

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

**ESTRUTURA GENÉTICA E DIVERSIFICAÇÃO DE PLANTAS NO PAMPA:
ESTUDOS DE CASO EM *PETUNIA* (SOLANACEAE)**

Caroline Turchetto

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

Orientadora: Dra. Loreta B. Freitas

Porto Alegre, Agosto de 2014



"Proteção à natureza, aos monumentos naturais, às espécies botânicas e zoológicas e harmonização das obras humanas com a paisagem natural..."

(Pe. Balduino Rambo - A Fisionomia do Rio Grande do Sul)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética – UFRGS. Os experimentos de sequenciamento e genotipagem foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, PUCRS, sob a coordenação do Dr. Sandro L. Bonatto. O projeto foi financiado com recursos do CNPq, CAPES-PROCAD, FAPERGS-PRONEX e PPGBM-UFRGS. A bolsa de doutorado foi concedida pelo CNPq (edital 70) e CAPES.

AGRADECIMENTOS

Todas às vezes, ao final do dia, antes de sair e fechar a porta, eu olhava para o laboratório e, naqueles poucos segundos, eu me lembrava de todo o esforço que eu fiz para poder chegar até ali. No mesmo instante, eu me sentia feliz e privilegiada com a lembrança do convívio dos que habitaram e ainda habitam o mundo do LEM e também a todas as pessoas especiais que Deus colocou ou que me colou em suas vidas. Para essas pessoas eu dedico meus agradecimentos especiais:

À minha orientadora **Loreta Brandão de Freitas** por ter me aceito em seu laboratório e por me instigar a aceitar todos os desafios. Por ter oferecido todas as condições para o bom desenvolvimento deste trabalho, e por me mostrar e advertir das limitações que eu encontraria na prática do trabalho, o que me fez crescer como profissional.

Aos **professores do Departamento de Genética** da UFRGS que contribuíram para formação do meu conhecimento ao longo destes 6 anos na Universidade.

Aos meus atuais colegas do Laboratório de Evolução Molecular pela amizade no dia-a-dia, auxílio nas coletas e atividades de laboratório, pelas discussões científicas e muitos outros assuntos que tornaram cada dia de trabalho muito agradável: **Ana Lúcia, Ana Luiza, Clênio, Geraldo, Maikel, Gustavo, Michel, Dani, Karina, Marcelo, Lauís, Giovana**. E a todos os alunos que passaram pelo LEM neste período com os quais eu pude crescer pessoal e profissionalmente. Preciso agradecer imensamente a querida e competente **Júlia Beduschi**, que pelo período de um ano trabalhou como iniciação científica comigo, deixo meu muito obrigada por toda ajuda que me deste nos experimentos. À **Ana Lúcia A. Segatto** que além de minha colega de laboratório é minha grande amiga que carregarei para todo o sempre. Obrigada pela amizade, paciência e ajuda durante todo esse período. Obrigada ao **Geraldo, Daniele, Gustavo e Jacqueline** que no último mês dedicaram seus tempos a me ajudar a finalizar os trabalhos. Preciso registrar aqui o como o LEM é uma excelente equipe de trabalho!!!

Agradeço com muito carinho ao **Elmo**, pela dedicação e eficiência com que faz seu trabalho. Pela recepção sempre cordial e pronta para ajudar.

Agradeço a **Fernanda Pedone Valdez**, pela eficiência com que realiza seu trabalho no sequenciamento e genotipagem na PUC/RS. Obrigada pela disposição sempre!

Agradeço ao professor **Sandro L. Bonatto** pelas discussões e ajuda na análise de dados.

A todos os meus **amigos** que de alguma forma tornam meu dia mais agradável em momentos difíceis. Que confortaram nos momentos de angústia e compreenderam minha ausência.

Ao **CNPQ** e **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado.

Agradeço aos meus pais **Vera e Alcides**, porque eles sempre me incentivaram, educaram e apoiaram, mesmo que às vezes o sacrifício fosse demasiado grande. Muito obrigada pai e mãe, tenho muito orgulho de tê-los como meus pais.

À minha irmã **Andreia Turchetto Zolet**, pois sei que sempre teremos uma a outra. Agradeço pelo amor e apoio durante toda minha caminhada. Por me fazer acreditar que era possível apesar das dificuldades. Ao meu cunhado **Renato Michelin Zolet** pelo incentivo e amizade sempre em todos os momentos. Obrigada a vocês dois que foram fundamentais para eu conseguir passar por todos os obstáculos.

Um agradecimento especial ao meu querido companheiro **Leo**, que além do conforto de seu amor e carinho, foi sempre compreensivo e me apoiou nas decisões que eu tomava no meu percurso profissional. Obrigada pela paciência e só posso dizer que é pra toda a vida!!

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

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	11
1.Região geográfica do Pampa e a Serra do Sudeste	11
2. Caracterização do grupo de estudo	13
3. Diversificação, Especiação, Hibridação e Fluxo Gênico.....	19
Objetivo Geral	25
Objetivos específicos	25
CAPÍTULO I – ARTIGO 1	29
CAPÍTULO II– ARTIGO 2.....	46
CAPÍTULO III– ARTIGO 3	55
CAPÍTULO IV– ARTIGO 4	88
CAPÍTULO V– ARTIGO 5	167
CAPÍTULO VI– ARTIGO 6.....	203
DISCUSSÃO GERAL, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	235
REFERÊNCIAS	241

RESUMO

O Pampa, localizado na porção sul do Neotrópico, é uma vasta região de terras baixas compostas principalmente por gramíneas, possivelmente constituindo a ecorregião menos estudada no sul da América do Sul. Constituído de uma paisagem heterogênea, o Pampa abriga uma rica biodiversidade com muitas espécies endêmicas. Entretanto, o conhecimento sobre o padrão de distribuição geográfica e evolução de plantas que ocorrem nessa área ainda é escasso. O objetivo do presente trabalho foi gerar dados moleculares e avaliar diferentes interações ecológicas nas espécies do gênero *Petunia* (Solanaceae), que ocorrem no Pampa, através do uso de marcadores moleculares (microsatélites nucleares e sequenciamento de regiões do cloroplasto), e morfológicos. Contribuindo assim, para o conhecimento dos processos de diversificação e especiação de plantas do Pampa, bem como da história evolutiva do gênero *Petunia*. Para isto foram conduzidos experimentos de caracterização da diversidade genética e morfológica em populações naturais cujos resultados foram avaliados com metodologias de análise filogeográfica, populacional e de fluxo gênico. Os resultados foram descritos em detalhes nos seis artigos científicos que compõem a Tese e podem ser assim resumidos. A rápida radiação dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* demonstra como a forte pressão seletiva para diferentes polinizadores, juntamente com adaptação a diferenças edáficas e climáticas, pode constituir o fator chave envolvido na diversificação de plantas nos Pampas. *Petunia axillaris* é um bom exemplo disso, pois as diferenças nos caracteres florais que discriminam taxonomicamente as três subespécies deste complexo são o resultado das adaptações a fatores ecológicos (diferenças de solo e polinizadores) e representam linhagens evolutivas e não meramente plasticidade fenotípica. Nós também encontramos que *P. axillaris* subsp. *axillaris* apresenta altos níveis de auto-polinização numa região simpátrica com *P. exserta*, e nós sugerimos que isto pode ser um mecanismo de prevenção contra formação de híbridos com esta espécie, visto que este mecanismo têm sido documentado nos últimos anos. Esses resultados estão de acordo com nossos achados de baixa incidência de híbridos nas zonas de contato entre essas duas espécies, onde possivelmente atuam mecanismos de isolamento reprodutivo bem como forte seleção que mantém os limites dessas espécies, como diferentes polinizadores e microhabitats específicos. Surpreendentemente, nós encontramos altos níveis de diversidade em *P.*

secreta, uma espécie irmã de *P. exserta* e *P. axillaris*, e que dentre as três é a que apresenta maior diferenciação genética. Em conclusão, nossos resultados mostram que essas três espécies de *Petunia* do Pampa apresentam acentuada diferenciação genética e que os processos de especiação realmente podem ser relacionados a adaptações ecológicas. Embora os mecanismos de isolamento reprodutivo não tenham sido conclusivos por completo, estratégias de isolamento reprodutivo podem ser encontradas nessas espécies e podem ser responsáveis pela sua manutenção como *taxa* independentes.

ABSTRACT

The Pampas, located in the southern portion of the Neotropic, is a wide region of lowlands with vegetation composed mainly of grasses, being possibly the ecoregion less studied in South America. It is constituted of a heterogeneous landscape and harbors a rich biodiversity with many endemic species. However, the knowledge about the geographic distribution and evolution of plants that occur in the Pampas region is still scarce. The objective of this work was to generate molecular data and evaluate the ecological interactions among species of the genus *Petunia* (Solanaceae) that occur on the Pampas using molecular markers (nuclear microsatellites and plastid sequences) and morphological traits. With this we intent to contribute to the knowledge of the Pampas plant diversification and speciation processes, as well as on the evolutionary history of the genus *Petunia*. Genetic and morphological variability were characterized in natural populations and the results were evaluated with methods including phylogeographic, population genetics, and gene flow approaches. Results were described in detail on six scientific articles that compose this thesis and can be summarized as follow. The rapid radiation of the genera *Petunia* and *Calibrachoa* demonstrate how strong selective pressure to different pollinators together with the adaptation to edaphic and climatic differences can constitute key factors in the diversification of plants in the Pampas. *Petunia axillaris* is a good example of this. The differences in floral characteristics that differentiate its three subspecies are adaptations to ecological factors (soil and pollinators differences) and represents evolutionary lineages and not merely phenotypic plasticity. We also found that *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* presents high levels of self-pollination in a sympatric region with *Petunia exserta* and we suggest this could be a mechanism to prevent hybridization, which has been documented in the last years. The results are in accordance with our findings of few hybrids individuals in the contact zones of *P. exserta* and *P. axillaris*, which probably act mechanisms of reproductive isolation and strong selection that keeps the limits of these species, as different pollinators and specific microhabitats. Surprisingly we found high levels of genetic diversity in *P. secreta*, a rare species sister to *P. exserta* and *P. axillaris*. Considering these three related species, *P. secreta* is genetically most differentiated. In conclusion, our results demonstrate that species of the *Petunia* from the Pampas show accentuate genetic differentiation and that the speciation processes could be related to ecological

adaptations. Even though the mechanisms of reproductive isolation were not completely conclusive, reproductive isolation strategies are found in these species and guarantee their maintenance as independent taxa.

INTRODUÇÃO

1.Região geográfica do Pampa e a Serra do Sudeste

A vegetação campestre do Sul do Brasil está incluída, segundo a classificação do IBGE (2004), no Pampa e na Mata Atlântica. Os campos de altitude da Mata Atlântica são encontrados na região do Planalto Sul-Brasileiro conhecida como Campos de Cima da Serra. Os campos subtropicais do Pampa podem ser encontrados nas regiões Depressão Central, Serra do Sudeste e Campanha, na metade sul do Rio Grande do Sul. Essas formações apresentam uma matriz formada por áreas extensas de campos, com inclusões florestais pelas margens dos rios (Boldrini, 2009).

O Pampa está localizado entre 30° e 34° de latitude sul e 57° e 63° longitude oeste, estendendo-se em regiões pastoris, em planícies das províncias argentinas de Buenos Aires, La Pampa, Santa Fé, Entre Rios e Corrientes e a República Oriental do Uruguai. Esta região possui uma grande diversidade geomorfológica, pois inclui várias unidades geradas em contextos tectônicos e paleogeográficos distintos (Paim *et al.*, 2000). Esta diversidade é representada por elementos magmáticos intrusivos (granitos) do Proterozóico médio, sedimentos Holocênicos do litoral, em uma faixa que inclui também rochas basálticas do Mesozóico, além de uma série de elementos sedimentares (IBGE, 1997a,b). É caracterizado pelo clima temperado, classificado como mesotérmico brando e superúmido, com frentes frias periódicas no inverno (junho-setembro), quando as temperaturas podem atingir 0°C. Os verões são quentes, tendo uma variação média de entre 22°C e mais de 34°C de temperatura entre dezembro e março. Precipitações anuais variam entre 1.250 e 1.500 mm, não se observando a configuração de uma estação seca definida (Suertegaray & Silva, 2009). As paisagens campestres do Pampa são naturalmente invadidas por contingentes arbóreos representantes da Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual e da Floresta Ombrófila Densa, notadamente nas partes norte e leste. Essa mudança caracteriza um processo de substituição natural das estepes por formações florestais, em função da mudança climática de frio/seco para quente/úmido no atual período interglacial (IBGE, 2004).

A variação no substrato geológico e na altitude contribui para a diversidade de tipos vegetacionais da região do Pampa (Suertegaray & Silva, 2009). A fitofisionomia

do Pampa no Rio Grande do Sul é bastante heterogênea, sendo classificada como savana, que se caracteriza por apresentar um extrato herbáceo arbustivo, com árvores espalhadas ou agrupadas e por matas de galeria. Esta formação recobre relevos fortemente ondulados até montanhosos, solos pouco profundos e com afloramentos rochosos. A savana ocupa vasta distribuição geográfica no Planalto Sul-Rio-Grandense, razão pela qual faz limite com quase todos os tipos de vegetação existentes no Estado (Teixeira *et al.*, 1986). A origem dos campos nesse Bioma é incerta. Segundo Rambo (1956), o fator determinante seria o controle exercido pelo solo, sendo o clima geral propício ao desenvolvimento de florestas subtropicais. A natureza de mosaico do Pampa e suas conexões com outros biomas também se expressa na aparição de diversos elementos de distintas floras sul-americanas na sua composição (Grela, 2004).

Embora a região do Pampa já fosse dominada por campos quando da chegada dos seus primeiros habitantes (Behling, 2002), foi a partir de 1800 com a intensa colonização dessa região por colonos europeus que houve uma alteração mais significativa da composição vegetal da região, principalmente devida ao pastoreio e à implantação de cultivos agrícolas. Atualmente, a introdução de espécies exóticas e a implantação da indústria de florestamento representam ameaças consideráveis à biota do Pampa (Pillar, 2006).

A região fisiográfica da Serra do Sudeste, também conhecida como Escudo Sul-Rio-grandense (Fortes, 1959), ocupa uma área aproximada de 44.000 km² representando aproximadamente um quarto do Pampa no Rio Grande do Sul. Essa região, marcada pela presença das grandes torres de pedra (Figura 1J-K), é caracterizada por uma complexidade litológica, envolvendo as rochas mais antigas do Rio Grande do Sul, datadas do Pré-Cambriano (Holz, 1999). 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). Rambo (1956) comentou não ser possível fazer uma descrição minuciosa de todas as paisagens da Serra do Sudeste, muitas vezes destoando do resto do Pampa por apresentar uma vegetação savanóide (arbóreo-arbustiva) sobre solos rasos. A região tem relevo de ondulado a fortemente ondulado, com altitudes que variam de 150 a 500 m. Nessa região, como no resto do bioma Pampa, muitas áreas atualmente cobertas por vegetação campestre seriam ocupadas por subarbustos, arbustos e árvores de baixo porte, as quais aos poucos vão sendo cortados e queimados, ampliando as áreas utilizadas como pastagem (Girardi-Deiro *et al.*, 1994).

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

2. Caracterização do grupo de estudo

A família Solanaceae A.Juss., ordem Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl, Lamídeas (APG III, 2009), é composta por cerca de 3000 espécies e aproximadamente 150 gêneros. Possui distribuição cosmopolita concentrada na Região Neotropical, sendo que no Brasil são encontrados 30 gêneros e 450 espécies (Souza & Lorenzi, 2012). Olmstead & Palmer (1992) sugeriram que a diversificação inicial das Solanaceae seguiu o desmembramento e a separação do Gondwana, há aproximadamente 50 milhões de anos, e que a família teve um provável centro de origem na América do Sul.

A família Solanaceae é composta por espécies que podem ser ervas, arbustos, árvores, trepadeiras ou epífitas, geralmente caracterizadas por flores actinomorfas com cinco estames, cinco pétalas e cinco sépalas concrecidas. Muitos membros desta família são venenosos devido à presença de alcaloides, outros são fontes de drogas farmacêuticas ou narcóticas como, por exemplo, *Nicotiana* (tabaco), *Atropa* (beladona) e *Datura* (estramônio). A família Solanaceae também abriga diversas espécies usadas na alimentação humana, especialmente os gêneros *Solanum* (tomate, batata, etc.) e *Capiscum* (pimenta), além de incluir diversas espécies de interesse ornamental em gêneros como *Browallia*, *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Salpiglossis*, *Solandra* e *Petunia* (Judd *et al.*, 2009).

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

O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) apresenta 14 espécies que ocorrem somente no sul da América do Sul, sendo que a maioria delas é encontrada no sul e sudeste do

Brasil (Stehmann *et al.*, 2009). Algumas espécies do gênero são endêmicas de áreas muito restritas e associadas a regiões fitoecológicas específicas (por exemplo, *Petunia exserta* Stehmann e *Petunia secreta* Stehmann & Semir), enquanto outras apresentam uma ampla distribuição geográfica, como exemplo *Petunia axillaris* (Lam) Britton, Sterns and Poggenb e *Petunia integrifolia* (Hook.) (Stehmann, 1999).

O gênero *Petunia* é conhecido mundialmente através das petúnias-de-jardim, um híbrido produzido artificialmente por volta de 1820 e 1830 pelo cruzamento entre as espécies nativas *P. axillaris* e *P. integrifolia* (Sink, 1975), posteriormente inferido *P. interior* T.Ando & G.Hashim como parental roxo (Segatto *et al.*, 2014a). Esses híbridos artificiais, nomeados de *Petunia x hybrida* (Hook) Vilm. (hoje comumente conhecida como *Petunia hybrida*), tem uma longa história de cruzamentos e são mundialmente utilizados como plantas ornamentais. Além do uso ornamental, *Petunia hybrida* apresenta características que favorecem seu uso como um sistema modelo para pesquisas científicas, como a facilidade de cultivo, relativamente curto ciclo de vida, fácil propagação assexuada, flores grandes e folhas que permitem estudos citogenéticos e bioquímicos, produção abundante de frutos e sementes, alta eficiência da transformação genética e avaliação de mutantes (Gerats & Vandenbussche, 2005). *Petunia hybrida* também tem sido utilizada para investigar a arquitetura genética das diferentes síndromes de polinização encontradas dentro das espécies do gênero (Stuurman *et al.*, 2004). Mapas genéticos para *Petunia hybrida* foram construídos baseados em marcadores morfológicos (Gerats *et al.*, 1993; Strommer *et al.*, 2009), marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Strommer *et al.*, 2000) e AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Strommer *et al.*, 2002; Stuurman *et al.*, 2004). Mais recentemente, marcadores microssatélites derivados de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) foram desenvolvidos e mapeados (Bossolini *et al.*, 2011), fornecendo uma boa ferramenta para estudos de diversidade genética e dos processos de especiação no gênero.

Trabalhos prévios demonstram, em condições experimentais, que as espécies de *Petunia* preservam sua capacidade de inter cruzar (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2001), mas apesar da falta de barreiras intrínsecas ao cruzamento nestas espécies (Dell'Olivio *et al.*, 2011), a incidência de hibridação é rara na natureza, com um caso descrito para *P. axillaris* e *P. exserta* sendo menos pronunciada (Segatto *et al.*, 2014b) que previamente descrito (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006;). Os principais mecanismos de isolamento reprodutivo que tem sido sugerido para o gênero são ecológicos (segregação

floral e de habitat) e geográficos. As espécies de *Petunia* florescem geralmente no mesmo período, não havendo isolamento sazonal (Stehmann *et al.*, 2009). A síndrome floral mais comum e provavelmente ancestral no gênero *Petunia* é a melitofilia (conjunto de caracteres florais adaptados à polinização por abelhas), enquanto a ornitofilia (polinização por pássaros) e a esfingofilia (polinização por mariposas) são consideradas síndromes derivadas (Stehmann *et al.*, 2009; Reck-Kortmann *et al.*, in press). Em geral as espécies melitófilas são auto-incompatíveis (Tsukamoto *et al.*, 1998), sendo a polinização preferencialmente realizada por abelhas especializadas, num provável processo de co-evolução, uma etapa fundamental para sua manutenção (Stehmann *et al.*, 2009). *Petunia exserta*, *P. secreta* e algumas linhagens de *P. axillaris*, entretanto, são autocompatíveis (Tsukamoto *et al.*, 2003; Kokubun *et al.*, 2006; Stehmann *et al.*, 2009). Todas as espécies do gênero apresentam frutos capsulares, secos quando maduros, que produzem uma grande quantidade de sementes pequenas, as quais se depositam no solo próximo à planta mãe (autocoria), não havendo um sistema especializado de dispersão a longas distâncias, apesar de o vento pode auxiliar no processo de dispersão (van der Puij, 1982; Stehmann *et al.*, 2009).

Baseado em estudo com dados de plastídios, as espécies de *Petunia* formam dois clados principais, um composto por espécies que crescem em altitudes superiores a 500 m (Campos de Cima da Serra) e outro composto por espécies que ocorrem a menos de 500 m (Pampa) (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010). As espécies de *Petunia* são distribuídas em dois principais centros de diversidade localizados no sul do Brasil: os campos altitudinais da borda oriental do planalto das Araucárias em Santa Catarina e os afloramentos rochosos areníticos da Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul (Stehmann *et al.*, 2009). Vários estudos com o gênero *Petunia* têm incluído dados moleculares com o objetivo de compreender os processos envolvidos na evolução deste gênero (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Longo *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2014a; Segatto *et al.*, 2014b; Turchetto *et al.*, 2014). A maioria desses estudos foi baseada principalmente em dados de genoma de cloroplasto mostrando um padrão geral de pouca diferenciação genética entre as espécies, indicando uma diversificação recente para gênero. Olmstead *et al.* (2008), considerando a estrutura filogenética dos gêneros da tribo Petunieae e sua distribuição geográfica, sugeriu que os gêneros desta tribo teriam tido antepassados de origem Andina. Para as espécies do gênero *Petunia* que ocorrem em campos de altitude (clado de terras altas), todas com

flores de coloração rosa e polinizadas por abelhas, foi sugerido como principal processo de diversificação o isolamento geográfico (especiação alopátrica) como um resultado da expansão do ancestral do grupo durante os períodos glaciais, seguido pela fragmentação e isolamento dentro de ilhas de altitude formadas pela expansão da mata de araucária nos períodos interglaciais (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

A história evolutiva do gênero *Petunia* também pode estar relacionada à diversidade de seus polinizadores (Watanabe *et al.*, 1996; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Hoballah *et al.*, 2007; Gübitz *et al.*, 2009). Todas as espécies do clado de terras altas são melitófilas, enquanto que na região do Pampa, podemos encontrar três síndromes de polinização no gênero, algumas vezes em simpatria.

As espécies *Petunia exserta*, *Petunia axillaris* e *Petunia secreta* estão entre as espécies que ocorrem no centro de diversidade do gênero na Serra do Sudeste. *Petunia axillaris* é uma das espécies parentais da petúnia-de-jardim, possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil, Uruguai, Argentina e Bolívia (Ando, 1996). No Brasil, esta espécie é encontrada apenas na metade sul do Rio Grande do Sul, na região do Pampa, em afloramentos rochosos e locais alterados como beiras de estrada. O complexo *Petunia axillaris* é composto por três subespécies que ocupam territórios adjacentes (*P. axillaris* subsp. *axillaris*, *P. axillaris* subsp. *parodii* (Steere) Cabrera. e *P. axillaris* subsp. *subandina* Ando) que são tradicionalmente delimitadas com base em sua distribuição geográfica e detalhes da morfologia floral (Ando, 1996; Kokubun *et al.*, 2006). Turchetto *et al.* (2014) mostram que as subespécies compartilham variabilidade genética baseada em marcadores de cloroplasto, mas apresentam uma maior diferenciação genética se a avaliação for baseada em marcadores CAPS. Apenas *P. axillaris* subsp. *axillaris* ocorre na região das Guaritas na Serra do Sudeste onde ocorre também *P. exserta*. A espécie *Petunia secreta* é morfologicamente similar a *P. axillaris* subsp. *axillaris* distinguível apenas pela coloração da flor. Esta espécie é rara na natureza e desde sua descrição poucos indivíduos têm sido encontrados. *Petunia exserta* e *P. secreta* ocorrem em afloramentos rochosos de origem sedimentar (conglomerados) e em áreas extremamente restritas da Serra do Sudeste (Figura 1J-K). *Petunia exserta* habita reentrâncias rochosas sombreadas da formação Guaritas, enquanto *P. secreta* pode ser encontrada em afloramentos rochosos expostos ao sol da formação Pedra do Segredo, ambas localizadas no município de Caçapava do Sul (Stehmann, 1999; Stehmann *et al.*, 2009).

As principais diferenças entre as três espécies, além da distribuição, restringem-se a adaptações para diferentes polinizadores, sendo as flores de *P. axillaris* brancas e fragrantas ao entardecer (esfingófilas) (Sink, 1984; Stehmann, 1999; Venail *et al.*, 2010; Hermann & Kuhlemeier, 2011). Já as flores de *P. exserta* possuem uma série de características adaptadas à ornitofilia, como a corola vermelha com bordo do limbo reflexo e anteras e estilete fortemente exsertos e não emitem perfume (Stehmann, 1987; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). *Petunia secreta* tem flores rosadas e não fragrantas e são visitadas por pequenas abelhas (Halictidae, *Pseudagapostemon* Schrottky) (Stehmann & Semir, 2005) (Figura 1).

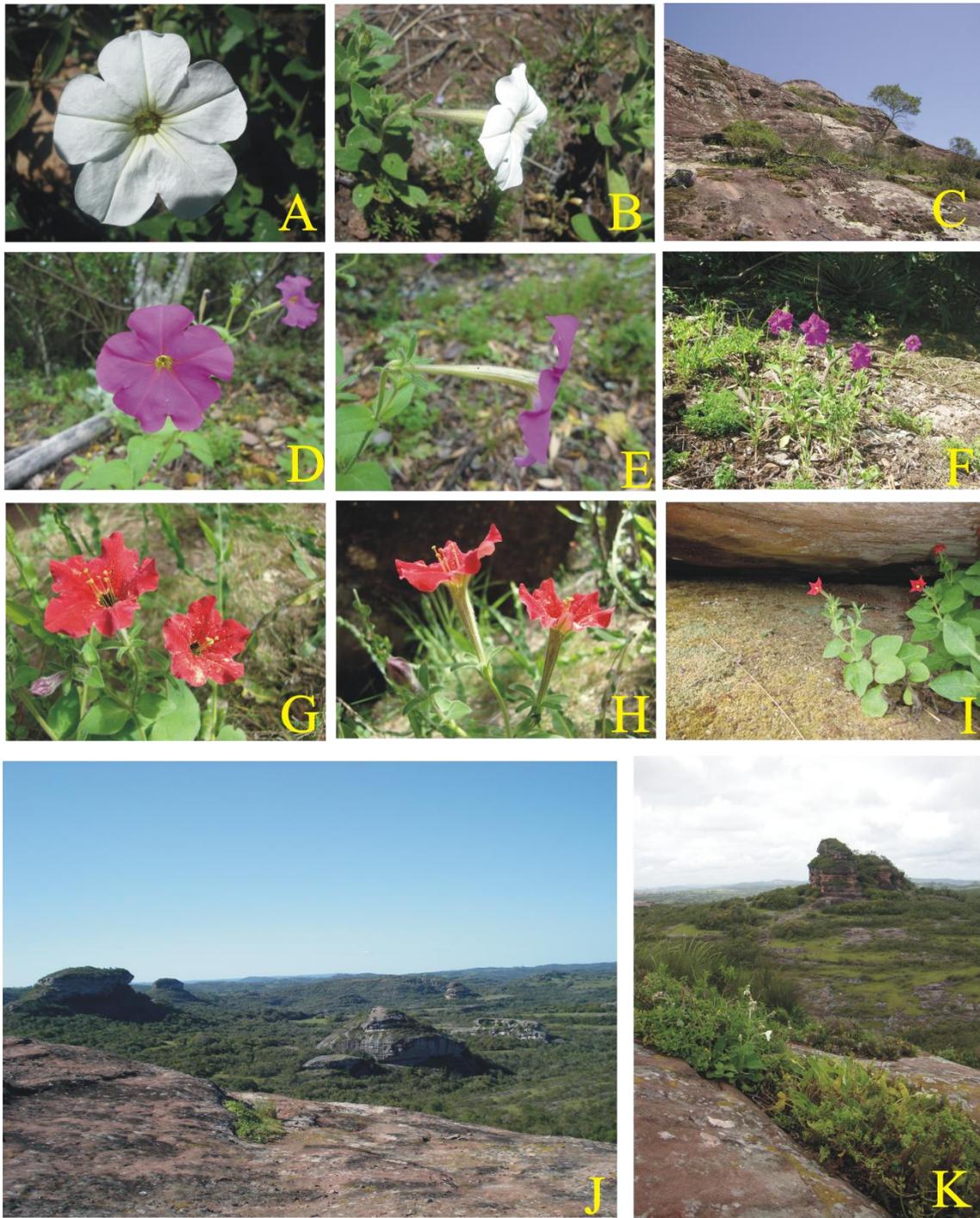


Figura 1: Morfologia típica e habitat de cada espécie estudada: (A – C) *Petunia axillaris* subsp. *axillaris*; a imagem C representa uma mancha de vegetação no topo de uma torre onde esta espécie ocorre; (D - F) *Petunia secreta*, note a semelhança morfológica desta espécie com *P. axillaris* subsp. *axillaris*; (F - H). *Petunia exserta*, em H uma caverna em uma torre onde esta espécie cresce; e (J e K) visão geral das Guaritas na Serra do Sudeste mostrando as torres areníticas.

Os baixos níveis de variabilidade genética interespecífica encontrados para diversos marcadores moleculares (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010) para o gênero

Petunia em geral e para as espécies da Serra do Sudeste em particular, indicam que a separação entre *P. axillaris*, *P. exserta* e *P. secreta* é extremamente recente. Mudanças de habitat e alterações de características florais são alguns dos fatores provavelmente envolvidos no isolamento reprodutivo entre essas espécies. Apesar disso, Lorenz-Lemke *et al.* (2006) encontraram plantas com características morfológicas intermediárias entre *P. axillaris* e *P. exserta*. Os marcadores plastidiais (espaçadores intergênicos *psbB-psbH*, *trnH-psbA* e *trnS-trnG*) analisados por estes autores revelaram um padrão espacial de ocorrência no qual praticamente todas as plantas presentes na mesma torre, independentemente do fenótipo, apresentavam o mesmo haplótipo. Os autores concluíram que a integridade genética de *P. exserta* estava ameaçada pela introgressão de material genético de *P. axillaris*. Segatto *et al.* (2014b) analisaram 39 populações de *P. exserta* e 77 populações de *P. axillaris*, cobrindo toda a distribuição desta, com os mesmos marcadores de cloroplasto e adicionando os marcadores CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*). Os autores concluíram que hibridização pode ocorrer em algumas populações ou em diferentes anos, mas outros fatores podem estar envolvidos na variação da cor das flores encontradas e que sugeririam hibridação. Além do mais, o compartilhamento de haplótipos pode ser explicado por retenção de polimorfismo ancestral, uma vez que se detecta recente divergência entre elas.

A filogenia mais recentemente obtida para o gênero mostra a proximidade evolutiva dessas três espécies da Serra do Sudeste (Reck-Kortmann 2014, in press). A utilização de marcadores microssatélites nucleares, bem como a análise de caracteres morfológicos, poderá contribuir para a compreensão dos processos evolutivos envolvidos nos cenários de especiação entre essas espécies.

3. Diversificação, Especiação, Hibridação e Fluxo Gênico

As espécies são muitas vezes vistas como entidades coesas, grupos de populações ligadas por fluxo de genes e reprodutivamente isolados de outros grupos (Mayr, 1963). As espécies também podem ser definidas como diagnosticamente distintas (Nixon & Wheeler, 1990) ou grupos exclusivos (Baum & Shaw, 1995) de indivíduos. Na verdade, a coesão, diagnosticidade e exclusividade são propriedades de genes individuais ou regiões genômicas e não de organismos inteiros (Barton & Hewitt, 1985; Harrison, 1990; Wu, 2001; Nosil *et al.*, 2009; Larson *et al.*, 2014). Devido à variedade independente e recombinação, cada região genômica pode ter uma história

evolutiva única, e os limites entre as espécies poderão ser semipermeáveis, de acordo com a região do genoma avaliada. Diante do fluxo gênico em curso, algumas regiões do genoma podem tornar-se (ou permanecer) fortemente diferenciadas, especialmente se estas regiões contiverem genes que contribuam para o isolamento reprodutivo ou adaptação local (Larson *et al.*, 2014).

A compreensão de o que são espécies, sua origem e diversificação, pode estar em grande parte, ligada ao conhecimento detalhado dos fatores naturais e genéticos que limitam o fluxo gênico entre elas (Abbott *et al.*, 2008), levando ao isolamento reprodutivo. Nas plantas, o esquema mais clássico para descrever a origem do isolamento reprodutivo é se o fluxo gênico é impedido antes (pré-zigótico) ou após a formação do zigoto híbrido (pós-zigótico) (Grant, 1981; Snow, 1994; Tiffin *et al.*, 2001). O tempo e o modo de especiação podem ser fortemente influenciados pela natureza dessas barreiras de isolamento reprodutivo (Cozzolino & Scopece, 2008). Em plantas, podemos citar como barreiras pré-zigóticas: o isolamento temporal (floração em épocas diferentes ou períodos diferentes do dia); o isolamento de hábitat; o isolamento floral (atração de polinizadores diferentes ou diferenças morfológicas que impeçam a polinização por um mesmo polinizador); o sistema reprodutivo (autopolinização, agamospermia). E como exemplo de barreiras pós-zigóticas temos: a incompatibilidade da semente; a inviabilidade do híbrido; o isolamento floral do híbrido (ausência de polinizadores efetivos); a esterilidade do híbrido; e o colapso do híbrido (a primeira geração pode ser viável e fértil, mas as gerações seguintes ou indivíduos provindos de retrocruzamento podem ser inviáveis ou estéreis) (Judd *et al.*, 2009).

O tipo de isolamento reprodutivo predominante em estágios iniciais de divergência das espécies pode afetar a natureza e a velocidade da emergência de barreiras reprodutivas adicionais que, posteriormente, reforçam o isolamento entre as espécies (Cozzolino & Scopece, 2008). Muitos estudos citam o isolamento pré-zigótico como sendo o mais importante, ou a barreira inicial ao fluxo gênico e, assim, potencialmente mais importante nos processos de especiação (Lowry *et al.*, 2008; Moyle *et al.*, 2014). Esta visão decorre do fato de muitas espécies vegetais apresentarem substancial isolamento pré-zigótico (por exemplo, diferentes polinizadores), mas nenhum isolamento pós-zigótico conhecido (Kay, 2006; Cozzolino & Scopece, 2008). O isolamento pré-zigótico pode, por sua própria natureza, contribuir mais para a barreira total ao fluxo gênico que o isolamento pós-zigótico pode em qualquer fase do processo de especiação. Isso simplesmente porque, nesse caso, um organismo deve cruzar fora da

sua própria população antes de produzir descendência híbrida estéril ou inviável (Sobel *et al.*, 2010). No entanto, essa visão não leva em conta corretamente o isolamento pós-zigótico extrínseco devido ao diferencial adaptativo, que às vezes pode ser o primeiro passo para a especiação (Cozzolino & Scopece, 2008; Schluter, 2009). Uma combinação de mecanismos de isolamento pode atuar em conjunto ou um deles reforçar o outro. Como o isolamento pós-zigótico tem um alto custo biológico, muitas vezes, mecanismos pré-zigóticos podem se tornar mais intensos, através de um fenômeno conhecido como reforço. Isso ocorre pela evolução de cruzamentos preferenciais prevenindo o desperdício de gametas (Mallet, 2005).

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

Fenótipos distintos podem ser aparentes, mas sua arquitetura genética subjacente pode variar, sugerindo que a seleção produz mudanças rápidas no isolamento, em algumas circunstâncias, mas não em outras. A compreensão das contribuições dos diferentes componentes que direcionam o isolamento reprodutivo ainda deixa em aberto questões cruciais sobre a ordem de sua aparição (Butlin *et al.*, 2008; Nosil *et al.*, 2009): quais barreiras aparecem pela primeira vez e dão início ao processo de especiação? Que barreiras são mais propensas a concluir o processo de especiação? E ainda, pode ocorrer decadência das barreiras quando as condições mudam (como exemplificado por Taylor *et al.*, 2006)? Estas questões são abordadas em diferentes pares de populações e contribuem para a compreensão de que barreiras surgem primeiro quando o isolamento ainda é baixo e quais as últimas barreiras que surgem quando o isolamento já é quase completo.

A deriva genética também pode dar importantes contribuições para os processos de especiação (Lynch, 2007). A deriva pode iniciar o processo de especiação, fornecendo a divergência inicial em que a seleção atua posteriormente e essa interação

pode contribuir para a evolução do isolamento reprodutivo, mesmo na presença de considerável fluxo gênico (Uyeda *et al.*, 2009; Tazzyman & Iwasa, 2010). Além disso, a deriva também pode atuar durante o reforço, proporcionando o desequilíbrio de ligação inicial entre características (Servedio & Noor, 2003), bem como pode contribuir para radiações adaptativas, quando, por exemplo, a especiação por seleção divergente é iniciada por eventos fundadores (Rice & Hostert, 1993). Portanto, as interações deriva-seleção podem juntas direcionar o isolamento reprodutivo e conseqüentemente a diversificação de espécies.

Segundo Butlin *et al.* (2012) a divergência é mais difícil de prever quando as populações experimentam regimes de seleção idênticos, mas em tais casos, existe também um papel para a deriva. Incompatibilidade híbrida de Dobzhansky-Muller pode acontecer quando as populações derivam para diferentes aptidões sob seleção estabilizadora (Fierst & Hansen, 2010) e tal disfunção híbrida pode ser iniciada por alterações genéticas neutras ou quase neutras (Presgraves, 2010). No entanto, estas alterações podem ser o resultado da estocasticidade de mutação, em vez de deriva por si só. O papel da deriva ao longo do processo de especiação é claramente influenciado pela extensão do fluxo gênico entre populações divergindo, por exemplo, sendo muito baixo durante uma fase alopátrica e maior num seguinte contato secundário. Para podermos compreender o impacto potencial de deriva é necessário determinar a quantidade de fluxo gênico durante a divergência, o que é um problema difícil. Alguns métodos tem sido implementados para inferir histórias da população (Marko & Hart, 2011), como Computação Bayesiana Aproximada (ABC) (Barraclough, 2010), os testes com base nas indicações de efeitos alélicos (Orr, 1998), e extensão da abordagem comparativa Q_{st} / F_{st} (Leinonen *et al.*, 2008).

Desde a criação da teoria por Darwin, a seleção natural tem sido sugerida como uma força que direciona a especiação. Seleção divergente ou disruptiva decorrente da heterogeneidade de habitat recentemente tem sido destacada como uma força dominante direcionando a divergência de populações, e esta hipótese é suportada por diversos exemplos de ‘especiação ecológica’ (Schluter, 2009). As assinaturas de especiação podem mudar ao longo do tempo evolutivo, visto que os processos posteriores podem mascarar os passos iniciais do processo. Podemos citar como exemplo disso a seleção sexual que poderia estar envolvida no início do surgimento de isolamento reprodutivo, mas não na manutenção da coexistência, o que requer a ação da seleção natural (Sobel, 2010).

Hibridação é um evento muito importante na história de espécies de plantas, ocorrendo em aproximadamente 25% das espécies. Em animais, esse fenômeno é avaliado como menos frequente, sendo que aproximadamente 10% das espécies estariam envolvidas em eventos de hibridação e possível introgressão (Mallet, 2005). Zonas híbridas oferecem uma oportunidade única para identificar o papel de genes individuais em isolamento reprodutivo.

Dentre outras consequências, a hibridação pode ser uma fonte de diversidade genética, permitindo a introdução de alguns traços seletivamente favoráveis a partir de espécies relacionadas e contribuindo para o êxito da nova linhagem sem mistura geral de genomas parentais. Os alelos que são vantajosos de ambas as espécies parentais poderão ser facilmente trocados através de hibridização, enquanto regiões genômicas que contribuem para as barreiras entre espécies terão baixo fluxo gênico e clinas caracteristicamente íngremes (Barton & Hewitt, 1985; Harrison, 1990; Payseur, 2010; Larson *et al.*, 2014). Um bom exemplo disso foi descrito para borboletas do gênero *Heliconius* (Salazar *et al.*, 2010). Evidentemente, são necessários outros processos que não a hibridação para completar a especiação em qualquer cenário; portanto, hibridação deve ser vista como um contribuinte para a origem do isolamento reprodutivo, em vez de causa única da especiação.

Uma área central de estudos da biologia evolutiva tem sido a notável diversidade de padrões de cruzamento e os sistemas sexuais de plantas com flores. Essa notável diversidade de sistemas de cruzamentos em plantas oferece oportunidades únicas para explorar a dinâmica dos processos evolutivos. Essa área de pesquisa cresceu consideravelmente ao longo da última década (por exemplo, Kalisz *et al.*, 2004; Delph & Wolf, 2005; Goodwillie *et al.*, 2005; Harder & Barrett, 2006; Barrett, 2010; Eckert *et al.*, 2010; Bodbyl-Roels & Kelly, 2011).

Diversos fatores genéticos e ecológicos interferem no sistema reprodutivo de uma espécie. Dentre eles, podemos citar: o sistema sexual (monoícia, dioícia ou hermafroditismo) e a presença de auto-incompatibilidade (Murawski & Hamrick, 1991; Lee, 2000); o tamanho e a densidade populacional; a estrutura espacial, relativa ao modo de distribuição dos indivíduos em florescimento; a fenologia do florescimento, relacionada a variações entre os períodos de floração das plantas (Boshier *et al.*, 1995); o modo de polinização e o comportamento dos polinizadores (Franseschinelli & Bawa, 2000). A estrutura do sistema de cruzamento modela o efeito da endogamia em diferenciação genética entre as populações.

O termo fluxo gênico é utilizado para todos os mecanismos que resultam em movimentos de genes dentro de uma população e de uma população para outra (Slatkin, 1987). Dessa forma, enquanto os efeitos da seleção natural, mutação e deriva genética levam a diferenciação dentro e entre populações, o fluxo gênico atua no sentido contrário, homogeneizando a variação genética espacial dentro e entre populações, além de poder induzir nova variação (Wright, 1949; Hamrick *et al.*, 1993). Portanto, o conhecimento sobre a dinâmica do fluxo gênico é essencial na compreensão do potencial evolutivo da espécie.

Em espécies vegetais o fluxo gênico é realizado de duas maneiras, pelo movimento do pólen e por meio da dispersão das sementes. Uma vez que o fluxo gênico via pólen e via semente são eventos independentes, espécies de plantas com dispersão de pólen efetiva de longo alcance, porém, com dispersão de semente localizada, podem ter menos variação genética entre populações geograficamente separadas, o que desencadeia a ocorrência de grupos de indivíduos aparentados (Nason & Hamrick, 1997). O reconhecimento e quantificação dessas maneiras de dispersão gênica são fundamentais para se compreender a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações de plantas (Levin, 1981; Hardy *et al.*, 2006).

Os padrões de biodiversidade vistos hoje são o resultado da interação de especiação, as mudanças de faixa de alcance das espécies e extinção. Entre estes, a especiação é o único processo que gera 'nova' diversidade. Uma boa compreensão dos mecanismos de especiação é de importância óbvia para a compreensão da dinâmica e dos padrões de biodiversidade atuais.

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi gerar dados moleculares e avaliar diferentes interações ecológicas nas espécies do gênero *Petunia* (Solanaceae), que ocorrem no Pampa, através do uso de marcadores moleculares (microsatélites nucleares e sequenciamento de regiões do cloroplasto), e morfológicos. Contribuindo assim, para o conhecimento inicial dos processos de diversificação e especiação de plantas no Pampa, bem como história evolutiva do gênero *Petunia*.

Objetivos específicos

- a) Avaliar os padrões filogeográficos encontrados nos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* com o objetivo de discutir os principais processos que podem estar envolvidos no processo de diversificação nas espécies que ocorrem no Pampa.
- b) Avaliar os padrões genéticos, morfológicos e ecológicos que envolvem a classificação taxonômica do complexo *Petunia axillaris*.
- c) Caracterizar a variabilidade de marcadores microsatélites derivados de ESTs (Expressed Sequence Tags) de *Petunia* em populações naturais do complexo *Petunia axillaris* e *Petunia exserta*.
- d) Analisar dados morfológicos e genéticos, através do uso de marcadores moleculares microstélites, em zonas de contato entre *Petunia exserta* e *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* na Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul. O objetivo foi tentar determinar se indivíduos morfológicamente atípicos constituem híbridos interespecíficos e se há fluxo gênico ou se existe algum mecanismo de fluxo gênico nas zonas de contato.
- e) Estimar a distância de dispersão de pólen e estrutura de cruzamentos em *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* na região da Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul, através do uso de marcadores microsatélites.
- f) Quantificar os parâmetros de variabilidade genética em *Petunia secreta* e comparar essa diversidade genética com a de outras espécies congêneres.

Estrutura e Organização da Tese

Esta tese foi dividida em capítulos para descrever cada conjunto de experimentos que levaram ao alcance dos objetivos propostos e foram assim distribuídos:

Capítulo 1:

“Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland”

Jeferson N. Fregonezi, Caroline Turchetto, Sandro L. Bonatto e Loreta B. Freitas

Este artigo já está publicado na revista *Botanical Journal of the Linnean Society* em primeira co-autoria compartilhada. Neste trabalho nós descrevemos os padrões filogeográficos encontrados em *Petunia* e *Calibrachoa* a fim de discutir os principais processos que direcionam a diversificação de plantas nessa região.

Capítulo 2:

“Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: A comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation.”

Caroline Turchetto, Ana L.A. Segatto, Mariana P.C. Telles, José A.F. Diniz-Filho e Loreta B. Freitas

Este artigo já está publicado na revista *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. Neste estudo nós avaliamos parâmetros morfológicos, genéticos e ecológicos para as três subespécies taxonomicamente reconhecidas de *Petunia axillaris*, com o objetivo investigar se a morfologia floral está relacionada à variação ambiental e se a correlação geográfica entre a morfologia floral e genótipos observada entre subespécies refletem condições ambientais ou meramente um processo de isolamento por distância.

Capítulo 3:

“Genetic differentiation revealed by EST-SSR markers in closely related wild *Petunia* species”.

Caroline Turchetto, Ana Lúcia A. Segatto, Julia Beduschi, Cris Kuhlemeier, Sandro L. Bonatto e Loreta B. Freitas

Este artigo foi aceito com revisões no periódico *Plant Systematic and Evolution*. O objetivo deste trabalho foi avaliar os polimorfismos em marcadores microssatélites gerados a partir de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) nas espécies nativas de *Petunia*: as três subespécies de *Petunia axillaris* e *Petunia exserta*.

Capítulo 4:

“Maintenance of species boundaries despite natural hybridization between sympatric species of *Petunia* provides insights on speciation process.”

Caroline Turchetto, Ana L. A. Segatto, Gustavo A. Silva-Arias, Julia Beduschi, Cris Kuhlemeier, Sandro L. Bonatto e Loreta B. Freitas

Este artigo está em preparação para ser submetido ao periódico *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Os objetivos deste estudo foram verificar a natureza de indivíduos com morfologia intermediária entre *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* e *Petunia exserta* encontrados nas zonas de contato entre essas duas espécies, e avaliar as forças evolutivas que poderiam ter levado à diferenciação das espécies na zona de contato.

Capítulo 5:

“Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa Grasslands *Petunia* species.”

Caroline Turchetto, Jacqueline S. Lima, Daniele M. Rodrigues, Sandro L. Bonatto³, Loreta B. Freitas

Este artigo está em preparação para ser submetido para a revista *Annals of Botany*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a distância de dispersão de pólen e a estrutura de cruzamento de *Petunia axillaris* subsp. *axillaris*.

Capítulo 6:

“Levels and patterns of genetic diversity in the endemic and rare *Petunia secreta* (Solanaceae) based on plastid polymorphisms and microsatellites.”

Caroline Turchetto, Ana Lúcia A. Segatto, Geraldo Mäder, Sandro L. Bonatto e Loreta B. Freitas

Este trabalho está em preparação para ser submetido para a revista *Conservation Genetics*. O objetivo deste trabalho foi quantificar a variabilidade genética em *Petunia secreta*, uma espécie rara e comparar essa diversidade com outras espécies congêneres.

A última parte da tese é composta por uma discussão geral dos resultados obtidos nos diferentes capítulos, sintetizando os principais achados em relação ao objetivo geral da tese, considerações finais e perspectivas.

CAPÍTULO I – ARTIGO 1

Artigo publicado na revista *Botanical Journal of the Linnean Society*

Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa*
(Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland

DISCUSSÃO GERAL, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Geralmente, o isolamento reprodutivo envolve múltiplas fases do ciclo de vida das plantas e, na maioria dos casos, uma variedade de barreiras reprodutivas contribui para o isolamento total (Ramsey *et al.*, 2003; Lowry *et al.*, 2008). O isolamento reprodutivo pode surgir como uma consequência da seleção natural sobre caracteres relacionados com o sucesso reprodutivo ou como uma consequência da divergência adaptativa das populações (Larson *et al.*, 2014).

O gênero *Petunia* é exclusivo do sul da América do Sul com espécies ocorrendo principalmente no sul e sudeste do Brasil (Stehmann *et al.*, 2009). Vários estudos, baseados principalmente em marcadores moleculares plastidiais, tentaram estabelecer o relacionamento filogenético das espécies do gênero (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010), e os resultados obtidos foram árvores com baixos suportes nos ramos. Apesar disto, dois clados bem suportados nas filogenias de cloroplasto são observados e podem ser associados com a altitude de ocorrência das espécies. Um deles é composto por espécies de campos de altitude, com elevações superiores a 500 m, correspondendo ao centro de divergência proposto por Stehmann *et al.* (2009) dos Campos de Cima da Serra; o outro é composto pelas espécies que ocorrem em campos de baixa altitude no Pampa, em elevações inferiores a 500 m, região que envolve o segundo centro de diversidade previamente proposto localizado na Serra do Sudeste.

Em relação à diversificação do grupo de terras altas, o principal cenário evolutivo sugerido foi especiação alopátrica como um resultado da expansão da espécie ancestral durante os períodos glaciais, seguido por fragmentação e isolamento dentro de ilhas de altitude, como um resultado da expansão e contração das áreas de florestas durante os períodos interglaciais (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

Na presente Tese, Capítulo 1, nós analisamos os processos de diversificação que podem ter direcionado a especiação do grupo de terras baixas, correspondendo ao Pampa. Nós comparamos estes processos com aqueles descritos para as terras altas, combinando as filogenias obtidas para os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*, gêneros muito próximos evolutivamente, que compartilham diversos caracteres morfológicos (Stehmann *et al.*, 2009). Nós sugerimos diferentes consequências para as mudanças climáticas ocorridas

durante o Pleistoceno na região do Pampa em comparação com as terras altas para ambos os gêneros. Nas terras baixas não houve fragmentação na distribuição das espécies em função de contração e expansão de florestas, como nos campos de altitude e os padrões de distribuição da variabilidade genética ao longo da distribuição geográfica das espécies sugerem que os processos de especiação possam ter sido direcionados por adaptação a microambientes, com fatores ecológicos e geomorfológicos contribuindo para a diversificação dessas espécies, reforçados pelo isolamento reprodutivo por adaptação a diferentes polinizadores.

Reck-Kortmann *et al.* (2014, in press) realizaram a reconstrução filogenética do gênero *Petunia* a partir de marcadores dos genomas nuclear e plastidial e incluíram todas as espécies do gênero, obtendo a mais completa filogenia até o momento. Além da comparação das relações evolutivas entre as espécies, estes autores fizeram uma reconstrução do provável ancestral do gênero considerando os principais aspectos que diferenciam as espécies (elevação da área de ocorrência, polinizadores e comprimento do tubo da corola). Nesta filogenia foram obtidos dois clados principais bem suportados que dividem as espécies em dois grupos: espécies com tubo da corola longo e espécies com tubo curto. Entre as espécies de tubo longo, um grupo de três espécies proximamente relacionadas apresenta três diferentes síndromes florais e corresponde às espécies que ocorrem na Serra do Sudeste. Em todas as filogenias já obtidas para *Petunia* estas três espécies são recuperadas como grupos irmão.

Na reconstrução da provável área ancestral do gênero *Petunia*, Reck-Kortmann *et al.* (2014, in press) sugeriram a região do Pampa, com elevações inferiores a 500, como a mais provável, tendo sido as terras altas colonizadas em dois eventos independentes. Este provável ancestral também teria tubo da corola curto e seria polinizado por abelhas, com as demais síndromes florais do gênero sendo derivadas, corroborando sugestões anteriores baseadas em dados morfológicos (Stehmann *et al.*, 2009).

Desta forma, o grupo de espécies de tubo longo, ocorrendo nas terras baixas do Pampa e mais especificamente em um dos centros de diversidade do gênero, evolutivamente relacionado e apresentando diferentes síndromes florais, constitui um modelo extremamente atrativo para o desenvolvimento de experimentos para testar hipóteses evolutivas que permitiram a diversificação destas plantas.

A principal diferença encontrada entre estas três espécies está relacionada com as características florais que permitem sua adaptação a diferentes polinizadores: *Petunia axillaris* tem flores brancas, fragrantas e são polinizadas por mariposas (Venail *et al.*, 2010); *P. exserta* tem flores vermelhas e não fragrantas, sendo polinizada por beija-flores (Sthemann *et al.*, 2009). Já *P. secreta* com suas flores rosas polinizadas por pequenas abelhas solitárias (Sthemann & Semir, 2005) constitui uma reversão ao estado ancestral de acordo com Reck-Kortmann *et al.* (2014, in press).

Para testar a hipótese de que a diversificação no Pampa pode estar relacionada a adaptações a microambientes, nós propusemos os experimentos descritos no Capítulo 2, onde escolhemos três subespécies de *P. axillaris* que apresentam grande diversidade ecológica e morfológica e baixa diversidade molecular (Turchetto *et al.*, 2014). Nós encontramos que as características florais tradicionalmente utilizadas para diferenciar as subespécies de *P. axillaris* são mesmo o resultado da adaptação a diferentes ambientes (condições ecológicas diversas, envolvendo composição do solo e variáveis de precipitação) e estão fortemente relacionadas a genes específicos (uma forte correlação com a composição alélica em genes relacionados ao desenvolvimento floral). É sabido que genes relacionados ao desenvolvimento floral em *Petunia* são responsáveis pela alteração na forma das flores (Segatto *et al.*, 2013) e influenciam fortemente a interação destas espécies com seus respectivos polinizadores (Venail, *et al.* 2010; Hermann & Kuhlemeier, 2011). Neste artigo também, nós sugerimos que estas subespécies possam representar um estágio incipiente de especiação.

A baixa variabilidade genética encontrada em todos os trabalhos envolvendo espécies de *Petunia*, tanto em relação a marcadores do DNA de cloroplasto (Ando *et al.*, 2005; Kulscheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; 2010; Longo *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2014b; Turchetto *et al.*, 2014a) quanto nucleares (Kulscheski *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Kriedt *et al.*, 2011; Longo *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2014b; Turchetto *et al.*, 2014a; Reck-Kortmann *et al.*, 2014, in press), que muitas vezes não permitem sequer a identificação das espécies, leva à busca por marcadores moleculares mais informativos. Bossolini *et al.* (2011) descreveram uma série de microssatélites obtidos a partir de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) cobrindo todos os cromossomos de *Petunia* os quais foram testados na amplificação de alguns poucos acessos de espécies nativas e em petúnias-de-jardim. No Capítulo 3 nós descrevemos os resultados obtidos testando estes marcadores em

populações silvestres das três subespécies de *P. axillaris* e de *P. exserta*, além de analisar a validade destes loci na identificação de eventos de hibridação interespecífica em indivíduos candidatos descritos por Lorenz-Lemke *et al.* (2006). Nós selecionamos 14 loci com grande potencial para caracterizar a variabilidade genética nestes *taxa* e oito deles foram mais informativos considerando alelos exclusivos às duas espécies e com maior potencial de identificar híbridos entre elas.

Ainda na mesma linha de pensamento do Capítulo 3, mas expandindo a análise para diferenças mais marcantes em relação à adaptação a síndromes de polinização diferentes, nós estudamos a subespécie *P. axillaris* subsp. *axillaris* e a espécie *P. exserta* que podem ser encontradas na região das Guaritas, Município de Caçapava do Sul, Serra do Sudeste (Rio Grande do Sul, Brasil). Estes dois *taxa* já foram estudados por nosso grupo (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto *et al.*, 2014a) e estes trabalhos relataram a possibilidade de hibridação interespecífica na zona de contato entre eles. Os dois estudos prévios foram baseados apenas em marcadores moleculares e envolveram extensas amostragens nas áreas de ocorrência de ambos, mais em uma abordagem filogeográfica e populacional, do que na busca por esclarecer os prováveis processos de hibridação, esta foi apenas uma consequência. Então, aqui, como descrito no Capítulo 4, nós utilizamos oito dos marcadores descritos no Capítulo 3 que foram mais informativos e que apresentaram o maior potencial para diferenciar estas duas espécies para caracterizar zonas de contato secundário entre *P. axillaris* subsp. *axillaris* e *P. exserta* e investigar a ocorrência de híbridos naturais entre elas, bem como descrever sua provável origem, numa tentativa de contribuir para o entendimento dos processos de especiação no grupo. Nós também incluímos uma detalhada análise da morfologia, baseada na medida de caracteres florais e caracterização da cor das flores. O resultado obtido foi surpreendente, visto que, embora muitos indivíduos apresentem características morfológicas sugestivas de hibridação, existe uma baixa incidência de híbridos nas zonas de contato quando marcadores diagnósticos e biparentais são incluídos na análise. Além disso, os indivíduos de *P. exserta* com morfologia típica da espécie representam duas linhagens evolutivas distintas e todos os indivíduos com a morfologia considerada como intermediária (cor da flor e tamanho dos caracteres florais) sugestiva da condição híbrida pertencem a apenas uma das linhagens. Os modelos de especiação testados neste trabalho sugeriram que um processo de especiação simpátrica pode estar se desenrolando na Serra do Sudeste, onde a hibridação

interespecífica tem ao menos um papel pequeno na geração da diversidade e que, novamente, forças seletivas relacionadas à adaptação a microambientes atuam na manutenção da integridade dos taxa, reforçadas pelos agentes polinizadores diferentes. Neste trabalho nós não pudemos descartar modos de reprodução diferentes e outras estratégias de manutenção dos limites entre as espécies.

Desta forma, os experimentos descritos no Capítulo 5 foram propostos, envolvendo inicialmente a espécie *P. axillaris* subsp. *axillaris*, em populações da região das Guaritas. Dentre as subespécies de *P. axillaris*, esta parece apresentar o sistema reprodutivo mais complexo, tendo sido descritas população autoincompatíveis, populações autocompatíveis e sistema misto (Ando *et al.*, 1998; Kokubun *et al.*, 2006). As populações descritas como de sistema misto foram obtidas na Serra do Sudeste, bem próximo à área das Guaritas e foram analisadas apenas em relação à formação de sementes após polinização manual usando pólen próprio ou não próprio. Assim, aqui nós propusemos avaliar uma grande população natural, da região das Guaritas onde esta espécie ocorre em simpatria com *P. exserta*. Com isto esperávamos obter resultados que nos permitissem entender os processos evolutivos descritos no capítulo 4 ou, pelo menos, esclarecer alguns pontos. A avaliação do sistema de cruzamento e dispersão de pólen para *P. axillaris* subsp. *axillaris* mostrou que esta espécie na região de simpatria com *P. exserta*, é preferencialmente auto-polinizada e quando apresenta polinização cruzada esta pode ser a longas distâncias. Embora não tenham sido resultados que nos permitam afirmar que mecanismos diversificadores estão agindo na Serra do Sudeste nestas plantas, estas análises reforçam a hipótese sugerida no Capítulo 4 para a manutenção dos limites das espécies.

No Capítulo 6 nós descrevemos os resultados obtidos para a terceira espécies de *Petunia* que pode ser encontrada na Serra do Sudeste. Como falado anteriormente, esta espécie representa uma reversão à condição de melitofilia e faz parte do clado de tubo longo na filogenia do gênero. Coletada pela primeira vez há dez anos e descrita somente em 2005 (Stehmann & Semir, 2005), esta espécie se caracteriza pelo pequeno número de populações e indivíduos que podem ser encontrados. Em diversos anos de pesquisa na região de ocorrência, nosso grupo buscou por plantas desta espécie sem qualquer sucesso, o que sugere que ela possa apresentar bancos de sementes que não germinam em todas os anos. Neste trabalho nós avaliamos parâmetros de diversidade genética em *P. secreta* e comparamos com *P. axillaris* e *P. exserta*. A alta diversidade encontrada em *P. secreta*,

tanto para marcadores plastidiais quanto para os marcadores de microssatélites, foi surpreendente visto a pequena área de ocorrência e a raridade desta espécie. Apesar disto, esta espécie apresentou um déficit de heterozigotos bastante significativo que foi relacionado a provável índice elevado de endocruzamento. Neste trabalho nós sugerimos que um programa de proteção para a espécie, baseado na manutenção de bancos de sementes e coleções vivas que possam vir a ser usadas para repor variabilidade eventualmente perdida, é necessário. Considerando todas as linhagens evolutivas encontradas baseadas na diversidade de alelos obtidos pelos marcadores de microssatélites, *P. secreta* foi o táxon mais divergente entre os analisados.

Tomados em conjunto, nossos resultados mostraram que as espécies de *Petunia* da Serra do Sudeste apresentam acentuada diferenciação genética e que os processos de especiação realmente podem ser relacionados a adaptações ecológicas. Embora os mecanismos não tenham sido elucidados por completo, estratégias de isolamento reprodutivo são encontradas nessas espécies e garantem sua manutenção como *taxa* independentes. Estas estratégias estão diretamente associadas à interação com diferentes polinizadores, podendo estar também relacionadas a outros mecanismos, como por exemplo, a incidência de altas taxas de autopolinização, impedindo a formação de híbridos naturais, uma vez que nenhuma delas apresenta barreiras intrínsecas à fertilização cruzada artificial (Stuurman *et al.*, 2004).

Análises do sistema de cruzamento e dispersão de pólen para as espécies *P. exserta* e *P. secreta* estão em andamento para que possam ser desenvolvidos estudos aprofundados sobre a biologia reprodutiva dessas espécies. Além disso, com a perspectiva de correlacionar a diversidade genética a partir destes marcadores com os processos de diversificação das espécies (pela identificação de novas linhagens evolutivas) e pelo fato de que esta diversidade pode revelar associação entre regiões específicas do genoma e aspectos ecológicos (correlação direta entre diversidade neutra, genes relacionados a características morfológicas específicas e fatores edáficos), a caracterização de outras populações e espécies de *Petunia* do Pampa seguirão este mesmo modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- Abbott RJ & Comes HP (2007) Blowin' in the wind - the transition from ecotype to species. *New Phytol* 175: 195-197.
- Abbott RJ, Ritchie MG & Hollingsworth PM (2008) Introduction. Speciation in plants and animals: pattern and process. *Phil Trans R Soc B* 363: 2965-2969.
- Ando T (1996) Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *APG* 47: 19-30.
- 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.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161: 105-121.
- Barraclough TG (2010) Evolving entities: towards a unified framework for understanding diversity at the species and higher levels. *Philos Trans R Soc B* 365:1801-1813.
- Barrett SCH (2010) Darwin's legacy: the forms, function, and sexual diversity of flowers. *Phil Trans R Soc B* 365: 351-368.
- Barton NH & Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 16:113-148.
- Baum DA & Shaw KL (1995) Genealogical perspectives on the species problem. In: Hoch PC & Stephenson AG (eds) *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, pp 289-303.
- Behling H (2002) Carbon storage increases by major forest ecosystems in tropical South America since the Last Glacial Maximum and the early Holocene. *Glob Planet Change* 33: 107-116.
- Bodbyl-Roels SA & Kelly JK (2011) Rapid evolution caused by pollinator loss in *Mimulus guttatus*. *Evolution* 65: 2541-2552.
- Boldrini II (2009) A flora dos Campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar V, Müller SC, Castilhos ZMS & Jacques AVA (eds) *Campos Sulinos- conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 63-77.

- Boshier DH, Chase MR & Bawa KS (1995) Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *Am J Bot* 82: 484-490.
- Bossolini E, Klahre U, Brandenburg A, Reinhardt D & Kuhlemeier C (2011) High resolution linkage maps of the model organism *Petunia* reveal substantial synteny decay with the related genome of tomato. *Genome* 54: 327-340.
- Butlin RK, Galindo J & Grahame JW (2008) Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? *Philos Trans R Soc B* 363:2997-3007.
- 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 Hf1 gene. *J Plant Res* 120: 385-397.
- Cozzolino S & Scopece G (2008) Specificity in pollination and consequences for postmating reproductive isolation in deceptive mediterranean orchids. *Philos Trans R Soc B* 363: 3037-3046.
- Dell'Olivo, Hoballah AME, Gübitz T & Kuhlemeier C (2011) Isolation barriers between *Petunia axillaris* and *Petunia integrifolia* (Solanaceae). *Evolution* 65: 1979-1991.
- Delph LF & Wolf DE (2005) Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytol* 166: 119–128.
- Eckert CG, Kalisz S, Geber MA, Sargent R, Elle E, Cheptou P, Goodwillie C, Johnston MO, Kelly JK, Moeller DA, Porcher E, Ree RH, Vallejo-Marín M & Winn AA (2010) Plant mating systems in a changing world. *Trends Ecol Evol* 25: 35-43.
- Fierst JL & Hansen TF (2010) Genetic architecture and postzygotic reproductive isolation: evolution of Bateson-Dobzhansky-Muller incompatibilities in a polygenic model. *Evolution* 64: 675-693.
- Fortes, AB (1959) Geografia do Rio Grande do Sul. Globo, Porto Alegre, 393 pp.
- Franceschinelli EV & Bawa KS (2000) The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* 84: 116-123.
- Gerats AGM, Souer E, Kroon J, McLean M, Farcy E & Maizonnier D (1993) *Petunia hybrida*. In: O'Brien S (ed) Genetic maps: locus maps of complex genomes. 6ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 613-623.

- Gerats T & Vandenbussche M (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. Trends Plant Sci 10: 251-256.
- Girardi-Deiro AM, Mota AF & Gonçalves JON (1994) Efeito do corte de plantas lenhosas sobre o estrato herbáceo da vegetação da Serra do Sudeste, RS, Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 29: 1823-1832.
- Goodwillie C, Kalisz S & Eckert CG (2005) The evolutionary enigma of mixed mating in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. Annu Rev Ecol Evol Syst 36: 47-49.
- Grant V (1981) Plant speciation. New York, NY: Columbia University Press.
- Grela IA (2004) Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas. Universidad de la República, Montevideo, 103 pp.
- Guadagnin DL, Larocca J & Sobral M (2000) Flora vascular de interesse para a conservação na bacia do arroio João Dias: avaliação ecológica rápida. In: Ronchi LH & Lobato AOC (eds) Minas do Camaquã, um estudo multidisciplinar. UNISINOS, São Leopoldo, pp 71- 84.
- Gübitz T, Hoballah ME, Dell’Olive A & Kuhlemeier C (2009) *Petunia* as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Second edition. Springer, New York, pp 29-49.
- Hamrick JL, Murawski DA & Nason JD (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. Plant Ecol 107: 281-297.
- Harder LD & Barrett SCH (2006) Ecology and evolution of flowers. Oxford University Press, Oxford, 384 pp.
- Hardy OJ, Maggia L, BAandou E, Breyne P, Caron H, Chevallier MH, Doligez A, Dutech C, Kremer A & Latouche-Hallé C (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. Mol Ecol 15: 559-571.
- Harrison RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. In: Futuyma D & Antonovics J (eds) Oxford Surveys in Evolutionary Biology. Oxford University Press, New York, pp 69-128.

- Hermann K & Kuhlemeier C (2011) The genetic architecture of natural variation in flower morphology. *Plant Biol* 14: 60-65.
- Hoballah ME, Gübitz T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell'Olivo A, Arnold M & Kuhlemeier C (2007) Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *Plant Cell* 19: 779-790.
- Holz M (1999) Do mar ao deserto- a evolução do Rio Grande do Sul no tempo geológico. 1ª edição. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 142 pp.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1997) Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil. Rio de Janeiro, 208 pp.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF & Donoghue MJ (2009) Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª edição. Artmed, São Paulo, 612 pp.
- Kalisz S, Vogler DW & Hanley KM (2004) Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430: 884-887.
- KM Kay (2006) Reproductive isolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers. *Evolution* 60: 538-552.
- Kokubun H, Nakano M, Tsukamoto T, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L, Basualdo IL, Kao TH & Ando T (2006) Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. *J Plant Res* 119: 419-430.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126: 3-14.
- Larson EL, White TA, Ross CL & Harrison RG (2014) Gene flow and the maintenance of species boundaries. *Mol Ecol* 23: 1668-1678.
- Lee SL (2000) Mating system parameters of *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae) in three different forest types and a seed orchard. *Heredity* 85: 338-345.
- Leinonen T, O'Hara RB, Cano JM & Merilä J (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *J Evol Biol* 21: 1-17.
- Levin DA (1981) Dispersal versus gene flow in plants. *Ann Missouri Bot Gard* 68: 233-253.

- Lexer C & Widmer A (2008) The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions. *363*: 3023-3036.
- Longo D, Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Bonatto SL & Freitas LB (2014) Phylogeography of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 174: 199-213.
- Lorenz-Lemke AP, Mader G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15: 4487-4497.
- Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL & 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.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA & Willis JH (2008) The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Phil Trans R Soc B* 363: 3009-3021.
- Lynch M (2007) *The Origins of Genome Architecture*. Sinauer Associates, Massachusetts, 494 pp.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol* 20: 229-237.
- Marko PB & Hart MW (2011) The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends Ecol Evol* 26: 448-456.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 797 pp.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente (2009) *Avaliação e Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos*. Brasília p 46.
- Moyle LC, Jewell CP & Kostyun JL (2014) Fertile approaches to dissecting mechanisms of premating and postmating prezygotic reproductive isolation. *Curr Opin Plant Biol* 18: 16-23
- Muraswski DA & Hamrick JL (1991) The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity* 67: 167-174.
- Nason JD & Hamrick JL (1997) Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *J Hered* 88: 264-276.

- Nixon KC & Wheeler QD (1990) An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211-223.
- Nosil P, Funk DJ & Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Mol Ecol* 18: 375-402.
- Nosil P, Harmon LJ, Seehausen O (2009) Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends Ecol Evol* 24: 145-156.
- Olmstead RG & Palmer JD (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationship and character evolution. *Ann Mo Bot Gard* 79: 346-360.
- Olmstead RG, Bohs L, Magid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF & Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57: 1159-1181.
- Olmstead RG, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L & Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee N, Symon DE, Lester RN & Jessop JP (eds) *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization*. Royal Botanic Garden, Kew, pp 111-137.
- Orr HA (1998) The population genetics of adaptation: the distribution of factors fixed during adaptive evolution. *Evolution* 52: 935-949.
- Paim PSG, Chemale F & Lopes RC (2000) A Bacia do Camaquã. In: Holz M & Rios LF (eds) *Geologia do Rio Grande do Sul*. UFRGS, Porto Alegre pp 231-274.
- Patterson N, Richter DJ, Gnerre S, Lander ES, Reich D (2008) Complex speciation of humans and chimpanzees - Reply. *Nature* 452: E4.
- Payseur BA (2010) Using differential introgression in hybrid zones to identify genomic regions involved in speciation. *Mol Ecol Resour* 10: 806-820.
- Paz ALG, Romanowski HP & Morais ABB (2008) Nymphalidae, Papilionidae e Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea) da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotropical* 8: 141-149.
- Presgraves DC (2010) The molecular evolutionary basis of species formation. *Nat Rev Genet* 11:175-180.
- Rambo B (1956) *A fisionomia do Rio Grande do Sul*. Terceira edição. UNISINOS, São Leopoldo, 473 pp.
- Ramsey J, Bradshaw Jr, HD, Schemske DW (2003) Components of reproductive isolation between the monkey flowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57, 1520–1534.

- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL, Freitas LB. Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *MolPhylogenetEvol* (in pres)
- Rice WR & Hostert EE (1993) Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 47: 1637-1653.
- Salazar C, Baxter SW, Pardo-Diaz C, Wu G, SurrIDGE A, Linares M, Bermingham E & Jiggins CD (2010) Genetic evidence for hybrid trait speciation in *Heliconius* butterflies. *PLoS Genet* 6: e1000930.
- Schluter D (2009) Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323: 737-741.
- Segatto ALA, Turchetto-Zolet AC, Aizza LCB, Monte-Bello CC, Dornelas MC, Margis R, Freitas L (2013). *MAEWEST* expression in flower development of two *Petunia* species. *Int J Mol Sci* 14:13796-807.
- Segatto ALA, Ramos-Fregonezi AMC, Bonatto SL & Freitas L (2014a) Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *Am J Bot* 10:119-127.
- Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL & Freitas LB (2014) Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta* (2014b) *Mol Phylogenet Evol* 70: 504–512.
- Servedio MR & Noor MAF (2003) The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34: 339-364.
- Sink KC (1975) Inheritance of three genes for morphological characters in *Petunia hybrida* in crosses with four *Petunia* species. *Can J Genet Cytol* 17: 67-74.
- Sink KC (1984) *Petunia*. In: Sink KC (ed) *Petunia* Monogr. Theor Appl Genet. Springer-Verlag, Berlin, pp 3-9.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Snow AA (1994) Postpollination selection and male fitness in plants. *Am. Nat.* 144, 69–83.
- Sobel JM, Chen GF, Watt LR, Schemske DW (2010) The biology of speciation. *Evolution* 64: 295-315.

- Souza VC & Lorenzi H (2012) 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.
- Stehmann JR (1987) *Petunia exserta* (Solanaceae): Uma nova espécie do Rio Grande do Sul, Brasil. *Napaea* 2: 19-21.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB, Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Second edition. Springer, New York, pp 1- 28.
- Stehmann, J.R. (1999) Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Tese de doutorado.
- Stehmann JR & Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. In: Keating RC, Hollowel V & Croat Tb (eds) *A Festschrift for Willian G D'Arcy: the legacy of taxonomist*. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, pp 341-348.
- Strommer J, Gerats AGM, Sanago M & Molnar SJ (2000) A gene-based RFLP map of *Petunia*. *Theor Appl Genet* 100: 899-905.
- Strommer J, Peters J, Zethof J, De Keukeleire P, & Gerats T (2002) AFLP maps of *Petunia hybrida*: building maps when markers cluster. *Theor Appl Genet* 105: 1000 - 1009.
- Strommer J, Peters JL & Gerats T (2009) Genetic recombination and mapping in *Petunia*. In: T. Gerats & J. Strommer (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. 2ª edição. Springer, New York, pp 395-416.
- Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C, & Kuhlemeier C (2004) Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. *Genetics*, 168: 1585-1599.
- Suertegaray DMA & Silva LAP (2009) 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.
- Taylor EB, Boughman JW, Groenenboom M, Sniatynski M, Schluter D, Gow JL (2006) Speciation in reverse: morphological and genetic evidence of the collapse of a three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) species pair. *Mol Ecol* 15: 343-355.

- Tazzyman SJ & Iwasa Y (2010) Sexual selection can increase the effect of random genetic drift – a quantitative genetic model of polymorphism in *Oophaga pumilio*, the strawberry poison-dart frog. *Evolution* 64: 1719-1728.
- Teixeira MB, Coura Neto AB, Pastore U, Rangel-Filho ALR (1986) Vegetação. In: Levantamento de recursos naturais. IBGE, Rio de Janeiro, pp 541-620.
- The Marie Curie SPECIATION Network. (2012) What do we need to know about speciation? *Trends Ecol Evol* 27: 27-39.
- Tiffin P, Olson MS, Moyle LC (2001) Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. *Proc. R. Soc. B* 268, 861–867.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, Hashimoto G, Marchesi E & Kao T (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *APG* 49: 115-133.
- Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E & Kao T (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiol* 131: 1903-1912.
- Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, Kuhlemeier C, Solís-Neffa VG, Speranza, PR, Bonatto SL & Freitas LB (2014) Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Mol Ecol* 23: 374-389.
- Uyeda JC, Arnold SJ, Hohenlohe PA & Mead LS (2009) Drift promotes speciation by sexual selection. *Evolution* 63: 583-594.
- Van Der Pull L (1982) Principles of dispersal in higher plants. Springer-Verlag, Berlin, New York, p 156.
- Venail J, Dell’Olivo A & Kuhlemeier C (2010) Speciation genes in the genus *Petunia*. *Philos Trans Phys Sci B* 365: 461-468.
- Wakeley J (2008) Complex speciation of humans and chimpanzees. *Nature* 452: E3–E4
- Watanabe H, Ando T, Lida S, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Hashimoto G & Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P-axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *Engei Gakkai Zasshi* 65: 625-634.
- Watanabe H, Ando T, Tsukamoto T, Hashimoto G & Marchesi E (2001) Cross-compatibility of *Petunia exserta* with other *Petunia* taxa. *Engei Gakkai Zasshi* 70: 33-40.

Wright S (1949) The genetical structure of populations. *Ann Hum Genet* 15: 323-354.

Wu CI (2001) The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 851-865.

Sessão de Recursos da Internet

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) Mapa de Biomas. ftp://geofpt.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas_murais/biomas.pdf (5 de agosto de 2014).

Pillar VP (2006) Estado atual e desafios para a conservação dos campos. Workshop Estado atual e desafios para a conservação dos campos. <http://www.ecologia.ufrgs.br/ecologia/campos/finalcampos.htm> (5 de agosto de 2014).