificação de Hunziker (2001), o gênero pertence à subfamília Solanoideae, tribo Solaneae, subtribo Iochrominae, juntamente com *Iochroma* Benth., *Saracha* Ruiz & Pav. e *Oryctes* S. Watson. Já de acordo com dados genéticos, o mesmo pertence à subtribo Withaninae (Olmstead *et al.* 2008)).

Além dos gêneros já citados, fazem parte da subtribo Withaninae os gêneros *Athenaea* e *Aureliana*, que serão tratados em um item próprio a seguir.

Os gêneros *Athenaea* e *Aureliana*

Os gêneros *Aureliana* e *Athenaea* apresentam grandes similaridades morfológicas. No passado, ambos foram incluídos em *Bassovia* Aubl., *Capsicum*, *Whinteringia*, *Withania* e até mesmo *Solanum* (Dunal 1852, Miers 1857, Bentham & Hooker 1876, Hiern 1877, Moricand 1937). Atualmente os gêneros são reconhecidos como distintos, resgatando a circunscrição de Sendtner (1846) da *Flora Brasiliensis* (Barboza & Hunziker 1989, Hunziker & Barboza 1990).

As plantas do gênero *Athenaea* são arbustos heliófilos, com 1,5 a 3 m de altura. As folhas e cálices florais apresentam indumento característico, hispido, hirsuto, viloso e com tricomas glandulares. As folhas são geminadas, raramente solitárias, ovadas, elípticas ou lanceoladas. As flores são axilares, pentâmeras, quase dialissépalas, com corola rotada com 5 a 8,5 mm ou 10 a 17 mm, de acordo com a espécie. Possuem pétalas brancas com

máculas arroxeadas ou esverdeadas na superfície interna. O ovário é pubescente ou glabro e os estiletos podem ser heteromórficos (de alturas diferentes) entre diferentes flores do mesmo indivíduo. Os frutos ovoides e com diversas sementes são envolvidos total ou parcialmente pelo cálice (Hunziker 2001). Há uma contagem cromossômica publicada, para *Athenaea picta* (Mart.) Sendtn., de $2n = 24$, $x = 12$ (Gadella *et al.* 1969). São reconhecidas sete espécies para o gênero (Tabela 1), ocorrendo em território brasileiro, nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, do nível do mar até 2.000 m de altitude, em ambientes como capoeiras, clareiras, trilhas na mata e beiras de cursos de água (Hunziker & Barboza 1990, Hunziker 2001). Suas flores, especialmente a corola e o androceu, são muito semelhantes morfológicamente às de *Aureliana* e *Capsicum*, mas o cálice frutífero acrescente encontrado em *Athenaea* é a característica que majoritariamente distingue o gênero dos demais relacionados (Hunziker & Barboza 1990, Hunziker 2001). Todas as espécies do gênero *Athenaea* são endêmicas da Mata Atlântica (Stehmann 2009). Algumas espécies do gênero são retratadas na Figura 1.

Aureliana é um pequeno gênero sul-americano que possui sete espécies, a maior parte delas encontrada nas regiões sudeste e sul do Brasil. As plantas são arbustos ou pequenas árvores (1,5 a 8 m de altura), têm folhas geminadas, ocasionalmente solitárias, de tamanho médio (4,5 a 11,5 cm de comprimento), de forma ovada, quase elíptica, lanceolada, raramente quase ovada ou obovada, acuminada ou obtusa, atenuada na base. As flores são axilares, pentâmeras, com cálice espesso e corola rotada com 5 a 13 mm de altura, e apresentam máculas esverdeadas, arroxeadas ou amarronzadas na superfície interior das pétalas. O ovário geralmente é glabro e os estiletos podem ser heteromórficos entre diferentes flores do mesmo indivíduo. Os frutos são pequenos (1 a 1,5 cm de diâmetro), de forma subglobosa, ovoide ou elipsoidal, com diversas sementes, de cor amarela ou amarelo-alaranjado ou esverdeada quando maduros, com cálice persistente, mas não acrescente. As espécies deste gênero habitam o sub-bosque e clareiras das florestas tropicais e subtropicais, em altitudes que variam do nível do mar até 1800 m (Hunziker 2001). As flores de *Aureliana* são morfológicamente muito semelhantes às de *Athenaea* e *Capsicum*. É possível distinguir as plantas de *Aureliana* das de *Athenaea* através da presença de cálice frutífero acrescente, característico de *Athenaea*. O gênero *Capsicum* diferencia-se de *Aureliana* por apresentar cálice truncado apendiculado e frutos de sabor picante proporcionado pela capsaicina, um metabólito secundário que os frutos

das espécies de *Aureliana* não possuem (Hunziker & Barboza 1990, Hunziker 2001). Há apenas uma contagem cromossômica disponível para o gênero *Aureliana*. *Aureliana sellowiana* (Sendtn.) Barboza & Stehmann apresenta $2n = 24$ ($x = 12$) (Barboza *et al.* 2010).

A área de distribuição das espécies de *Aureliana* coincide parcialmente com a de *Athenaea*, embora seja mais ampla, iniciando no estado da Bahia, até o Rio Grande do Sul, no Brasil, e atingindo o nordeste da Argentina (província de Misiones), Paraguai e Bolívia. A espécie mais abundante é *Aureliana fasciculata* (Vell.) Sendtn., conhecida popularmente no Brasil por “coerana” e “caavurana” (Hunziker 2001). A espécie tem três variedades descritas: *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*, *Aureliana fasciculata* var. *longifolia* (Sendtn.) A.T. Hunz. & Barboza e *Aureliana fasciculata* var. *tomentella* (Sendtn.) Barboza & A.T. Hunz., e atualmente a delimitação das mesmas é bastante confusa, pois as chaves dicotômicas publicadas para a identificação das variedades não contemplam a amplitude de variação morfológica encontrada na natureza. Hunziker e Barboza (1990) publicaram uma sinopse do gênero, reconhecendo cinco espécies. Além destas, mais três espécies foram descritas posteriormente (Carvalho & Bovini 1995; Almeida-Lafetá 2000; Barboza *et al.* 2010). Em 2001, as seguintes espécies de *Aureliana* foram reconhecidas por Hunziker: *Aureliana fasciculata*, *Aureliana wettsteiniana* (Witas.) A.T. Hunz. & Barboza, *Aureliana brasiliiana* (A.T. Hunz.) Barboza & A.T. Hunz., *Aureliana velutina* Sendtn. e *Aureliana tomentosa* Sendt. A espécie *Aureliana angustifolia* Alm.-Lafetá foi considerada sinonímia de *A. brasiliiana*. Para esse autor, *Aureliana* se relaciona mais proximamente com o gênero *Capsicum*. Entre outras similaridades, as estruturas do cálice e do fruto são decisivas para a diferenciação entre os gêneros. As espécies reconhecidas de *Aureliana* são apresentadas na Tabela 2. A Figura 2 mostra imagens de *Aureliana* spp.

Não há consenso sobre o grupo a que pertencem os gêneros *Athenaea* e *Aureliana* na classificação infrafamiliar de Solanaceae. Hunziker (2001), que utilizou no seu sistema de classificação, fundamentalmente, características morfológicas, incluiu *Athenaea* e *Aureliana* na subtribo Capsicinae (tribo Solaneae, subfamília Solanoideae). Além deste, fazem parte de Capsinae *Capsicum*, *Darcyanthus* Hunz., *Eriolarynx* (Hunz.) Hunz., *Vassobia* Rusby, *Larnax* Miers, *Dunalia* Kunth e *Whitania*. Através da análise filogenética de dados moleculares foi proposta outra classificação para os gêneros *Athenaea* e

Aureliana, inicialmente provisória (Olmstead *et al.* 1999) e a seguir de maneira oficial, com a descrição dos grupos (Olmstead *et al.* 2008). Os dois gêneros foram incluídos em um grupo diferente daquele de *Capsicum*, embora ainda na subfamília Solanoideae. Enquanto *Capsicum* foi incluído na tribo Capsiceae, *Athenaea* e *Aureliana* foram incorporados à nova subtribo Withaninae (descrita em 2008). Na análise filogenética baseada nas sequências dos genes *ndhf* e *rbcL*, além de fragmentos de restrição do DNA plastidial, os gêneros *Aureliana* e *Withania* resultaram agrupados, tendo como grupo irmão o gênero *Tubocapsicum* (Olmstead *et al.* 1999). Não foram incluídos nesta análise representantes do gênero *Athenaea*. Posteriormente, em uma análise filogenética a partir das sequências dos genes *ndhF* e *trnL*, incluindo o espaçador *trnL-trnF*, os gêneros *Athenaea* e *Aureliana* se mostraram irmãos. As espécies analisadas do gênero *Withania* tiveram como grupo irmão *Melissia begoniifolia* Hook. e as duas espécies de *Nothoestrum* incluídas na análise tiveram o *Tubocapsicum anomalum* como grupo irmão, e *Discopodium penninervium* como grupo irmão do agrupamento formado pelas três espécies anteriores. Também a relação entre os gêneros *Capsicum* e *Tubocapsicum* é incerta. Zhang & Lu (1999) realizaram um estudo comparativo entre os gêneros *Physalis*, *Capsicum* e *Tubocapsicum*, analisando características morfológicas de pólen, sementes e células da epiderme foliar. Segundo seus resultados, a espécie de *Capsicum* analisada, *Capsicum annuum* L., seria mais basal do que as espécies do gênero *Physalis*, e o gênero *Tubocapsicum* seria mais derivado.

Para o Rio Grande do Sul há registro de ocorrência de uma única espécie do gênero *Athenaea*: *Athenaea picta*, cujo limite sul da distribuição corresponde ao norte do estado, entre as formações de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Decidual, na região do Alto Uruguai. Também constam registros de ocorrência de *Aureliana wettsteiniana*, em área de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Densa, no leste do estado, e de *Aureliana fasciculata* var. *tomentella*, na área similar a de *Athenaea picta* (Soares 2006, Soares *et al.* 2007).

Athenaea e *Aureliana* são gêneros ainda pouco conhecidos. Há apenas uma contagem cromossômica para cada um, e não há estudos de biologia floral. Com base em características morfológicas florais, sem observação direta de polinizadores, Cocucci (1999) descreveu a melitofilia (polinização por abelhas) como a síndrome floral das espécies de *Aureliana* e *Athenaea*. Igualmente não há registros de predadores ou

dispersores de sementes, embora, em função da cor e forma dos frutos, suponha-se que os mesmos sejam predados por morcegos, que realizariam a dispersão das sementes. Está em andamento a revisão morfológica dos dois gêneros (J. R. Stehmann, comunicação pessoal).

Tabela 1. Lista de espécies do gênero *Athenaea*:

Espécie
<i>Athenaea anonacea</i> Sendtn.
<i>Athenaea cuspidata</i> Witas
<i>Athenaea martiana</i> Sendtn.
<i>Athenaea micrantha</i> Sendtn.
<i>Athenaea pereirae</i> Barboza & A.T. Hunz.
<i>Athenaea picta</i> (Mart.) Sendtn.
<i>Athenaea pogogena</i> (Moric.) Sendtn.

Tabela 2. Lista de espécies do gênero *Aureliana*:

Espécie.
<i>Aureliana angustifolia</i> R. C. Almeida-Lafetá
<i>Aureliana brasiliana</i> (A.T. Hunz.) Barboza & A.T. Hunz.
<i>Aureliana darcy</i> Carvalho & Bovini
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>fasciculata</i>
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>longifolia</i> (Sendtn.) A.T. Hunz. & Barboza
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>tomentella</i> (Sendtn.) Barboza & A.T. Hunz.
<i>Aureliana sellowiana</i> (Sendtn.) Barboza & Stehmann
<i>Aureliana tomentosa</i> Sendtn.
<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.
<i>Aureliana wettsteiniana</i> (Witas.) A.T. Hunz. & Barboza

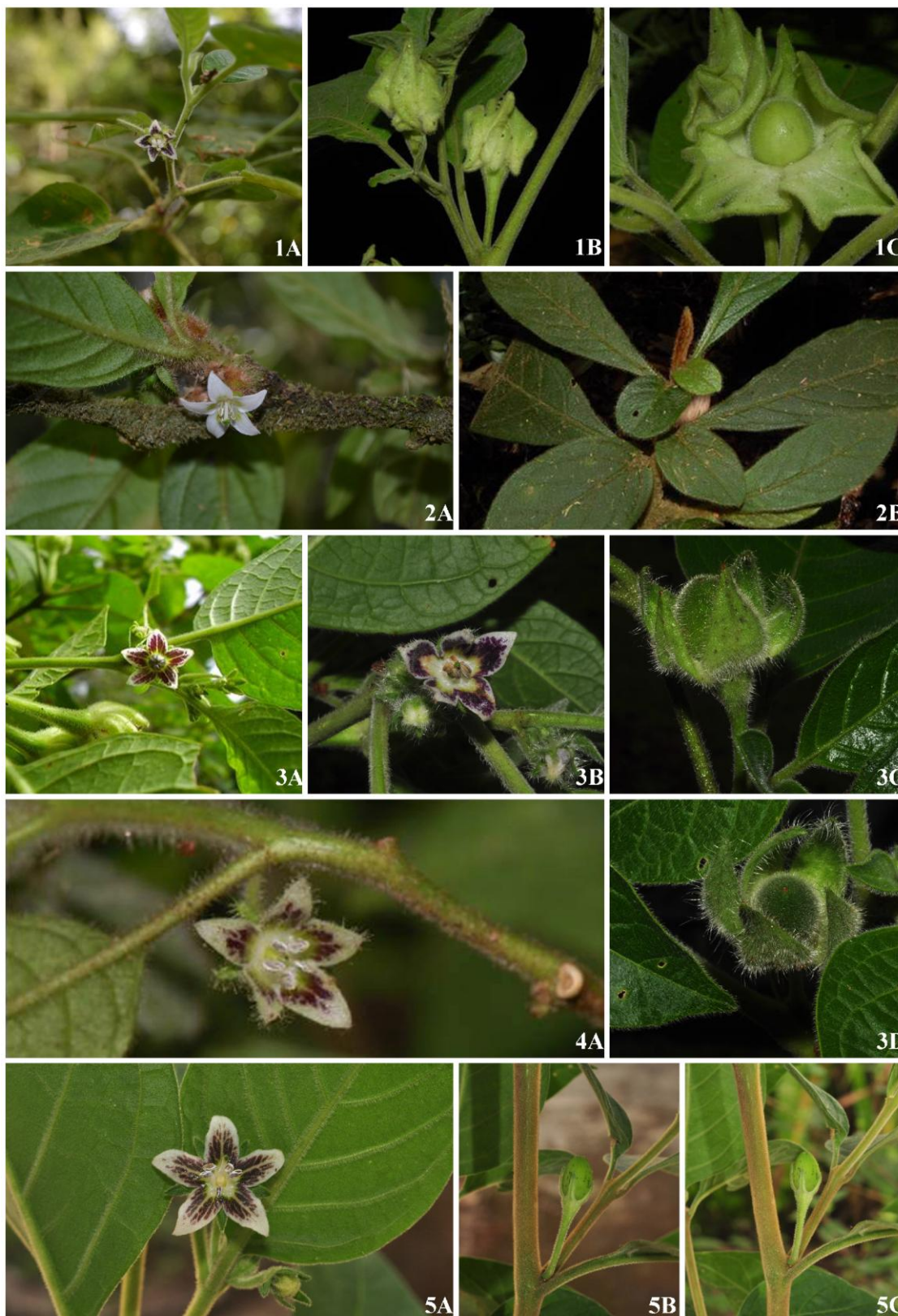


Figura 1. Imagens de *Athenaea cuspidata* (1A – 1C), *Athenaea martiana* (2A, 2B), *Athenaea pogogena* (3A – 3D), *Athenaea micrantha* (4A) e *Athenaea pereirae* (5A – 5C). Fotografias de Leandro Giacomin (1 e 2) e João Renato Stehmann (demais).

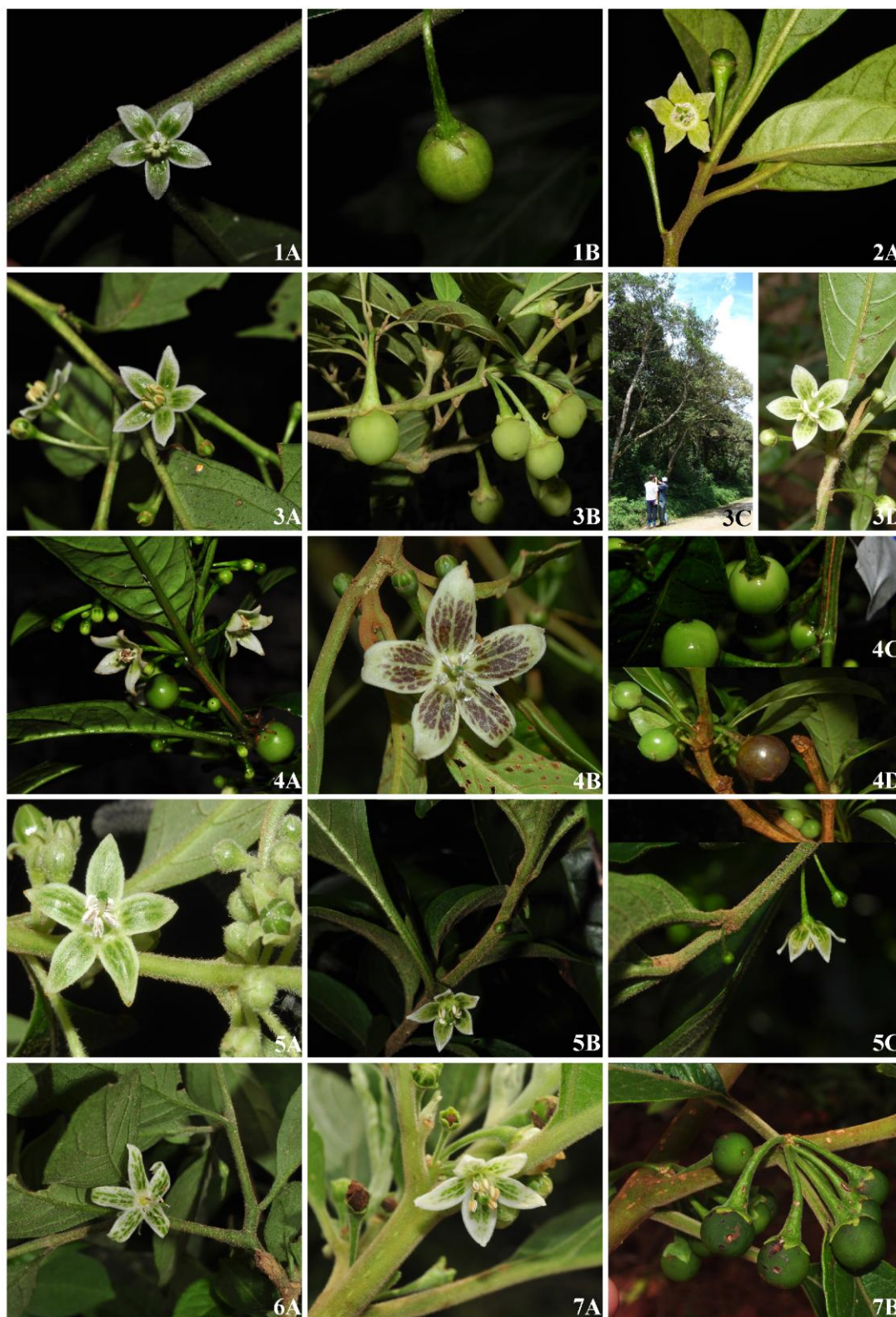


Figura 2. Imagens de *Aureliana brasiliiana* (1A, 1B), *Aureliana darcyi* (2A), *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata* (3A – 3D), *Aureliana fasciculata* var. *longifolia* (4A – 4D), *Aureliana fasciculata* var. *tomentella* (5A – 5C), *Aureliana wettsteiniana* (6A) e *Aureliana velutina* (7A, 7B). Fotografias de Cláudio Nicoletti de Fraga (2A), Verônica Thode (3C) e João Renato Stehmann (demais).

A Mata Atlântica

As formações que compõem a Mata Atlântica, de acordo com o Decreto Federal nº 750/93, são as seguintes: Floresta Ombrófila Densa Atlântica, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, Manguezais, Restingas, Campos de Altitude, Brejos Interioranos e Encraves Florestais no Nordeste. As florestas ombrófilas, com aspecto de floresta típica tropical pluvial, são as vegetações popularmente associados à Mata Atlântica. Segundo Tonhasca (2005), esse agrupamento de ecossistemas não é tecnicamente apropriado, mas acaba por tornar-se benéfico sob o ponto de vista conservacionista, uma vez que o Domínio Atlântico, o conjunto de formações legalmente consideradas, torna-se mais amplo e tem proteção assegurada pela legislação.

A origem da Mata Atlântica remonta, em última instância, ao soerguimento dos Andes (segundo Tonhasca 2005). Na costa oeste da América do Sul ocorreu o encontro de duas placas tectônicas: a placa de Nazca, que se moveu para leste, e a placa sul-americana, que se deslocou em direção ao oeste. Na área de convergência, a placa de Nazca mergulhou sob a placa sul-americana, empurrando a segunda para cima (Kious & Tilling 1996). Em diversos momentos ao longo do período Cretáceo, especialmente no Cenozóico, a porção da crosta localizada sobre a área de convergência se elevou, originando a Cordilheira dos Andes (Graham 2009). Como resultado da resistência ao movimento na área de convergência, a placa sul-americana sofreu um processo secundário de elevação do terreno na porção leste do continente. Este soerguimento ergueu o Complexo Cristalino, uma cadeia de montanhas com cerca de 9000 km, que se estende por quase toda a costa brasileira. O soerguimento do Complexo Cristalino não foi homogêneo: fraturas provocaram diferenças nos níveis de elevação do terreno e afundamento de blocos de rocha, que foram desgastados pelo vento e pela chuva, originando as escarpas abruptas e os picos de formas arredondadas que caracterizam a Serra do Mar. Os sedimentos resultantes do processo erosivo se acumularam ao longo da costa e originaram a planície litorânea, que sofreu com recuos e avanços periódicos do mar, de acordo com as mudanças climáticas. Diversas regressões e transgressões marinhas levaram à deposição adicional de sedimentos marinhos na costa e nas margens dos rios, promovendo a formação de lagunas, restingas e cordões arenosos. São as encostas criadas pelo soerguimento do Complexo Cristalino, juntamente com a planície litorânea resultante do acúmulo de detritos da erosão e

sedimentos, que compõem o ambiente físico dos principais ecossistemas que constituem a Mata Atlântica legal (Tonhasca 2005).

Sob os pontos de vista ético, moral e estético, a Mata Atlântica é “patrimônio natural nacional e patrimônio biológico da humanidade, espaço para atividades de lazer e prática de esportes, além de espaço para a contemplação e observação da natureza”. Do ponto de vista utilitário, serve como sistema de controle de erosão, enchentes, sedimentação e poluição, reservatório de água, fonte de renda pela exploração do ecoturismo e também como importantíssimo recurso educacional (Tonhasca 2005). Calcula-se que existam aproximadamente 8000 espécies endêmicas dentre as cerca de 20000 espécies vegetais que ocorrem nesta formação fitoecológica (Myers *et al.* 2000, Mittermeier *et al.* 2005). Somente entre os anos de 1990 e 2006 mais de 1000 espécies de angiospermas foram descobertas nesse ambiente (Sobral & Stehmann 2009).

A Mata Atlântica é um dos cinco biomas mais ameaçados do mundo, pois se encontra em estado de intensa fragmentação (Ranta *et al.* 1998, Tabarelli *et al.* 2004, entre outros). Sua degradação em larga escala iniciou com a exploração do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) após a chegada dos portugueses ao Brasil no ano de 1500. Até hoje ainda são exploradas inúmeras espécies florestais, como cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), palmitheiro (*Euterpe edulis* Mart.), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), além de bromélias e orquídeas diversas com uso ornamental e árvores madeireiras (Reis *et al.* 2000).

A área original estimada da Mata Atlântica era de mais de 120.000.000 km². Hoje as estimativas de sua área remanescente variam entre 9.200.000 e 16.000.000 km² (Myers *et al.* 2000, Ribeiro *et al.* 2009). As áreas de Mata Atlântica que persistem estão dispostas de modo esparsa ao longo da costa brasileira e no interior das regiões Sul e Sudeste, além de fragmentos no sul dos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul e no interior dos estados da região Nordeste (Conservation International do Brasil 2000, Morellato & Haddad 2000). Houve, portanto, um processo de fragmentação do bioma original. Diversos autores (revisado por Tabanez & Viana 2000) identificaram que fragmentos florestais podem apresentar aumento de temperatura, diminuição da umidade do solo, maior mortalidade de árvores, diminuição da regeneração arbórea, mudanças no comportamento e dinâmica da fauna, e diminuição da diversidade nos primeiros anos ou décadas após o isolamento, quando comparados com florestas contínuas. Sabe-se também que a fragmentação do

habitat pode levar à redução da variabilidade genética através de eventos do tipo gargalo de garrafa, enquanto que o efeito do fundador, a deriva genética e o fluxo gênico restrito podem aumentar o isolamento genético das populações e sua divergência. Esses efeitos genéticos, além do possível aumento do endocruzamento, podem levar à fixação de alelos deletérios, colocando em risco a persistência das espécies (Frankham *et al.* 2008).

Os trabalhos que avaliam a variabilidade genética de plantas da Mata Atlântica ainda não são numerosos. Inicialmente, os marcadores moleculares preferencialmente utilizados foram as isoenzimas (Reis *et al.* 1999, Conte *et al.* 2003, Ribeiro *et al.* 2005, Alcantara *et al.* 2006). Atualmente, são mais utilizados marcadores de sequência, (Lorenz-Lemke *et al.* 2005, Collevati *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2011, por exemplo) e microssatélites (Lira *et al.* 2003, Palma-Silva *et al.* 2009, entre outros), tanto do genoma nuclear quanto do plastidial. Além disso, marcadores tipo AFLP, do inglês “Amplified Fragment Length Polymorphism” (Andrade *et al.* 2007, Ledru *et al.* 2007, por exemplo) têm sido utilizados com sucesso para esse tipo de investigação.

Filogenias de plantas a partir de dados moleculares

As publicações iniciais de análises filogenéticas em plantas enfocavam questões taxonômicas envolvendo grandes grupos, como o relacionamento entre as principais linhagens de angiospermas. Os primeiros trabalhos (Soltis *et al.* 1990, Chase *et al.* 1993), utilizaram sequências do gene que codifica a enzima rubisco (*rbcL*) e os trabalhos subsequentes, genes como a subunidade F da enzima NADH desidrogenase (*ndhF*) e a subunidade β da proteína ATP sintase (*atpB*) (Hoot *et al.* 1995, Kim & Jansen 1995). Com a automatização do processo de sequenciamento de DNA, as análises filogenéticas tornaram-se menos dispendiosas e mais rápidas, o que possibilitou a popularização desta abordagem.

A exploração das informações do genoma nuclear na análise filogenética de plantas teve início com a utilização do marcador nuclear ITS (os espaçadores internos transcritos do DNA nuclear ribossomal, nrDNA) e da subunidade 18S do nrDNA (Baldwin 1992, 1993, Chaw *et al.* 1993, Suh *et al.* 1993). A utilização de genes nucleares de cópia única, ou com poucas cópias, também é vantajosa, porque esses genes podem ser mais informativos para a resolução de relacionamentos entre espécies próximas, apesar das dificuldades decorrentes do conhecimento limitado sobre a evolução de famílias gênicas

(revisado por Sang 2002). As sequências do genoma mitocondrial foram incorporadas posteriormente (Hiesel *et al.* 1994, Duff & Nickrent 1999, Qiu *et al.* 1999, 2000, 2001), possivelmente em função de sua baixa taxa de substituição quando comparadas às dos genomas nuclear e plastidial (Wolfe *et al.* 1987, Muse 2000).

Como as árvores filogenéticas das angiospermas disponíveis na década de 1990 eram congruentes, isto é, apresentavam resultados concordantes mesmo que construídas a partir de diferentes marcadores, foi proposta uma nova classificação das angiospermas, baseada em resultados de análises filogenéticas. Diversos autores, compondo o “Angiosperm Phylogeny Group” (APG), traduziram os dados filogenéticos disponíveis até o momento em um sistema de classificação hierárquico, tratando dos níveis de família e superiores. A primeira versão desse trabalho foi publicada em 1998 e a segunda, nomeada APG II, em 2003. Em 2009 foi publicada a APG III.

Para estudos em níveis filogenéticos abaixo de família, são amplamente utilizadas sequências não codificadoras do genoma plastidial, a partir do pressuposto de que regiões não codificadoras têm menos restrições funcionais que regiões codificadoras e, portanto, podem apresentar maiores níveis de variação (Gielly & Taberlet 1994, Shaw *et al.* 2005). Inicialmente, os marcadores moleculares utilizados foram os espaçadores intergênicos plastidiais *trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL* e os introns do gene do RNA transportador de lisina (*trnK*) e da enzima maturase K (*matK*) (Johnson & Soltis 1994, Manem & Natali 1995, Kajita *et al.* 1998, por exemplo).

Shaw *et al.* (2005) realizaram uma extensa revisão comparando a utilidade filogenética de 21 regiões não codificadoras do DNA de cloroplasto. Os autores demonstraram que as taxas evolutivas das regiões estudadas são heterogêneas. Além disso, eventos de inserção e deleção correspondem a cerca de 30% dos caracteres potencialmente informativos encontrados nas sequências estudadas e, por isso, os mesmos podem ser de grande utilidade em estudos filogenéticos infragenéricos. A utilidade filogenética dos eventos de inserção e deleção (indels) também foi assinalada por Kelchner (2000) e foi demonstrada, entre outros, por meio da análise do intron mitocondrial *nad1b/c* na família Orchidaceae Juss. (Freudenstein & Chase 2001). Atualmente, indels são caracteres amplamente utilizados em análises filogenéticas, em adição aos dados de sequência, como por exemplo, na filogenia da família Verbenaceae J. St.-Hil. recentemente publicada (Marx *et al.* 2010).

Ao longo do desenvolvimento das análises filogenéticas, diversos métodos foram e ainda são utilizados para a obtenção de árvores filogenéticas. Os métodos de busca, como a parcimônia, e os baseados em verossimilhança, têm em comum uma grande demanda computacional, embora se baseiem em princípios diferentes. O método de parcimônia visa à obtenção da árvore filogenética com o menor número de passos mutacionais. Esse método tem um desempenho razoável quando as sequências são proximamente relacionadas e/ou a amostragem é densa. Por outro lado, seu desempenho não é bom quando há variação substancial no comprimento dos ramos das OTUs analisadas, o que é conhecido como “atração de ramos longos” (revisado por Bergsten 2005). Na análise filogenética baseada em máxima verossimilhança é mensurado o quão bem uma árvore produzida prediz os dados observados, no caso, as sequências. As árvores com maior probabilidade de explicar os dados observados, ou seja, maior verossimilhança, são as preferidas. Dois pontos negativos desse método são os fatos de que a melhor árvore para um determinado conjunto de dados pode nunca chegar a ser analisada e que uma imensa capacidade computacional é demandada para a análise, especialmente para testes de suporte dos agrupamentos obtidos. O método de análise bayesiana é muito próximo ao de máxima verossimilhança. Nesse caso, é considerada como a melhor hipótese aquela que maximiza a probabilidade posterior, que é proporcional à verossimilhança multiplicada pela probabilidade anterior dos dados (“priors”). Levando em conta o tempo de análise necessário para inferências baseadas em máxima verossimilhança somente, a análise bayesiana é considerada rápida.

O princípio do relógio molecular, de que as taxas evolutivas são constantes, para uma mesma região do genoma, em diferentes organismos, foi proposto por Emile Zuckerkandl & Linus Pauling em 1965 (para uma perspectiva histórica desta proposição, ver Morgan 1998). Desde então, o mesmo foi aliado aos diferentes métodos de reconstrução filogenética e também às informações sobre taxas evolutivas, resultando em datações de diversos eventos biológicos. Ao longo do tempo, com o acúmulo de conhecimento na área, diversas alternativas ao relógio molecular estrito surgiram, como o relógio molecular relaxado e uma de suas variantes, o relógio molecular “local” (“local molecular clock”) (Drummond *et al.* 2006, Drummond & Suchard 2010, entre outros). Além disso, há diferentes métodos e “softwares” para realização de datações, e diferentes

maneiras de incorporar à análise incerteza quanto a datações fósseis e de diferentes taxas evolutivas.

A partir de datações moleculares, diversos eventos ligados à evolução das angiospermas foram datados. Entre os anos de 1995 e 2005 foram publicados cerca de 100 estudos sobre biogeografia de plantas contendo datações moleculares, dos quais cerca de 50 utilizaram a abordagem do relógio molecular relaxado (Renner 2005). Diversos resultados relacionados à datação de angiospermas merecem destaque. Por exemplo, a origem do grupo de angiospermas atuais foi estimada por Wikström *et al.* (2001) como tendo ocorrido entre 158 e 179 Ma. O mesmo grupo foi datado entre 167 e 199 Ma, através de metodologia e pontos de calibração diferentes (Bell *et al.* 2010) ou há cerca de 241 Ma (Magallón & Castillo 2009). Grupos taxonômicos menos abrangentes também estão sendo datados, e os resultados tornam-se cada vez mais confiáveis à medida que mais e mais pontos de calibração, como fósseis e barreiras geográficas datadas, são incorporados às análises. O surgimento do gênero *Inga* Mill., que ocorre na América Central e na América do Sul foi datado em cerca de 10 Ma. A idade geológica do Istmo do Panamá foi utilizada como ponto de calibração (Richardson *et al.* 2001). A história biogeográfica de grupos de interesse também pode ser elucidada com a utilização de datações moleculares. A distribuição pantropical do gênero *Begonia* L. deve-se a eventos de dispersão intercontinentais, datados do final do Cretáceo ou início do Neogeno (Goodall-Copestake *et al.* 2009), assim como a ocorrência de espécies do gênero *Nothofagus* Blume na América, Oceania e Ásia é um evento pós-Gonduânico, datado entre 55 e 40 Ma (Cook & Crisp 2005).

Também é extremamente relevante a contribuição das análises filogenéticas no campo da taxonomia e nomenclatura botânica. No gênero *Passiflora* L., por exemplo, há dois casos. Baseados nos resultados de Muschner *et al.* (2003), a redução drástica do número de subgêneros no grupo proposta a partir de dados morfológicos por Feuillet & MacDougal (2003) foi corroborada e o gênero monoespecífico *Tetrastilys* foi incluído em *Passiflora*. O mesmo aconteceu com os gêneros *Hollrungia* K. Schum. e *Tetrapathaea* (DC.) Reichb. (Krosnick & Freudenstein 2005, Krosnick *et al.* 2009). Esses são apenas dois exemplos restritos a um gênero, mas é importante destacar que está em andamento uma grande discussão sobre nomenclatura de grupos monofiléticos a partir de análises

filogenéticas (Forey 2002, De Queiroz 2006, Brummitt 2008, Laurin & Bryant 2009, entre outros).

Análises filogeográficas

Estudos que visam relacionar a distribuição dos organismos com condições geológicas, climáticas e ecológicas, tanto presentes como passadas, não são novidades na área científica, como registram os trabalhos de Biogeografia Histórica. Em 1987, Avise *et al.* propuseram o termo “filogeografia” para designar o estudo da distribuição da variabilidade genética em um contexto espacial e temporal. Desde então, muitas contribuições foram feitas às ideias iniciais na área da filogeografia.

Os marcadores moleculares mais populares em estudos filogeográficos são as sequências dos genomas plastidial, para plantas, e mitocondrial, para animais. Marcadores desses genomas são amplamente utilizados porque têm taxas evolutivas apropriadas para investigação da variabilidade genética intraespecífica ou entre espécies muito próximas, além de serem de fácil amplificação por PCR, uma vez que há regiões bastante conservadas que permitem o desenho de “primers” universais. Esses genomas também são haplóides, e teoricamente não estão sujeitos à recombinação genética.

Assim como as técnicas mais modernas de sequenciamento de DNA tornaram a obtenção de dados mais rápida e menos dispendiosa, as ferramentas estatísticas para análises filogeográficas estão em constante aprimoramento. Houve um grande aumento tanto no número de artigos de filogeografia publicados quanto no número de citações dos mesmos (Beheregaray 2008, Hickerson *et al.* 2010), utilizando técnicas como a “Nested clade analyses”, proposta por Templeton (1998), a “filogeografia estatística” (Knowles & Maddison 2002, Knowles 2004), e análises baseadas em coalescência.

A partir do acúmulo de publicações tratando de padrões filogeográficos para numerosos organismos de ocorrência sobreposta, tornou-se possível comparar os diversos resultados obtidos e delinear cenários de eventos que tenham afetado a área como um todo, e sua influência em diversos tipos de organismos. Esse tipo de “metanálise” recebe o nome de “filogeografia comparada”. Beheregaray (2008) calculou que análises de filogeografia comparada representaram 8% das publicações na área de filogeografia entre os anos de 1987 e 2006.

Justificativa

Pouco se sabe sobre as espécies dos gêneros *Aureliana* e *Athenaea* além das suas descrições. As sinopses existentes para ambos não descrevem detalhadamente a morfologia e a distribuição geográfica dos *taxa* ocorrentes no Brasil, tampouco as chaves de identificação publicadas (Hunziker & Barboza 1990, Barboza *et al.* 2010) abrangem toda a variação morfológica encontrada na natureza. Não foi publicada, até o momento, qualquer análise filogenética incluindo mais que uma espécie de cada um dos gêneros. Barboza *et al.* (2010) destacaram em seu trabalho sobre *Aureliana sellowiana* a necessidade da realização de estudos incluindo mais espécies para discutir o posicionamento de *Aureliana* na tribo Capsicinae (*sensu* Hunziker 2001) ou na subtribo Withaninae (*sensu* Olmstead & Bohs 2007, Olmstead *et al.* 2008). É ainda mais complexo e merecedor de estudos detalhados o caso de *Aureliana fasciculata*, com suas três variedades de ampla variação morfológica.

Além das questões taxonômicas, as espécies de *Aureliana* e *Athenaea* são bons indicadores para estudos sobre a Mata Atlântica, seu ambiente natural. Some-se a isso o fato de que pouco se sabe sobre o “status” de conservação de cada uma das espécies desses dois gêneros. Portanto, são necessários estudos para que se conheçam quantas realmente são suas espécies, onde ocorrem, quais os relacionamentos evolutivos entre elas e qual seu “status” de conservação. Além disso, o acesso à estrutura genética populacional de espécies ameaçadas ou com o habitat ameaçado pode auxiliar na identificação de áreas prioritárias para conservação.

Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi contribuir para o conhecimento das relações evolutivas entre as espécies dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana*, bem como auxiliar na classificação taxonômica dessas espécies. Os objetivos específicos foram:

- realizar a análise filogenética dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana*, elucidando o relacionamento entre as espécies dos mesmos e também o posicionamento dos gêneros dentro da subtribo Withaninae.
- proceder à datação, a partir da análise de dados moleculares, do surgimento e da diversificação dos gêneros *Aureliana* e *Athenaea*.
- avaliar os padrões de diversidade genética ao longo da distribuição de *Aureliana fasciculata*, através da análise de marcadores genéticos com variação intraespecífica, visando o entendimento dos processos evolutivos e históricos que levaram à distribuição atual.
- contribuir para a delimitação das entidades taxonômicas relacionadas à espécie *Aureliana fasciculata*, através da análise da variação genética dentro e entre as variedades da referida espécie.

Artigo 1

“First insights into *Aureliana* and *Athenaea* (Solanaceae) phylogeny: subtribe position and diversification age”

Artigo a ser submetido ao periódico “American Journal of Botany”.

Zamberlan et al., *Athenaea* and *Aureliana* phylogeny

**FIRST INSIGHTS INTO *ATHENAEA* AND *AURELIANA* (SOLANACEAE) PHYLOGENY: SUBTRIBE
POSITION AND DIVERSIFICATION AGE¹**

Priscilla M. Zamberlan², Luana Castro², João R. Stehmann³, Sandro L. Bonatto³, Loreta B. Freitas^{2,5}

²Laboratory of Molecular Evolution, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil;

³Laboratory of Vegetal Systematic, Department of Botany, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil;

⁴Laboratory of Genomic and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil.

FOOTNOTES

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

The authors thank A. Fregonezi, G. Mäder, I. Rodrigues, J. Fregonezi, L. Giacomini, P. Viana, and V. Thode for their assistance with field collections, R. Olmstead and G. Barboza for providing samples, and M. S. Silva and C. Sarturi for providing lab assistance. This work was supported by the following: the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul; and Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

L.B.F., P.M.Z. and J.R.S. planned, designed, and led the project, P.M.Z. and L.C. did the laboratory work, P.M.Z. and S.L.B. ran the analyses, P.M.Z. and J.R.S. collected the plant material, and P.M.Z. and L.B.F. wrote most of the text. All authors have contributed in the preparation of the study and have commented on and approved the final manuscript.

⁵Author for correspondence (e-mail: loreta.freitas@ufrgs.br)

ABSTRACT

Premise of the study: The subtribe Withaninae (Solanaceae) is composed of eight genera and approximately 40 species. It presents a wide distribution, with registered occurrences in Africa, Eurasia, and South America, where *Athenaea* and *Aureliana* occur mainly in the Brazilian Atlantic Rainforest. The phylogenetic relationship among Withaninae genera was investigated with a focus on *Athenaea* and *Aureliana* species phylogeny and divergence time estimates.

Methods: Thirteen species of *Athenaea* and *Aureliana* plus seven other species of Withaninae were included in a phylogenetic analysis conducted using five plastidial regions (*ndhF* gene, *trnL* intron, *trnL-trnF*, *psaI-accD*, and *trnC-ycf6* intergenic spacers). The age of the Hawaiian Archipelago high islands, to which *Nothocestrum* is endemic, was used as a calibration point to diversification time estimates.

Key Results: Withaninae was recovered as monophyletic. *Athenaea* and *Aureliana* species formed a strongly supported clade; although the genera were not monophyletic, and the support for the internal relationships was moderate to low. The diversification time estimated for Withaninae was 9.8 mya, and that for the *Athenaea* and *Aureliana* clade was 3.9 mya.

Conclusions: Our results indicate that the current geographical distribution of Withaninae may be a result of at least three, long-distance dispersal events through the oceans.

Moreover, our results indicated that Withaninae diversification was dated back to the Miocene Epoch, and *Aureliana* and *Athenaea* diversification occurred during the Pliocene Epoch.

Key words: *Athenaea*; Atlantic Rainforest; *Aureliana*; long-distance dispersal; molecular phylogeny; plastidial markers; Solanaceae; Withaninae.

The taxonomic knowledge of the Solanaceae family has been greatly improved in recent years. First, Hunziker (2001) published a seminal work, which revises the group based on morphological characteristics. In the year 2008, Olmstead et al. presented a molecular phylogeny of the family, including 89 genera, represented by 190 species, based on the sequences of two regions of the plastidial genome, *ndhF* gene and non-coding region *trnL-trnF*. There are major differences between the classifications proposed by these two sets of authors.

One interesting situation is the one of *Aureliana* Sendtn. and *Athenaea* Sendtn. Hunziker (2001) proposed that *Athenaea* and *Aureliana* should be included in the subtribe Capsicinae (Solaneae, Solanoideae), along with *Capsicum* L., *Darcyanthus* Hunz., *Eriolarynx* (Hunz.) Hunz., *Vassobia* Rusby, *Larnax* Miers, *Dunalia* Kunth, and *Withania* Pauq. Olmstead et al. (2008) proposed that both genera are part of the new subtribe Withaninae. This group includes ca. 40 species distributed among eight genera, and it has a remarkable distribution. Representatives of Withaninae are found in South America (*Aureliana* and *Athenaea*), in some Atlantic oceanic islands (*Withania* from Canaries, *Mellissia* Hook. in St. Helena Island), in Africa (*Withania*, *Discopodium* Hochst), Eurasia (*Withania*), Asia [*Tubocapsicum* (Wettst.) Makino], and in the Hawaiian Archipelago (endemic genus *Nothocestrum* A. Gray).

Solanaceae is proposed to have a post-Gondwanic origin, because the estimated mean age of Solanaceae was approximately 38 million years ago (mya), based on molecular data analysis (Bell et al., 2010). Moreover, the oldest known Solanaceae fossil, *Cantisolanum daturoides* EM Reid and MEJ Chandler, is attributed to the Eocene (33.9 – 55.8 mya) (Collinson et al., 1993).

Olmstead et al. (2008) described the Withaninae geographic range as ‘all over the map’, because it has a nearly worldwide distribution and presents relatively few genera, especially if compared to groups with similar geographical ranges but are far more specious within the Solanaceae family. The hypothesis proposed by these authors to explain the intriguing geographical distribution of Withaninae include the occurrence of long-distance dispersal events, in which the Hawaiian endemic *Nothocestrum* most likely arrived from the West, because its known sister group, *Tubocapsicum*, occurs in China and Japan, and other related species occur in Africa and Eurasia. In the past few years, despite its rarity and unpredictability, long-distance dispersal has become the favored explanation for several biogeographic patterns (e.g., Renner, 2004; De Queiroz, 2005; Gillespie et al., 2012).

Athenaea is composed of seven species, all of them endemic to the Atlantic Rainforest, one of the most threatened environments in the world (Myers et al., 2000; Ribeiro et al., 2009). *Aureliana* contains eight species, occurring mainly in the Atlantic Rainforest, plus some records of its most widespread species, *A. fasciculata* (Vell.) Sendtn., in Argentina, Bolivia, and Paraguay. Both genera include shrubby plants with white and green small axillary flowers (Barboza and Hunziker, 1989; Hunziker and Barboza, 1990). What distinguishes the genera is the presence of an acrescent calyx that involves the fruit in *Athenaea*. See Figure 1 for various *Athenaea* and *Aureliana* representatives.

To investigate the phylogenetic relationship between *Athenaea* and *Aureliana* species and to increase the knowledge regarding the relationship between genera in Withaninae, a phylogenetic analysis was conducted using four regions of the plastidial

genome. Divergence times in the subtribe were also estimated to better understand the biogeographical history of the group.

MATERIALS AND METHODS

Plant material – Six species of *Athenaea* and seven species belonging to *Aureliana* were included in the present analysis. Eight species, which belong to five different genera of Withaninae, were added to the data set. *Capsicum hunzikerianum* Barboza & Bianch., *Solanum trachytrichium* Bitter, and *Vassobia breviflora* (Sendtn.) Hunz. were used as the outgroup. See Appendix 1 for sources and voucher information. Silica gel-preserved samples of leaf tissue from field collection and material provided by other researchers were used for DNA extraction.

DNA extraction, markers amplification, and sequencing – Genomic DNA was extracted from young leaves using the Nucleo Spin Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Five plastidial DNA regions were amplified through a Polymerase Chain Reaction (PCR). The *trnL-trnF* intergenic spacer and the *trnL* intron were amplified together using 0.2 μ M *c* and *f* primers (Taberlet et al., 1991), 0.2 mM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 1 unit of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), and its 1X reaction buffer using the following parameters: 3 min of initial denaturation at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C, followed by final extension at 72°C for 10 min. Internal primers *d* and *e* (Taberlet et al., 1991) were used for sequencing. The *ndhF* gene region was amplified using Olmstead and Sweere (1994) primers. Two PCR reactions were conducted for each sample, the first one using primers 1F and 1318R, and the second using primers 972F and 2110R at 0.16 μ M each, 0.2 mM dNTPs, 2 mM

MgCl₂, 1 unit of Taq DNA Polymerase and its reaction buffer (1X). Additional internal primers (described by the same authors) were used to sequence the complete, amplified region. Plastidial intergenic spacers *ycf6-trnC* and *psaI-accD* were amplified using primers described in the literature (Shaw et al., 2005; Shaw et al., 2007; respectively). Both fragments were amplified using 0.16 μM of each specific primer, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 unit of Taq DNA Polymerase, and its 1X reaction buffer according to the following conditions: 3 min of initial denaturation at 94°C, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 1 min at 72°C (for *psaI-accD*) or 1 min 30 s (for *trnC-ycf6*), followed by a final extension at 72°C for 10 min. All PCR products were purified using the polyethyleneglycol precipitation method (Dunn and Blattner, 1987). The sequencing reaction was performed using ET terminators kit (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) on a MegaBACE 1000 automatic machine (GE Healthcare Biosciences) following the manufacturer's protocols.

Sequence alignment and characterization – Forward and reverse reads were analyzed for all sequences generated in this study using Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australia). Seven *ndhF* and six *trnL-trnF* sequences of species that belong to Withaninae available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were downloaded and included in the analysis. See Appendix 2 for GenBank accession numbers for all sequences employed in the present study. The final data set was composed of *psaI-accD* and *ycf6-trnC* intergenic spacer sequences generated for all sampled groups, plus *ndhF* and *trnL-trnF* sequences obtained from *Aureliana* and *Athenaea* species and those downloaded from GenBank. The *trnL-trnF* region was divided in *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer for alignment and sequence characterization proposals. The sequences were aligned using

Clustal W (Thompson et al., 1994) implemented on Mega5 (Tamura et al., 2011). All alignments were manually adjusted.

Phylogenetic analysis and divergence time estimates – Phylogenetic relationships and divergence time were both conducted in the BEAST package version 1.6.2 (Drummond and Rambaut, 2007). Divergence time estimates were conducted adopting a relaxed molecular clock approach (Drummond et al., 2006) and a GTR+G substitution model. The origin of current high islands in the Hawaiian Archipelago, dated as circa 5.1 mya (Clague, 1996), was employed as a maximum age constraint for the diversification of the genus *Nothocestrum*, which is known to be endemic from these islands (Hunziker, 2001; Baldwin and Wagner, 2010). A normal prior (mean value: 5.1, standard deviation: 0.2) was set as the most recent ancestral time for the *Nothocestrum* species. Two independent BEAST analyses were performed for 100 million iterations, and samples were taken for each 10,000 chains. Initial 10% chains were discarded as burn-in. TRACER 1.5 (available on <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) was used to inspect the runs visually. The results were combined using LogCombiner as implemented on the BEAST package. The phylogenetic relationships were summarized in a maximum clade credibility tree and their 95% highest posterior densities (HPD) using TreeAnnotator v.1.6.2.

RESULTS

Sequence characterization –Detailed alignment characterization is displayed in Table 1. Missing data corresponded to 10% of the dataset. Insertion/deletions (indels) of several sizes occurred in all markers, the most informative of them are in the *trnL* intron, where two indels were detected in the three *Withania* species, and one was found in all

Athenaea and *Aureliana* species. Regions of alignment uncertainty were excluded from the analyses. The combined final dataset was 4535 nucleotides long.

Phylogenetic relationships and molecular dating – The Bayesian maximum clade credibility phylogenetic tree is shown in Figure 2. The subtribe Withaninae was recovered as a monophyletic group. Within Withaninae, two major clades were detected, one composed only of taxa that do not occur in South America (non-SA clade) and the other, named South America group (SA clade), comprised species of *Aureliana* and *Athenaea*, which are endemic to South America. The first clade, that presents low support value, was formed by two clades, one including the three species of *Withania*, and the second one composed of the species *Nothoestrum*, plus *Discopodium penninervium* Hochst. and *Tubocapsicum anomalum*. The monophyly of *Withania* was highly supported. An *Aureliana* plus *Athenaea* clade, including representatives of the majority of their species, was also highly supported, but the two genera were not monophyletic. One well-supported clade was composed of four *Athenaea* species with a conspicuous acrescent calyx. Interestingly, the three individuals of *Aureliana fasciculata*, from different varieties, did not group together. The estimated mean age of Withaninae subtribe diversification was approximately 9.8 mya, and that of the clade *Athenaea* plus *Aureliana* was 3.9 mya (Figure 2). See Table 3 for estimated mean ages and their respective 95% highest posterior densities for major clades recovered in the phylogeny.

DISCUSSION

Phylogenetic relationships and taxonomic implications –Our results, which included additional species of the group and more markers, supported the monophyly of

Withaninae suggested by Olmstead et al. (2008). The internal resolution of the clade joining *Nothocestrum*, *Discopodium penninervium*, and *Tubocapsicum anomalum*, the latter two monospecific genera, was different from Olmstead et al. (2008). Both analyses, however, displayed limited support values, so the question about the sister group *Nothocestrum* remains uncertain.

The grouping of *Athenaea* with *Aureliana* in a highly supported clade suggested by Olmstead et al. (2008) was also corroborated here, with a much higher taxonomic sampling. The genera were not monophyletic, although the moderate to low support for most internal groups preclude any conclusive decision. The hypothesis that *Athenaea* and *Aureliana* may be a single genus is supported by the reality that the acrescent calyx, the single morphological sinapomorphy that distinguish the genera, is not a highly conspicuous character in all species of *Athenaea*. The highly supported group including *A. pogogena*, *A. micrantha*, *A. cuspidata*, and *A. picta* presents a conspicuous acrescent calyx, while the remaining species of *Athenaea* display a less conspicuous calyx (I.M.C. Rodrigues, personal communication). Interestingly, major calyx morphology modifications are well-documented in Solanaceae (Hu and Saedler, 2007), including *Tubocapsicum* and *Withania* (Khan et al., 2009), and thus may be employed successfully as taxonomic characters. A broad and careful taxonomic review of both genera is therefore highly recommended.

The *Aureliana fasciculata* species status and infraspecific classification should also be the subject of a broad taxonomic review because its three varieties were not recovered as a clade. Furthermore, each one of the *A. fasciculata* varieties is characterized by a combination of leaf characteristics related to size and pilosity (Hunziker and Barboza,

1990; Hunziker, 2001), and these characters are known to display phenotypic plasticity in response to environmental influences (Nicotra et al., 2010).

Biogeographical insights – One possible source of bias in our analysis was the usage of only two of the four species of *Nothocestrum*, because the origin of the older extant Hawaiian island, Kauai, was set as a maximum age constraint for the genus diversification. As exemplified by Linder et al. (2005), if the inclusion of the other two species led to a higher divergence, our mean ages of diversification would be overestimated. The sampled species, however, occur across the major islands of the archipelago, and those not sampled are endemic to only one island. It might be an indicative that the sampled species are the most divergent ones.

A summary of the long-distance dispersal events proposed below is shown in Figure 3, along with the subtribe Withaninae geographical distribution. Withaninae diversification started approximately 9.8 mya during the Miocene Epoch, in the Tortonian period, when the global climate was warmer and wetter than it is currently (Pound et al., 2010). We hypothesized that the ancestral group lived in South America because this is the main source area of the Solanaceae species (Huziker, 2001). *Aureliana* and *Athenaea* seem to be descendants of the ancestors that remained in South America. Owing to the small number of *Withania* species included in the present analysis, the genus diversification age, circa 3.1 mya, is most likely an underestimate. *Athenaea* and *Aureliana* diversification was estimated to have started circa 3.9 mya, during the Middle Pliocene geological period. At this time, the global climate was warmer in comparison to currently (Dowsett et al., 1994; Sloan et al., 1996). As indicated by data from vertebrate palaeontology and phytoliths, South America had a more humid, warmer climate, although palaeobotanical information

on the history of the Pliocene vegetation of South America is scarce (Salzmann et al., 2011).

More than one long-distance dispersal event may have occurred in *Withaninae* during the non-SA group evolutionary history. The ancestors of the non-SA group may have dispersed through the Atlantic Ocean from South America to Africa. Other long-distance dispersal events from South America to Africa have been reported, as in *Rapateaceae*, *Melastomataceae*, and *Cucurbitaceae* families (Givnish et al., 2000; Renner et al., 2001; Duchon & Renner, 2010). In *Solanaceae*, phylogenetic relationships and age estimates indicated that *Hyoscyameae* and *Mandragoreae*, that are distributed exclusively in Eurasia, originated after two, independent dispersal events of their ancestors from the New World (Tu et al., 2010). In Africa, several divergence events seem to have occurred in the *Withaninae* subtribe. One of them possibly originated the most recent ancestor of *Withania*, followed by the expansion of the genus, including the Canary Islands, possibly through another long-distance dispersal event (see below). Currently, the occurrence area for this group is Eurasia and Africa (Hunziker, 2001). Another divergence event might have originated the *Nothoestrum* ancestor. A putative, third, long-distance dispersal event, from Asia through the Pacific Ocean, might have reached the Hawaiian Archipelago, where *Nothoestrum* is currently found. This hypothesis is supported by the internal position of *Nothoestrum* in the phylogenetic tree. We also hypothesized that the ancestors of the *Discopodium* and *Tubocapsicum* clades (which eventually became extinct) occupied a broader geographic area. *Discopodium* and *Tubocapsicum*, currently flourishing in east Africa and Southeast Asia, might have originated in the extreme locations in its occurrence area.

The fruits of *Aureliana* and *Athenaea* are berries (Hunziker 2001) that do not display any obvious adaptation for floating, but it is possible that if their ancestor presented similar fruit morphology, they might have been carried by ocean currents. As discussed by Nathan et al. (2008), ocean currents can be responsible for long-distance dispersal of plants over hundreds of kilometers without any specialized dispersal morphology. The dispersal of *Withaninae* seeds across the Atlantic Ocean by birds is one possibility, although Renner (2004) noted several arguments that argue against the long-distance dispersal of seeds across the tropical Atlantic Ocean by birds. According to the author, there are no bird migratory routes across the Atlantic, and marine birds almost never feed on seeds or fruits. In addition, frugivorous land birds empty their guts every few minutes (e.g., White and Stiles 1990). As an example, the average time of seed permanence inside a shrike, passerine bird, was 45-55 min (Nogales et al., 1998).

Further questions about the origin of the Canary Islands species of *Withania* should be addressed based on a broader sampling of the genus, which contains approximately 20 species (Hunziker, 2001), but there may have been a secondary, long-distance dispersal event from Europe to the islands. In this archipelago, Nogales et al. (1996; 1998) have obtained indirect evidence of *Withania aristata* Pauq. seeds dispersion by feral cats, fruits and seeds by lizards and shrikes. One can hypothesize that similar events could have been responsible for the *Nothocestrum* species dispersion events within the Hawaiian Archipelago, from older islands now submerged (the origin of the archipelago is estimated circa 32 mya) (Clague, 1996). According to geological modeling and molecular dating of several groups, however, this is highly unlikely. The size of and distance between Hawaiian volcanic islands have varied greatly over time. At the time of the Kauai formation, the Hawaiian archipelago was formed by small and separated islands, which

would have reduced island-to-island colonization success (Price and Clague, 2002). The authors also noted that in a survey of molecular divergence date studies, 12 of 15 Hawaiian radiations had most recent common ancestors estimated to be younger than Kauai, which is at least consistent with recent, long-distance origins (please see Heads, 2011, for a criticism).

In conclusion, our results indicated that *Aureliana* and *Athenaea* form a highly supported clade, whose diversification started circa 3.9 mya. Based on our analysis, the low resolution of the internal relationship in the group as observed might be a consequence of a rapid and morphologically driven speciation process that is not yet fully reflected on the plastidial genome or might be due to low variability of these molecular markers in the genera. We hypothesized that at least three long-distance dispersal events have led to the present, almost cosmopolitan, distribution of the group. Fully resolved phylogenetic analysis will enable us to statistically test the biogeographic hypotheses proposed here.

LITERATURE CITED

- BALDWIN, B., AND WAGNER, W. 2010. Hawaiian angiosperm radiations of North American origin. *Annals of Botany* 105: 849-879.
- BARBOZA, G., AND HUNZIKER, A. T. 1989. Estudios sobre Solanaceae XXIX. Sinopsis taxonomica de *Athenaea*. *Boletín Sociedad Argentina Botánica* 26: 91-105.
- BELL, C. D., SOLTIS, D. E., AND SOLTIS, O. S. 2010. The age and diversification of the angiosperms re-revisited. *American Journal of Botany* 97: 1296-1303.
- CLAGUE D. A. 1996. The growth and subsidence of the Hawaiian-Emperor volcanic chain. *In* A. Keast and S. E. Miller [eds], The origin and evolution of Pacific island biotas,

- New Guinea to eastern Polynesia: patterns and processes, 35–50. SPB Academic Publishing, Amsterdam, Netherlands.
- COLLINSON M. E., BOULTER M. C., AND HOLMES, P. L. 1993. Magnoliophyta ('Angiospermae'). *In* M. J. Benton [ed], The fossil record Vol. 2, 809-841. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- DE QUEIROZ, K. 2005. The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 68-73.
- DOWSETT, H., THOMPSON, R., BARRON, J., CRONIN, T., FLEMING, F., ISHMAN, S., POORE, R., et al. 1994. Joint investigation of the Middle Pliocene climate I: PRISM paleoenvironmental reconstructions. *Global and Planetary Change* 9: 169-195.
- DRUMMOND, A. J., AND RAMBAUT, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- DRUMMOND, A. J., HO, S. Y.W., PHILLIPS, M. J., AND RAMBAUT, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4, e88 [on line]. Website <http://www.plosbiology.org>.
- DUCHEN, P., AND RENNER, S. S. 2010. The evolution of *Cayaponia* (Cucurbitaceae): Repeated shifts from bat to bee pollination and long-distance dispersal to Africa 2–5 million years ago. *American Journal of Botany* 97: 1129-1141.
- DUNN, I. S., AND 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.
- GILLESPIE, R. G., BALDWIN, B. G., WATERS, J. M, FRASER, C. I., NIKULA, R., AND RODERICK, G. K. 2012. Long-distance dispersal: a framework for hypothesis testing. *Trends in Ecology and Evolution* 27: 47-56.

- GIVNISH, T. J., EVANS, T. M., ZHRA, M. L., PATTERSON, T. B., BERRY P. E., AND SYTSMA K. J. 2000. Molecular evolution, adaptative radiation, and geographic diversification in the amphiatlantic family Rapateaceae: evidence from *ndhF* sequences and morphology. *Evolution* 54: 1915–1937.
- HEADS, M. 2011. Old taxa on young islands: a critique of the use of island age to date island-endemic clades and calibrate phylogenies. *Systematic Biology* 60: 204-218.
- HU, J. Y., AND SEADLER H. 2007. Evolution of the inflated calyx syndrome in Solanaceae. *Molecular Biology and Evolution* 24: 2443-2453.
- HUNZIKER, A. T. 2001. *Genera Solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system*. Liechtenstein: ARG Gantner Verlag, K.-G.
- HUNZIKER, A. T., AND BARBOZA, G. E. 1990. Estudios sobre Solanaceae XXX: Revision de *Aureliana*. *Darwiniana* 30: 95-113.
- KHAN, M. R, HU, J. Y., RISS, S., HE, C., AND SAEDLER, H. 2009. MPF2-like-A MADS-box genes control the inflated calyx syndrome in *Withania* (Solanaceae): roles of Darwinian selection. *Molecular Biology and Evolution* 26: 2463-2473.
- LINDER, P. H., HARDY, C. R., AND RUTSCHMANN, F. 2005. Taxon sampling effects in molecular clock dating: an example from the African Restionaceae. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 35: 569-582.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. S., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B., AND KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- NATHAN, R., SCHURR, F. M., SPIEGEL, O., STEINITZ, O., TRAKHTENBROT, A, AND TSOAR, A. 2008. Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 638-647.

- NICOTRA, A. B., ATKIN, O. K., BONSER, S. P., DAVIDSON, A. M., FINNEGAN, E. J.,
MATHESIUS, U., POTT, P., et al. 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate.
Trends in Plant Science 15: 684-692.
- NOGALES, M., DELGADO, J. D., AND MEDINA, F. M. 1998. Shrikes, lizards and *Lycium
intricatum* (Solanaceae) fruits: a case of indirect seed dispersal on an oceanic island
(Alegranza, Canary Islands). *Journal of Ecology* 86: 866-871.
- NOGALES, M., MEDINA, F. M., AND VALIDO, A. 1996. Indirect seed dispersal by the feral
cats *Felis catus* in island ecosystems (Canary Islands). *Ecography* 19: 3-6.
- OLMSTEAD, R. G., AND SWEERE, J.A. 1994. Combining data in phylogenetic systematics:
an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic
Biology* 43: 467-481.
- OLMSTEAD, R. G., BOHS, L., MAGID, H. A., SANTIAGO-VALENTIN, E., GARCIA, V. F., AND
COLLIER, S. M. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57: 1159-1181.
- POUND, M. J., HAYWOOD, A. M., SALZMANN, U., RIDING, J. B., LUNT, D. J., AND HUNTER,
S. J. 2010. A Tortonian (Late Miocene, 11.61 – 7.25 Ma) global vegetation
reconstruction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 300: 29-45.
- PRICE, J. P., AND CLAGUE, D. A. 2002. How old is the Hawaiian biota? Geology and
phylogeny suggest recent divergence. *Proceedings of the Royal Society, B, Biological
Sciences* 269: 2429-2435.
- RENNER, S. 2004. Plant dispersal across the tropical Atlantic by wind and sea currents.
International Journal of Plant Sciences 165: S23-S33.

- RENNER, S. S., AND MEYER K. 2001. Historical biogeography of Melastomataceae: the roles of Tertiary migration and long-distance dispersal. *American Journal of Botany* 88: 1290–1300.
- RIBEIRO, M.C., METZGER, J. P., MARTENSEN, A. C., POZONI, F. J., AND HIROTA, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141-1153.
- SALZMANN, U., WILLIAMS, M., HAYWOOD, A. M., JOHNSON, A. L. A., KENDER, S., AND ZALASIEWICZ, J. 2011. Climate and environment of a Pliocene warm world. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 309: 1-8.
- SHAW, J., LICKEY, E. B., BECK, J. T., FARMER, S. B., WUSHENG, L. MILLER, J. SIRIPUN, K. C., et al. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- SHAW, J., LICKEY, E. B., SCHILLING, E. E., AND SMALL, R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- SLOAN, L. C., CROWLEY, T. J., AND POLLARD, D. 1996. Modeling of middle Pliocene climate with the NCAR GENESIS general circulation model. *Marine Micropalaeontology* 27: 51-61.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., AND BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., AND KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood,

evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., AND GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

TU, T., VOLIS, S., DILLON, M. O., SUN, H. AND WEN, J. 2010. Dispersals of Hyoscyameae and Mandragoreae (Solanaceae) from the New World to Eurasia in the early Miocene and their biogeographic diversification within Eurasia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 1226-1237.

WHITE, D. W., AND STILES, E. W. 1990 Co-occurrences of foods in stomachs and feces of fruit-eating birds. *Condor* 92:291–303.

TABLE 1. Alignment characteristics of plastidial regions *ndhF* gene, *trnL* intron, and *trnL-trnF*, *psaI-accD*, and *trnC-ycf6* intergenic spacers.

Character	<i>ndhF</i>	<i>trnL</i> intron	<i>trnL-trnF</i>	<i>psaI-accD</i>	<i>trnC-ycf6</i>
Length range (bp)					
Ingroup only	2054-2060	489-502	218-395	714-780	566-605
Outgroup included	2054-2060	489-523	218-400	714-780	566-605
Aligned length (bp)					
Ingroup only	2060	502	412	782	644
Outgroup included	2060	523	412	829	660
Variable characters (%)					
Ingroup only	49 (2.38)	11 (2.19)	21 (5.1)	22 (2.81)	12 (1.86)
Outgroup included	105 (5.1)	20 (3.82)	41 (9.95)	43 (5.19)	35 (5.3)

TABLE 2. Estimated mean ages (million years) with 95% highest posterior densities (HPD) for major Withaninae clades. Nodes refer to Figure 2.

Node	Mean Age	95% HPD
A. Withaninae subtribe	9.8	7.7 – 12.3
B	3.9	2.6 – 5.3
C	9.2	6.5 – 10.1
D <i>Withania</i> genus	3.1	1.5 – 5.0

APPENDIX 1. Specimens used for this study, including collection site, location, and voucher information. Herbaria acronyms refer to Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB) and the Bishop Museum (BISH). Abbreviations correspond to Brazilian states as follows: BA, Bahia; ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo. Collection numbers were provided when voucher information was not available. Specimens marked with an asterisk were kindly provided by R. G. Olmstead.

Taxa	Collection site	Location	Voucher
<i>Athenaea cuspidata</i> Witas	Conservation Area Boracéia, SP.	23 39' 10"S, 45 53' 07"W	BHCB115951
<i>Athenaea martiana</i> Sendtn.	Juiz de Fora, MG.	NA	BHCB134379
<i>Athenaea micrantha</i> Sendtn.	Road São José – Una, BA.	15 07' 19"S, 39 15' 47"W	BHCB126140
<i>Athenaea pereirae</i> Barboza & A.T. Hunz.	Santuário do Caraça, MG.	20 01' 18"S, 43 11' 38"W	BHCB142292
<i>Athenaea picta</i> (Mart.) Sendtn.	Bananal, SP.	22 41' 02"S, 44 19' 22"W	BHCB144999
<i>Athenaea pogogena</i> (Moric.) Sendtn.	Conservation Area Serra Bonita, Camacan, BA.	15 23' 22"S, 39 33' 50"W	BHCB126160
<i>Aureliana angustifolia</i> R. C. Almeida-Lafetá	Juiz de Fora, MG.	21 41' 20"S, 43 20' 40"W	BHCB134380
<i>Aureliana brasiliiana</i> (A.T. Hunz.) Barboza & A.T. Hunz.	Itatiaia National Park, RJ.	22 25' 32"S, 44 37' 19"W	BHCB145043
<i>Aureliana darcy</i> Carvalho Bovini	Trindade, Paraty, RJ.	23 21' 05"S, 44 43' 34"W	BHCB115994
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>fasciculata</i>	Conservation Area Japi, Jundiá, SP.	23 14' 41"S, 46 56' 12"W	BHCB115929
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>tomentella</i> (Sendtn.) Barboza & A.T. Hunz.	Santa Teresa, ES.	19 56' 11"S, 40 35' 59"W	BHCB115995
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>longifolia</i> (Sendtn.) A.T. Hunz. & Barboza	Moji das Cruzes, SP.	23 40' 01"S, 46 08' 02"W	BHCB115939
<i>Aureliana sellowiana</i> (Sendtn.) Barboza & Stehmann	Parelheiros, São Paulo, SP.	23 54' 01"S, 46 43' 33"W	BHCB145006
<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.	Nova Lima, MG.	19 59' 09"S, 43 50' 49"W	BHCB103620
<i>Aureliana wettsteiniana</i> (Witas.) A.T. Hunz. & Barboza	Porto União, SC.	26 14' 16"S, 51 04' 40"W	BHCB143430
<i>Capsicum hunzikerianum</i> Barboza & Bianch.	Conservation Area Boracéia, SP.	23 40' 09"S, 45 53' 57"W	BHCB115970
* <i>Discopodium penninervium</i> Hochst.	Tanzania	NA	R. E. S. Tanner 3288
* <i>Nothoestrum longifolium</i> A.Gray	NA	NA	BISH 431975

Taxa	Collection site	Location	Voucher
* <i>Nothocestrum latifolium</i> A.Gray	NA	NA	H. St. John 26469
<i>Solanum trachytrichium</i> Bitter	Guarapuava, PR.	25 19' 20"S, 51 11' 45"W	BHCB96565
* <i>Tubocapsicum anomalum</i> (Frach & Sav.) Makino	NA	NA	Chen 231
<i>Vassobia breviflora</i> (Sendtn.) Hunz.	Road São Pedro do Sul – Santa Maria, RS.	29 40' 32"S, 53 57' 55"W	BHCB102084
* <i>Withania coagulans</i> (Stocks) Dunal	NA	NA	Lester S.0678/69
* <i>Withania riebeckii</i> Schweinf. ex Balf.f.	NA	NA	D'Arcy 17750
* <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal	NA	NA	Lester S.0960

NA – not available.

APPENDIX 2. Specimens used for this study with GenBank accession numbers. Italicized numbers refer to sequences previously published and available at GenBank. Specimens marked with an asterisk were kindly provided by R. G. Olmstead.

Taxa	GenBank Accession Number				
	<i>ndhF</i>	<i>trnL intron</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>psaI-accD</i>	<i>trnC-ycf6</i>
<i>Athenaea cuspidata</i>					
<i>Athenaea martiana</i>					
<i>Athenaea micrantha</i>					
<i>Athenaea pereirae</i>					
<i>Athenaea picta</i>					
<i>Athenaea pogogena</i>					
<i>Aureliana angustifolia</i>					
<i>Aureliana brasiliana</i>					
<i>Aureliana darcy</i>					
<i>Aureliana fasciculata</i> var. <i>fasciculata</i>					
<i>Aureliana fasciculata</i> var. <i>tomentella</i>					
<i>Aureliana fasciculata</i> var. <i>longifolia</i>					
<i>Aureliana sellowiana</i>					
<i>Aureliana velutina</i>					
<i>Aureliana wettsteiniana</i>					
<i>Capsicum hunzikerianum</i>					
* <i>Discopodium penninervium</i>	<i>EU126012</i>	<i>EU580986</i>			
* <i>Nothocestrum longifolium</i>	<i>EU580922</i>	<i>EU581038</i>			
* <i>Nothocestrum latifolium</i>	<i>EU580921</i>	<i>EU581037</i>			
<i>Solanum trachytrichium</i>					
* <i>Tubocapsicum annomalum</i>	<i>EU580950</i>	<i>EU580914</i>			
<i>Vassobia breviflora</i>					
* <i>Withania coagulans</i>	<i>EU580951</i>	<i>EU581068</i>			
* <i>Withania riebeckii</i>					
* <i>Withania somnifera</i>	<i>EU580952</i>	<i>EU581069</i>			

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. *Athenaea* and *Aureliana* representatives: *Athenaea cuspidata* (1a, 1b), *Athenaea pogogena* (2), *Athenaea martiana* (3), *Athenaea pereirae* (4a, 4b), *Aureliana brasiliana* (5), *Aureliana velutina* (6), *Aureliana darcy* (2), *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata* (8a, 8b), and *Aureliana wettsteiniana* (9). Photos by L. Giacomini (1), C. N. Fraga (7) and J. R. Stehmann.

Fig. 2. A maximum clade credibility phylogenetic tree showing the relationships between subtribe Withaninae species, with an emphasis on *Athenaea* and *Aureliana* genera. Values above branches correspond to posterior probability. The node marked with an asterisk refers to the calibration point. The geological time scale is shown at the bottom. Horizontal bars indicate the 95% highest posterior age intervals, based on BEAST analyses. I indicates South America clade; II, Non-South America clade; III, Withaninae subtribe; IV, outgroups. Letters inside circles correspond to Table 2.

Fig. 3. Withaninae subtribe distribution around the world. Arrows indicate possible long-distance dispersal routes. Symbols correspond to the geographical range of the genera as follows: ◆ *Nothoestrum*, ‡ *Athenaea* and *Aureliana*, ■ *Mellissia*, ● *Withania*, † *Discopodium*, ▣ *Tubocapsicum*.

Fig. 1.

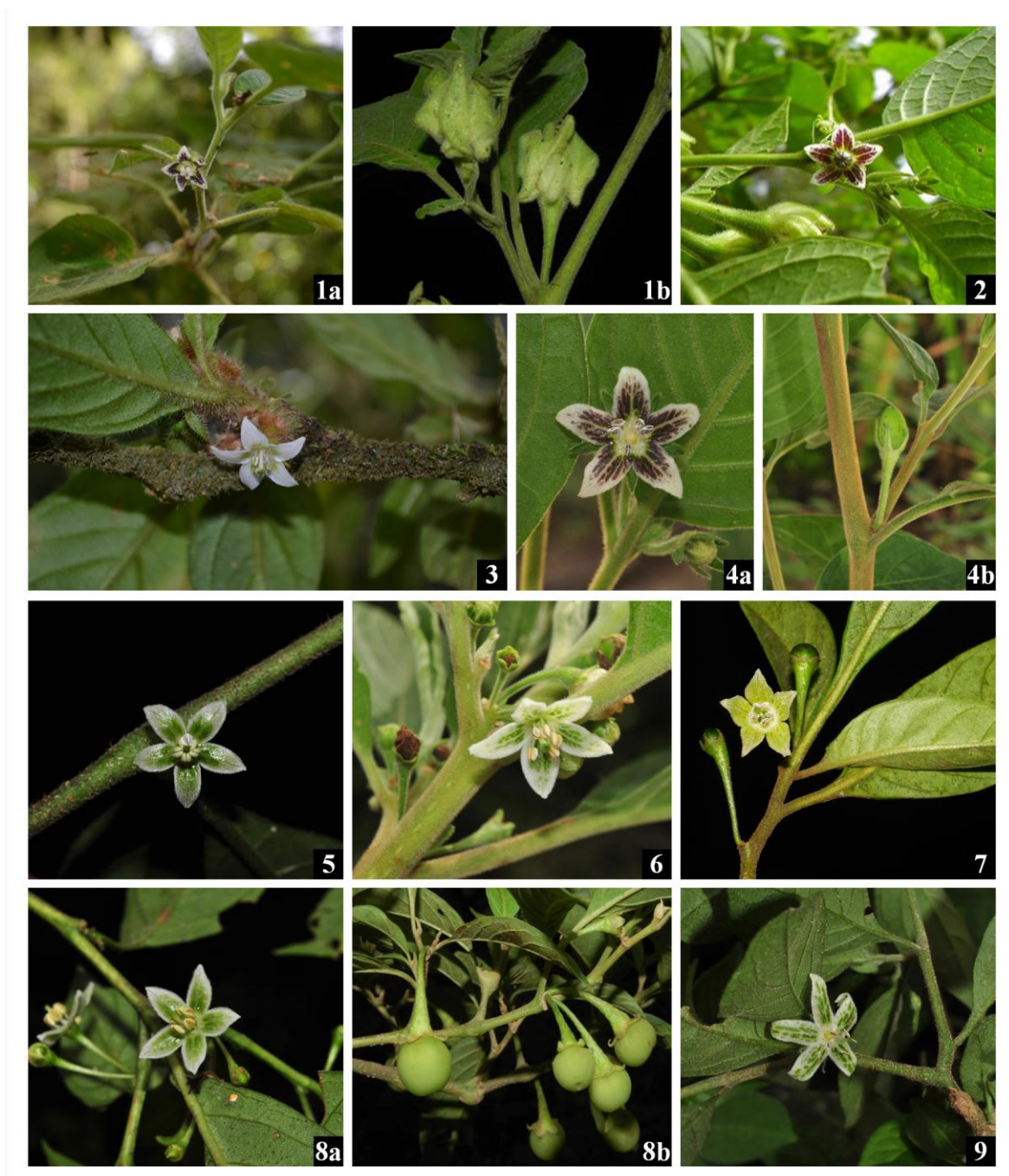


Fig. 2

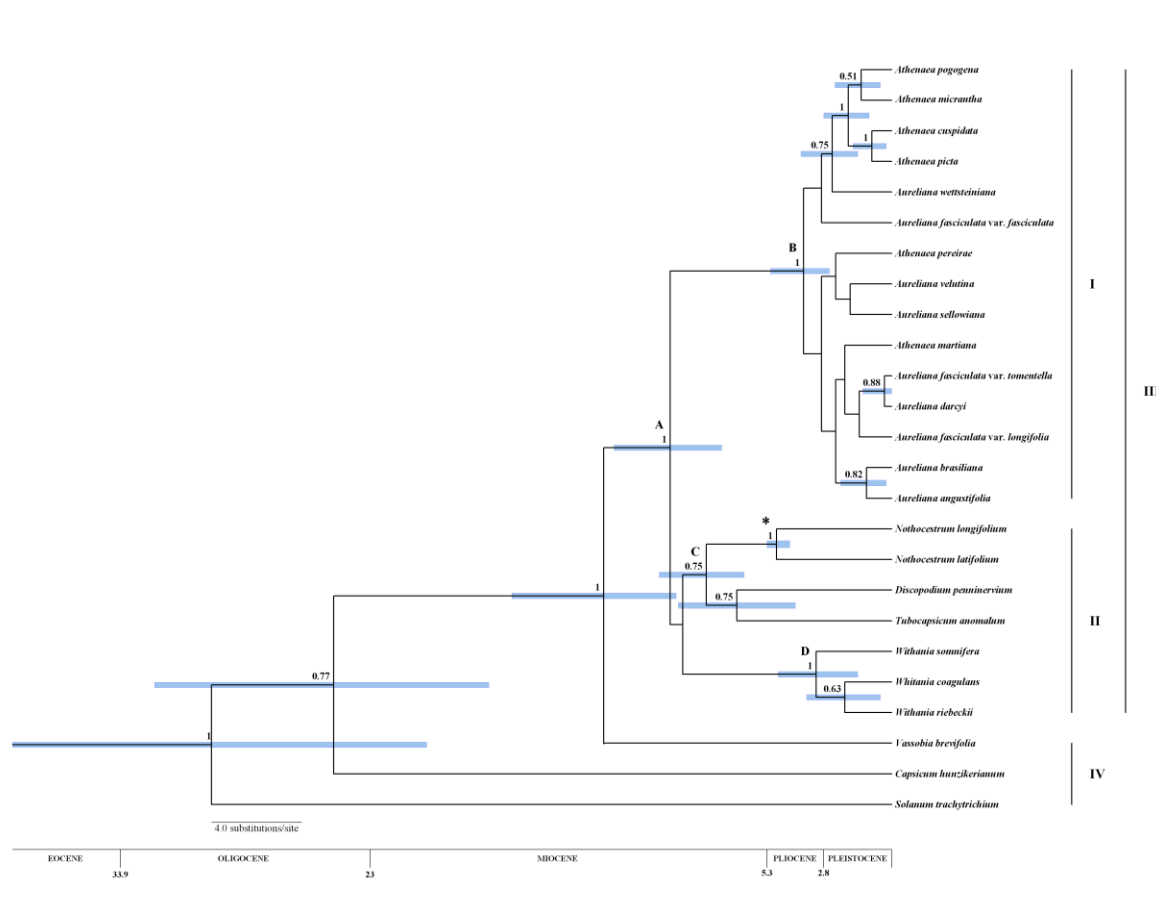
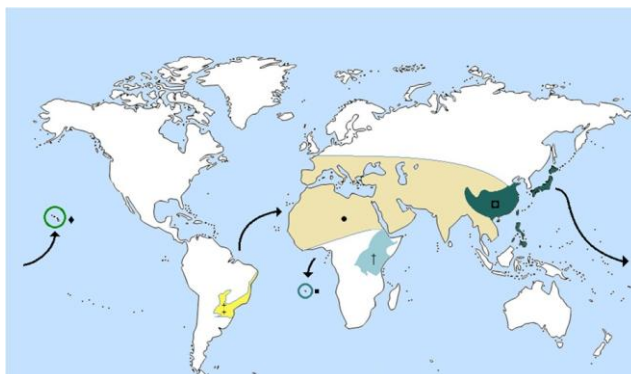


Fig. 3



Artigo 2**“The phylogeography of the Atlantic Forest shrub *Aureliana fasciculata*
(Solanaceae)”**

Artigo a ser submetido ao periódico “Annals of Botany”.

1 Original Article

2

3 THE PHYLOGEOGRAPHY OF THE ATLANTIC FOREST SHRUB *AURELIANA*

4 *FASCICULATA* (SOLANACEAE)

5

6 Priscilla Mena Zamberlan¹, Aline M. C. Ramos-Fregonezi¹, Jéferson Nunes Fregonezi¹,

7 Michele Silveira da Silva¹, João R. Stehmann², Sandro L. Bonatto³, Loreta B. Freitas^{1*}.

8

9 ¹Laboratory of Molecular Evolution, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio
10 Grande do Sul, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil,

11 ²Laboratory of Vegetal Systematic, Department of Botany, Universidade Federal de Minas
12 Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil,

13 ³Laboratory of Genomic and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio
14 Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil.

15

16 Running title: *Aureliana fasciculata* phylogeography

17 *Corresponding author: loreta.freitas@ufrgs.br

18

1 ABSTRACT

2

3 *Background and Aims:* The Atlantic Rainforest has undergone great climatic
4 change over time, and despite efforts, little is known about how the forest, especially trees
5 and shrubs, has reacted to these oscillations. *Aureliana fasciculata* (Solanaceae) is a shrub
6 that occurs throughout the Atlantic Rainforest and is suitable taxon to address questions
7 about the response of the forest to the climatic changes that occurred during the
8 Pleistocene.

9 *Methods:* A total of 112 samples from 23 locations were included in the analyses.
10 Two plastidial intergenic spacers, *trnH-psbA* and *trnS-trnG*, were sequenced, and network
11 analysis, neutrality tests, Mantel's test, AMOVA and SAMOVA were performed to detect
12 haplotypic relationships and to evaluate the distribution of the genetic variability of the
13 species in the Atlantic Rainforest. A Bayesian skyline plot was employed to investigate the
14 demographic history of the group.

15 *Key Results:* The phylogeographical analysis indicated the existence of two groups
16 of haplotypes and collection locations, Northern and Southern groups, split by the São
17 Paulo and Rio de Janeiro states. The Bayesian skyline plot suggests a recent population
18 expansion circa 50,000–60,000 years ago, which was not detected by classic neutrality
19 tests. The structure of the molecular variation did not correspond to the morphological
20 infraspecific classification.

21 *Conclusions:* Our analysis indicated that *A. fasciculata* has undergone a slight
22 population expansion related to climate conditions during the Pleistocene but that it has
23 probably remained relatively stable during the LGM. This finding supports the idea that the

1 present Atlantic Rainforest was moulded not only by climatic effects related to the LGM
2 but also by more ancient environmental changes.

3

4 Keywords: Atlantic Rainforest, *Aureliana fasciculata*, Solanaceae, *trnH-psbA*, *trnS-trnG*,
5 past climatic changes.

6

1 INTRODUCTION

2

3 The Atlantic Rainforest is one of the most diverse and threatened biomes in the
4 world: it displays a high level of endemism and is under strong anthropogenic pressure
5 (Myers *et al.*, 2000). There are only approximately 16,000,000 km² remaining from its
6 original coverage, estimated in approximately 150,000,000 km² (MC Ribeiro *et al.*, 2009),
7 and the present area is distributed in a highly fragmented landscape (Tabarelli *et al.*, 2004).
8 The biome occupies an area of complex topography, which was drawn by tectonic activity
9 and sea-level changes during the Pleistocene (Suguoio *et al.*, 2005), and presents a strong
10 seasonality, sharp environmental gradients and orographic-driven rainfall as a result of the
11 winds from the tropical Atlantic. Because of these factors, the Atlantic Rainforest is
12 composed of open, mixed, and closed evergreen, semi-deciduous and deciduous forest
13 landscapes, interspersing patches of forest and areas of open field (Behling, 1999, 2002;
14 Behling & Lichte, 1997; Behling & Negrelle, 2001; Martins, 2011).

15 Efforts have been made recently to understand the factors that have led to the
16 biological diversification of the Atlantic Rainforest and to reconstruct the evolutionary
17 history of this biome. Several studies proposed that the Atlantic Rainforest experienced
18 both contractions (Carnaval and Moritz, 2008; Carnaval *et al.*, 2009) and expansions
19 (Auler *et al.*, 2004) in response to climatic changes during the Quaternary period (Ledru,
20 1993). Phylogeographic evidence has also suggested past fragmentation of the Atlantic
21 Rainforest (Lira *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2004; Ledru *et al.*, 2007). Some progress has
22 been achieved, but studies concerning the evolutionary history of the responses of the trees
23 and shrubs to past climatic oscillations are scarce (Collevati *et al.*, 2009; RA Ribeiro *et al.*,
24 2011). *Aureliana fasciculata* Sendtn. (Solanaceae) is a suitable taxon for studies that aim to

1 add information to these questions because it is widely distributed throughout the Atlantic
2 Rainforest.

3 *Aureliana fasciculata* is a shrub with white and green flowers that occurs
4 throughout the Atlantic Rainforest, with some documented collections in the Parana Basin
5 (Hunziker and Barboza, 1990). Although the shrub presents various habitats preferences
6 and abundant populations (Caiafa and Martins, 2010), it is considered a rare species, with a
7 restricted distribution area. Based on leaf size and pilosity characteristics, three varieties
8 are recognised within the species: *A. fasciculata* var. *fasciculata* Sendtn., *A. fasciculata*
9 var. *longifolia* (Sendtn.) A.T. Hunz. & Barboza and *A. fasciculata* var. *tomentella* (Sendtn.)
10 Barboza & A.T. Hunz (Hunziker and Barboza, 1990).

11 In the present work, the genetic variability of *A. fasciculata* in the Atlantic
12 Rainforest was assessed through the analysis of the DNA sequence variability of two
13 segments of the plastidial genome to investigate the response of the Atlantic Rainforest to
14 climatic changes occurring during the Pleistocene.

15

16 MATERIALS AND METHODS

17

18 *Plant material*

19 A total of 112 *Aureliana fasciculata* individuals collected throughout the Atlantic
20 Rainforest (Fig. 1) were included in the present study. The identification of taxonomic
21 varieties based on morphological features was performed in the laboratory. Leaf tissue was
22 sampled from each individual and preserved in silica gel. See Table 1 for the collection
23 sites and voucher information. One specimen of *Aureliana angustifolia* R.C. Almeida-
24 Lafetá was used as outgroup.

1 *DNA extraction, marker amplification and sequencing*

2 Genomic DNA was extracted from young leaves using the Nucleo Spin Plant II kit
3 (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Two plastidial intergenic regions, *trnH-psbA* and
4 *trnS-trnG*, were amplified using the Polymerase Chain Reaction (PCR) with previously
5 described primers (Sang *et al.*, 1997 and Hamilton, 1999; respectively) and conditions
6 (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Five nanograms of template DNA was amplified using a
7 Veriti thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA), and the resulting PCR
8 products were purified using the polyethyleneglycol precipitation method (Dunn and
9 Blattner, 1987). The sequencing reactions were performed using the ET Terminator Kit
10 (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA) using a MegaBACE 1000 automatic
11 machine (GE Healthcare Biosciences) following the manufacturer's protocols.

12

13 *Sequence alignment and genetic variability analysis*

14 Forward and reverse sequencing reads were analysed for all of the sequences using
15 Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australia), and the alignment was
16 performed using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), implemented in MEGA5 (Tamura *et*
17 *al.*, 2011), and manually edited. The sequences of each marker were combined, as both
18 intergenic spacers belong to the plastidial genome and thus are linked markers. The
19 nucleotide and haplotypic diversities (Nei, 1987) and Fu's F_s (Fu, 1997) and Tajima's D
20 (Tajima, 1989) neutrality tests were estimated for each population and for the entire set of
21 samples using Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010). Mantel's test (Mantel,
22 1967), as implemented in Alleles In Space 1.0 software (Miller, 2005), was employed to
23 evaluate the relationship between the genetic and geographical distances. To access the
24 evolutionary relationship of the haplotypes, a haplotype network was generated using

1 Median Joining methodology ($\epsilon = 0$; Bandelt *et al.*, 1999) with Network 4.6.0.0 software
2 (available at www.fluxus-engineering.com). Indels more than one nucleotide long were
3 manually coded as a single indel. To estimate the genetic variation among the populations
4 and varieties, an analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) was
5 performed using Arlequin via F and Φ -statistics; the pairwise F_{ST} and Φ_{ST} between pairs of
6 populations were also estimated. The Spatial Analysis of Molecular Variation software
7 (SAMOVA; Dupanloup *et al.*, 2002) was used to detect groups of populations that are
8 geographically homogenous and genetically differentiated from each other. We tested two
9 to six groups ($K = 2 - 6$) of populations, and the most suitable K was defined by the F_{CT}
10 value. To avoid misleading estimate of intrapopulation variability, locations with less
11 than five specimens were excluded from any “per population” analysis. The resulting
12 dataset comprised 75% of the original sample.

13

14 *Demography*

15 The population size dynamics over time was investigated using Bayesian skyline
16 plots (BSP; Drummond *et al.*, 2005), as implemented in BEAST software version 1.6.2
17 (Drummond and Rambaut, 2007). The BEAST analysis was performed for 100 million
18 iterations using the HKY+ I evolutive model, and samples were obtained for each 10,000
19 chains. The first 10% of the chains were discarded as burn-in. TRACER 1.5 (available at
20 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) was used to visually inspect the runs. A general
21 substitution rate for plastidial DNA was employed (1.52×10^{-9} per site per year; Yamane *et*
22 *al.*, 2006) as a strict clock prior. The generation time for *A. fasciculata* was considered to
23 be two years (JRS, field observation).

24

1 RESULTS

2

3 *Sequence characterisation*

4 The final data set was composed of 112 *A. fasciculata* sequences, with its three
5 varieties represented by 69 individuals of *A. fasciculata* var. *fasciculata*, 34 of *A.*
6 *fasciculata* var. *longifolia* and nine of *A. fasciculata* var. *tomentella*. The *trnH-psbA*
7 alignment was 254 base pairs (bp) long, and the *trnS-trnG* alignment was 654 bp long
8 (GenBank accession numbers XXXX-XXXX and YYYYY-YYYY, respectively). The
9 combined resulting alignment, including outgroup was 908 bp long, and it presented ten
10 variable sites (five transitions and five transversions) plus seven indel events (Table S1).
11 The nucleotide diversity (π) of *A. fasciculata* was 0.004 ± 0.002 (with indels more than 1
12 bp long coded as a single indel), and the haplotype diversity (h) was 0.850 ± 0.018 ; see
13 Table S1 for a description of the indels [**Supplementary Information**]. Values
14 corresponding to π and h of each collection site are available at Table S2 [**Supplementary**
15 **Information**].

16

17 *Genetic structure and population demography*

18 The non-significant Tajima's D (= 1.536, $P > 0.05$) and Fu's F_s (= -0.809, $P > 0.02$)
19 neutrality tests suggest a history of demographic stability for the species. When performed
20 for each collection site separately, only L11 displayed a statistically significant value
21 (Tajima's D = -1.831 $P < 0.05$). See Table S2 [**Supplementary Information**] for all of the
22 neutrality tests results per location. Mantel's test indicated a weak to moderate correlation
23 between the genetic and geographical distances ($r^2 = 0.30$, $P < 0.001$).

1 The 17 polymorphisms observed in the whole dataset characterised 15 haplotypes;
2 one haplotype (H15) was exclusively identified as an outgroup: *Aureliana angustifolia*.
3 The most frequent haplotype was H1, which was detected in 32 individuals from seven
4 different collection sites. A complete description of the haplotypes and polymorphisms is
5 provided in Table S1.

6 The haplotype network suggests the existence of two groups of haplotypes in the
7 species (Fig. 2). One group, named South Group (SG), comprised the larger amount of
8 sampled individuals (79) and haplotypes (10). SG was composed of all of the specimens
9 sampled from Northeast Argentina and from the Santa Catarina (SC), Paraná (PR), and São
10 Paulo (SP) Brazilian states, with the exception of one individual from SP collected in
11 collection site 11 (see Table 1). The other group of haplotypes, referred to as North Group
12 (NG), was composed of four haplotypes (33 individuals) comprising all of specimens
13 collected from the Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) and Bahia (BA) Brazilian
14 states, with exception of one individual from collection site 2 in BA, which belongs to SG.
15 Three individuals from *A. fasciculata* var. *fasciculata* from Rio de Janeiro (RJ) were
16 collected on the SP border and displayed an exclusive haplotype (H14) included in SG. Of
17 note, the specimens collected in Itatiaia National Park, RJ, were distributed in both SG and
18 NG and represent different varieties of the species. The specimens included in NG
19 presented haplotype H4 and were identified as *A. fasciculata* var. *fasciculata*; those of *A.*
20 *fasciculata* var. *tomentella* included in SG displayed haplotype H1. The outgroup
21 haplotype (H15) was connected to SG.

22 Haplotypes H2 and H4 were detected in individuals of both *A. fasciculata* var.
23 *fasciculata* and *A. fasciculata* var. *longifolia*. Specimens belonging to the three varieties of
24 *A. fasciculata* displayed haplotype H1. The sampled individuals of *A. fasciculata* var.

1 *tomentella* did not present any exclusive haplotype. All of the specimens of this variety
2 exhibited haplotypes H1 or H4, both highly frequent in SG.

3 The AMOVA indicated a high level of differentiation among the groups defined as
4 collection localities ($F_{ST} = 0.668$, $\Phi_{ST} = 0.821$; $P < 0.001$), yet a low differentiation was
5 detected among the three varieties of *A. fasciculata* ($F_{ST} = 0.163$, $\Phi_{ST} = 0.223$; $P < 0.001$).
6 The SAMOVA results corroborated the existence of two distinct groups in *A. fasciculata*
7 ($F_{CT} = 0.665$, $P < 0.001$), which corresponded to the NG and SG groups, as detected by
8 network reconstruction. When $K = 3$ was considered ($F_{CT} = 0.675$, $P < 0.001$), the resulting
9 grouping pattern was similar to the one detected when $K = 2$, except the population
10 collected at location 20 (SC) was considered a third group. When $K = 4 - 6$, the F_{CT} values
11 reached a plateau. Despite the few exceptions already described for the localities, 2 (BA),
12 16 (SP), and 8 (RJ), the groups recovered by the SAMOVA and network analysis
13 correspond to two geographical groups of collection sites (indicated in Fig. 1). When
14 neutrality tests were performed for NG and SG separately, the results indicate population
15 stability (Tajima's $D = -1.09$ $P > 0.05$ and Fu's $F_s = 0.745$ $P > 0.02$ for NG; Tajima's $D = -$
16 0.459 $P > 0.05$ and Fu's $F_s = -0.685$ $P > 0.02$ for SG). The pairwise F_{ST} and Φ_{ST}
17 comparisons (Table 2) indicated a statistically significant pattern of geographic structure
18 and displayed high values when comparisons were performed between the NG (2, 6, and
19 7) and SG locations (11, 12, 12, 17, 19, 20, 21, and 22).

20 The BSP was consistent with a pattern of a slight population increase, circa 50,000–
21 60,000 years ago (50–60 Kya) (Fig. 3). The current estimated number of effective
22 population size was ~1,000,000, but the confidence interval of this estimative was broad.

23

24 DISCUSSION

1

2 *Genetic variability and demography*

3 The values of π and h obtained for the *A. fasciculata* plastidial markers included in
4 this analysis were similar to those described in the literature for the same plastidial
5 intergenic regions obtained for shrubs or trees in Atlantic Rainforest (Ramos *et al.*, 2009;
6 RA Ribeiro *et al.*, 2011) and other Angiosperm species (Petit *et al.*, 2005).

7 The plastidial sequences of the *A. fasciculata* in the Atlantic Rainforest identified a
8 genetically diverse shrub species with southern and northern geographic groups. Several
9 studies have found a north–south split in the Atlantic Rainforest for both plants and
10 animals (Pellegrino *et al.*, 2005; Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Carnaval *et*
11 *al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011), but the
12 position of the putative "barrier" varied widely. Many studies found a separation around
13 the Doce River in the ES state (see Carnaval and Moritz, 2008) whereas others detected
14 southern divisions around SP or between SP and RJ (Colombi *et al.*, 2010). The division
15 identified in the present study for *A. fasciculata*, approximately between the SP and RJ
16 states, is more consistent with the latter findings.

17 The presence of both NG and SG individuals were detected in Itatiaia National Park
18 (RJ); the detection of a typical NG haplotype (H4) in one individual in a southern
19 collection site (16) and an SG haplotype (H1) in one specimen in a far northern location (2)
20 might have been caused by minor recent dispersion (allele introgression) or shared
21 ancestral polymorphism (incomplete lineage sorting).

22 The increase in *A. fasciculata* population size detected circa 50–60 Kya is
23 consistent with the expansion of the forest, as detected by the observation of an increased
24 amount of tree pollen recorded 60 Kya in two SP locations (Ledru *et al.*, 2005). As

1 previously described by Ledru (1993), a high arboreal pollen frequency is associated with a
2 short dry season and moist climate in low latitudes in the tropics, which could increase the
3 distribution area when the weather is wetter. In addition, the absence of evidence of a
4 population bottleneck during the Last Glacial Maximum (LGM, ca. 21,000 years ago) or a
5 population expansion associated with the recent interglacial period is in accord with a
6 scenario described for other non-forest species (Jakob *et al.*, 2009; Antonelli *et al.*, 2010;
7 Cosacov *et al.*, 2010) and sand-dune plants (Kadereit *et al.*, 2005; King *et al.*, 2009),
8 suggesting that a significant proportion of the species did not undergo a dramatic range
9 fragmentation into separate glacial refuges during the LGM.

10 The phylogeographic pattern detected in the present work has considerable
11 implications for conservation. Despite its presence inside conservation areas, *A. fasciculata*
12 is found mainly along roadsides when outside the protected regions (see Table 1), which
13 might be related to the seed dispersal by frugivorous bats because *A. fasciculata* fruits are
14 fleshy berries. This environment is highly unstable and is almost impossible to preserve. In
15 a broader perspective, the area named ‘Serra do Mar Corridor’, comprising RJ and eastern
16 regions of SP and where most of our collection sites are located, is considered to be one of
17 the richest areas of endemism in the entire Atlantic Rainforest (Werneck *et al.*, 2011); this
18 area is of special interest for *A. fasciculata* conservation efforts.

19

20 *Taxonomic implications*

21 An important question that emerges from the present results is related to the
22 taxonomic status of the varieties of *Aureliana fasciculata*. The present infraspecific
23 classification is not supported by our genetic results: according to our AMOVA results, a
24 low genetic differentiation was detected among the varieties, in contrast to the elevated

1 differentiation revealed among the collection locations. Different morphologies were found
2 in sympatry in some locations (collection sites 12, 13, 15, 17, and 21) and presented
3 closely related haplotypes. The incongruence between the morphologically determined
4 infraspecific classification and the distribution of genetic variability among the three
5 varieties could be attributed to a plasticity of the morphological characters selected as
6 diagnostics to identify the varieties (reviewed by Nicotra *et al.*, 2010). The existence of
7 shared plastidial DNA haplotypes among the three *A. fasciculata* varieties and the genetic
8 similarity detected among them is possibly related to the geographical structure of the
9 distribution of variability within the species that was detected by our analysis. However,
10 given that plastidial genome markers exhibit slow evolutionary rates (Wolfe *et al.*, 1987),
11 evidence using nuclear markers with faster evolutionary rates, such as microsatellites,
12 could help to elucidate better the evolutionary history of the infraspecific taxa (Zamberlan
13 *et al.*, in press).

14 In conclusion, our results suggest that the infraspecific classification of *A.*
15 *fasciculata* is not congruent with the distribution of genetic variability within the species.
16 A careful taxonomic review of the species is recommended. Future classifications should
17 take into account both genetic and morphological information. Regarding the
18 phylogeographic pattern of *A. fasciculata* and its implications in our understanding of the
19 Atlantic Rainforest, our analysis indicates that the species has undergone a slight
20 population expansion within the last 50-60 Kya and that it probably has remained stable
21 during the LGM. This finding supports the idea that the present Atlantic Rainforest was
22 moulded not only by climatic effects related to the LGM but also by more ancient
23 environmental changes.

24

1 FUNDING

2 This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
3 e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação
4 de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul; and Programa de Pós-Graduação
5 em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

6

7 ACKNOWLEDGEMENTS

8 We thank Geraldo Mäder, Gloria Barboza, Izabella Rodrigues, Leandro Giacomini,
9 Pedro Viana, and Verônica Thode for assistance in the field collections and Luana Castro
10 and Cladinara Sarturi for lab assistance.

11

12 LITERATURE CITED

13

14 **Antonelli A, Verola C, Parisod C, Gustafsson AL. 2010.** Climate cooling promoted the
15 expansion and radiation of a threatened group of South American orchids
16 (Epidendroideae: Laeliinae). *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 597-607.

17 **Auler AA, Wang X, Edwards RL, et al. 2004.** Quaternary ecological and geomorphic
18 changes associated with rainfall events in presently semi-arid northeastern Brazil.
19 *Journal of Quaternary Science* **19**: 693-701.

20 **Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999.** Median-Joining networks for inferring intraspecific
21 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 37-48.

22 **Behling H. 1999.** Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of*
23 *Paleobotany and Palynology* **99**: 143-156.

- 1 **Behling H. 2002.** South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a
2 synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **177**: 19-27.
- 3 **Behling H, Lichte M. 1997.** Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times
4 in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research* **48**: 348-358.
- 5 **Behling H, Negrelle RRB. 2001.** Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic
6 lowland, Southern Brazil, during the late Quaternary. *Quaternary Research* **56**: 383-389.
- 7 **Cabanne GS, Santos FR, Miyaki CY. 2007.** Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus*
8 (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in
9 southern Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 73-84.
- 10 **Caiafa AN, Martins FR. 2010.** Forms of rarity of tree species in the southern Brazilian
11 Atlantic Rainforest. *Biodiversity and Conservation* **19**: 2597-2618.
- 12 **Carnaval AC, Moritz C. 2008.** Historical climate modeling predicts patterns of current
13 biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* **35**: 1187-1201.
- 14 **Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C. 2009.** Stability
15 predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* **323**: 785-789.
- 16 **Collevatti RG, Rabelo SG, Vieira RF. 2009.** Phylogeography and disjunct distribution in
17 *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered Cerrado shrub species. *Annals of*
18 *Botany* **104**: 655-664.
- 19 **Colombi VH, Lopes SR, Fagundes V. 2010.** Testing the Rio Doce as a riverine barrier in
20 shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*.
21 *Genetics and Molecular Biology* **33**: 758-759.

- 1 **Cosacov A, Sérsic AN, Johnson L, Sosa V, Cocucci AA. 2010.** Multiple periglacial
2 refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the
3 phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography* **37**: 1463-1477.
- 4 **Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B & Pybus OG. 2005.** Bayesian Coalescent
5 Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology*
6 *and Evolution* **22**: 1185-1192.
- 7 **Drummond AJ, Rambaut A. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling
8 trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214
- 9 **Dunn IS, Blattner FR. 1987.** Charons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity,
10 recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic*
11 *Acids Research* **15**: 2677-2698.
- 12 **Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002.** A simulated annealing approach to define
13 the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**: 2571-2581.
- 14 **Excoffier L, Lischer HEL. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to
15 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*
16 *Resources* **10**: 564-567.
- 17 **Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992.** Analysis of molecular variance inferred
18 from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial
19 DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- 20 **Fitzpatrick SW, Brasileiro CA, Haddad CFB, Zamudio KR. 2009.** Geographical
21 variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional
22 differences in habitat stability. *Molecular Ecology* **18**: 2877-2896.

- 1 **Fu YX. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,
2 hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.
- 3 **Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL. 2006.** Phylogeography of the
4 *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island
5 colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* **15**: 3969-3982.
- 6 **Hamilton MB. 1999.** Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic
7 regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* **8**: 513-525.
- 8 **Ho SYW, Shapiro B. 2011.** Skyline-plot methods for estimating demographic history from
9 nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources* **11**: 423-434.
- 10 **Hunziker AT, Barboza GE. 1990.** Estudios sobre *Solanaceae* XXX. Revision de
11 *Aureliana Darwiniana* **30**: 95-113.
- 12 **Jakob SS, Martinez-Meyer E, Blattner FR. 2009.** Phylogeographic analyses and
13 paleodistribution modeling indicate Pleistocene in situ survival of *Hordeum* species
14 (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or spatial restriction. *Molecular Biology*
15 *and Evolution* **26**: 907-923.
- 16 **Kadereit JW, Arafah R, Somogyi G, Westberg E. 2005.** Terrestrial growth and marine
17 dispersal? Comparative phylogeography of five coastal plant species at a European scale
18 *Taxon* **54**: 861-876.
- 19 **King MG, Horning ME, Roalson EH. 2009.** Range persistence during the last glacial
20 maximum: *Carex macrocephala* was not restricted to glacial refugia. *Molecular Ecology*
21 **18**: 4256-4269.
- 22 **Ledru MP. 1993.** Late Quaternary environmental and climatic change in central Brazil.
23 *Quaternary Research* **39**: 90-98.

- 1 **Ledru MP, Rousseau DD, Cruz Jr. FW, Riccomini C, Karmann I, Martin L. 2005.**
2 Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic
3 Rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research* **64**: 444-450.
- 4 **Ledru MP, Salatino MLF, Ceccantini G, Salatino A, Pinheiro F, Pintaud JC. 2007.**
5 Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical
6 conifer in the lowlands of South America. *Diversity and Distributions* **13**: 761-771.
- 7 **Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA, Provan H. 2003.** Longterm
8 population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam.
9 revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology* **12**: 3219-3225.
- 10 **Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, et al. 2006.** Diversity and natural
11 hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and
12 ecological analysis. *Molecular Ecology* **15**: 4487-4497.
- 13 **Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach.
14 *Cancer Research* **27**: 209-220.
- 15 **Martins FM. 2011.** Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the
16 Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell
17 us? *Biological Journal of the Linnean Society* **104**: 499-509.
- 18 **Miller MP. 2005.** Alleles in Space (AIS): Computer software for the joint analyses of
19 interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* **96**: 722-724.
- 20 **Minin VN, Bloomquist EW, Suchard MA. 2008.** Smooth skyride through a rough
21 skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Molecular*
22 *Biology and Evolution* **25**: 1459-1471.

- 1 **Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000.** Biodiversity
2 hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- 3 **Nei M. 1987.** *Molecular evolutionary genetics*. New York, NY: Columbia University Press.
- 4 **Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, et al. 2010.** Plant phenotypic plasticity in a changing
5 climate. *Trends in Plant Science* **15**: 684-692.
- 6 **Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barabará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH.**
7 **2009.** Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea*
8 (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity* **103**: 503-512.
- 9 **Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY, Sites JW.**
10 **2005.** Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex
11 (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian
12 Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 13–26.
- 13 **Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG. 2005.**
14 Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant
15 populations. *Molecular Ecology* **14**: 689-701.
- 16 **Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, et al. 2010.** Hybridization and introgression across
17 different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E.*
18 *puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* **19**: 3981-3994.
- 19 **Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Lovato MB. 2009.** Phylogeographical structure of the
20 Neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its
21 relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of*
22 *Heredity* **100**: 206-216

- 1 **Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Pozoni FJ, Hirota MM. 2009.** The Brazilian
2 Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed?
3 Implications for conservation. *Biological Conservation* **142**: 1141-1153.
- 4 **Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB. 2011.** Phylogeography of the
5 endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history
6 and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* **106**: 46-57.
- 7 **Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro M, Margis R. 2004.** Even population
8 differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely
9 distributed species from the Brazilian Coastal Atlantic Rainforest. *Diversity and*
10 *Distributions* **10**: 201-210.
- 11 **Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. 1997.** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate
12 evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* **84**:
13 1120-1136.
- 14 **Suguio K, Angulo RJ, Carvalho AM, et al. 2005.** Paleoníveis do mar e paleolinhas de
15 costa. In: Souza CRG, Suguio K, Oliveira AMS, Oliveira PE, eds. *Quaternário do*
16 *Brasil*. Ribeirão Preto: Holos, 114-129.
- 17 **Tabarelli M, Silva JMC, Gascon C. 2004.** Forest fragmentation, synergisms and the
18 impoverishment of neotropical forests. *Biodiversity and Conservation* **13**: 1419-1425.
- 19 **Tajima F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA
20 polymorphism. *Genetics* **123**: 588-595.
- 21 **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5:
22 Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary

- 1 distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-
2 2739.
- 3 **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity
4 of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
5 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- 6 **Werneck MS, Sobral MEG, Rocha CTV, Landau EC, Stehmann JR. 2011.** Distribution
7 and endemism of Angiosperms in the Atlantic Forest. *Natureza & Conservação* **9**:188-
8 193.
- 9 **Wolfe KH, Wen-Hsiung L, Sharp PM. 1987.** Rates of nucleotide substitution vary
10 greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of*
11 *National Academy of Science USA* **84**: 9054-9058.
- 12 **Yamane K, Yano K, Kawahara T. 2006.** Pattern and rate of indel evolution inferred from
13 whole chloroplast intergenic regions in sugarcane, maize and rice. *DNA Research* **13**:
14 197-204.
- 15 **Zamberlan PM, Silva MS, Ramos-Fregonezi, AMC, Bonatto SL, Freitas LB. 2012.**
16 Microsatellites in *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata* (Solanaceae), a shrub that
17 inhabits Atlantic Rainforest. *American Journal of Botany* (in press).
18

Table 1. The collection site names and identification (ID), total and per variety number of individuals sampled (N), geographical coordinates and voucher information are shown for *Aureliana fasciculata* (ID 1–23) and *Aureliana angustifolia* (ID 24) individuals included in the present research. The italicised letters refer to *A. fasciculata* varieties as follows: *A. fasciculata* var. *fasciculata* (*f*); *A. fasciculata* var. *longifolia* (*l*); and *A. fasciculata* var. *tomentella* (*t*).

ID	Collection site*	N (<i>f</i> , <i>l</i> , <i>t</i>)	Location	Voucher**
1	Road BA-270/Itacaré, BA.	2 (2, 0, 0)	15 25' 14"S, 39 16' 13"W	BHCB126144
2	Conservation Area Serra Bonita, Camacan, BA.	15 (15, 0, 0)	15 23' 10"S, 39 34' 04"W	BHCB126175
3	Talisman, Santa Maria do Salto, MG.	1 (1, 0, 0)	16 24' 34"S, 40 02' 45"W	BHCB126176
4	Santa Teresa, ES.	3 (0, 0, 3)	19 56' 11"S, 40 35' 59"W	BHCB115995
5	Nova Friburgo, RJ.	2 (2, 0, 0)	22 22' 32"S, 42 29' 28"W	BHCB145094
6	Teresópolis, RJ.	5 (5, 0, 0)	22 26' 52"S, 42 57' 05"W	BHCB145091
7	Itatiaia National Park, RJ.	5 (5, 0, 0)	22 26' 51"S, 44 36' 09"W	BHCB145030
8	BR-485 Road, Itatiaia National Park, RJ.	4 (0, 0, 4)	22 22' 04"S, 44 44' 25"W	BHCB145058
9	Road Paraty-Cunha, RJ.	3 (3, 0, 0)	23 11' 42"S, 44 50' 17"W	BHCB115989
10	Serra do Mar State Park, Cunha, SP.	2 (0, 2, 0)	23 13' 49"S, 45 01' 18"W	BHCB115984
11	Conservation Area Japi, Jundiá, SP.	16 (16, 0, 0)	23 14' 41"S, 46 56' 12"W	BHCB115929
12	Road SP-088, Biritiba Mirim – Salesópolis, SP.	5 (3, 2, 0)	23 14' 41"S, 46 56' 12"W	NA, BHCB115978 <i>l</i>
13	Conservation Área Boracéia SP.	10 (1, 9, 0)	23 39' 14"S, 45 53' 21"W	BHCB115976 <i>f</i> , BHCB115959 <i>l</i>
14	Moji das Cruzes, SP.	2 (0, 2, 0)	23 40' 01"S, 46 08' 02"W	BHCB115939
15	Road Paranapiacaba-Taquarussú, Paranapiacaba, SP.	4, (3, 1, 0)	23 45' 54"S, 46 17' 15"W	BHCB145129 <i>f</i> , BHCB145132 <i>l</i>
16	Conservation Area IB, Paranapiacaba, Sto. André SP.	1 (1, 0, 0)	23 46' 25"S, 46 18' 44"W	BHCB145008
17	Nascentes de Paranapiacaba Park, Paranapiacaba, Santo André, SP.	5 (4, 1, 0)	23 47' 13"S, 46 18' 18"W	BHCB145010 <i>f</i> , BHCB145017 <i>l</i>
18	Road Embu-Guaçu, SP.	1 (1, 0, 0)	23 47' 05"S, 46 49' 57"W	BHCB145005
19	Quatro Barras, PR.	6 (0, 6, 0)	25 22' 47"S, 49 02' 16"W	NA
20	Barra do Saí, Itapoá, SC.	6 (6, 0, 0)	26 00' 52"S, 48 36' 40"W	BHCB143435
21	Itaiópolis, SC.	6 (2, 4, 0)	26 32' 58"S, 49 46' 30"W	BHCB143439 <i>f</i> , BHCB143437 <i>l</i>
22	Bituruna, PR.	6 (0, 6, 0)	26 04' 30"S, 51 40' 49"W	NA
23	Dpto. Guarani, Misiones, Argentina.	2 (0, 0, 2)	26 52' 23"S, 54 13' 50"W	NA
24	Juiz de Fora, MG.	1	21 41' 20"S, 43 20' 40"W	BHCB134380

NA – not available;

*Abbreviations correspond to Brazilian states as follows: BA, Bahia; ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; PR, Paraná; RJ, Rio de Janeiro; SC, Santa Catarina; and SP, São Paulo. **BHCB: 'Universidade Federal de Minas Gerais' Herbarium.

Table 2. Pairwise F_{ST} (above) and Φ_{ST} (below) estimated from combined *trnS-trnG* and *trnH-psbA* plastidial intergenic spacers of *Aureliana fasciculata* from locations where more than four individuals were sampled. See Table 1 for the collection site identification (ID).

ID	2	6	7	11	12	13	17	19	20	21	22
2	-	0.524	0.639*	0.658*	0.434	0.620*	0.422*	0.548*	0.654*	0.467*	0.523*
6	0.281	-	1.000	0.898*	0.700	0.865*	0.650	0.817	1.000	0.709*	0.817
7	0.603	1.000	-	0.904*	0.700	0.865*	0.650	0.817	1.000	0.709	0.817
11	0.827*	0.898*	0.915*	-	0.327	0.846*	0.719*	0.815*	0.908*	0.626	0.005
12	0.785*	0.880	0.900	0.204	-	0.447	0.293	0.544	0.727	0.294	0.078
13	0.846*	0.956*	0.954	0.756*	0.447	-	0.488	0.726	0.874*	0.645*	0.749*
17	0.781*	0.875	0.897	0.667*	0.412	0.588	-	0.020	0.681*	0.023	0.497
19	0.839*	0.964	0.970	0.771*	0.663	0.809	0.022	-	0.833	0.025	0.667
20	0.874*	1.000*	1.000	0.858*	0.753	0.793*	0.806	0.947	-	0.733*	0.833*
21	0.793*	0.882	0.902	0.502*	0.294	0.645	0.002	0.160	0.822*	-	0.400
22	0.829*	0.964	0.970	0.298	0.231	0.827*	0.692	0.857	0.947	0.5333	-

* $P < 0.001$

Supplementary Information

Table S1. List of 15 haplotypes identified among 112 individuals of *Aureliana fasciculata* plus one individual of *A. angustifolia* (H15). The numbers indicate the variable positions in each plastidial region (*trnH-psbA*, 1 to 254; *trnS-trnG*, 255 to 908). N represents the number of individuals that presented each haplotype.

Haplotype	N	Site																
		<i>psbA-trnH</i>								<i>trnS-trnG</i>								
		0	2	4	5	7	7	4	8	6	6	6	6	7	7	8	8	8
H1	32	-	†	A	C	C	A	A	-	C	°	-	-	C	G	-	A	A
H2	16	-	†	T	-	A	°	-	-	.	.	-	.	.
H3	6	-	-	-	A	°	-	-	.	.	✕	.	.
H4	16	-	†	.	T	.	.	.	-	A	-	-	-	.	T	-	G	.
H5	2	-	†	.	T	.	.	G	-	A	-	-	-	.	T	-	G	.
H6	10	-	†	.	T	.	.	.	-	A	-	-	-	.	T	-	G	G
H7	1	-	†	-	.	°	-	-	.	T	-	.	.
H8	1	-	†	T	-	A	°	-	-	.	T	-	.	.
H9	5	-	†	.	T	.	.	.	-	A	-	-	^	.	T	-	G	.
H10	16	-	-	-	A	°	-	-	.	.	-	.	.
H11	2	-	-	-	A	°	◇	-	.	.	-	.	G
H12	1	-	†	-	.	°	-	-	.	.	-	.	.
H13	1	-	†	T	◆	A	°	-	-	.	.	-	.	.
H14	3	*	†	-	.	°	-	-	.	.	-	.	.
H15	1	-	†	.	.	A	C	.	-	A	°	-	-	A	.	-	.	.

*Indel 6 bp long; †Indel 13 bp long; ◆Indel 8 bp long; °Indel 15 bp long; ◇Indel 5 bp long; ^Indel 6 bp long; ✕Indel 4 bp long.

Table S2. Collection site identification (ID; see Table 1 for the corresponding geographical location), number of haplotypes detected (H), haplotypic diversity (h), nucleotide diversity (π), and Tajima's D and Fu's Fs neutrality indices estimated for the combined *trnS-trnG* and *trnH-psbA* plastidial intergenic spacers of *Aureliana fasciculata*. Locations with less than five individuals sampled were excluded. SD corresponds to standard deviation values.

ID	H	h (SD)	π (SD)	Tajima's D	Fu's Fs
1	-	-	-	-	-
2	3	0.524 (0.116)	0.0013 (0.0010)	-1.159	1.225
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	1	0	0	0	-
7	1	0	0	0	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	2	0.125 (0.106)	0.0007 (0.0006)	-1.831*	1.661
12	2	0.600 (0.175)	0.0013 (0.0012)	1.225	1.688
13	2	0.200 (0.154)	0.0004 (0.0005)	-1.112	0.586
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	3	0.700 (0.218)	0.0013 (0.0012)	-0.973	-0.186
18	-	-	-	-	-
19	2	0.333 (0.215)	0.0004 (0.0005)	0	-0.003
20	1	0	0	0	-
21	2	0.533 (0.172)	0.001187 (0.001042)	1.032	1.723
22	2	0.333 (0.215)	0.000371 (0.000488)	-0.933	-0.003
23	-	-	-	-	-

*P < 0.05

Figure captions

Fig. 1. Map indicating the collection sites of *Aureliana fasciculata* and Brazilian states. The putative barrier inferred using the SAMOVA is displayed as a red dashed line.

Fig. 2. Median-joining network of combined *psbA-trnH* and *trnS-trnG* plastidial spacer region haplotypes of 112 *Aureliana fasciculata* individuals according to (A) their geographical location (abbreviations correspond to Brazilian states: BA, Bahia; ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; PR, Paraná; RJ, Rio de Janeiro; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo; and AR, Argentina) and (B) the morphological variety of the species. H15 is an *A. angustifolia* haplotype. The circumference size is proportional to the haplotype frequency. Mutational events are shown in the network as dashes.

Fig 3. Demographic history of *Aureliana fasciculata*, as determined using a Bayesian skyline plot. The black line represents the posterior median value. The lilac area represents the 95% Bayesian credible interval. Y axis corresponds to effective population size (N_e).

Fig. 1

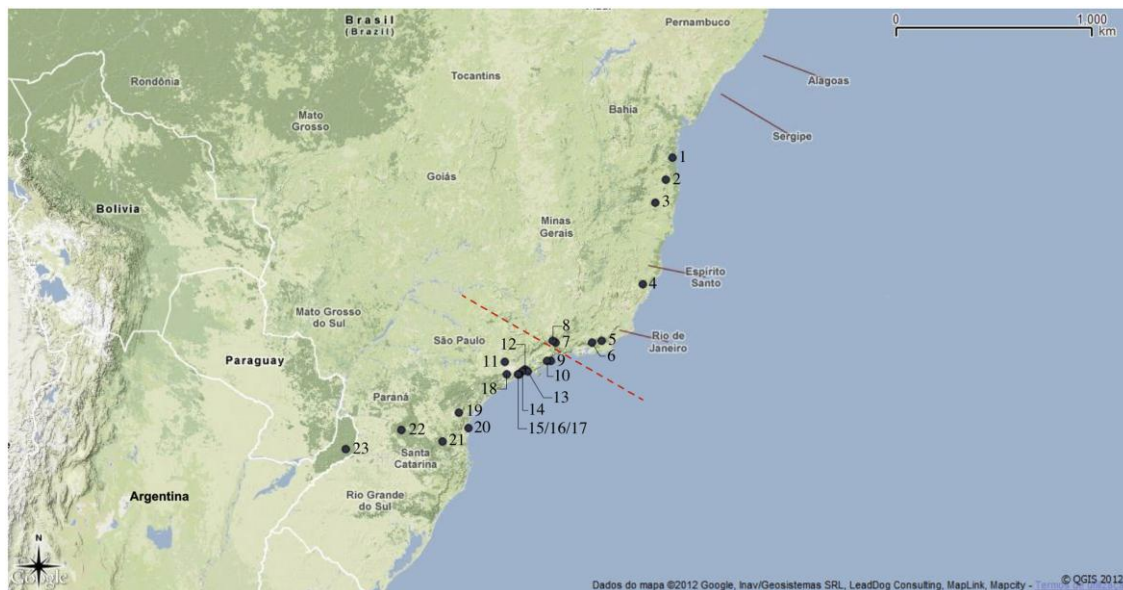


Fig. 2

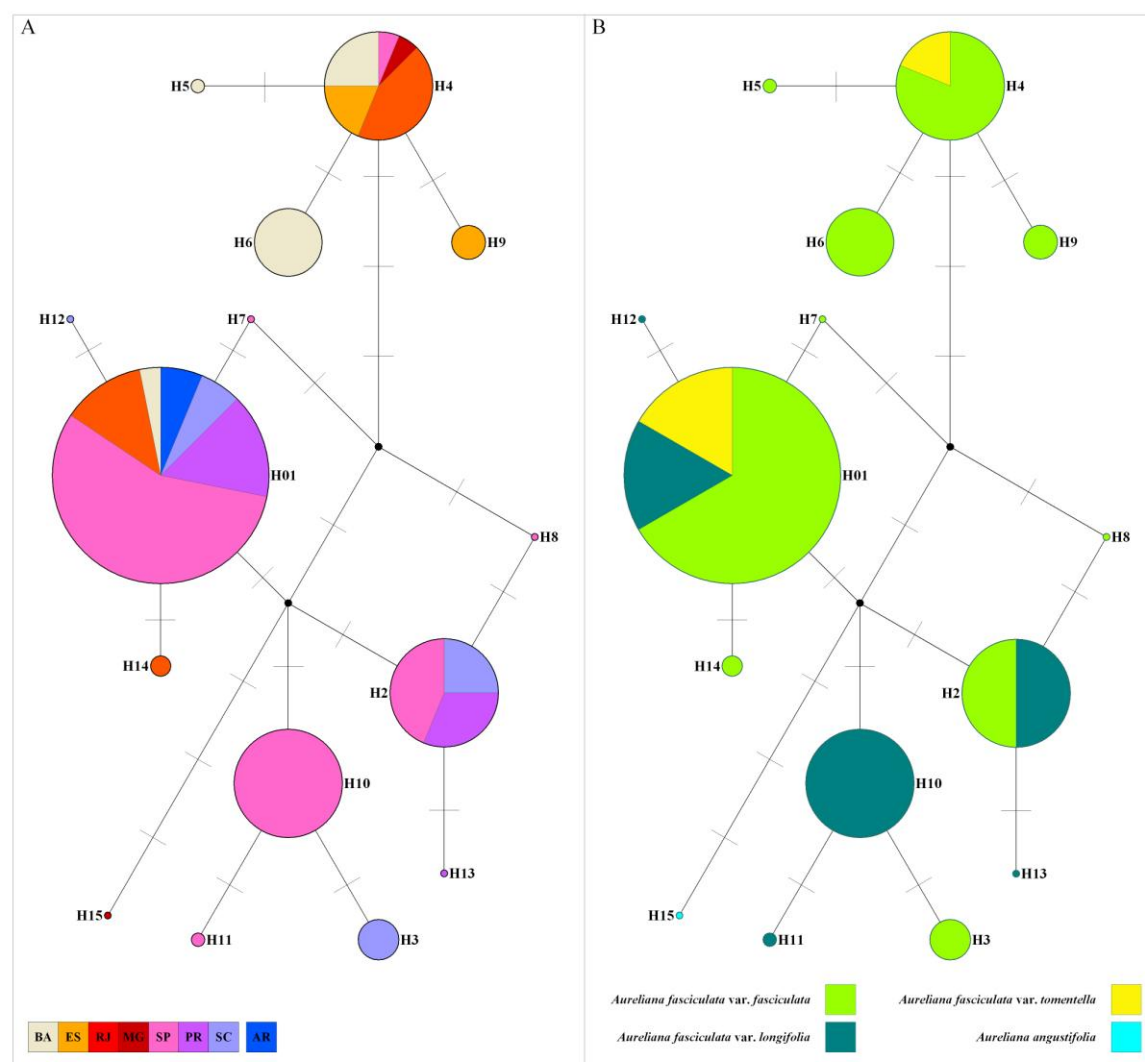
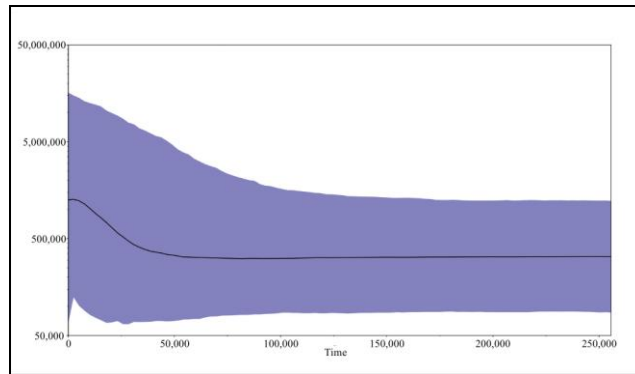


Fig. 3



Artigo 3

“Microsatellites in *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata* (Solanaceae), a shrub that inhabits Atlantic Rainforest”

Artigo aceito para publicação no periódico “American Journal of Botany - Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences”.

Draft manuscript submitted for Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences

Short Title for Running Head: AJB Primer Notes & Protocols - Aureliana fasciculata microsatellites

Microsatellites in *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata* (Solanaceae), a shrub that inhabits Atlantic Rainforest¹

Priscilla M. Zamberlan², Michele S. da Silva², Aline M. C. Ramos-Fregonezi², Sandro L. Bonatto³, Loreta B. Freitas^{2,4}

²Laboratory of Molecular Evolution, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, ³Laboratory of Genomic and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil

Email addresses:

PMZ: priscilla.zamberlan@gmail.com

MSS: mi.chele.ss@hotmail.com

AMCRF: alinemitcheli@gmail.com

SLB: slbonatto@puers.br

LBF: loreta.freitas@ufrgs.br

Number of words: 1151

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

⁴Author for correspondence: loreta.freitas@ufrgs.br

Acknowledgments: The authors thank Dr. A. P. Souza, F. W. Cidade, and G. Mori for technical support, Dr. J. R. Stehmann, Dr. G. E. Barboza, I. M. C. Rodrigues, and L. Giacomini for field collections, and CNPq, CAPES, FAPERGS, and PPGBM-UFRGS for financial support and grants.

ABSTRACT

Premise of the study: Microsatellite primers were developed in *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*, a shrub that inhabits Atlantic Rainforest, to investigate the intraspecific genetic structure of the species.

Methods and Results: Nine pairs of microsatellite primers were designed that were based on an SRR-enriched library. Seven loci were amplified successfully. Two populations of *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata* were genotyped and all loci were polymorphic, with 2–5 alleles per locus per population detected. Cross-species amplification was achieved in other members of the genus and members of the sister genus *Athenaea*.

Conclusions: The development of these microsatellite markers will contribute to future population genetic studies in *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*. Cross-amplification among other species in the genus and the sister genus *Athenaea* might be a useful tool to establish patterns of genetic variability within the Atlantic Rainforest.

Key words: Atlantic Rainforest; *Aureliana fasciculata*; microsatellites.

INTRODUCTION

Putative refuge areas in the Atlantic Rainforest have been proposed (Carnaval & Moritz, 2008), but have not been tested by studies of intraspecific plant genetic diversity, since the knowledge of the genetic diversity in plants that inhabit this biome is scarce. Given its wide distribution, *A. fasciculata* var. *fasciculata* is an excellent taxon for this type of study. The identification of informative genetic markers within this species is an important first step that makes such an investigation possible.

Aureliana fasciculata (Vell.) Sendtn. inhabits Atlantic Rainforest, from northeast Brazil to northeast Argentina (Misiones). Owing to the high morphological variability of leaf size, pilosity, and trichomes occurrence in the species, three varieties are recognized: *A. fasciculata* var. *fasciculata*, *A. fasciculata* var. *longifolia* (Sendtn.) A.T. Hunz. & Barboza, and *A. fasciculata* var. *tomentella* (Sendtn.) Barboza & A.T. Hunz. (Hunziker & Barboza, 1990; Hunziker, 2001). Of these varieties, *A. fasciculata* var. *fasciculata* has the broadest distribution, occurring from northeast to south Brazil. *A. fasciculata* var. *longifolia* occurs only in the northeast and southeast regions of the country, and *A. fasciculata* var. *tomentella*

is distributed from southeast Brazil to northeast Argentina (Misiones Province). Seven other species in this genus are endemic to Atlantic Rainforest (Stehmann, 2009).

The aim of this study was to develop and characterize microsatellite markers in *A. fasciculata* var. *fasciculata* and to test their transferability to other *Aureliana* species and those of its sister genus, *Athenaea* Sendtn. (sensu Olmstead et al., 2008).

METHODS AND RESULTS

Total DNA from one individual of *A. fasciculata* var. *fasciculata* was obtained from powdered leaves using the NucleoSpin Plant II DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Simple sequence repeats (SSRs) were isolated using an enriched library methodology (adapted from Zane et al., 2002). In brief, total DNA was cleaved with the restriction enzyme *RsaI* and the resulting fragments were linked to two complementary oligo adapters. One of the adapters was used as a primer for the polymerase chain reaction (PCR). The resulting PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Fragments that contained microsatellite repeats were selected with the biotinylated probes (dCT)₈ and (dGT)₈, and isolated with Dynabeads M-280 Streptavidin magnetic particles (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). An additional PCR was performed using one of the adapters as a primer. The PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and inserted into competent XL1-Blue *E. coli*. Ninety-four positive colonies were grown in liquid LB medium and stocks were prepared in LB that contained 30% glycerol. The SSR-enriched library was screened by PCR amplification of the plasmid DNA, followed by purification and sequencing of the amplified products using the T7 and SP6 vector primers with a MegaBACE™ 1000 automated sequencer (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Fourteen inserted fragments contained microsatellites (considered as di-nucleotide motifs with at least six repeats), of which nine presented adequate number of flanking nucleotides to allow primers pairing, and were therefore suitable for the construction of primers. Primers were designed using the Primer3 electronic engine (Rozen & Skaletsky, 2000).

DNA from individuals from two populations of *A. fasciculata* var. *fasciculata*, Japi (southeast Brazil, $n = 20$) and Serra Bonita (northeast Brazil, $n = 20$), was used to test the primers. Six *Aureliana* and six *Athenaea* species (1 – 3 individuals each) were tested for cross-amplification. Amplifications were performed in a 15- μ L reaction that contained 10 ng of template DNA, 200 μ M each dNTP (Invitrogen, Carlsbad,

California, USA), 2.0 pmol each of fluorescently labeled M13(-21) primer and reverse primer, 0.4 pmol of forward primer with a 5'-M13(-21) tail, 2.0 mM MgCl₂ (Invitrogen), and 0.5 U of Taq Platinum DNA polymerase and 1× Taq Platinum reaction buffer (Invitrogen). Fragments were analyzed on a MegaBACE™ 1000 automated sequencer using an ET-ROX 550 size ladder (GE Healthcare). Microsatellite genotypes were determined using GENETIC PROFILER 2.0 (GE Healthcare). From the initial set of nine pairs of primers, seven amplified successfully. Primer sequences and the respective annealing temperatures are shown in Table 1. All PCR products conformed to the sizes expected from the sequence information, and one or two peaks per loci per individual were obtained (consistent with a diploid condition). The numbers of alleles, expected and observed heterozygosities, Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), and linkage disequilibrium were analyzed with ARLEQUIN version 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) and GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset, 1995) and tested for significance including the sequential Bonferroni correction.

All amplified loci were polymorphic, and no locus deviated significantly from HWE in either population (Table 1). The number of alleles per locus per population ranged from two to five (three on average); the observed and expected heterozygosity ranged from 0.050 to 1.000 and 0.050 to 0.706, respectively. No linkage disequilibrium was detected for all loci pairs ($0.05 < P \text{ value} < 0.002$) which indicated the seven loci can be treated as independent genetic markers. Cross-species amplification was successful to different degrees for all species of *Athenaea* and *Aureliana* sampled (Table 2). The differential amplification might have been caused by the presence of null alleles or, alternatively, might reflect some degree of genetic differentiation. Both the AFF-C7 and AFF-H5 primer pairs showed low cross-amplification efficiency. In addition to the possible presence of null alleles, these results might be influenced by the efficiency of the designed primers. As alternatives, new sets of primers could be designed from the published cloned sequences. Three pairs of primers (AFF-B3, AFF-D2, and AFF-H2) amplified their respective loci successfully in 70% of the taxa investigated, and might be important tools for use in comparative studies of these genera.

CONCLUSIONS

The development of polymorphic microsatellite markers will contribute to future population genetic studies in *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*. The use of such markers will provide information on the genetic diversity and structure in this and related species. Cross-amplification among other species of

Aureliana and its sister genus *Athenaea* might be a useful tool for other population genetic and comparative studies of patterns of the distribution of genetic variability in Atlantic Rainforest.

LITERATURE CITED

- CARNAVAL, A.C. AND C. MORITZ. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.
- EXCOFFIER, L.G.L. AND H.E.L. LISCHER. 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.
- HUNZIKER, A.T. AND G.E. BARBOZA. 1990. Estudos sobre Solanaceae XXX: Revision de *Aureliana*. *Darwiniana* 30: 95-113.
- HUNZIKER, A.T. 2001. *Genera Solanacearum*: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. Gantner, Ruggell, Liechtenstein.
- OLMSTEAD, R.G., L. BOHS, H.A. MIGID, E. SANTIAGO-VALENTIN, V.F. GARCIA AND S.M. COLLIER. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57(4): 1159-1181.
- RAYMOND, M., AND F. ROUSSET. 1995. GENEPOP (version-1.2) — population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- ROZEN, S. AND H.J. SKALETSKY. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Krawetz and S. Misner [eds.], *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- STEHMANN, J.R. 2009. Solanaceae. In J.R. Stehmann, R.C. Forzza, A. Salino, M. Sobral, D.P. da Costa, and L.H.Y. Kamino [eds.], *Plants of the Atlantic Forest (Plantas da Floresta Atlântica)*, 476-483. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- ZANE L., L. BARGELLONI AND T. PATARNELLO. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

Table 1. Primer sequences and characteristics for microsatellite loci from *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*, including GenBank accession number, repeat motif, primer sequence, annealing temperature (T_a), allele size range (bp), and number of alleles per locus (A). Expected heterozygosity (H_E) and observed heterozygosity (H_O) are provided for the two populations, Japi (23°14'41"S, 46°56'12"W) and Serra Bonita (15°23'10"S, 39°34'04"W), Brazil ($n = 20$ for each), that were studied.

						<i>A. fasciculata</i> var. <i>fasciculata</i>						
						Japi (n=20)			Serra Bonita (n=20)			
Locus	Repeat	Primer sequence (5'→3')	GenBank accession no.	T_a (°C)	Allele size range (bp)*	A	H_E	H_O	A	H_E	H_O	
AFF-A3	(TG)5C(GT)5(TA)6	F: GCGGTAGGGGTAGTCAATGT R: CAAGTCTTTAGCTCAAAAGTTCAA	JN176631	54	256–262	4	0.706	0.067	3	0.550	0.250	
AFF-B3	(AC)11(AT)9	F: GGCAAGTAGTCAAGAATCACCA R: AGCATGACGAGTGGGGTTAC	JN176632	63	160–164	2	0.512	0.950	2	0.501	0.850	
AFF-C7	(GT)7	F: AGTTTCAGCCACATCTCCAATC R: CTACACACAAGTGGGGATCAAA	JN176633	62	243–251	2	0.053	0.053	2	0.142	0.050	
AFF-C9	(TA)7(GT)12TT(GT)6	F: TGCCCTATAGCCACACTTT R: TGCTTGAAATCTCTCTTTCTCA	JN176634	58	163–169	2	0.450	0.550	3	0.188	0.050	
AFF-D2	(GT)8	F: CAAGAAACCCCTACCCCTTC R: CACTCCCCAAATCCCTTA	JN176635	63	250–264	3	0.554	0.800	5	0.585	1.000	
AFF-G5	(AG)4(TG)6	F: TGCACCATAAACTTGACCACA R: AGCCCTGCTGCTACACTTTC	JN176636	60	159–173	2	0.050	0.050	4	0.191	0.100	
AFF-H2	(CT)7(GT)2GC(GT)9	F: GGTTGTGGGAACAATTCCAG R: GGCAAGACCAAAATAGCCAGA	JN176637	63	251–261	5	0.192	0.150	3	0.272	0.100	
Mean							0.359			0.347		

* M13 tail included.

Table 2. Cross-taxa amplification of seven microsatellite markers developed for *A. fasciculata* var. *fasciculata* in other six *Aureliana* and six *Athenaea* species, and two other *A. fasciculata* varieties.

Species (sample size)	AFF-A3	AFF-B3	AFF-C7	AFF-C9	AFF-D2	AFF-G5	AFF-H2
<i>Athenaea cuspidata</i> (2)	+	+	-	+	+	-	+
<i>Athenaea martiana</i> (3)	+	+	-	-	-	-	+
<i>Athenaea micrantha</i> (1)	-	+	-	+	+	-	+
<i>Athenaea pereirae</i> (3)	+	+	-	+	+	-	+
<i>Athenaea picta</i> (2)	+	+	-	+	+	-	+
<i>Athenaea pogogena</i> (3)	+	+	-	+	+	-	+
<i>Aureliana angustifolia</i> (2)	-	+	-	-	-	-	+
<i>Aureliana brasiliana</i> (3)	+	+	-	+	+	+	+
<i>Aureliana darcyi</i> (3)	+	+	+	-	+	-	+
<i>Aureliana fasciculata</i> var. <i>tomentella</i> (3)	-	+	-	-	+	-	+
<i>Aureliana fasciculata</i> var. <i>longifolia</i> (3)	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aureliana sellowiana</i> (2)	-	+	-	+	+	-	+
<i>Aureliana velutina</i> (3)	+	+	-	-	+	-	+
<i>Aureliana wettsteiniana</i> (3)	-	+	-	-	+	-	-

+, successful amplification; - unsuccessful amplification

Appendix 1. Information on voucher specimens deposited at the BHC Herbarium (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil) and collection sites.

Taxon: Voucher specimen, collection site.
<i>Athenaea cuspidata</i> Witas: BHC115951, Salesópolis, São Paulo, BRA, 23°39'10"S 45°53'08"W.
<i>Athenaea martiana</i> Sendtn.: BHC134379, Juiz de Fora, Minas Gerais, BRA, 21°45'31"S 43°23'39"W.
<i>Athenaea micrantha</i> Sendtn.: BHC126140, Estrada São José-Uma, Bahia, BRA, 15°07'19"S 39°15'47."W.
<i>Athenaea pereirae</i> Barboza & A.T. Hunz.: BHC149222, Caraça, Minas Gerais, BRA. 20°05'46"S, 43°29'17"W.
<i>Athenaea picta</i> (Mart.) Sendtn.: BHC143439, Itaiópolis, Santa Catarina, BRA, 26°32'57"S 49°46'30"W.
<i>Athenaea pogogena</i> (Moric.) Sendtn.: BHC126160, Camacan, Bahia, BRA, 15°23'22.33106"S 39°33'51"W. BHC145102, Teresópolis, Rio de Janeiro, BRA, 22°22'35"S 42°29'07"W.
<i>Aureliana angustifolia</i> R.C. Almeida-Lafetá: BHC134380, Juiz de Fora, Minas Gerais, BRA, 21°45'30"S 43°23'39"W.
<i>Aureliana brasiliiana</i> (A.T. Hunz.) Barboza & A.T. Hunz.: BHC145043, Itatiaia, Rio de Janeiro, BRA, 22°25'32"S, 44°37'19"W. BHC145065 Ouro Preto, Minas Gerais, BRA, 20°26'32"S 43°30'40"W.
<i>Aureliana darcyi</i> Carvalho & Bovini: BHC115994, Paraty, Rio de Janeiro, BRA, 23°21'05"S 44°43'34"W.
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>fasiculata</i> : BHC115929, Jundiaí, São Paulo, BRA, 23°14'41"S 46°56'12"W. BHC126175, Camacan, Bahia, Brazil, 15°23'10"S 39°34'04"W.
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>longifolia</i> (Sendtn.) A.T. Hunz. & Barboza: BHC115959, Salesópolis, São Paulo, BRA, 23°39'15"S 45°53'22"W. BHC145055, Itaiópolis, Santa Catarina, BRA, 26°19'33"S 49°27'47"W.
<i>Aureliana fasciculata</i> (Vell.) Sendtn. var. <i>tomentella</i> (Sendtn.) Barboza & A.T. Hunz.: BHC115995, Santa Teresa, Espírito Santo, BRA, 19°57'14"S 40°31'52"W. Barboza et al. 2113, Departamento Guarani, Província de Misiones, ARG, 26°54'53"S 54°13'28"W.
<i>Aureliana sellowiana</i> (Sendtn.) Barboza & Stehmann: BHC145006 São Paulo, BRA, 23°54'01"S 46°43'34"W.
<i>Aureliana velutina</i> Sendtn.: BHC104335, Belo Horizonte, Minas Gerais, BRA. 19°52'20"S 43°58'21"W.
<i>Aureliana wettsteiniana</i> (Witas.) A.T. Hunz. & Barboza: BHC143430, Porto União, Santa Catarina, BRA, 26°16'13"S 51°03'28"W.

Discussão Geral

Análise filogenética

O desenvolvimento do presente trabalho possibilitou a realização de diversas coletas a campo, que resultaram em uma ampla amostragem dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana*. Seis das sete espécies de *Athenaea* e sete das oito espécies descritas de *Aureliana* foram incluídas nas análises filogenéticas e de datação. A análise filogenética realizada a partir da análise de quatro regiões do genoma plastidial confirmou que os dois gêneros são bastante próximos e que pertencem à subtribo Withaninae, conforme proposto por Olmstead *et al.* (2008), que incluíram apenas uma espécie de cada gênero em suas análises. Entretanto, não foram detectados clados correspondendo a cada um dos dois gêneros, e a sustentação dos agrupamentos obtidos foi baixa, em geral. Duas justificativas, a serem detalhadas abaixo, são possíveis para esse fato: a) os marcadores moleculares empregados têm variabilidade insuficiente para esclarecer o relacionamento entre os gêneros e suas espécies; ou b) os gêneros apresentam espécies muito próximas e não se sustentam como grupos monofiléticos separadamente.

Além das quatro regiões do genoma plastidial incluídas nas análises, os genes *matK*, *rbcL*, *rps4* e *rpoC1* e os espaçadores *atpI-atpH*, *rps16-trnK* e *rpl32-trnL* foram avaliados, mas não apresentaram variação (dados não mostrados). Uma parte do intron *b-c* do gene do genoma mitocondrial *nad1* também foi sequenciada e não apresentou variação. Após diversas tentativas, não foi possível aperfeiçoar a amplificação ou o sequenciamento de dois marcadores do genoma nuclear: *nrITS* (espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal) e *CHS* (chalcona sintase). Dificuldades para os mesmos marcadores nucleares já haviam sido enfrentadas no gênero *Calibrachoa* (Solanaceae), que também apresentou baixa variabilidade no marcador *nad1* (Fregonezi 2009).

É possível que as espécies de *Athenaea* e *Aureliana* ainda apresentem grande identidade nas sequências do genoma plastidial, embora sua divergência não seja extremamente recente. Um fato que apoia essa hipótese é a ausência de caracteres morfológicos que diferenciem os dois gêneros, à exceção do cálice acrescente (I. M. C. Rodrigues, comunicação pessoal). Entretanto, nem mesmo esse caráter é considerado robusto, uma vez que há espécies de *Athenaea* que apresentam cálice acrescente pouco desenvolvido.

O emprego de marcadores tipo AFLP é uma alternativa possível a ser empregada no futuro para elucidar o relacionamento entre as espécies de *Athenaea* e *Aureliana*. Os mesmos já foram utilizados com sucesso para analisar a relação entre as espécies da seção *Erythranthe* do gênero *Mimulus* L., Phrymaceae (Beardsley *et al.* 2003), no gênero *Trollius* L., Ranunculaceae (Després *et al.* 2003) e entre as espécies de *Araucaria* Juss. da Nova Caledônia (Gaudel *et al.* 2012). Também está em andamento no Laboratório de Evolução Molecular da UFRGS a análise filogenética através de AFLPs do gênero *Petunia* (M. Reck, comunicação pessoal). Entretanto, existem dois desafios a serem superados para que o emprego dessa técnica seja viável no caso de *Athenaea* e *Aureliana*. Primeiro, é necessário obter grandes quantidades de DNA de alta qualidade de cada amostra. Ao longo do desenvolvimento da tese, constatou-se que grandes quantidades de DNA das espécies de *Athenaea* e *Aureliana* só eram obtidas através de extrações com fenol e clorofórmio (Roy *et al.* 1992; modificado), mas o material genético obtido invariavelmente apresentava coloração escura, e não era possível realizar reações de amplificação ou clivagem do mesmo. A coloração foi atribuída à presença de diversos compostos secundários já descritos para a família Solanaceae (listados Hunziker 2001, entre outros). As extrações de DNA com kits comerciais levaram à obtenção de DNA sem a presença de inibidores, mas em menor quantidade. O segundo obstáculo refere-se à amostragem. Com exceção de *Aureliana fasciculata*, as demais espécies de *Athenaea* e *Aureliana* são consideradas raras. Por isso, um grande esforço de coleta será necessário para obter o tamanho amostral adequado para as análises.

Uma segunda alternativa é o sequenciamento de genes nucleares com baixo número de cópias. Marcadores nucleares têm sido testados e descritos constantemente (Sang 2002, Schlüter *et al.* 2005, Hughes *et al.* 2006, Krak *et al.* 2012, entre outros). Os genes da família multigênica PPR (do inglês “Pentatricopeptide Repeat”) são exemplos de marcadores promissores, por diversos motivos: a relação entre as cópias gênicas já foi elucidada, foram construídos “primers” específicos para cada gene e os genes não apresentam introns e têm alinhamento simples, além de apresentarem grande variabilidade (Yuan *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2010). Entretanto, “primers” específicos para PPRs ainda não estão disponíveis para a família Solanaceae. A disponibilização de diversos genomas da família, por meio de projetos como o “SOL Genomic Network” (Mueller *et al.* 2005),

fornecerá subsídios para a construção de “primers” degenerados para esses marcadores em Solanaceae.

Biogeografia

Foi estimado no presente trabalho que a diversificação do clado formado pelas espécies dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana* teve início cerca de 3,9 milhões de anos atrás, durante o Plioceno. Conforme simulações climáticas realizadas, nessa época o clima na América do Sul, onde os ancestrais de *Athenaea* e *Aureliana* provavelmente ocorreram, o clima foi descrito como úmido e quente, embora os registros palinológicos para o Plioceno na América do Sul não sejam abundantes (Salzmann *et al.* 2011). Já a diversificação da subtribo Withaninae teve início cerca de 9,6 milhões de anos atrás, durante o período Tortoniano, quando o clima global também era mais úmido e quente do que hoje em dia (Pound *et al.* 2010).

A proposição de eventos de dispersão a longa distância como causa da distribuição atual quase cosmopolita das espécies da subtribo Withaninae está de acordo com a tendência atual na literatura científica. Por sua natureza aleatória e improvável pensava-se que eventos de dispersão a longa distância fossem extremamente raros (Gillespie *et al.* 2012). Entretanto, com o advento das datações moleculares, fica cada vez mais claro que esses eventos são responsáveis pela origem da distribuição disjunta de muitos grupos de plantas. A partir do acúmulo de novas informações está havendo uma mudança de paradigma na biogeografia: a hipótese de que a maioria dos grupos de organismos com distribuição disjunta no hemisfério sul surgiu ainda no período em que Gondwana estava unido e que a disjunção atual seria consequência de sua separação está sendo substituída pela hipótese de que diversos eventos de dispersão a longa distância tenham ocorrido e sido bem-sucedidos, levando à distribuição atual de diversos grupos de organismos. (revisado por Renner 2004, De Queiroz 2005, Yoder & Nowak 2006, Upchurch 2008).

A datação da divergência das espécies de *Athenaea* e *Aureliana*, e as datações da subtribo Withaninae e de seus eventos internos de divergência também serão grandemente beneficiadas pela obtenção de árvores filogenéticas completamente resolvidas e com altos valores de suporte estatístico para o grupo, conforme discutido no tópico anterior. A partir de filogenias resolvidas será possível empregar métodos estatísticos para inferir e testar hipóteses biogeográficas, através de “softwares” como DIVA (do inglês, “Dispersal-

Vicariance Analysis”; Ronquist 1997), S-DIVA (“Statistical Dispersal-Vicariance Analysis”; Yu *et al.* 2010) e Lagrange (“likelihood analysis of geographical range evolution”; Ree *et al.* 2005, Ree & Smith 2008).

Análise filogeográfica

Quanto à distribuição da variabilidade genética em *Aureliana fasciculata*, as sequências plastidiais de *A. fasciculata* na Floresta Atlântica identificaram uma espécie arbustiva geneticamente diversa, com dois grupos geograficamente relacionados, Norte e Sul. Diversos estudos identificaram uma separação norte-sul na Mata Atlântica para plantas e animais (Pellegrino *et al.* 2005, Grazziotin *et al.* 2006, Cabanne *et al.* 2007, Carnaval *et al.* 2009, Fitzpatrick *et al.* 2009, Palma-Silva *et al.* 2009), mas a posição dessa barreira varia. Muitos estudos a identificaram com o rio Doce, no ES, de acordo com o sugerido primeiramente por Carnaval & Moritz (2008), mas outros não (Colombi *et al.* 2010, por exemplo).

Quanto à história demográfica de *Aureliana fasciculata*, foi possível detectar uma expansão populacional datando de cerca de 50-60 mil anos atrás. Esse evento é consistente com o registro de expansão florestal na forma de aumento do componente arbóreo em amostras de pólen no estado de São Paulo, detectado por Ledru *et al.* (2005). É interessante notar que nossos resultados demonstram a influência de eventos anteriores às glaciações do Pleistoceno na história demográfica de *Aureliana fasciculata*. Muitas espécies de Mata Atlântica retratam em sua história demográfica a influência de eventos recentes, na forma de “gargalos de garrafa” associados ao último máximo glacial (aproximadamente 21 mil anos atrás), ou de expansões populacionais recentes associadas aos períodos interglaciais (revisado por Martins 2011). No caso de *Aureliana fasciculata*, a assinatura histórica detectada revela a influência dos eventos climáticos do Pleistoceno sobre a demografia da espécie. Esse é mais um registro importante que sugere que uma parcela significativa das espécies não sofreu efeitos severos de fragmentação e posterior expansão relacionados ao último máximo glacial, e que os efeitos do Pleistoceno também influenciaram a distribuição atual da variabilidade genética das espécies da Mata Atlântica. Por último, é válido destacar que a utilização dos *loci* de microssatélites descritos neste trabalho poderá adicionar informações sobre a questão da distribuição da variabilidade genética de *Aureliana fasciculata* ao longo da Mata Atlântica.

Taxonomia

Quanto às contribuições para a taxonomia de *Aureliana fasciculata*, os resultados obtidos no presente trabalho não apontam a validade das três variedades aceitas para a espécie atualmente. A distribuição da variabilidade genética na espécie parece estar muito mais associada aos diferentes pontos de coleta do que às variedades da espécie, de acordo com os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA), por exemplo. Além disso, a incongruência entre as variedades morfológicas e a distribuição da variabilidade genética pode ser atribuída à plasticidade dos caracteres morfológicos diagnósticos utilizados para identificar as variedades (revisado por Nicotra *et al.* 2010).

Ao longo das coletas realizadas, foi verificada a ocorrência de indivíduos de *A. fasciculata* var. *fasciculata* e *A. fasciculata* var. *longifolia* em simpatria em ao menos cinco localidades, nos estados de São Paulo e Santa Catarina. Também foi percebido que a morfologia dos indivíduos coletados diferia a cada localidade ou ponto de coleta. Isso é um indício de que a espécie apresenta grande variabilidade morfológica, que pode estar associada às especificidades de cada local de ocorrência. É possível que as diferenças entre as variedades descritas na literatura (Hunziker & Barboza 1990) sejam parte de um gradiente de variação encontrado na natureza. Além disso, é necessário considerar o viés das coletas botânicas para herbários. Áreas de conservação e áreas próximas a herbários e universidades, assim como os estados do sul e sudeste no Brasil apresentam mais coletas por área do que as áreas mais distantes ou de difícil acesso, como algumas partes das regiões norte e nordeste do país (Moerman & Estabrook 2006, Sobral & Stehmann 2009). Em relação a isso, os trabalhos de taxonomia molecular e de revisão morfológica (em andamento) de *Athenaea* e *Aureliana* contribuíram para o aumento significativo da quantidade de amostras do grupo em coleções botânicas e bancos de DNA. As exsicatas e material genético foram depositados no Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB) e no Laboratório de Evolução Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, respectivamente.

As dificuldades encontradas para a descrição e identificação das variedades de *Aureliana fasciculata* trazem à tona a questionamentos sobre a validade da utilização de *taxa* infra-específicos neste caso, pois não há sentido tem uma unidade taxonômica sem caracteres diagnósticos efetivos nem sustentação genética. Também é digno de nota que as dificuldades quanto à taxonomia de *Aureliana* não se restringem às variedades de

Aureliana fasciculata. Ao longo da realização do presente trabalho foram encontradas dificuldades para, por exemplo, definir o grupo externo na análise filogeográfica de *Aureliana fasciculata*. Os espaçadores plastidiais utilizados como marcadores foram utilizados com sucesso em diversos estudos similares, inclusive na família Solanaceae (Lorenz-Lemke *et al.* 2006, 2010, Mader 2008). Entretanto, tiveram poder limitado para diferenciar espécies no gênero *Aureliana* (dados não mostrados). O grupo externo escolhido, *Aureliana angustifolia*, diferencia-se dos indivíduos mais próximos de *Aureliana fasciculata* por apenas três mutações, o mesmo número de eventos mutacionais que separa os grupos Norte e Sul dos indivíduos da espécie. Além disso, a escassez de caracteres diagnósticos efetivos para o gênero e para suas espécies (tanto as atualmente aceitas como as antigas) têm sido um desafio na revisão taxonômica em andamento (I. M. C. Rodrigues, comunicação pessoal).

Os resultados expostos no presente trabalho reforçam a necessidade da ampla e cuidadosa revisão morfológica dos gêneros *Athenaea* e *Aureliana* que está em andamento. Por outro lado, estudos de biologia floral e reprodutiva, de anatomia celular e de caracterização cariotípica, entre outros, ainda não estão disponíveis para o grupo. A interpretação deste conjunto de informações, somado aos resultados já obtidos por meio das ferramentas da biologia molecular expostos nesta tese, ampliará o entendimento da história evolutiva e da taxonomia de *Athenaea* e *Aureliana*.

Referências Bibliográficas

As referências listadas referem-se aos tópicos “Introdução” e “Discussão Geral”.

- Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Rajender S, Madhukar D, Shankhwar SN & Ahmad S (2010) *Withania somnifera* improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. *Fertil Steril* 94(3): 989-996.
- Alcantara S, Semir J & Solferini VN (2006) Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. *Ann Bot* 98: 1207-1213.
- Almeida-Lafetá RC (2000) A new species of *Aureliana* (Solanaceae) from Minas Gerais, Brazil. *Novon* 10: 187-189.
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E & Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96: 289-297.
- Andrade IM, Mayo SJ, van Den Ber C, Fay MF, Chester M, Lexer C & Kirkup D (2007) A preliminary study of genetic variation in populations of *Monstera adansonii* var. *klotzschiana* (Araceae) from North-East Brazil, estimated with AFLP molecular markers. *Ann Bot* 100(6): 1143-1154.
- Aoki S & Ito M (2000). Molecular phylogeny of *Nicotiana* (Solanaceae) based on the nucleotide sequence of the *matK* gene. *Plant Biol.* 2: 316-324.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Lin Soc* 161(2): 105-121.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Baldwin BG (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Mol Phylogenet Evol* 1: 3-16.
- Baldwin BG (1993) Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *Am J Bot* 80: 222-238.
- Baldwin B & Wagner W (2010) Hawaiian angiosperm radiations of North American origin. *Ann Bot* 105: 849-879.
- Barboza G & Hunziker AT (1989) Estudios sobre Solanaceae XXIX. Sinopsis Taxonomica de *Athenaea*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 26: 91-105.
- Barboza G, Chiarini F & Stehmann JR (2010) Real identity of *Witheringia sellowiana* (Solanaceae), typification, and chromosome number. *Syst Bot* 35(2): 420-424.
- Beardsley PM, Yen A & Olmstead RG (2003). AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution* 57(6): 1397-1410.

- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17(17): 3754-3774.
- Bell CD, Soltis DE & Soltis OS (2010) The age and diversification of the angiosperms revisited. *Am J Bot* 97(8): 1296-1303.
- Bentham G & Hooker JD (1876) *Genera Plantarum* 2: VIII+533-1279.
- Bergsten J (2005) A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193.
- Bohs L (2007) Phylogeny of the Cyphomandra clade of the genus *Solanum* (Solanaceae) based on ITS sequence data. *Taxon* 56(4): 1012-1026.
- Bohs L & Olmstead RG (1997) Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Syst Bot* 22: 5-17.
- Brummitt RK (2008) Evolution in taxonomic perspective. *Taxon* 57(4): 1049-1050.
- Cabanne GS, Santos FR & Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc* 91: 73-84.
- Carnaval AC & Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J Biogeogr* 35: 1187-1201.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT & Moritz C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Carr GD (1985) Additional chromosome numbers of Hawaiian flowering plants. *Pac Sci* 39(3): 302-306.
- Carvalho LAF & Bovini MG (1995). *Aureliana darcyi*, a new species of Solanaceae from Brazil. *Novon* 5: 257-258.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu YL *et al.* (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Mo Bot Gard* 80: 528-580.
- Chaw SM, Long H, Wang BS, Zharkinkh A & Li WH (1993) The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences. *J Mol Evol* 37: 624-630.
- Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L & Ando T (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (Solanaceae) based on the sequence of the *Hfl* gene. *J Plant Res* 120: 385-397.
- Clarkson JJ, Knap S, Aoki S, Garcia VF, Olmstead RG & Chase MW (2004). Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Mol Phylogen Evol* 33: 75-90.
- Cocucci A (1999) Evolutionary radiation in neotropical Solanaceae. *In: Solanaceae IV*. Nee M, Symon DE, Lester RN & Jessop JP (eds), Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 9-22.
- Collevatti RG, Rabelo SG & Vieira RF (2009) Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered Cerrado shrub species. *Ann Bot* 104: 655-664.

- Collinson ME, Boulter MC & Holmes PL (1993) In *The Fossil Record* (Chapman and Hall, London), Vol 2, pp 809–841.
- Colombi VH, Lopes SR & Fagundes V (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Gen Mol Biol* 33: 758-759.
- Cook L & Crisp M (2005) Not so ancient: the extant crown group of *Nothofagus* represents a post-Gondwanan radiation. *Proc R. Soc B* 272: 2535-2544.
- Conservation International do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/ Instituto Estadual de Florestas-MG (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. MMA/SBF, Brasília, 40 pp.
- Conte R, Nodari RO, Vencovsky R & Reis MS (2003). Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 91: 401-406.
- Cronquist A (1981) *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, Columbia University Press, 1261pp.
- D'Arcy WG (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. *In: Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Hawkes JG, Lester RN, Nee M & Estrada N (eds.) Royal Botanic Garden, Kew. pp. 75-137.
- D'Arcy WG, Keating RC, Zhang Z-Y & Peng C-I (2001) The genus *Tubocapsicum*. *Bot Bull Acad Sin* 42: 67-84.
- Davis L & Kuttan G (2000) Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *J Ethnopharmacol* 71: 193-200.
- De Queiroz, A. (2005) The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends Ecol Evol* 20: 68–73.
- De Queiroz K (2006) The PhyloCode and the distinction between taxonomy and nomenclature. *Syst Biol* 55(1): 160-162. *Mol Phyl Evol* 27: 185-196.
- Després L, Gielly L, Redoutet B & Taberlet P (2003) Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability.
- Devaux C, Lavigne C, Falentin-Guyomarch H, Vautrin S, Lecomte J & Klein EK (2005) High diversity of oilseed rape pollen clouds over an agro-ecosystem indicates long-distance dispersal. *Mol Ecol* 14: 2269-2280.
- Dillon MO, Tu T, Soejima A, Tingshuang Y, Zelong N, Tye A & Jun W (2007) Phylogeny of *Nolana* (Nolaneae, Solanoideae, Solanaceae) as inferred from granule-bound starch syntahase I (GBSSI) sequences. *Taxon* 56(4): 1000-1011.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ & Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4, e88.
- Drummond AJ & Suchard MA (2010) Bayesian random local clocks, or one rate to rule them all. *BMC Biology* 8, 114.

- Duff RJ & Nickrent DL (1999) Phylogenetic relationships of land plants using mitochondrial small-subunit rDNA sequences. *Am J Bot* 86: 372-386.
- Dunal F (1852) Solanaceae. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* 13. 690 pp.
- Eich E (2008) Solanaceae and Convolvulaceae: secondary metabolites – biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economical significance. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, GER, XIV+625pp.
- FAO (2010) FAO Statistical Yearbook 2010. <http://www.faostat.org> (4 fevereiro 2012)
- Fay MF, Thomas VE, Knapp S (2007) *Mellissia begoniifolia* (Solanaceae). *Curtis's Bot Mag* 24: 243-250.
- Feuillet C & MacDougal JM (2003) A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13: 34-38.
- Fitzpatrick SW, Brasileiro CA, Haddad CFB & Zamudio KR (2009) Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol Ecol* 18: 2877-2896.
- Forey PL (2002) *PhyloCode* – pain, no gain. *Taxon* 51: 43-54.
- Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Edição traduzida. Editora SBG, Ribeirão Preto, 280pp.
- Fregonezi JN (2009) História evolutiva do gênero *Calibrachoa* La Llave & Lex. (Solanaceae). Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 197pp.
- Fregonezi JN, Freitas LB, Bonatto SL, Semir J, Stehmann JR (2012) Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence. *Taxon* 61(1): 120-130.
- Freudenstein JV & Chase MW (2001) Analysis of mitochondrial *nad1b-c* intron sequences in Orchidaceae: utility and coding of length-change characters. *Syst Bot* 26: 645-657.
- Fukuda T, Yokoyama J & Ohashi H (2001) Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 19(2): 246-258.
- Gadella TWJ, Kliphuis E, Lindeman JC & Mennega EA (1969) Chromosome numbers and seedling morphology of some Angiosperms collected in Brazil. *Acta Bot Neerl* 18(1): 74-83.
- Gaudel M, Rouhan G, Gardner MF & Hollingsworth PM (2012) AFLP markers provide insights into the evolutionary relationships and diversification of New Caledonian *Araucaria* species (Araucariaceae). *Am J Bot* 99(1) 68-81.
- Gielly L & Taberlet P (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Mol Biol Evol* 11: 769-777.
- Gillespie RG, Baldwin BG, Waters JM, Fraser CI, Nikula R & Roderick GK (2012) Long-distance dispersal: a framework for hypothesis testing. *Trends Ecol Evol* 27: 47-55.

- Goodall-Copestake WP, Harris DJ & Hollingsworth PM (2009) The origin of a mega-diverse genus: dating *Begonia* (Begoniaceae) using alternative datasets, calibrations and relaxed clock methods. *Bot J Linn Soc* 159(3): 363-380.
- Graham A (2009) The Andes: a geological overview from a biological perspective. *Ann Miss Bot Gard* 96(3): 371-385.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S & Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol* 15: 3969-3982.
- Habtermariam S (1997) Cytotoxicity and immunosuppressive activity of withanolides from *Discopodium penninervium*. *Planta Med* 63: 15-17.
- Habtermariam S, Skelton BW, Wateman PG & White AH (2000) 17-Epiacnistin-A, a further withanolide from the leaves of *Discopodium penninervium*. *J Nat Prod* 63: 512-513.
- Hawkes JG (1999) The economic importance of the family Solanaceae. *In: Solanaceae IV. Advances in Biology and Utilization*. M Nee, Symon DE, Lester RN & Jessop JP (eds.), Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 1-8.
- Hepper FN (1991) Old World *Withania* (Solanaceae): a taxonomic review and key to the species. *In: Solanaceae III. Taxonomy, chemistry, evolution*. Hawkes JG, Lester RN, Nee M & Estrada N (eds.), Royal Botanic Gardens, Kew, pp: 211-227.
- Heiser Jr, CB (1984) The ethnobotany of the neotropical Solanaceae. *In: Ethnobotany in the Neotropics*. Prance GT & Kallunki JA (eds.), New York Botanical Garden, New York pp: 48-52.
- Hiesel R, Haseler AV & Brennicke A (1994) Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis. *Proc Natl. Acad Sci* 91: 634-638.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF & Yoder AD (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol Phyl Evol* 54: 291-301.
- Hiern WP (1877) *Symbolae ad floram Brasiliae Centralis cognoscendam*. *Kjoeb Vidensk Meddel Natuh For* 1877: 643-672.
- Hoot SB, Culham A & Crane PR (1995) The utility of *atpB* gene sequences in resolving phylogenetic relationships: comparison with *rbcL* and 18S ribosomal DNA sequences in the Lardizabalaceae. *Ann Mo Bot Gard* 82: 194-207.
- Hughes CE, Eastwood RJ & Bailey CD (2006) From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Phil Trans R Soc B* 361: 211-225.
- Hunziker AT & Barboza GE (1990) Estudios sobre Solanaceae XXX: Revision de *Aureliana*. *Darwiniana* 30: 95-113.
- Hunziker AT (1979) South American Solanaceae: a Synoptic Survey. *In: The Biology & Taxonomy of Solanaceae*. Hawkes JG; Lester RN & Skelding AD (eds.), Academic Press, London.
- Hunziker AT (1995) Studies on *Solanaceae*, XXXVIII. Miscellaneous novelties in the taxonomy of Solanaceae. *Lorentzia* 8: 5-8.

- Hunziker AT (2001) *Genera Solanacearum*: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. Liechtenstein: ARG Gantner Verlag, K.-G. XVI + 500 pp.
- Johnson LA & Soltis DE (1994) *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Syst Bot* 19: 143-156.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA & Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, XVI + 464 pp.
- Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, Tachida H, Wikneswari R, Tsumura Y, Yoshimaru H & Yamazaki T (1998) Molecular phylogeny of Depetrocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *matK*, *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer region in chloroplast DNA. *Mol Phylogenet Evol* 10: 202-209.
- Kelchner SA (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann Mo Bot Gard* 87: 482-498.
- Kim K & Jansen RK (1995) *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proc Natl Acad Sci* 92: 10379-10383.
- Kious WJ & Tilling RI (1996) *The dynamic earth: the story of plate tectonics*. United States Geological Service, U. S. Government Printing Office, Washington, D. C., EUA. 77 pp.
- Knowles LL (2004) The burgeoning field of statistical phylogeography. *J Evol Biol* 17: 1-10.
- Knowles LL & Maddison WP (2002) Statistical phylogeography. *Mol Ecol* 11: 2623-2635.
- Krak K, Álvarez I, Caklová P, Costa A, Chrtek J & Fehrer J (2012) Development of novel low-copy nuclear markers for Hieraciinae (Asteraceae) and their perspective for other tribes. *Am J Bot* 99(2): e74-e77.
- Krosnick SE & Freudenstein JV (2005) Monophyly and floral character homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). *Syst Bot* 30(1): 139-152.
- Krosnick SE, Ford AJ & Freudenstein JV (2009) Taxonomic revision of *Passiflora* subgenus *Tetrapathea* including the monotypic genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a new species of *Passiflora*. *Syst Bot* 34(2): 375-385.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Setehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126: 3-14.
- Kulkarni S & Dhir A (2007) *Withania somnifera*: an Indian ginseng. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 32(5): 1093-1105.
- Kumar A, Kaul MK, Bhan MK, Khanna PK & Suri KA (2007) Morphological and chemical variation in 25 collections of the Indian medicinal plant, *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae). *Genet Resour Crop Evol* 54: 655-660.
- Ladiges PY, Marks CE & Nelson G (2011) Biogeography of *Nicotiana* section *Suaveolentes* (Solanaceae) reveals geographical tracks in arid Australia. *J Biogeogr* 38: 2066-2077.

- Lavina EL & Fauth G (2010) Evolução Geológica da América do Sul nos Últimos 250 Milhões de Anos. *In: Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. Carvalho C & Almeida E (eds.), Roca, São Paulo, v. 1, pp. 3-13.
- Laurin M & Bryant HN (2009) Third meeting of the International Society for Phylogenetic Nomenclature: a report. *Zool Scr* 38(3): 333-337.
- Ledru MP, Rousseau DD, Cruz Jr. FW, Riccomini C, Karmann I & Martin L (2005) Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic Rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research* 64: 444-450.
- Ledru M, Salatino MLF, Ceccantin G, Saltino A, Pinheiro F & Pintaud J (2007) Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South América. *Diversity Distrib* 13: 761-771.
- Levin RA & Miller JS (2005). Relationships within tribe Lycieae (Solanaceae): paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. *Am J Bot* 93: 2044-2053.
- Levin RA, Myers NR & Bohs L (2006). Phylogenetic relationships among the “spiny solanums” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae). *Am J Bot* 93: 157–169.
- Levin RA, Watson K & Bohs L (2005) A four-gene study of evolutionary relationships in *Solanum*, section *Acanthophora*. *Am J Bot* 92: 603-612.
- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA & Provan J (2003) Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Mol Ecol* 12: 3219 - 3225
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Sethmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia*: a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15: 4487-4497.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM & Freitas LB (2005). Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA). *Ann Bot* 95: 799-806.
- Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Sethmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Mol Ecol* 19: 5240–5251.
- Mäder G (2008) Filogeografia e variabilidade genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae). Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 86pp.
- Magallón S & Castillo A (2009) Angiosperm diversification through time. *Am J Bot* 96(1): 349-365.
- Manem JF & Natali A (1995) Comparison of the evolution of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (*rbcL*) and *atpB-rbcL* noncoding spacer sequences in a recent plant group, the tribe Rubieae (Rubiaceae). *J Mol Evol* 41: 920-927.
- Martins FM (2011) Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? *Biol J Linn Soc* 104: 499-509.

- Marx HE, O'Leary NO, Yuan YW, Lu-Irving P, Tank DV, Múlgura ME & Olmstead RG (2010) A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. *Am J Bot* 97: 1647-1663.
- Mercedes A & Spooner DM (2010) Phylogeny of *Solanum* series *Piurana* and related species in *Solanum* section *Petota* based on five conserved ortholog sequences. *Taxon* 59(4): 1091-1101.
- Miers J (1857) *Illustrations of South American Plantas 2 (App.):1 -69*. H. Bailliere, London.
- Miller JS (2002) Phylogenetic relationships and the evolution of gender dimorphism in *Lycium* (Solanaceae). *Syst Bot* 27: 416-429-8.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J & Fonseca GAB (2005) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Washington: Conservation International, 392pp.
- Moerman DE & Estabrook (2006) The botanist effect: counties with maximal species richness tend to be home to universities and botanists. *J. Biogeogr* 33: 1969–1974.
- Morellato LPC & Haddad CFB (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Rain Forest. *Biotropica* 32: 786-792.
- Morgan GJ (1998) Emile Zuckerkandl, Linus Pauling, and the molecular evolutionary clock, 1959–1965. *J Hist Biol* 31: 155-178.
- Moricand ME (1937) *Plantes Nouvelles d'Amérique* p.25-26, t. 17-18.
- Moscone EA, Scaldaferrero MA, Grabielle M, Cecchini NM, Garcia YS, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE & Ehrendorfer F (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Hort* 745: 137-169.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D & Tanksley SD (2005) The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiol* 138(3): 1310-1317.
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM & Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *Am J Bot* 90(8): 1229-1238.
- Muse SV (2000) Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant Mol Biol* 42: 25-43.
- Myers N, Mittermeier RS, Mittermeier CG, Fonseca GAB & Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nathan R, Schurr FM, Spiegel O, Steinitz O, Trakhtenbrot A & Tsoar A (2008) Mechanisms of long-distance seed dispersal *Trends Ecol Evol* 23(11): 638-647.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F & van Kleunen M (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci* 15: 684-692.
- Olmstead RG & Bohs L (2007) A summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. *Acta Hort* 745: 255-268.

- Olmstead RG & Palmer JD (1997) Implications for the phylogeny, classification and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Syst Bot* 22: 19-29.
- Olmstead RG, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L & Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. *In: Solanaceae IV*. Nee M, Symon DE, Lester RN & Jessop JP (eds), Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 111-137.
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF & Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57(4): 1159-1181.
- Paape T, Igic B, Smith SD, Olmstead RG, Bohs L & Kohn JR (2008) A 15-Myr-old genetic bottleneck. *Mol Biol Evol* 25(4): 655-663.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Bárbara T, Bered F & Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY & Sites JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc* 85: 13–26.
- Perry L, Dickau R, Zarillo S, Holst I, Pearsall DM, Piperno DR, Berman MJ, Cooke RG, Rademaker K, Ranere AJ, Raymond JS, Sandweiss DH, Scramelli F, Tarble K & Zeidler JA (2007) Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science* 315: 986-988
- Pinto M & Ugá MAD (2010) Os custos de doenças tabaco-relacionadas para o Sistema Único de Saúde. *Cad. Saúde Pública* 26(6): 1234-1245.
- Pio Corrêa M (1974) Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v.5, p. 65-69.
- Pound MJ, Haywood AM, Salzmann U, Riding JB, Lunt DJ & Hunter SJ (2010) A Tortonian (Late Miocene, 11.61 – 7.25 Ma) global vegetation reconstruction. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 300: 29-45.
- Qiu YL, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis OS, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V & Chase MW (1999) The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407.
- Qiu YL, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis OS, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V & Chase MW (2000) Phylogeny of basal angiosperms: analyses of five genes from three genomes. *Int J Plant Sci* 161: S3-S27.
- Qiu YL, Lee J, Whitlock BA, Bernasconi-Quadroni F & Dombrowska O (2001) Was the ANITA rooting of the angiosperm phylogeny affected by long-branch attraction? *Amborella*, Numphales, Illiciales, Trimeniaceae and *Austrobileya*. *Mol Biol Evol* 18: 1745-1753.
- Ranta P, Blom T, Niemelä J, Joensuu E & Siitonen M (1998) The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodivers Cons* 7: 385-403.

- Ree RH & Smith AS (2008) Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Syst Biol* 57: 4-14.
- Ree RH, Moore BR, Webb CO & Donoghue MJ (2005) A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution* 59: 2299-2311.
- Reifschneider JB (2000) *Capsicum*. Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília, Embrapa.
- Reis MS, Vencovski R, Kageyama PY, Fantini AC, Nodari RO & Montovani A (1999). Variação genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Martius na Floresta Tropical Atlântica. *In: Reis A & Reis MS (eds.) Euterpe edulis* Martius – Biologia, conservação e manejo sustentado, 48-52: 135-149. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí SC, Brasil.
- Reis MS, Fantini AC, Nodari RO, Reis, A, Guerra MP & Montovani A (2000) Management and conservation of natural populations in Atlantic Rain Forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). *Biotropica* 32: 894-902.
- Renner SS (2004) Plant dispersal across the tropical Atlantic by wind and sea currents. *Int J Plant Sci* 165: S23–S33.
- Renner SS (2005) Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. *Trends Plant Sci* 10(11): 2535-2544.
- Ribeiro RA, Ramos ACS, Lemos-Filho JP & Lovato MB (2005) Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Ann Bot* 95: 1171-1177.
- Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS & Lovato MB (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46-57.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Pozoni FJ & Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv* 142: 1141-1153.
- Richardson JE, Pennington RT, Pennington TD & Hollingsworth PM (2001) Rapid diversification of a species-rich genus of Neotropical Rain Forest trees. *Science* 293: 2242-2245.
- Roddick JG (1991) The Importance of the Solanaceae in medicine and drug therapy. *In: Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Hawkes JG; Lester RN; Nee M & Estrada N (eds.) Royal Botanic Garden, Kew. pp. 7-23.
- Ronquist F (1997) Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Syst Biol* 46: 195-203.
- Roy A, Frascaria N, MacKay J & Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor Appl Genet* 85: 173-180.
- Salzmann U, Williams M, Haywood A, Johnson ALA, Kender S & Zalasiewicz J (2011) Climate and environment of a Pliocene warm world. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 309(1-2): 1-8.
- Sang T (2002) Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 121-147.

- Schlüter PM, Stuessy TF & Paulys HF (2005) Making the first step: practical consideration for the isolation of low-copy nuclear sequence markers. *Taxon* 54(3): 766-770.
- Sendtner O (1846) Solanaceae et Cestrinae. *Flora Brasiliensis. C. F. P. v. Martius*. 10: 1-228.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE & Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92: 142-166.
- Soares ELC (2006) Estudos taxonômicos em Solanaceae lenhosas no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre. 230p.
- Soares ELC, Vignoli-Silva M, Vendruscolo GS & Mentz LA (2007) Solanaceae nativas do Rio Grande do Sul, Brasil: Listagem I. *Revista Brasileira de Biociências* 5(2): 1050-1052.
- Sobral M & Stehmann JR (2009) An analysis of new angiosperm species discoveries in Brazil (1990-2006). *Taxon* 58(1): 227-232.
- Soltis DE, Soltis PS, Clegg MT & Durbin M (1990) *rbcL* sequence divergence and phylogenetic relationships in Saxifragaceae sensu lato. *Natl. Acad. Sci.* 87: 464- 4644.
- Soltis DE, Soltis PS, Endress PK & Chase MW (2005) *Phylogeny and Evolution of Angiosperms*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, 370 pp.
- Spooner DM, van den Berg RG & Miller JT (2000) Species and series boundaries of *Solanum* series *Longipedicellata* (Solanaceae) and phenetically similar species in ser. *Demissa* and ser. *Tuberosa*: implications for a practical taxonomy of Section *Petota*. *Am J Bot* 88: 113-130.
- Stehmann JR (2009) Solanaceae. *In: Plantas da Floresta Atlântica*. Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP & Kamino LHY (eds.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 516pp.
- Stehmann JR, Mentz LA, Agra MF, Vignoli-Silva M & Giacomini L (2012) *Solanaceae*. *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000225> (22 fevereiro 2012).
- Suh Y, Thien LB, Reeve HE & Zimmer EA (1993) Molecular evolution and phylogenetic implication of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am J Bot* 80: 1042-1055.
- Tabarelli M, Silva JMC & Gascon C (2004) Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. *Biodivers Cons* 13: 1419-1425
- Tabanez AAJ & Viana VM (2000) Patch structure within Brazilian Atlantic Forest fragments and its implications for conservation. *Biotropica* 32: 925-933.
- Tank DC & Omstead RG (2009) The evolutionary origin of a secons radiation of annual *Castilleja* (Orobanchaceae) species in South America: the role of long distance dispersand and allopolyploidy. *Am J Bot* 96(10): 1907-1921.

- Tate JA, Acosta MC, McDill J, Moscone E, Simpson BB & Cocucci AA (2009) Phylogeny and character evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): molecular, morphological and cytogenetic evidence. *Syst Bot* 34(1): 198-206.
- Teixeira ST, Valadares MC, Gonçalves AS, de Melo A & Queiroz MLS (2006) Prophylactic administration of *Withania somnifera* extract increases host resistance in *Listeria monocytogenes* infected mice. *Int Immunopharmacol* 6: 1535-1542.
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol Ecol* 7: 381-397.
- Tepe EJ & Bohs L (2010) A molecular phylogeny of *Solanum* sect. *Pterioidea* (Solanaceae) and the utility of COSII markers in resolving relationships among closely related species. *Taxon* 59(3): 733-743.
- Tonhasca JR. A (2005) *Ecologia e história natural da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro, Interciência, 197 pp.
- Tu T, Volis S, Dillon MO, Sun H & Wen J (2010) Dispersals of Hyoscyameae and Mandragoreae (Solanaceae) from the New World to Eurasia in the early Miocene and their biogeographic diversification within Eurasia. *Mol Phyl Evol* 57(3): 1226-1237.
- Tu T, Dillon MO, Sun H & Wen J (2008) Phylogeny of *Nolana* (Solanaceae) of the Atacama and Peruvian deserts inferred from sequences of four plastid markers and the nuclear *LEAFY* second intron. *Mol Phyl Evol* 49: 561-573.
- Upchurch P (2008) Gondwanan break-up: legacies of a lost world? *Trends Ecol Evol* 23(4): 229-236.
- Van den Berg RG, Miller JT, Ugarte ML, Kardolus JP, Villand J, Nienhuis J & Spooner DM (1998). Collapse of morphological species in the wild potato *Solanum brevicaulle* complex (Solanaceae: sect. *Petota*). *Am J Bot* 85: 92-109.
- Volkov RA, Komarova NY, Panchuk II & Hemleben V (2003). Molecular evolution of rDNA external transcribed spacer and phylogeny of sect. *Petota* (genus *Solanum*). *Mol Phyl Evol* 29: 187-202.
- Walsh BM & Hoot SB (2001) Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. *Int J Plant Sci* 162: 1409-1418.
- Weese TL & Bohs L (2007). A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae) *Syst Bot* 32: 445-463.
- Wettstein R von (1891) Solanaceae. *Ibid* 4 (3b): 4-38, f. 1-16.
- Wikström N, Savolainen V & Chase MW (2001) Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proc R Soc Lond B* 268: 2211-2220.
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem* 64: 3-19.
- Wolfe KH, Li W & Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Nat Acad Sci* 84: 9054-9058.

- Yoder AD & Nowak MD (2006) Has vicariance or dispersal been the predominant biogeographic force in Madagascar? Only time will tell. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:405–31.
- Yu Y, Harris AJ, He XJ (2010) S-DIVA (statistical dispersal-vicariance analysis): a tool for inferring biogeographic histories. *Mol Phyl Evol* 56(2): 848-850.
- Yuan YM, Wohlhauser S, Möller M, Klackengerg J, Callmander MW & Küpfer P (2005) Phylogeny and biogeography of *Exacum* (Gentianaceae): a disjunctive distribution in the Indian Ocean Basin resulted from long distance dispersal and extensive radiation. *Syst Biol* 54(1): 21-34.
- Yuan YW, Liu C, Marx HE & Olmstead RG (2009) The pentatricopeptide repeat (PPR) gene family, a tremendous resource for plant phylogenetic studies. *New Phytol* 182: 272-283.
- Yuan YW, Liu C, Marc HE & Olmstead RG (2010) An empirical demonstration of using pentatricopeptide repeat (PPR) genes as plant phylogenetic tools: phylogeny of Verbenaceae and the *Verbena* complex. *Mol Phyl Evol* 53: 23-35.
- Zhang Z-Y & Lu A-M (1999) A comparative study of *Physalis*, *Capsicum* and *Tubocapsicum*; three genera of Solanaceae. *In*: Solanaceae IV. Nee M, Symon DE, Lester RN & Jessop JP (eds), Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 81-98.
- Zuckerandl E & Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In*: *Evolving Genes and Proteins*. Byson B & Vogel H (eds), Academic Press, New York, pp. 97-116.