

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Análises morfométricas, biologia reprodutiva e
cruzamentos interespecíficos para estudo da hibridação
natural entre duas espécies de *Petunia* (Solanaceae)**

MARCELO COSTA TEIXEIRA

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

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

Porto Alegre, junho de 2019.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

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

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Loreta Brandão de Freitas** por toda a dedicação ao longo deste trabalho, por ter sempre me oportunizado o aprendizado e o suporte necessário para todas as etapas do trabalho;

Aos **professores do Departamento de Botânica** da UFRGS pela contribuição para o meu crescimento acadêmico;

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Evolução Molecular (**LEM**) da UFRGS aos que passaram durante, aos que permaneceram e aos que chegaram ao longo destes anos: Ana Lúcia, Daniele, Gustavo, Lina, Maikel, Sara, Caroline, Geraldo, Giovanna, Alice, Carolina, Analu, Ariadne, Elise, Luana, Sebastian, Pedro.

Agradeço ao **Clênio** pelas conversas descontraídas;

Ao **Elmo e Milene**;

A todos aos colaboradores deste trabalho **Renan, Sara, Carolina** e especialmente à **Caroline** por participar de todas as etapas deste trabalho e contribuir muito para o meu crescimento profissional.

Ao Senhor **Deosionil** (Seu Desinho) e ao Senhor **Álvaro** sempre solícitos nos trabalhos de campo;

A **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado;

Agradeço à minha família, **pais e irmão**, pelo amor incondicional e presença em todos os momentos da minha vida;

Aos meus filhos **Lionel e Dimitri** por todo o amor, compreensão, motivação em todos os momentos e que sempre me esperam com um abraço apertado;

Nunca conseguirei expressar o quanto foram importantes. **Obrigado a todos!!**

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	9
1. <i>Região geográfica da Serra do Sudeste</i>	9
2. <i>Caracterização do grupo de estudo</i>	10
3. <i>Zonas híbridas, Isolamento reprodutivo e Morfometria geométrica</i>	13
4. <i>Objetivo Geral</i>	15
5. <i>Objetivos Específicos</i>	15
CAPÍTULO II – ARTIGO 1	17
CAPÍTULO III – ARTIGO 2	18
CAPÍTULO IV – ARTIGO 3	19
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

Muitas das observações de hibridação em plantas vêm de estudos de zonas híbridas ou áreas de mistura entre duas espécies relacionadas que incluem alguns híbridos viáveis. Tais zonas híbridas podem ser o resultado de contato secundário ou especiação em curso em simpatria ou parapatria, permitindo a colonização de nichos inexplorados pelos parentais que geralmente apresentam uma impressionante variação na morfologia floral e estas características podem influenciar o grau de isolamento reprodutivo entre as espécies, alterando qualquer um dos vários passos no isolamento pré-zigótico e pós-zigótico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os processos de hibridação interespecíficos, seus efeitos na integridade morfológica das espécies, na biologia reprodutiva e na correspondência de classificação genético-morfológica. Para isto foram conduzidos experimentos para caracterizar a forma da corola em populações de *Petunia exserta* e *Petunia axillaris* e seus híbridos naturais, examinar a biologia reprodutiva e classificar os indivíduos através de análises genéticas e morfológicas no gênero *Petunia*. Os resultados foram descritos detalhadamente nos capítulos II, III e IV que compõem esta Tese e podem ser assim resumidos. As análises morfométricas revelaram que cada espécie apresenta uma forma floral específica independente do local de coleta. Por outro lado, em duas zonas de contato, um mosaico de fenótipos florais foi observado com algumas classes híbridas muito semelhantes a ambas as espécies. Encontramos também, diferenças na compatibilidade entre indivíduos, classes e cruzamentos recíprocos, apesar da alta produção e viabilidade de sementes. Nossos resultados revelaram que a cor da corola é um bom indicador do componente genético de cada espécie e de seus híbridos, assim como a forma da corola, embora, nesta haja divergências na correspondência. Em conclusão, nossos resultados sugerem que várias gerações de híbridos ou retrocruzamentos poderiam ter originado a diversidade de formas florais nos sítios simpátricos, que a alta compatibilidade entre as linhagens pode explicar a manutenção e estabilidade das zonas híbridas aumentando a variabilidade e a introgressão simétrica entre as espécies analisadas.

ABSTRACT

Many of the hybridization observations on plants come from hybrid zone studies or mixing areas between two related species that include some viable hybrids. Such hybrid zones may be the result of secondary contact or ongoing speciation in sympatry or parapatry, allowing the colonization of unexplored niches by the parents who usually present an impressive variation in floral morphology and these characteristics may influence the degree of reproductive isolation between species, by altering any of the several steps in pre-zygotic and post-zygotic isolation. The objective of the present work was to evaluate the interspecific hybridization process, its effects on the morphological integrity of two *Petunia* species and the reproductive biology, emphasizing on the correspondence between genetic and morphological classification. To do this, we conducted experiments to characterize the corolla shape in populations of *P. exserta* and *P. axillaris* and their natural hybrids, from two contact zones and allopatric sites of each species, to examine the reproductive biology, and to classify the individuals through genetic and morphological analyzes in *Petunia* genus. The results were described in detail in chapters II, III, and IV that integrate this Thesis and can be summarized as follows. Morphometric analyses revealed that each species presents a specific floral shape independently from the collection site. On the other hands, in two contact zones, a mosaic of floral phenotypes was observed with some hybrid classes very similar to one or another species. We also found differences in the compatibility between individuals, classes, and reciprocal crosses, despite high seed production and seedling viability. Our results revealed that corolla color is a good indicator of the genetic component of each species and its hybrids, as well as the corolla shape, although some differences related to the correlation between traits. In conclusion, our results suggest that several generations of hybrids or backcrosses could have originated the diversity of floral forms in the sympatric sites, that high compatibility between lineages may explain the maintenance and stability of the hybrid zones, increasing the variability and the symmetric introgression between these *Petunia* species.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. Região geográfica da Serra do Sudeste

A região fisiográfica da Serra do Sudeste, também conhecida como Escudo Sul-Rio-grandense, ocupa uma área aproximada de 44.000 km² e está inserida no Bioma Pampa (IBGE, 2004). O Pampa como Bioma é caracterizado por um mosaico de campos, vegetação arbustiva e diferentes tipos florestais (Teixeira *et al.*, 1986). Embora pouco estudada, a estrutura vegetacional dessa região é muito diversa, em resposta a vários fatores, como clima, o solo, o relevo e o manejo a que esta vegetação está submetida (Boldrini, 2009; Suertegaray & Silva, 2009).

A região da Serra do Sudeste é a região com as rochas mais antigas do Estado datadas do Pré-Cambriano (Holz, 1999; Almeida *et al.*, 2009), cobertas por uma vegetação savanoide (arbóreo-arbustiva) sobre solos rasos. Nesta região existe uma formação geológica conhecida como Guaritas, que consiste em conglomerado de torres areníticas (Paim & Lopes, 2000) com encostas íngremes e topos convexos (Rambo, 1956). Os arenitos das Guaritas foram derivados de depósitos aluviais e eólicos que datam do início do Cambriano, cerca de 535 milhões de anos atrás (Almeida *et al.*, 2009). Esse tipo de formação rochosa influencia o padrão vegetacional, quer diretamente por constituir um microhabitat particular, quer indiretamente devido sua influência sobre as condições microclimáticas. Muitas vezes estes ambientes transicionais servem como refúgios, abrigando muitas espécies endêmicas e ou raras (Medina *et al.*, 2006; Jacobi *et al.*, 2007).

Estudos vêm documentando uma grande riqueza de biodiversidade nessa região, com aproximadamente 30 espécies de plantas endêmicas (Guadagnin *et al.*, 2000; Paz *et al.*, 2008). As florestas da região são classificadas como florestas estacionais semidecíduas (Oliveira-Filho *et al.* 2013), tendo elementos de florestas do interior, bem como de florestas atlânticas costeiras. Carlucci *et al.* (2015) observaram que a diversidade de espécies e comunidades vegetais na região das Guaritas está diretamente associada com as encostas opostas das torres, onde encostas menos expostas à radiação solar foram taxonomicamente mais diversas.

Na Serra do Sudeste, assim como no restante do bioma Pampa, muitas áreas atualmente cobertas por vegetação campestre seriam ocupadas por subarbustos, arbustos e árvores de baixo porte, as quais aos poucos vão sendo cortadas e queimadas, ampliando as áreas utilizadas como pastagem (Girardi-Deiro *et al.*, 1994), sendo estas práticas muito

utilizadas por produtores locais (Caporal & Boldrini, 2007). A Serra do Sudeste, como um todo, não permite o desenvolvimento de uma agricultura de monocultura extensiva pela pouca profundidade do solo. As principais atividades geradoras de renda para os produtores locais são a bovinocultura, ovinocultura e caprinocultura.

Na localidade conhecida como Minas do Camaquã, Guaritas, iniciou-se em 1870 a extração de cobre que foi interrompida em 1996, quando ocorreu o esgotamento total das reservas economicamente viáveis (Paim, 2000). No entanto, dois projetos de mineração estão sendo desenvolvidos em São José do Norte e Caçapava do Sul. O projeto Caçapava, a ser instalado nas margens do rio Camaquã, prevê a instalação de uma planta polimetálica para extração de zinco, chumbo e cobre. As prospecções e sondagens na área ocorrem desde 2008 e sua implementação definitiva poderá resultar em extensivos danos ao meio ambiente, destacando que as áreas dos projetos pertencem ao Pampa, um dos Biomas mais negligenciados em termos de preservação, com falta de conhecimento básico sobre a biodiversidade dos campos nativos e baixo número de áreas efetivamente protegidas em Unidades de Conservação (Overbeck *et al.*, 2007; Overbeck *et al.*, 2015).

A Serra do Sudeste é classificada como área de extrema importância biológica e de elevadíssima prioridade para conservação (Ministério do Meio Ambiente, 2009). A região das Guaritas é de grande interesse para a conservação (Ministério do Meio Ambiente 2007), devido à sua beleza paisagística original e ao caráter endêmico de parte de sua flora. No entanto, a área não está formalmente preservada até o momento.

2. Caracterização do grupo de estudo

A família Solanaceae A. Juss., ordem Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl, Lamiidea é uma família de angiospermas rica em espécies e bastante representativa nas regiões de Campos. Composta por cerca de 3000 espécies e aproximadamente 150 gêneros, os representantes da família podem ser ervas, arbustos, árvores, trepadeiras ou epífitas (APG IV, 2016). Solanaceae é um componente importante da vegetação de sub-bosque e tendem a ser plantas sucessionais iniciais (Muscarella & Fleming, 2007). No Brasil são encontrados 34 gêneros e 488 espécies (Flora do Brasil <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB225>>) pertencentes a esta família botânica. Muitos membros apresentam alcaloides, princípios ativos que permitem sua utilização como fármacos ou narcóticos como, por exemplo, *Nicotiana tabacum* L. (tabaco), *Atropa belladonna* L. (beladona) e *Datura stramonium* L. (estramônio). A

família Solanaceae também é muito utilizada na alimentação humana, especialmente, os gêneros *Solanum* L (tomate, batata, etc.) e *Capisicum* L (pimenta), além de plantas amplamente cultivadas como ornamentais como *Browallia* L, *Brunfelsia* L, *Cestrum* L, *Salpiglossis* Hook, *Solandra* Sw e *Petunia* Juss (Judd *et al.*, 2009, Flora do Brasil <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB225>>).

Estudos recentes sobre a diversificação de Solanaceae sugeriram a origem da subfamília Solanoideae a 52,2 Ma (Särkinen *et al.*, 2018), com base em registros fósseis de *Physalis* encontrados na Argentina (Wilf *et al.* 2017), e 54 Ma (Dupin & Smith, 2018). Solanaceae apresenta um provável centro de origem na América do Sul (Olmstead & Palmer, 1992) com oito a nove eventos de dispersão para o Velho Mundo (Tu *et al.*, 2010; Dupin *et al.*, 2017). A família é considerada monofilética com base em caracteres morfológicos e de marcadores de cloroplasto (Olmstead & Palmer, 1992; Olmstead *et al.*, 1999). No entanto, as relações dentro da família apresentam resolução incerta. O agrupamento [Petunioideae [Solanoideae + Nicotianoideae]] é bem suportado em Olmstead *et al.* (1999), embora este agrupamento seja menos resolvido em Olmstead (2013) e Särkinen *et al.* (2013). Na filogenia de Olmstead & Bohs (2007), como grupo irmão do clado [Solanoideae + Nicotianoideae] estava uma politomia incluindo as subfamílias Petunioideae, Cestroideae e Schwenkioideae e frequentemente Solanaceae tem sido dividida em dois grandes grupos, Cestroideae e Solanoideae (Judd *et al.*, 2009).

O gênero *Petunia* Juss. pertence à subfamília Petunioideae (APG IV, 2016) é conhecido mundialmente através da petúnia-de-jardim, um híbrido ornamental amplamente cultivado e muito utilizado como modelo em diversos estudos (Gerats & Vandebussche, 2005). O gênero é endêmico do sul da América do Sul e em 1803 foram incluídas cerca de 30 espécies distribuídas principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Brasil), ao longo de todo o território do Uruguai e de algumas províncias da Argentina. Em 1985 estas espécies foram divididas em dois gêneros, principalmente devido a diferenças no número cromossômico, morfologia da semente, anatomia foliar e tipo de pré-floração (Wijsmann & Jong, 1985). Atualmente são descritas 14 espécies para o gênero *Petunia* com as demais espécies incluídas em *Calibrachoa* Cerv.. Distribuídas nas regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, as espécies de *Petunia* apresentam número cromossômico básico ($x = 7$) e pré-floração (imbricada) e são consideradas anuais em função de seu crescimento vegetativo segundo Stehmann *et al.* (2009). De acordo com os mesmos autores, são propostos dois centros de diversidade para o gênero: campos de altitude da borda oriental do planalto de Santa Catarina e afloramentos rochosos areníticos

(conglomerado) da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul.

Petunia axillaris (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. pode ser facilmente identificada pelo seu hábito ereto, pela cor corola branca, forma da corola tubular, pólen amarelo e pedicelo inflexível na fase de frutificação. As flores emitem uma fragrância ao anoitecer e são visitadas por mariposas da família Sphingidae (Galeto & Bernardello, 1993; Ando *et al.*, 2001). Esta espécie exibe a maior distribuição geográfica em extensão do gênero, ocorrendo no Brasil (RS), Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. Três subespécies alopátricas foram aceitas com base no comprimento do tubo da corola e arranjo dos estames e estudos de caracterização genética (Turchetto *et al.*, 2014b). Indivíduos de *P. axillaris* são heliófilos e habitam locais rochosos, também podendo ser encontrados ao longo das estradas (Stehmann *et al.*, 2009). *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* ocorre em toda região do Pampa, Rio Grande do Sul (Brasil), Uruguai e Argentina. Entretanto, no Uruguai ocorre apenas na metade sul do país, sendo o Rio Negro o limite de distribuição desta subespécie (Ando, 1996; Turchetto *et al.*, 2014a,b).

Petunia exserta Stehmann é a única espécie do gênero que apresenta coloração da corola vermelha e estames e estigma exsertos. Estas características são associadas à polinização por beija-flores (Stehmann, 1987; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). As plantas desta espécie apresentam hábito ereto, corola tubular, pólen amarelo e pedicelo inflexível como os apresentados por *P. axillaris*. Essa espécie é endêmica da região das Guaritas e áreas adjacentes, no município de Caçapava do Sul (Serra do Sudeste), crescendo em cavernas rasas esculpidas pelo vento nas torres de arenito da região (Stehmann *et al.*, 2009). Nesta área, as espécies *P. axillaris* subsp. *axillaris* e *P. exserta* são encontradas muitas vezes em simpatria, sendo separadas apenas pelo microambiente que habitam: enquanto *P. exserta* é encontrada apenas no interior das cavernas onde cresce ao abrigo da luz solar e da chuva diretas, *P. axillaris* subsp. *axillaris* habita áreas abertas e ensolaradas das encostas ou topo das torres (Stehmann *et al.*, 2009).

Os caracteres diagnósticos dessas espécies estão associados com a morfologia floral e com a atração de polinizadores para cada espécie (Stehmann *et al.*, 2009). Estudos vêm sendo desenvolvidos para o mapeamento de genes implicados em funções importantes nos processos de especiação em *Petunia*, que condicionam características florais atrativas aos polinizadores. Estes estudos encontraram um bloco de QTLs (quantitative trait loci) nos cromossomos II e V associados com a rápida mudança da morfologia floral entre as duas espécies com relação ao comprimento do pistilo e das anteras. Além disso, QTLs no cromossomo II também estão relacionados com a emissão de aroma e a cor da corola

(Hermann *et al.*, 2015).

Alguns estudos sobre a caracterização de polimorfismos moleculares indicaram a existência de híbridos naturais entre estas duas espécies de *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2015b). Por outro lado, estas espécies preservam sua integridade genética como representando pela existência de dois grupos genéticos distintos, resultantes provavelmente da adoção de diferentes estratégias reprodutivas. *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* nesta região deixa de ser autoincompatível para apresentar um sistema misto de cruzamento (Turchetto *et al.*, 2015a). A troca gênica pode ser frequente, em ambas as direções entre essas espécies. A introgressão modifica a constituição genética principalmente em dois sítios de ocorrência de ambas na região das Guaritas. Contudo, a integridade das espécies pode estar sendo mantidas devido a altos níveis de endogamia e retrocruzamentos cuja frequência e direção é dependente do habitat em que os híbridos se desenvolvem (Turchetto *et al.*, 2019).

3. Zonas híbridas, Isolamento reprodutivo e Morfometria geométrica

Baseado principalmente em estudos com animais, híbridos interespecíficos naturais foram tradicionalmente considerados ponto final na evolução e um fato raro, geralmente sendo estéreis ou indicando uma quebra no isolamento reprodutivo causado por distúrbios atribuídos à atividade humana (Mayr, 1963). Entretanto, hoje se sabe que híbridos naturais podem ser muito mais frequentes do que se imaginava, tanto em animais como em plantas (Mallet, 2007; Taylor & Larson, 2019), e, com uma gama muito mais ampla de papéis evolutivos, incluindo a introgressão de genes de outras espécies, como enfatizado originalmente por Anderson (1949); a persistência de zonas híbridas estáveis (Barton & Hewitt, 1985); a introdução de novas variantes genéticas que podem aumentar a adaptação a ambientes particulares (Anderson & Stebbins, 1954; Kim & Rieseberg, 1999; Martinsen *et al.*, 2001); por promover especiação através de reforço, ou seja, quando em simpatria ocorre fixação de características que dificultam o cruzamento entre as espécies (Servedio & Noor, 2003; Palma-Silva *et al.*, 2015); e a origem de novas espécies por hibridação ou evolução reticulada (Rieseberg *et al.*, 1996; Rieseberg, 1997).

Muitas das observações de hibridação em plantas vêm de estudos de zonas híbridas ou áreas de mistura entre duas espécies relacionadas que incluem alguns híbridos viáveis (Rieseberg *et al.*, 2003; Buerkle *et al.*, 2000). Tais zonas híbridas podem ser o resultado de contato secundário ou especiação em curso em simpatria ou parapatria, permitindo a

colonização de nichos inexplorados pelos parentais (Rieseberg *et al.*, 2003). Zonas híbridas geralmente apresentam uma impressionante variação na morfologia floral e estas características podem influenciar profundamente o grau de isolamento reprodutivo entre as espécies, alterando qualquer um dos vários passos no isolamento pré-zigótico e pós-zigótico (Wendt *et al.*, 2002; Ippolito *et al.*, 2004; Schumer *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2019). Um número crescente de estudos tem demonstrado que altas taxas de autopolinização dificultam a hibridação e a introgressão representando, assim, uma importante barreira de isolamento reprodutivo pré-zigótico (Cannon & Ler dau, 2015; Palma-Silva *et al.*, 2015; Neri *et al.*, 2018). Barreiras pós-zigóticas, como incompatibilidade estigmática, frutos abortivos, inviabilidade e esterilidade híbrida, também podem influenciar os padrões de hibridação (Soltis & Soltis 2009).

Características florais que podem contribuir para o isolamento reprodutivo entre espécies, por exemplo, quando as plantas parecem ter interações específicas com seus polinizadores (Gogler *et al.*, 2015; Scopece *et al.*, 2017) ou caracteres que contribuem para variação no sistema reprodutivo (Palma-Silva *et al.*, 2015; Neri *et al.*, 2017). Neste sentido, a produção de plantas híbridas entre espécies simpátricas pode estar associada ao grau de discriminação dos polinizadores sobre um determinado tipo floral (ver, por exemplo, Emms *et al.*, 1996). A menos que as plantas híbridas estejam imediatamente isoladas, elas podem ser um indicativo de fluxo gênico entre as espécies parentais (Ippolito *et al.*, 2004). A detecção de híbridos no habitat natural através do fenótipo morfológico pode ser dificultada devido à segregação de características fenotípicas na primeira geração (F1) e em gerações subsequentes. Populações mistas, onde ambos os parentais coocorrem juntamente com seus prováveis híbridos, podem ter uma estrutura complexa apresentando uma mistura de indivíduos com morfologia canônica de cada espécie, os híbridos entre elas, bem como aqueles resultantes de retrocruzamentos com um ou ambos os parentais e produtos de segregação (Fogelqvist *et al.*, 2015; Christe *et al.*, 2016).

A categorização das formas morfológicas é um componente importante da biologia comparativa. As categorias podem sugerir função e / ou os relacionamentos de parentesco entre os indivíduos e podem ser analisadas em um quadro comparativo para avaliar a homologia, a convergência e a correlação entre caracteres e indivíduos. Algumas categorias são bastante óbvias, enquanto outras são menos bem delineadas (Hebert *et al.*, 2004; Heinrichs *et al.*, 2010). Como tal, os métodos que fornecem alternativas objetivas e quantitativas à categorização subjetiva estão se tornando frequentes na literatura, particularmente quando as categorias não são imediatamente óbvias ou a variação entre os

tipos parece contínua. A quantificação desses traços fornece robustez matemática aos estudos de variação dentro das populações e à evolução do caráter comparativo (Gardner *et al.*, 2016).

A morfometria geométrica é uma metodologia que captura medições quantitativas da forma de estruturas, potencialmente descobrindo padrões de evolução da forma ou integração morfológica (Klingenberg, 2010). A morfometria geométrica difere dos métodos morfométricos tradicionais na medida em que caracteriza a forma de um objeto como um todo, em vez de partes individuais, produzindo um modelo de forma unificado. Resumidamente, marcos morfológicos homólogos ou semi-homólogos podem ser aplicados a uma população de imagens comparáveis, que fornecem os dados brutos para análises multivariadas de forma e em contextos evolutivos (Slice, 2007). Embora esses métodos tenham sido amplamente aplicados e bem desenvolvidos em zoologia e campos relacionados, os botânicos apenas começaram a adotá-los em estudos de forma floral e folha mais recentemente (Viscosi & Cardini, 2011). A variação morfométrica floral já foi aplicada a espécies de plantas únicas para abordar questões evolutivas e de desenvolvimento (Gómez *et al.*, 2006; Savriama *et al.*, 2012) e em conjuntos mais amplos de espécies para fins taxonômicos e evolutivos (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2013; van der Niet *et al.*, 2016).

4. Objetivo Geral

Contribuir para o melhor entendimento dos processos de hibridação interespecíficos, seus efeitos na integridade morfológica das espécies, na biologia reprodutiva e na correspondência de classificação genético-morfológica em duas espécies simpátricas do gênero *Petunia*.

5. Objetivos Específicos

I – Caracterizar a forma floral das espécies e dos híbridos das diferentes classes de cor e verificar se esta se correlaciona a uma forma de flor diferente baseada em morfologias lineares e geométricas;

II – Avaliar as diferenças no sucesso reprodutivo entre as três linhagens analisando a autocompatibilidade, as diferenças na produção de frutos, na quantidade e viabilidade de sementes derivadas de experimentos controlados de polinização em casa de vegetação;

III – Determinar a correspondência entre indivíduos de cor intermediária e as plantas híbridas estimando a contribuição dos perfis genéticos e da forma morfológica para classificar corretamente esses indivíduos.

CAPÍTULO II – ARTIGO 1

Artigo aceito com revisões pela revista *BOTANICAL JOURNAL OF THE LINNEAN*
SOCIETY

Morphological characterization of sympatric and allopatric *Petunia exserta* and *Petunia axillaris* (Solanaceae) populations

CAPÍTULO III – ARTIGO 2

Artigo em preparação para ser submetido à revista *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY*

Self-compatibility and reciprocal crosses in an interspecific hybrid zone explain population stability

CAPÍTULO IV – ARTIGO 3

Artigo aceito com revisões na revista *ACTA BOTANICA BRASILICA*

Morphological and genetic views on hybridization in two contact zones of closely related
Petunia species (Solanaceae) in South Brazil

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações morfológicas podem fornecer informações importantes sobre os processos evolutivos e ecológicos relacionados à hibridação interespecífica, especialmente quando espécies ecologicamente divergentes estão envolvidas (McIntosh *et al.*, 2014). Mudanças nos traços florais no gênero *Petunia* têm sido associadas a mudanças na síndrome floral (Hermann *et al.*, 2015; Amrad *et al.*, 2016; Sheehan *et al.*, 2016; Esfeld *et al.*, 2018). Esta interação planta polinizador tem sido sugerida uma importante força contribuindo, juntamente com outros fatores, para a diversificação do gênero, bem como para manutenção da integridade genética de espécies (Fregonezi *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2018). Na presente Tese, Capítulo II, mostramos uma grande diversidade na morfologia floral, especialmente no que diz respeito à forma e cor da corola, em duas zonas de contato entre *P. axillaris* e *P. exserta*. Os caracteres morfológicos usualmente utilizados para a discriminação e também indicativos de suas respectivas síndromes de polinização foram consistentemente diferentes em sítios isolados de cada uma das espécies, por outro lado nas zonas de contato esses caracteres apresentaram uma grande variação. A persistência de indivíduos com coloração intermediária da corola ao longo de vários anos (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto *et al.*, 2014a; Turchetto *et al.*, 2015), a variabilidade da forma da corola e as diferenças significativas entre indivíduos simpátricos e alopátricos sugerem que indivíduos de cor intermediária resultam do cruzamento entre híbridos e retrocruzamentos com ambas as espécies parentais.

Petunia exserta apresenta estames epipétalos e todos com aproximadamente mesmo comprimento do filete, fortemente exsertos e os estames dorsais normalmente possuem filetes maiores que a altura do estigma. Em *P. axillaris*, o estigma, os estames dorsais e laterais possuem comprimentos de filetes diferentes, sendo menores em relação à posição do estigma (Stehmann *et al.*, 2009). Medidas em uma população de híbridos de segunda geração F2 compreendendo um cruzamento experimental entre *P. axillaris* e *P. exserta* (Klahre *et al.*, 2011) observaram que os comprimentos de pistilo da progênie híbrida abrangia toda a diferença fenotípica observada entre os parentais desde exsertos até inclusos para essa característica. Além disso, Hermann *et al.* (2015) encontraram uma distribuição fenotípica semelhante a do comprimento dos filetes e variação transgressiva

para características como o comprimento do tubo e o comprimento da corola. Nossos resultados mostram que a cor, a posição das anteras, o comprimento dos filetes e do pistilo mudam independentemente entre as classes de híbridos, mas estão fortemente ligados em cada espécie, especialmente naqueles indivíduos coletados em sítios alopátricos ao longo da distribuição comum delas nas Guaritas. Além disso, não encontramos diferenças significativas no comprimento do filete e posicionamento das anteras entre as classes de cores híbridas e entre as duas espécies, considerando essa medida a partir do receptáculo da corola, independente dos locais de coleta, com comprimentos individuais variando continuamente. As diferenças entre as espécies são baseadas na variabilidade do comprimento do tubo e no comprimento da corola que resulta em pistilo e estames mais exsertos em *P. exserta* e mais inclusos em *P. axillaris*.

Em plantas monoclinas é útil distinguir qual é o sistema reprodutivo para entender a permanência e a diversidade da população (Charlesworth, 2006). No Capítulo III deste estudo, descrevemos altos níveis de autocompatibilidade *P. exserta*, *P. axillaris* e os híbridos naturais em duas zonas de contato dessas espécies. Além disso, foi observado uma viabilidade de sementes oriundas de cruzamentos manuais sob condições controladas. Este resultado encontrado pode explicar sua estabilidade como zona de contato entre *P. axillaris* e *P. exserta* e a ocorrência de híbridos ao longo das gerações, diversidade genética nessas populações (Turchetto *et al.*, 2019) e introgressão gerando diversidade morfológica. A alta autocompatibilidade e viabilidade na zona de contato entre duas espécies de *Petunia* e seus híbridos interespecíficos promovem o estabelecimento de populações estáveis e facilitam a troca gênica e a introgressão entre elas na área de contato. Associados a estudos anteriores sobre constituição genética e caracterização morfológica, os presentes dados contribuem para a compreensão do processo de diversificação de *Petunia*. Nossos experimentos revelaram também que *P. axillaris* e *P. exserta* e seus híbridos interespecíficos são autocompatíveis. Indivíduos de *P. exserta* e híbridos também são ocasionalmente autógamos espontâneos. Não observamos barreiras marcantes para a polinização entre indivíduos dentro de nenhuma linhagem.

A hibridação desempenha um papel essencial na evolução das plantas (Abbott *et al.*, 2016) e zonas de contato entre espécies recentemente divergentes fornecem uma oportunidade única para estudar o efeito da hibridação na diversidade genética e

morfológica (Meier *et al.*, 2016). No Capítulo IV deste estudo, os dados genéticos confirmam a natureza híbrida de indivíduos classificados anteriormente pela cor da corola. Os resultados deste estudo demonstraram que, em duas zonas de contato entre espécies intimamente relacionadas que habitam diferentes microambientes, a hibridação e introgressão interespecífica ocorrem regularmente. Essas duas espécies ainda mantêm seus limites morfológicos e genéticos, mas os híbridos estão crescendo em ambos os microambientes, o que altera a forma e a cor da corola e os polimorfismos genéticos em ambas as espécies parentais. As consequências da hibridação interespecífica podem variar profundamente entre as espécies e populações envolvidas, desde a eliminação dos limites das espécies, transformando duas espécies em uma (Soltis & Soltis 2009), até a geração de novas adaptações que promovem a especiação (Meier *et al.*, 2016). A hibridação é um fator importante no surgimento da diversidade em angiospermas (Yakimowski & Rieseberg, 2014). Estudos tem mostrado que a hibridação é um mecanismo responsável pelo surgimento de novas espécies, chamado especiação híbrida homoploide (quando não há poliploidização decorrente do processo de hibridação), em que o híbrido formado a partir de espécies intimamente relacionadas emerge isolamento reprodutivo dos parentais, geralmente associado com a ocupação de novos *habitats* (Abbott *et al.*, 2010; Imbert *et al.*, 2014; Comeault & Matute, 2018). Neste Capítulo, descrevemos a diversidade genética e morfológica entre duas espécies de *Petunia* que divergem principalmente em suas síndromes de polinização e adaptações ecológicas (Stehmann *et al.*, 2009). A hibridação entre elas promoveu o surgimento de uma nova classe de cor e forma de corola, especialmente dentro de cavidades rochosas junto a indivíduos *P. exserta*. Apesar de algumas vezes dissociadas, mudanças na cor e na forma seguiram mudanças no polimorfismo genético e trouxeram novas combinações de características morfológicas ao ambiente de *P. exserta*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R. J., HEGARTY, M. J., HISCOCK, S. J., BRENNAN, A. C. Homoploid hybrid speciation in action. *Taxon* 59: 1375-1386, 2010.
- ABBOTT, R. J., BARTON, N. H., GOOD, J. M. Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. *Molecular Ecology* 25: 2325-2332, 2016.
- ALMEIDA, R. P., JANIQUIAN, L., FRAGOSO-CESAR, A. R. S., MACRONATO, A. Evolution of a rift basin dominated by subaerial deposits: The Guaritas Rift, Early Cambrian, Southern Brazil. *Sedimentary Geology* 217: 30-51, 2009.
- AMRAD, A., MOSER, M., MANDEL, T., DE VRIES, M., SCHUURINK, R. C., FREITAS, L., KUHLEMEIER, C. Gain and loss of floral scent production through changes in structural genes during pollinator-mediated speciation. *Current Biology* 19: 3303–3312, 2016.
- ANDERSON, E. Introgressive hybridization. Wiley, New York, 1949.
- ANDERSON, E., G. L. Stebbins. Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8: 378-388, 1954.
- ANDO, T. Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *APG* 47: 19-30, 1996.
- ANDO, T., NOMURA, M., TSUKAHARA, J., WATANABE, H., KOKUBUN, H., TSUKAMOTO, T., HASHIMOTO, G., MARCHESI, E., KITCHING, I. J. Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Annals of Botany* 88: 403–413, 2001.
- APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1–20, 2016.
- BARTON, N. H. & HEWITT, G. M. Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 16:113-148, 1985.
- BOLDRINI, I. I. A flora dos Campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar V, Müller SC, Castilhos ZMS & Jacques AVA (eds) Campos Sulinos- conservação e uso sustentável da biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 63-77, 2009.
- BUERKLE, C. A., R. J. MORRIS, M. A. ASMUSSEN, L. H. RIESEBERG. The likelihood

- of homoploid hybrid speciation. *Heredity* 84: 441–451, 2000.
- CANNON, C.H., LERDAU, M. Variable mating behaviors and the maintenance of tropical biodiversity. *Front. Genet.* 6: 183, 2015.
- CAPORAL, F. J. M. & BOLDRINI, I. I. Florística e fitossociologia de um campo manejado na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 37- 44, 2007.
- CARLUCCI, M. B., DEBASTIANI, V. J., PILLAR, V. D., DUARTE L. D. S. Between and within species trait variability and the assembly of sapling communities in forest patches. *Journal of Vegetation Science* 26: 21-31, 2015.
- CHARLESWORTH, D. Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genetics* 2: e2, 2006.
- CHRISTE C, STÖLTING KN, PARIS M, FRAÏSSE C, BIRERNE N & LEXER C. Adaptive evolution and segregating load contribute to the genomic landscape of divergence in two tree species connected by episodic gene flow. *Molecular Ecology*, 25: 2482–2498, 2016.
- COMEALTE, A. A., MATUTE, D. R. Genetic divergence and the number of hybridizing species affect the path to homoploid hybrid speciation. *PNAS* 115: 9761–9766. 2018.
- DUPIN, J., & SMITH, S. D. Phylogenetics of Datureae (Solanaceae), including description of the new genus *Trompattia* and re-circumscription of the tribe. *Taxon* 67: 359-375, 2018.
- DUPIN, J., MATZKE, N. J., SÄRKIN, T., KNAPP, S., OLMSTEAD, R. G., BOHS, L., & SMITH, S. D. Bayesian estimation of the global biogeographical history of the Solanaceae. *J. Biogeog.* 44: 887-899, 2017.
- Emms SK, Hodges, S.A., Arnold, M. L. Pollen-tube competition, siring success, and consistent asymmetric hybridization in *Lousiana irises*. *Evolution*, 50: 2201-2206, 1996.
- ESFELD, K., BERARDI, A. E., MOSER, M., BOSSOLINI, E., FREITAS, L., KUHLEMEIER, C. Pseudogenization and resurrection of a speciation gene. *Current Biology* 28: 3776-3786, 2018.
- FERNÁNDEZ-MAZUECOS, M., BLANCO-PASTOR, J.L., GÓMEZ, J.M.; VARGAS, P. Corolla morphology influences diversification rates in bifid toad flaxes (*Linaria* sect.

- Versicolores). *Annals of Botany*, 112: 1705–1722, 2013.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB225>>. Acesso em: 18 Jul. 2019
- FOGELQVIST J, VERKHOZINA AV, KATYSHEV AI, ET AL. Genetic and morphological evidence for introgression between three species of willows. *BMC Evolutionary Biology*, 15: 1–10, 2015.
- FREGONEZI, J. N., TURCHETTO, C., BONATTO, S. L., FREITAS, L. B. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 171: 140–153, 2013.
- GALETTO, L., BERNARDELLO, L. Nectar secretion pattern and removal effects in three species of Solanaceae. *Canadian Journal of Botany* 71: 1394–1398, 1993.
- GARDNER, A. G., FITZ GERALD, J.N., MENZ, J., SHEPHERD, K.A., HOWARTH, D.G., JABAILY, R.S. Characterizing floral symmetry in the core Goodeniaceae with geometric morphometrics. *PLoS One*, 11: e0154736, 2016.
- GERATS, T., VANDENBUSSCHE, M. A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends Plant Sci* 10: 251-256, 2005.
- GIRARDI-DEIRO, A. M., MOTA, A. F., GONÇALVES, J. O. N. Efeito do corte de plantas lenhosas sobre o estrato herbáceo da vegetação da Serra do Sudeste, RS, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 29: 1823-1832, 1994.
- GOGLER, J., STOKL, J., CORTIS, P., BEYRLE, H., LUMAGA, M.R.B., COZZOLINO, S., AYASSE, M. Increased divergence in floral morphology strongly reduces gene flow in sympatric sexually deceptive orchids with the same pollinator. *Evolutionary Ecology*, 29: 703-717, 2015.
- GÓMEZ, J. M., PERFECTTI, F., CAMACHO, J. P. M. Natural selection on *Erysimum mediohispanicum* flower shape: insights into the evolution of zygomorphy. *The American Naturalist* **168**: 531–545, 2006.
- GUADAGNIN, D. L., LAROCCA, J., SOBRAL, M. Flora vascular de interesse para a conservação na bacia do arroio João Dias: avaliação ecológica rápida. In: Ronchi LH & Lobato AOC (eds) Minas do Camaquã, um estudo multidisciplinar. UNISINOS, São Leopoldo, pp 71- 84, 2000.

- HEBERT, P.D.N., PENTON, E.H., BURNS, J.M., JANZEN, D.H. HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 14812–14817, 2004.
- HEINRICHS, J., HENTSCHEL, J., BOMBOSCH, A., FIEBIG, A., REISE, J., EDELMANN, M., ET AL. One species or at least eight? Delimitation and distribution of *Frullania tamarisci* (L.) Dumort. s. l. (Jungermanniopsida, Porellales) inferred from nuclear and chloroplast 50 DNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 1105–1114, 2010.
- HERMANN, K., KLAHRE, U., VENAIL, J., BRANDENBURG, A., KUHLEMEIER, C. The genetics of reproductive organ morphology in two *Petunia* species with contrasting pollination syndromes. *Planta* 241: 1241–1254, 2015.
- HOLZ, M. Do mar ao deserto- a evolução do Rio Grande do Sul no tempo geológico. 1ª edição. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 142 pp, 1999.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Mapa de Biomas. Disponível em: ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas_murais/biomas.pdf Acesso em: 10 Mai. 2019.
- IMBERT, E., WANG, H., CONCHOU, L., VINCENT, H., TALAVERA, M., SCHATZ, B. Positive effect of the yellow morph on female reproductive success in the flower colour polymorphic *Iris lutescens* (Iridaceae), a deceptive species. *Journal of Evolutionary Biology* 27: 1965-1974, 2014.
- IPPOLITO, A., FERNANDES, G. W., HOLTSFORD, T. P. Pollinator preferences for *Nicotiana alata*, *N. forgetiana*, and their F1 hybrids. *Evolution* 58: 2634–2644, 2004.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª edição. Artmed, São Paulo, 612 pp, 2009.
- JACOBI, C.M., CARMO, F.F., VINCENT, R.C., STEHMANN, J.R. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiversity and Conservation* 16: 2185 – 2200, 2007.
- KIM, S., RIESEBERG, L. H. Genetic architecture of species differences in annual sunflowers: implications for adaptive trait introgression. *Genetics*, 153, 965–77, 1999.

- KLAHRE, U., GURBA, A., HERMANN, K., SAXENHOFER, M., BOSSOLINI, E., GUERIN, P. M., KUHLEMEIER, C. Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic loci for floral scent production. *Current Biology* 21: 730–739, 2011.
- KLINGENBERG, C.P. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Review Genetics*, 11: 623–635, 2010.
- LIAO, W. J., ZHU, R. B., LI, Y. F., LI, X. M., ZENG Y. F., ZHANG, D. Y. A comparison of reproductive isolation between two closely related oak species in zones of recent and ancient secondary contact. *BMC Evolutionary Biology* 19:70. 2019.
- LORENZ-LEMKE, A. P., MADER, G., MUSCHNER, V. C., STEHMANN, J. R., BONATTO, S. L., SALZANO, F. M., FREITAS, L. B. 2006. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15: 4487-4497, 2006.
- MALLET, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol* 20: 229-237, 2005.
- MARTINSEN, G. D., WHITHAM, T. G., TUREK, R. J., KEIM, P. 2001. Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution*, 55, 1325–35, 2001.
- MAYR, E. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 797 pp, 1963.
- MCINTOSH, E. J, ROSSETTO, M., WESTON, P. H., WARDLE, G. M. Maintenance of strong morphological differentiation despite ongoing natural hybridization between sympatric species of *Lomatia* (Proteaceae). *Annals of Botany* 113: 861–872, 2014.
- MEDINA, B.M.O., RIBEIRO, K.T., SCARANO, F.R. Plant-plant and plant-topography interactions on a rock outcrop at high altitude in southeastern Brazil. *Biotropica* 38:27 – 34, 2006.
- MEIER, J. I., MARQUES, D. A., MWAIKO, S., WAGNER, C. E., EXCOFFIER, L., SEEHAUSEN, O. Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nature Communications* 8: 14363, 2016.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. Avaliação e Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília p 46, 2009.
- MOLLY SCHUMERA, M., POWELL, D. L., DELCLÓSC, P. J., SQUIREC, M., CUI, R.,

- ANDOLFATTOG, P. H., ROSENTHALC, G. G. Assortative mating and persistent reproductive isolation in hybrids. PNAS 114: 10936–10941.
- MUSCARELLA, R., FLEMING, T. H. The role of frugivorous bats in tropical forest succession. Biol. Rev. 82: 573-590, 2007.
- NERI, J., WENDT, T., PALMA-SILVA C. Natural hybridization and genetic and morphological variation between two epiphytic bromeliads. AoB Plants 10: plx061, 2018.
- NERI, J., WENDT, T., LELES, B., DOS SANTOS, M.F., PALMA-SILVA, C. Variation in reproductive systems facilitates species boundaries of sympatric *Vriesea* (Bromeliaceae). Botanical Journal of the Linnaean Society, 184: 272-279, 2017.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T., BUDKE, J.C., JARENKOW, J.A., EISENLOHR, P.V., NEVES, D.R.M. Delving into the variations in tree species composition and richness across South American subtropical Atlantic and Pampean forests. Journal of Plant Ecology, 8: 242-260, 2013.
- OLMSTEAD, R. Phylogeny and biogeography of Solanaceae, Verbenaceae, and Bignoniaceae: A comparison of continental and intercontinental diversification patterns. Bot. J. Linnean Soc. 171: 80-102, 2013.
- OLMSTEAD, R. G., BOHS, L. A summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. Pp. 255-268, in Spooner, D. M., Bohs, L., Giovannoni, J., Olmstead, R. G., & Shibata, D. (eds), Solanaceae VI: Genomics Meets Biodiversity. ISHA Section Root and Tuber Crops. Acta Hort. 745, 2007.
- OLMSTEAD, R. G., PALMER, J. D. A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: Subfamilial relationships and character evolution. Ann. Missouri Bot. Gard. 79: 346-360, 1992.
- OLMSTEAD, R. G., SWEERE, J. A., SPANGLER, R. E., BOHS, L., PALMER, J. D. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. Pp. 111-137, in Nee, M., Symon, D., Lester, R. N., & Jessop, J. P. (eds), Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization. Royal Botanic Gardens, Kew, 1999.
- OVERBECK, G. E., MÜLLER, S. C., FIDELIS, A., PFADENHAUER, J., PILLAR, V. D., BLANCO, C. C., BOLDRINI, I.I.; BOTH, R., FORNECK, E. D. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and

- Systematics, 9:101-116, 2007.
- OVERBECK, G. E., VELEZ-MARTIN, E., SCARANO, F. R., LEWINSOHN, T. M., FONSECA, C. R., MEYER, S. T., MÜLLER, C., *et al.* Conservation in Brazil needs to include non-forest ecosystems. *Diversity and Distributions* 21: 1455–1460. 2015.
- PAIM, P. S. G., CHEMALE, F., & LOPES, R. C. A Bacia do Camaquã. In: Holz M & Rios LF (eds) *Geologia do Rio Grande do Sul*. UFRGS, Porto Alegre pp 231-274, 2000.
- PAIM, P. S. G., LOPES, R. C. 2000. Geologia da região das Minas do Camaquã. In: Ronchi LH & Lobato AOC (eds) *As Minas do Camaquã*. São Leopoldo, Editora UNISINOS, 132pp, 2000.
- PALMA-SILVA, C., COZOLLINO, S., PAGI, G.M., LEXER, C., WENDT, T. Mating system variation and assortative mating of sympatric bromeliads (*Pitcairnia spp.*) endemic to neotropical inselbergs. *American Journal of Botany*, 102: 758-764, 2015.
- PAZ, A. L. G., ROMANOWSKI, H. P., MORAIS, A. B. B. Nymphalidae, Papilionidae e Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea) da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotropical* 8: 141-149, 2008.
- RAMBO, B. A fisionomia do Rio Grande do Sul. 3ed. Unisinos, São Leopoldo, 473 pp, 1956.
- RIESEBERG, L. H., SINERVO, B., LINDER, C. R., UNGERER, M. C., ARIAS, D. M. Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids. *Science* 272, 741–5, 1996.
- RIESEBERG, L. H. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359- 389, 1997.
- RIESEBERG, L.H., RAYMOND, O., ROSENTHAL, D. M., LAI, Z., LIVINGSTONE, K. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301: 1211-1216, 2003.
- RODRIGUES, D. M., CABALLERO-VILLALOBOS, L., TURCHETTO, C., JACQUES, R. A., KUHLEMEIER, C., FREITAS, L. B. Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? *AoB Plants* 10: ply057. 2018.
- SÄRKINEN, T., BOHS, L., OLMSTEAD, R. G., KNAPP, S. A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): A dated 1000-tip tree. *BMC Evol. Biol.* 13: 214. doi: 10.1187/1471-2148-13-214, 2013.

- SÄRKINEN, T., KOTTNER, S., STUPPY, W., AHMED, F., & KNAPP, S. A new commelinid monocot seed fossil from the early Eocene previously identified as Solanaceae. *American J. Bot.* 105: 95-107, 2018.
- SAVRIAMA, Y., GÓMEZ, J.M., PERFECTTI, F., KLINGENBERG, C.P. Geometric morphometrics of corolla shape: dissecting components of symmetric and asymmetric variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *New Phytol.*, 196: 945–54, 2012.
- SCOPECE, G., GRAVENDEEL, B., COZZOLINO, S. The effects of different chiral morphs on visitation rates and fruit set in the orchid *Spiranthes spiralis*. *Plant Ecology and Diversity*, 10: 97-104, 2017.
- SEGATTO, A. L. A., RAMOS-FREGONEZI, A. M. C., BONATTO, S. L., FREITAS, L. Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *Am J Bot* 10:119-127, 2014a.
- SEGATTO, A. L. A., CAZÉ, A. L. R., TURCHETTO, C., KLAHRE, U., KUHLEMEIER, C., BONATTO, S. L. FREITAS, L. B. Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Mol Phylogenet Evol* 70: 504–512, 2014b.
- SERVEDIO, M. R., NOOR, M. A. F. 2003. The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34: 339-364, 2003.
- SHEEHAN, H., MOSER, M., KLAHRE, U., ESFELD, K., DELL'OLIVO, A., MANDEL, T., METZGER, S., VANDENBUSSCHE, M., FREITAS, L., KUHLEMEIER, C. 2016. *MYB-FL* controls gain and loss of floral UV absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nature Genetics* 48: 159–166, 2016.
- SLICE, D.E. 2007. Geometric morphometrics. *Annu Rev Anthropol.* 36:261–81, 2007.
- SOLTIS, P. S, SOLTIS, D. E. The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review in Plant Biology* 60: 561–588, 2009.
- SOUZA, V.C., LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3ª edição.* Instituto Plantarum, Nova Odessa, 768 pp, 2012.
- STEHMANN, J. R. *Petunia exserta* (Solanaceae): A new species of Rio Grande do Sul, Brazil. *Napaea* 2: 19-21, 1987.

- STEHMANN, J. R., LORENZ-LEMKE, A. P., FREITAS, L. B., SEMIR, J. The genus *Petunia*. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Second edition. Springer, New York, pp 1- 28, 2009.
- SUERTEGARAY, D. M. A, & SILVA, L. A. P. Tchê Pampa: histórias da natureza gaúcha. In: Pillar VD, Muller SC, Castilhos ZMS & Jacques AVA (eds) *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. MMA, Brasília, 403 pp, 2009.
- TAYLOR, S. A., LARSON, E. L. Insights from genomes into the evolutionary importance and prevalence of hybridization in nature. *Nature Ecology & Evolution* 3: 170–177. 2019.
- TEIXEIRA, M. B., COURA-NETO, A. B., PASTORE, U., RANGEL-FILHO, A. L. R. Vegetação. In: *Levantamento de recursos naturais*. IBGE, Rio de Janeiro, pp 541-620, 1986.
- TU, T., VOLIS, S., DILLON, M. O., SUN, H., WEN, J. Dispersals of Hyoscyameae and Mandragoreae (Solanaceae) from the New World to Eurasia in the early Miocene and their biogeographic diversification within Eurasia. *Molec. Phyl. Evol.* 57: 1225-1237, 2010.
- TURCHETTO, C., FAGUNDES, N. J. R., SEGATTO, A. L. A., KUHLEMEIER, C., SOLÍS NEFFA, V. G, SPERANZA, P. R., BONATTO, S. L., FREITAS, L. B. Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology* 23: 374–389, 2014a.
- TURCHETTO, C., SEGATTO, A. L. A., TELLES, M. P. C., DINIZ-FILHO, J. A. F., FREITAS, L. B. Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: a comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16: 75–82, 2014b.
- TURCHETTO, C., LIMA, J. S., RODRIGUES, D. M., BONATTO, S. L., FREITAS, L. B. Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). *Annals of Botany* 115: 939–948, 2015a.

- TURCHETTO, C., SEGATTO, A. L. A., BEDUSCH, J., BONATTO, S. L., FREITAS, L. B. Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants* 7: plv084, 2015b.
- TURCHETTO, C., SEGATTO, A. L. A., SILVA-ARIAS, G. A., BEDUSCHI, J., KUHLEMEIER, C., BONATTO, S. L., FREITAS, L. B. Contact zones and their consequences: hybridization between two ecologically isolated wild *Petunia* species. *Botanical Journal of the Linnean Society*. *In press*. 2019.
- VAN DER NIET, T., ZOLLIKOFER, C. P. E., DE LEÓN, M. S. P., JOHNSON, S. D., LINDER, H. P. Three-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation. *Trends in Plant Science* 15: 423-426. 2010.
- VISCOSI V, CARDINI A. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PLoS One*, 6: 25630, 2011.
- WENDT, T., CANELA, M. B. F., KLEIN, D. E., RIOS, R. I. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Syst. Evol.* 232: 201–212. 2002.
- WIJSMAN, H. J. W., JONG, J. H. On the interrelationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in *Petunia* group. *Acta Botanica Neerlandica*, 34(3), 337-349, 1985.
- WILF, P., CARVALHO, M. R., GANDOLFO, M. A., CÚNEO, N. R. Eocene lantern fruits from Gondwanan Patagonia and the early origins of Solanaceae. *Science* 355: 71-75, 2017.
- YAKIMOWSKI, S. B., RIESEBERG, L. H. The role of homoploid hybridization in evolution: a century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany* 101:1247-1258, 2014.