

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

História evolutiva do gênero *Petunia* Juss.

Maikel Reck Kortmann

Orientadora: Loreta Brandão de Freitas

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

Porto Alegre, Abril de 2014

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS:

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS
- Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS
- Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas, UEL
- Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - UFRGS
- Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando, vivendo que esperando porque embora quem quase morreu esteja
vivo, quem quase vive já morreu”

Sarah Westphal Batista da Silva

Dedico essa Tese
Ao meu marido Gustavo, a pessoa que mais me apoiou nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram durante a elaboração desta tese, em especial:

A minha orientadora, Loreta Brandão de Freitas, por ter me recebido no laboratório, pelos ensinamentos, pelos momentos que me encorajou e apoiou mesmo quando eu estava à beira de um surto.

Aos queridos LEMures, ex e atuais, que tornaram o dia a dia melhor, mesmo quando as coisas pareciam dar errado: Alice, Ana Lúcia, Ana Luíza, Carol, Daniele, Giovanna, Gustavo, Lauís, Michel, Marcelo, Verônica e especialmente ao Geraldo pelo apoio profissional, por aguentar as mil vezes que te chamo por dia e principalmente pela amizade construída.

Ao Elmo, por sua prestatividade e eficiência no comando da Secretaria.

Aos professores do PPGBM e a todos os demais professores que além de contribuir na minha busca por conhecimento me ensinaram o quanto pode ser bom ser professor, em especial Maria Paula, Pessatti e Tcacenco.

Agradeço imensamente a minha família que mesmo de longe me dá apoio, amor e força para continuar em busca dos meus objetivos. Em especial quero agradecer ao meu avô por ter sido um grande exemplo de honestidade e bondade.

A minha nova família, Jorge e Gilca, que também sempre me dedicaram o maior apoio.

Aos amigos novos e os de longa data pelos bons momentos juntos, que funcionaram como uma mágica capaz de me fazer relaxar mesmo nos momentos mais tensos.

E por fim, ao Gustavo, tanto por ser esse marido extremamente amoroso e companheiro, quanto pela imensa ajuda e apoio durante todo o período do doutorado. Você faz a minha vida melhor a cada dia! Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
CAPÍTULO I INTRODUÇÃO.....	11
I.1 Caracterização do grupo de estudo.....	12
I.2 Filogenia molecular do gênero <i>Petunia</i>	14
I.3 Estudos intraespecíficos no gênero <i>Petunia</i>	20
OBJETIVOS.....	24
CAPÍTULO II Molecular phylogeny reveals new insights on the <i>Petunia patagonica</i> (Solanaceae) status.....	26
CAPÍTULO III Multilocus phylogeny reconstruction: New insights on the evolutionary history of genus <i>Petunia</i> (Solanaceae).....	65
CAPÍTULO IV AFLP markers and cpDNA sequences helping the species delimitation in the <i>Petunia</i> genus (Solanaceae).....	98
CAPÍTULO V DISCUSSÃO GERAL.....	136
CAPÍTULO VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAP. I e V).....	143

RESUMO

O gênero *Petunia* Juss. é um gênero de diversificação recente na América do Sul. Os processos de especiação neste gênero estão relacionados a fatores como isolamento geográfico, adaptação a microambientes bem como à história evolutiva de seus polinizadores. Diferenças de habitat, distribuição geográfica e pequenos detalhes nas estruturas florais e vegetativas têm gerado muitas incongruências taxonômicas no gênero, acarretando uma variação no número de espécies consideradas por diferentes autores. Apesar da existência de alguns estudos filogenéticos com espécies do gênero *Petunia*, até o momento, nenhuma reconstrução filogenética robusta foi obtida, especialmente em função da baixa diversidade genética entre as espécies, às diferenças no número de espécies utilizadas em cada estudo e ao fato que nunca todos os *taxa* pertencentes ao gênero foram incluídos em uma mesma análise. A fim de determinar o posicionamento filogenético da espécie *P. patagonica* dentro da tribo Petunieae, utilizamos marcadores moleculares nucleares e plastidiais em uma abordagem filogenética e biogeográfica. Verificamos que as espécies de *Petunia* formaram um grupo monofilético excluindo *P. patagonica*. Com isso, pudemos demonstrar a necessidade de uma reclassificação de *P. patagonica* em um gênero diferente de *Petunia*. A proximidade genética, bem como características morfológicas e biogeográficas compartilhadas entre *P. patagonica* e *Fabiana imbricata*, sugerem *Fabiana* como o gênero mais provável para a inclusão da espécie *P. patagonica*. Adicionalmente, com o objetivo de investigar as relações evolutivas entre as espécies do gênero *Petunia*, utilizamos o conjunto de dados taxonômicos mais inclusivo até o momento, considerando todas as diferentes morfologias proposta para o gênero. Baseado em uma combinação de nove marcadores nucleares e cinco plastidiais, realizamos uma reconstrução filogenética, biogeográfica e de caracteres ancestrais para o gênero. A abordagem multilocos forneceu uma reconstrução filogenética bastante robusta, apoiando a hipótese de que a divergência basal está mais relacionada à diferenciação de comprimento do tubo da corola, enquanto a diversificação associada com a distribuição geográfica foi verificada apenas nos clados mais internos da filogenia. A reconstrução de área e a determinação do estado ancestral para caracteres morfológicos da flor e polinizadores sugeriram a origem de *Petunia* nas terras baixas do Pampa a partir de uma linhagem com tubo da corola curto e polinizada por abelhas.

Complementarmente, visando descrever a variabilidade genética intraespecífica e determinar a circunscrição das diferentes espécies de *Petunia*, utilizamos os marcadores AFLP, conhecidos por serem altamente polimórficos, bem como cpDNA, para 211 indivíduos, representando 15 espécies do gênero *Petunia*. Comparado com cpDNA, os marcadores AFLP foram mais eficazes em delimitar as espécies de *Petunia*. Considerando o AFLP, a maioria dos indivíduos formou agrupamentos exclusivos de acordo com sua morfologia, demonstrando uma alta relação entre dados genéticos e traços morfológicos. Uma maior variabilidade intraespecífica, bem como o pequeno número de grupos genéticos verificados nas análises de agrupamento, reforçaram a ideia de um grupo recentemente divergente que compartilha grande número de polimorfismos ancestrais. Os trabalhos que compõe essa tese contribuíram significativamente para o entendimento taxonômico e evolutivo do gênero *Petunia*, apontando a necessidade de uma reclassificação de *P. patagonica* em um gênero diferente de *Petunia*, fornecendo a mais extensa e robusta reconstrução filogenética para o gênero até os dias de hoje e identificando o papel da variabilidade genética intraespecífica na circunscrição das diferentes espécies do gênero.

ABSTRACT

Petunia Juss. is a recently diversified genus in South America. Speciation processes in this genus are related to factors such as geographic isolation, adaptation to microenvironment and the evolutionary history of its pollinators. Habitat differences, geographical distribution and small details on floral and vegetative structures have generated several taxonomical divergences in the genus, leading to a variation on the number of considered species by many authors. Despite the existence of some phylogenetic studies on *Petunia* genus, no phylogenetic reconstruction has so far been obtained overall, due to the already low genetic diversity of these species, the different number of species considered among studies, and the fact that no one included all *taxa*. In order to determine the phylogenetic setting of the *P. patagonica* species inside Petunieae tribe, we used nuclear and plastidial molecular markers through a phylogenetic and biogeographical approach. We observed that *Petunia* species formed a monophyletic group, except for *P. patagonica*. Accordingly, we were able to demonstrate that there is a need for a new setting of *P. patagonica* in a different genus from *Petunia*. Genetic proximity, as well as morphological and biogeographical characteristics shared between *P. patagonica* and *Fabiana imbricata*, suggest *Fabiana* as the most probable genus for inclusion of *P. patagonica*. Additionally, in order to investigate the evolutionary relationships among *Petunia* species, we used the most inclusive dataset so far generated. Based on the combination of nine nuclear and five plastid markers, we performed a phylogenetic, biogeographical and ancestral character reconstruction for the genus. A multilocus approach provided the most robust phylogenetic reconstruction for the genus, supporting the hypothesis of the basal divergence is more related to corolla tube length differentiation, while the diversification associated to geographical distribution was observed for only internal clades. Area and ancestral character reconstruction suggested that the origin of diversification of *Petunia* genus has happened in lowlands from the Pampas region from a short corolla tube and bee-pollinated ancestor. Furthermore, in order to describe the intraspecific genetic variability and to determine the circumscription of the different *Petunia* species, we used the highly polymorphic AFLP markers and cpDNA sequences of 211 individuals, representing 15 species of *Petunia*. Compared to cpDNA, AFLP

markers were more efficient on delimitating *Petunia* species. Considering the AFLP, most of individuals formed exclusive groups, according to their morphologies, demonstrating high correlation between genetic variability and morphological traits. A higher intraspecific variability, as well as the low number of genetic groups observed in clustering analyses, reinforces the idea of a recently divergent group, which share a great number of ancestral polymorphisms. The studies that constitute this Thesis have significantly contributed to the taxonomical and evolutionary understanding of *Petunia* genus, pointing to the need for a new setting of *P. patagonica* in a genus outside *Petunia*, providing so far the most extensive and robust phylogenetic reconstruction of the genus, and identifying the intraspecific genetic variability role in the species circumscription.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

I.1. Caracterização do grupo de estudo

O gênero *Petunia* foi descrito inicialmente por Jussieu (1803) a partir de duas espécies, *Petunia nyctaginiflora* Juss. (agora sinonimizada a *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb.) e *Petunia parviflora* Juss. (agora *Calibrachoa parviflora* (Juss.) D'Arcy.). Posteriormente, com base em estudos morfológicos e citogenéticos, Wijzman (1982; 1983) verificou que o gênero estava claramente dividido em dois grupos: um com espécies apresentando número cromossômico $2n=14$ e outro com espécies possuindo $2n=18$. Este mesmo autor realizou experimentos de cruzamento entre estas espécies e verificou que não havia a formação de híbridos entre espécies dos diferentes grupos, enquanto que entre as espécies de um mesmo grupo todos os cruzamentos eram viáveis (Wijsmann, 1983). Os resultados desses experimentos levaram Wijsmann & Jong (1985) a propor a separação desses grupos em gêneros distintos. Inicialmente, seriam mantidas no gênero *Petunia* as espécies relacionadas à *Petunia parviflora* Juss. que apresentavam $2n=18$, enquanto as espécies com $2n=14$ seriam transferidas para o gênero *Stimoryne* Rafin. Porém, como o nome *Petunia* já estava associado à *Petunia X hybrida*, uma espécie de interesse ornamental popularmente conhecida como petúnia-de-jardim, Wijnands & Bos (1986) propuseram a conservação de *Petunia nyctaginiflora* Juss. como o tipo nomenclatural para as espécies com $2n=14$, ao mesmo tempo que as espécies com $2n=18$ foram validadas para o gênero *Calibrachoa* La Llave & Lexarza (Wijsmann & Bos 1986; Brummitt, 1989; Stehmann & Semir, 1997). Essa separação em dois gêneros distintos foi posteriormente confirmada em diversos estudos moleculares (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Olmstead *et al.*, 2008; Särkinen *et al.*, 2013).

O gênero *Petunia* foi classificado por Olmstead *et al.* (2008) como pertencente a tribo Petunie. Considerando a estrutura filogenética dos gêneros da tribo e sua distribuição geográfica, foi sugerido que *Petunia* e *Calibrachoa* teriam antepassados de origem Andina (Olmstead *et al.*, 2008)

O Brasil é o país com maior número de espécies de *Petunia* (13 espécies), mas são também encontradas espécies distribuídas pela Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. As únicas espécies que não ocorrem no Brasil são *P. occidentalis* R.E.Fr. e *P. axillaris* ssp *subandina* T.Ando, que ocorrem somente na região sub-andina, e *P. patagonica* (Speg.) Millán, que ocorre restrita à região da Patagônia argentina (Stehmann *et al.*, 2009). Esta

última é a única espécie sob o nome *Petunia* que nunca foi avaliada taxonomicamente ou do ponto de vista molecular.

A distribuição geográfica da maioria das espécies no gênero *Petunia* inclui regiões temperadas e subtropicais da Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil, entre 22° e 39° S, com a espécie *P. patagonica* ocorrendo apenas em uma região restrita entre os paralelos 44° e 50° S, ultrapassando os limites sul da distribuição das demais espécies do gênero (Stehmann *et al.*, 2009) (Figura 1).

A distribuição das espécies de *Petunia* é limitada a três áreas principais de acordo com as zonas de altitude: 1) terras baixas entre 0 e 500 metros acima do nível do mar, representada pela região do Pampa, localizada no Uruguai, algumas províncias no oeste da Argentina e parte do Rio Grande do Sul, Brasil; 2) região do Planalto Sulbrasileiro, entre 500 e 900 m de altitude, na porção oeste e central dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; e 3) terras altas subtropicais, em altitudes superiores a 900 m de altitude no Planalto Sulbrasileiro, localizadas nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e no Paraná. As regiões correspondentes ao Pampa e aos Campos de Cima da Serra são consideradas como centro de diversidade do gênero, abrigando o maior número de *taxa* e também a maior variabilidade genética (Kulcheski *et al.*, 2006; Stehmann *et al.*, 2009).

Além disso, três *taxa* são distribuídos em áreas disjuntas: *P. axillaris* ssp. *subandina* e *P. occidentalis*, já mencionadas anteriormente, e *P. mantiqueirensis* T. Ando & Hashim., que ocorre em terras altas tropicais da Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil, em pequenas populações e em poucas localidades da Serra da Mantiqueira (Stehmann *et al.*, 2009).

Os processos de especiação no gênero *Petunia* nos centros de diversidade parecem ter sido influenciados por diferentes fatores. Lorenz-Lemke *et al.* (2010), baseando-se na diversidade de marcadores do DNA de cloroplasto (cpDNA) das espécies pertencentes aos grupos de altitude do Planalto Sulbrasileiro e da Serra da Mantiqueira, sugeriram que a diversificação para este grupo ocorreu principalmente devido a isolamento geográfico. Esse isolamento teria ocorrido quando, após um período de expansão do ancestral deste grupo durante os períodos mais frios e secos (períodos glaciais do Pleistoceno), o habitat foi fragmentado pelo avanço da floresta com araucárias (nos períodos interglaciais, mais quentes e úmidos, do Pleistoceno), levando à formação de ilhas isoladas nas áreas de maior

altitude. Este processo de isolamento bastante rápido teria favorecido a diferenciação das populações, dando origem às diferentes espécies que ocorrem atualmente nesta região. É importante salientar que tais espécies apresentam baixos índices de diversidade genética, compartilham amplamente os haplótipos do cpDNA (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010) e tem alta similaridade morfológica, com predomínio da polinização por abelhas (Stehmann *et al.*, 2009).

Já em relação ao grupo de espécies do Pampa, os estudos, também baseados em polimorfismos do cpDNA e na comparação dos padrões de distribuição desta variabilidade ao longo da distribuição geográfica das espécies, sugerem processos de especiação por adaptação a microambientes, com fatores ecológicos e geomorfológicos contribuindo para a diversificação nessa região, reforçados por isolamento reprodutivo (Fregonezi *et al.*, 2013).

A linha evolutiva do gênero *Petunia* também está relacionada à história evolutiva de seus polinizadores (Watanabe *et al.*, 1996; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Hoballah *et al.*, 2007; Gübitz *et al.*, 2009). Entre as espécies de *Petunia* encontram-se três diferentes síndromes florais, sendo a melitofilia (polinização por abelhas) a mais comum, e provavelmente ancestral no gênero, enquanto a ornitofilia (polinização por aves) e a esfingofilia (polinização por mariposas) são consideradas síndromes derivadas (Stehmann, 1999). Essa diversificação influenciada pelas síndromes florais é principalmente importante na região de terras baixas, onde as três síndromes de polinização podem ser encontradas, algumas vezes em simpatria. Um exemplo disso ocorre nas espécies de *Petunia* da região das Guaritas (Serra do Sudeste, RS, Brasil), onde é verificada uma grande diversidade de solo em uma pequena área geográfica (Fregonezi *et al.*, 2013; Turchetto *et al.*, 2014a, b), o que pode ser responsável pela grande diversificação morfológica das espécies encontradas nessa região. A forma da corola nas espécies de *Petunia* é significativamente associada ao tipo de solo (Aoki & Hattori, 1991).

I.2. Filogenia molecular do gênero *Petunia*

A construção de árvores filogenéticas possibilita explicar o relacionamento entre as espécies atuais e deduzir as histórias evolutivas das mesmas. Um fator que contribuiu para o avanço de estudos filogenéticos foi a utilização de marcadores de DNA. A possibilidade

de acessar informações contidas no material genético gera informações adicionais que permitem o entendimento da evolução de diferentes grupos taxonômicos.

Estudos filogenéticos com foco na delimitação de grupos taxonômicos têm elevado o número de reclassificações e a proposição de novas entidades taxonômicas (DeSalle *et al.*, 2005; Shaffer & Thomson, 2007; Reeves & Richards, 2011), baseando as decisões no grau de diversidade encontrada nos grupos. Contudo, a ausência de variabilidade, principalmente em espécies que divergiram recentemente, tem dificultado essa abordagem em alguns grupos.

Ao longo do tempo, as diferenças de habitat, distribuição geográfica e pequenos detalhes nas estruturas florais e vegetativas têm levado a muitas incongruências taxonômicas no gênero *Petunia*, com o número e a circunscrição das espécies variando entre os diferentes autores. Com isso, várias tentativas de reconstrução filogenética para as espécies de *Petunia* têm sido tentadas. Até o momento, a maioria destes estudos falhou em incluir toda a multiplicidade de *taxa* (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007) ou esteve restrita a poucos marcadores plastidiais (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Fregonezi *et al.*, 2013), o que dificulta a reconstrução filogenética completa do gênero.

Um exemplo claro disto é a controvérsia que envolve a classificação de *P. patagonica*. *Petunia patagonica* foi originalmente descrita por Spegazzini (1897) a partir de uma amostra encontrada em São Jorge do Golfo, Argentina. Com base em características morfológicas como, por exemplo, o tubo da corola que é estreito na base e se expande rapidamente para o ápice, Spegazzini classificou a espécie como pertencente ao gênero *Nierembergia* Ruiz & Pav., nomeando-a como *Nierembergia patagonica* Speg. Em uma revisão taxonômica do gênero *Nierembergia*, Millán (1941) rejeitou a classificação anterior e transferiu *N. patagonica* para o gênero *Petunia*, ficando, assim, *P. patagonica*. Essa classificação foi aceita por Hunziker (2001) e é vigente até os dias de hoje. Além, de ocorrer de forma disjunta das demais espécies do gênero *Petunia* (Figura 1), diversas características morfológicas, vegetativas e reprodutivas também diferenciam esta espécie do restante do gênero (Cosa de Gastiazoro, 1991; Barboza & Hunziker, 1993; Hunziker, 2001; Stehmann *et al.*, 2009 - ver Quadro 1 para maiores detalhes), reforçando ainda mais a controvérsia que envolve a definição taxonômica desta espécie.

Petunia patagonica tem sido negligenciada em estudos filogenéticos tanto no gênero *Nierembergia* (Tate *et al.*, 2009), quanto no gênero *Petunia* (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).





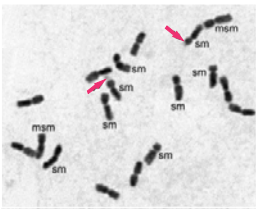
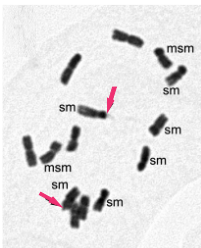
Figura 1: Comparação das distribuições geográficas de *P. patagonica* e das demais espécies do gênero *Petunia*.

O número cromossômico é outra característica que torna *P. patagonica* uma exceção no gênero (Acosta *et al.*, 2006). Considerando que as diferenças em número cromossômico foram determinantes para a separação das espécies antigamente consideradas como *Petunia* (Wijsman & Jong, 1985), o que foi amplamente confirmado em estudos moleculares (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Olmstead *et al.*, 2008; Särkinen *et al.*, 2013), o fato de *P. patagonica* possuir $2n=18$ diferentemente das demais espécies de *Petunia* deve ser considerado nas futuras revisões incluindo esta espécie.

As controvérsias que envolvem a classificação de *P. patagonica* apontam para a necessidade de uma revisão taxonômica dessa espécie. Estudos filogenéticos visando o

posicionamento filogenético de *P. patagonica* juntamente com as características morfológicas e cromossômicas podem contribuir para sua reclassificação correta.

Quadro 1: Características morfológicas e cromossômicas que diferenciam *P. patagonica* das demais espécies do gênero *Petunia*.

	<i>Petunia patagonica</i>	Outras espécies de <i>Petunia</i>
Morfologia		
Número cromossômico	 <p>$2n = 2x = 18$</p>	 <p>$2n = 2x = 14$</p>

Nota: Referências das imagens: Morfologia floral - A.A. Cocucci; Laboratório de Evolução Molecular; Cariótipo – modificado de Acosta *et al.*, 2006.

A história evolutiva das demais espécies do gênero *Petunia* tem sido investigada por diferentes tipos de marcadores moleculares, mas a maioria deles de origem plastidial. O primeiro estudo utilizando filogenia molecular em *Petunia* foi realizado por Ando *et al.*

(2005). Utilizando polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) de cpDNA e uma grande quantidade de diferentes morfologias para o grupo, estes autores testaram a hipótese de separação proposta por Wijisman & Jong (1985). Os dados moleculares obtidos por eles confirmaram a existência de dois grupos monofiléticos e distintos, cuja circunscrição correspondia aos números cromossômicos propostos respectivamente para *Petunia* e *Calibrachoa*.

Kulcheski *et al.* (2006) analisaram as relações evolutivas de onze espécies do gênero *Petunia* s.s. e incluíram como grupos externos espécies de *Calibrachoa*, *Nierembergia* e *Bouchetia* Dunal, usando sete marcadores de sequência (o gene 5.8 S e os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear - ITS1 e 2; os espaçadores intergênicos plastidiais *trnL-trnF*, *trnH-psbA*, *psbB-psbH* e *trnS-trnG*; o íntron do gene plastidial *trnF*; e o íntron do gene mitocondrial *nad1*). Estes autores recuperaram a separação entre *Petunia* e *Calibrachoa* e identificaram que estes são mais relacionados entre si que em relação aos outros grupos analisados. Apesar dos baixos índices de variabilidade genética observados entre as espécies de *Petunia*, os autores identificaram a ocorrência de dois grupos principais relacionados à altitude das áreas de ocorrência das espécies: (a) terras baixas, correspondendo às espécies da região do Pampa; e (b) terras altas do Planalto Sulbrasileiro, correspondendo às espécies encontradas em altitudes mais elevadas, o que corresponde às áreas considerados como centros de diversidade do gênero (Figura 2A). Nesta análise também foi evidenciada a separação das espécies de terras baixas em dois grupos relacionados a diferenças no comprimento do tubo da corola.

Baseando-se em sequências do gene nuclear *Hf1* (Flavonoide-3',5'-hidroxilase – enzima chave na biossíntese de flavonoides) e utilizando um maior número de morfologias (19 morfologias representando 16 espécies), Chen *et al.* (2007) construíram uma nova filogenia para *Petunia*. Neste caso, foram incluídas apenas espécies de *Nierembergia* e *Solanum* L. como grupos externos. Embora baseados apenas nas sequências de um gene nuclear, estes autores propuseram a separação do gênero *Petunia* em dois clados maiores, não relacionados à altitude da distribuição geográfica e sim ao comprimento do tubo da corola, sendo a espécie *P. occidentalis*, cujo tubo da corola é considerado curto, a espécie irmã das espécies de tubo longo (Figura 2B).

Apesar de todos os estudos filogenéticos conduzidos com espécies do gênero *Petunia*, uma reconstrução filogenética robusta ainda não foi obtida. De modo geral, a

correta reconstrução filogenética deste grupo foi dificultada tanto pela diferença no número de espécies analisadas, visto que nunca todos os *taxa* pertencentes ao gênero foram incluídos em uma mesma análise, quanto pela baixa diversidade encontrada no gênero (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010). A baixa diversidade encontrada pode ser devida à idade bastante recente do grupo (Kulcheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Särkinen *et al.*, 2013) e a retenção de polimorfismos ancestrais. Análises baseadas em cpDNA indicaram que a diversificação no gênero *Petunia* é extremamente recente, menos de dois milhões de anos (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010) e o compartilhamento de haplótipos entre espécies divergentes morfológicamente tem sido amplamente descrito (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Longo *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2014a, b).

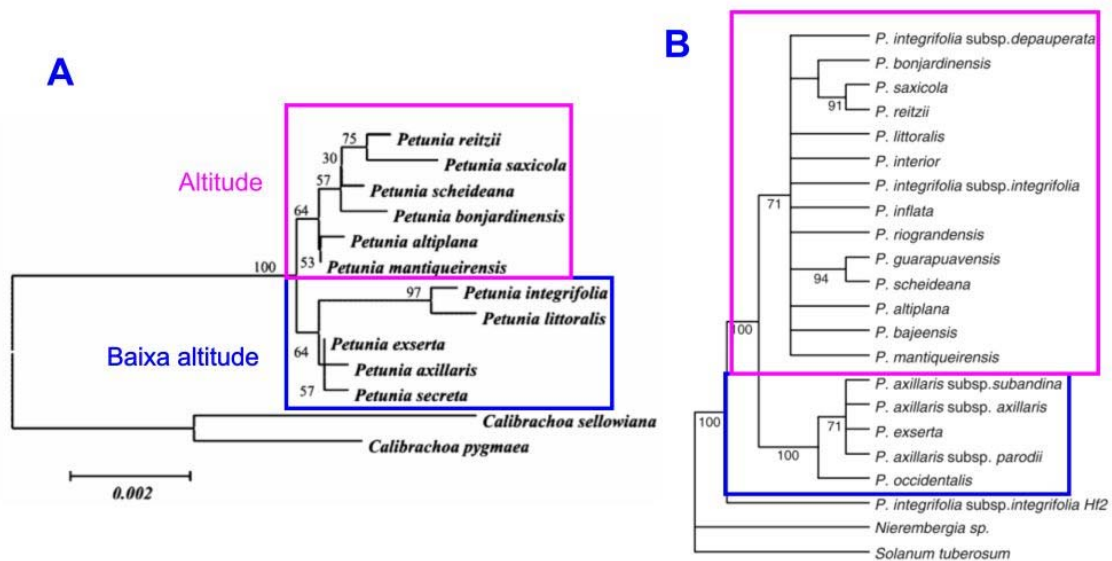


Figura 2: **A:** Árvore obtida pelo método de Neighbor-Joining para 11 espécies do gênero *Petunia*, destacando os dois grupos maiores relacionados à distribuição geográfica. Modificado de Kulcheski *et al.* (2006.) **B:** Reconstrução filogenética obtida por Máxima Parcimônia das 19 morfologias de *Petunia* com base em sequências do gene *Hfl*, destacando os dois grupos principais não relacionados à distribuição geográfica. Modificado de Chen *et al.*, 2007.

A utilização de um maior número de locos tem sido apontada como uma alternativa para reconstruções filogenéticas em grupos proximalmente relacionados (Chen & Li, 2001; Rokas *et al.*, 2003; Gadagkar *et al.*, 2005; Rokas & Carroll, 2005; Smith *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2011). Além de fornecer informações sobre uma porção maior do genoma, a inclusão de múltiplos locos independentes permite a identificação das forças evolutivas que afetaram todos os locos simultaneamente daquelas que atuaram em locos de forma particular (Hilton & Hey, 1997). Como os estudos filogenéticos em *Petunia* realizados até hoje foram baseados em poucas regiões do genoma e apresentaram resultados incongruentes, uma abordagem multilocus pode vir a esclarecer de maneira mais apurada as relações evolutivas no gênero.

I.3. Estudos intraespecíficos no gênero *Petunia*

Em paralelo com estudos filogenéticos, diversos outros trabalhos vêm sendo realizados envolvendo espécies do gênero *Petunia* no decorrer dos últimos anos. Estes estudos, de modo geral, visaram identificar relações evolutivas intraespecíficas e delimitar certos grupos de espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Longo *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2014a, b; Turchetto *et al.*, 2014a, b).

Um dos grupos mais frequentemente estudados corresponde às espécies *P. axillaris* e *P. exserta* Stehmann. Essas espécies são muito próximas evolutivamente e compartilham uma série de características morfológicas (Stehmann *et al.*, 2009). Além disso, essas espécies ocorrem em simpatria em algumas áreas de sua distribuição (Stehmann, 1987; Ando, 1996). Tanto em estudos baseados em espaçadores intergênicos plastidiais (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006) quanto baseados em marcadores nucleares e plastidiais combinados (Segatto *et al.*, 2014a), foi possível verificar que *P. axillaris* ssp. *axillaris* e *P. exserta*, apesar das diferenças em suas morfologias e síndromes de polinização, podem ser consideradas estreitamente relacionadas. Um cenário de hibridação entre essas espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006) foi confirmado, porém dois grupos genéticos correspondentes a duas espécies são mantidos (Segatto *et al.*, 2014a).

Os taxa que compõem o complexo *Petunia axillaris* também foram recentemente estudados. As subespécies de *P. axillaris* (*P. axillaris* ssp. *axillaris*, *P. axillaris* ssp. *parodii* (Steere) Cabrera. e *P. axillaris* ssp. *subandina*) são tradicionalmente delimitadas com base

em sua distribuição geográfica e detalhes da morfologia floral. A fim de determinar os padrões genéticos, morfológicos e ecológicos que envolvem a classificação neste complexo, Turchetto *et al.* (2014a, b) estudaram um grande número de populações de cada subespécie e verificaram que os indivíduos são, na sua maioria, coincidentes com a delimitação de cada subespécies e que cada uma delas representa uma unidade evolutiva diferente. Embora *P. axillaris* e *P. exserta* não possam ser confundidas, o relacionamento evolutivo entre as subespécies de *P. axillaris* e *P. exserta* permanece incerto e a ocorrência de híbridos naturais entre os *taxa* em simpatria só dificulta seu entendimento. Marcadores de cpDNA e nucleares sugerem que *P. exserta* é uma espécie derivada de *P. axillaris* ssp. *axillaris* em período mais recente que a separação das três subespécies (A.L.A. Segatto, dados não publicados).

A delimitação de espécies no complexo taxonômico denominado grupo *Petunia integrifolia* representa um dos maiores desafios entre os grupos de *Petunia*, pois as espécies que compõem esse grupo taxonômico são morfológicamente muito semelhantes. Longo *et al.* (2014) utilizaram plantas de cinco destes *taxa*: *P. inflata* R. E. Fr., *P. integrifolia* ssp. *integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell., *P. integrifolia* var. *depauperata* R. E. Fr., *P. riograndensis* T. Ando & Hashim. e *P. littoralis* L. B. Sm. & Downs. Com base em marcadores nucleares e plastidiais somente três linhagens evolutivas foram confirmadas, sugerindo que os poucos caracteres morfológicos que diferenciam esses táxons não são apropriados para a separação destas morfologias em espécies distintas. A condição de subespécies e a sinonimização de algumas morfologias (Stehmann & Bohs, 2007) obteve suporte nestes marcadores moleculares, diferentemente do que havia sido encontrado em outros estudos (Ando *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

A descrição taxonômica e a delimitação de espécies vegetais têm sido tradicionalmente baseadas em morfologia. Porém, a divergência morfológica pode ter pouca relação com o grau de delimitação das linhagens evolutivas (Orr, 2001), de forma que a delimitação de *taxa* baseada em morfologia e biogeografia pode esconder linhagens crípticas comprometendo, por exemplo, esforços para a definição de unidades de conservação. Sendo assim, o estabelecimento do estado taxonômico dos organismos utilizando a maior diversidade de caracteres possível é desejável (Frankhan *et al.*, 2004). Da mesma forma, a utilização de um maior número de indivíduos por espécie possibilita a

incorporação de evidências que auxiliam tanto na determinação da existência de um táxon, quanto na descrição de espécies raras ou crípticas (Cameron, 2010).

Apesar dos recentes estudos moleculares terem auxiliado na delimitação de alguns grupos taxonômicos em *Petunia*, a análise de múltiplos indivíduos e marcadores moleculares com o objetivo de circunscrever e delimitar espécies ainda não foi empregada para muitas das espécies do gênero. Esta estratégia pode beneficiar o entendimento das relações evolutivas entre as espécies do gênero e esclarecer alguns aspectos da taxonomia que, pela grande similaridade morfológica (Figura 3) entre a maioria de suas espécies, permanecem em aberto. Muitas das espécies de *Petunia* são identificadas apenas por poucos caracteres morfológicos, a maioria dos quais apresenta alta variação ao longo da distribuição geográfica das populações, originando inconsistências entre os taxonomistas no reconhecimento de nomes válidos (por exemplo, Ando *et al.*, 2005; Stehmann *et al.*, 2009).



Figura 3: Vista frontal da corola de diferentes espécies de *Petunia*: *P. altiplana*, *P. axillaris*, *P. bajeensis*, *P. bonjardinensis*, *P. exserta*, *P. guarapuavensis*, *P. inflata*, *P. integrifolia*, *P. interior*, *P. littoralis*, *P. mantiqueirensis*, *P. occidentalis*, *P. reitzii*, *P. saxicola*, *P. secreta*, *P. scheideana*.

A baixa variabilidade genética e o alto compartilhamento de polimorfismos ancestrais verificados entre as espécies de *Petunia* podem contribuir para uma fraca delimitação de suas espécies. Contudo, a utilização de grande número de polimorfismos pode vir a melhorar esta perspectiva. Uma forma de obter um maior número de polimorfismos de forma rápida e com baixo custo financeiro é utilizar a técnica de identificação de polimorfismos do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). Em contraste com os marcadores filogenéticos baseados no sequenciamento de um grande

número de regiões de DNA restritas a genomas específicos, a variação obtida com AFLP é espalhada por todo o genoma do organismo, abrangendo regiões não codificantes e codificantes do DNA presentes nos genomas nuclear e organelar, podendo, portanto, ser mais representativa dos padrões genéticos de diversidade e identificando com mais acurácia os processos evolutivos (Koopman, 2005; Degnan & Rosenberg, 2006).

OBJETIVOS

II.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral deste projeto de tese foi elucidar as relações filogenéticas e descrever os processos evolutivos responsáveis pela diversificação do gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae).

II.2. Objetivos Específicos

- a. Determinar o posicionamento taxonômico da espécie *P. patagônica* (Speg.) Millán associando marcadores genéticos a análises biogeográficas;
- b. Investigar as relações evolutivas entre as espécies do gênero *Petunia* através de uma análise filogenética envolvendo todos os *taxa* reconhecidos e marcadores moleculares dos genomas plastidial e nuclear;
- c. Descrever a variabilidade genética intraespecífica em espécies de *Petunia* recuperada a partir de marcadores plastidiais e nucleares de forma a determinar a circunscrição das diferentes espécies;
- d. Contribuir para o entendimento taxonômico e evolutivo do grupo.

CAPÍTULO II

Manuscrito submetido à revista *American Journal of Botany*

Phylogenetic relationships of *Petunia patagonica* (Solanaceae) revealed by molecular and biogeographical evidences

Maikel Reck-Kortmann, Gustavo Adolfo Silva-Arias, João Renato Stehmann, Julián Alejandro Greppi, Loreta Brandão de Freitas

CAPÍTULO III

Manuscrito submetido à revista *Molecular Phylogenetic and Evolution*

Multilocus phylogeny reconstruction: New insights on the evolutionary history of genus
Petunia (Solanaceae)

Maikel Reck-Kortmann, Gustavo Adolfo Silva-Arias, Ana Lúcia Anversa Segatto, Geraldo Mäder, Sandro Luis Bonatto, Loreta Brandão de Freitas

CAPÍTULO IV

Manuscrito submetido à revista *BMC Evolutionary Biology*

AFLP markers and cpDNA sequences aid in species delimitation in the *Petunia* genus
(Solanaceae)

Maikel Reck-Kortmann, Geraldo Mäder, Luana A. Rodrigues, Claudete F. Ruas, Sandro L.
Bonatto, Loreta B. Freitas

CAPÍTULO V
DISCUSSÃO GERAL

V. 1. Posicionamento filogenético de *Petunia patagonica*

A utilização de marcadores moleculares tem demonstrado ser grande aliada nos estudos que envolvem questões taxonômicas e evolutivas. Uma das vantagens dos marcadores moleculares é que a análise do DNA pode acessar, em alguns casos, mais caracteres informativos que a análise da morfologia, por exemplo. Abordagens genéticas e morfológicas são complementares e suportam a validação taxonômica, uma vez que mais caracteres podem ser usados na análise. Outro fator importante que aumenta a confiabilidade das decisões taxonômicas é o que os caracteres utilizados não estão diretamente relacionados.

Apesar de estar incluída no gênero *Petunia*, nossos resultados apresentaram evidências fortes que posicionam *P. patagonica* fora desse gênero. A maior proximidade genética foi encontrada entre *P. patagônica* e *F. imbricata* e este relacionamento é mais estreito que em relação a qualquer outra espécie da tribo Petunieae considerada (*Nierembergia*, *Bouchetia*, *Hunzikeria*, *Leptoglossis* e *Calibrachoa*).

De acordo com o conceito filogenético, quando comparados com outros grupos, os genes de indivíduos de uma mesma espécie são mais proximamente relacionados e apresentam um ancestral comum mais recente (Avice, 2000). O fato de as demais espécies de *Petunia* terem formado um grupo monofilético excluindo *P. patagonica* demonstra que o conceito filogenético pode ser utilizado na exclusão dessa espécie do gênero, uma vez que ela em comparação com as demais espécies possui sequências de DNA nuclear e plastidial bem distintas.

Além dos dados moleculares, diferenças na morfologia vegetativa e floral (exceto a forma geral da corola) de *P. patagonica* demonstram uma similaridade muito maior com *Fabiana* (ao menos *F. imbricata*) que em relação a quaisquer outras espécies de *Petunia* ou mesmo outros gêneros da tribo Petunieae. A diferença no número cromossômico básico também sugere que *P. patagonica* não pertença ao gênero *Petunia* e, é preciso destacar, que este foi um dos principais critérios na separação dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* (Wijsmann & Jong, 1985).

Nosso estudo de reconstrução de área ancestral sugeriu que o grupo formado pelas espécies de *Petunia*, *P. patagônica*, *Calibrachoa* e *F. imbricata* teve origem nos campos subtropicais do sul da América do Sul. A presença de *Petunia* nas montanhas subandinas, representada pelas espécies *P. occidentais* e *P. axillaris* ssp *subandina* cujas distribuições

são adjacentes à distribuição central do gênero (Ando *et al.*, 2005; Stehmann *et al.*, 2009), pode ser interpretada como uma condição derivada para o grupo.

O clado que contém esses três gêneros teve sua diversificação datada no período do Médio Mioceno (Särkinen *et al.*, 2013) a partir de dados moleculares combinados a registros fósseis da família Solanaceae. As alterações climáticas nesse período parecem ter favorecido o surgimento e a diversificação de novos grupos na região sul da América do Sul. Entre os fatores que levaram a essas mudanças estão o soerguimento dos Andes, que formou uma barreira importante para o vento e acarretou em muitas mudanças climáticas responsáveis por diversas alterações na paisagem: desertificação dos Andes Orientais (Compagnucci, 2011); mudanças na vegetação no sul da Argentina, especialmente na região correspondente às províncias de Santa Cruz e Chubut, levando ao desenvolvimento de florestas secas (Graham, 2010); uma regressão marinha na bacia do Rio Paraná, levando ao surgimento de novos habitats nas terras baixas do sul da América do Sul resultando na atual configuração dos campos subtropicais e estepe patagônica.

V. 2. Abordagem multilocus na reconstrução filogenética do gênero *Petunia*

Um maior número de locos combinado com a utilização de todas as morfologias descritas em *Petunia* resultou na mais extensa e robusta reconstrução filogenética para o gênero até hoje. Nosso estudo, no entanto, não foi capaz de resolver completamente as posições terminais na filogenia de *Petunia*, não esclarecendo todas as relações interespecíficas. Contudo, a abordagem multilocus foi mais eficiente em resolver os clados internos que qualquer combinação prévia de marcadores (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Fregonezi *et al.*, 2013).

Comparando nossos resultados com as filogenias previamente descritas no gênero verificamos uma diferença notável principalmente em relação à composição dos clados principais. Enquanto a maioria dos estudos anteriores (exceto Chen *et al.*, 2007 e Kriedt *et al.*, 2014) revelaram clados associados com a altitude da distribuição geográfica das espécies, a árvore filogenética baseada em múltiplos locos indica que a divergência basal está mais relacionada com a diferenciação do comprimento do tubo da corola, e que os clados internos nestes dois principais grupos estão associados à diversificação de acordo com a distribuição geográfica de suas espécies.

No clado denominado de *tubo curto* está a maioria das espécies do gênero, as quais apresentam flores de coloração purpúrea e tubo da corola curto, polinizadas por abelhas. O clado denominado *tubo longo* foi composto por três espécies cujo tubo da corola é considerado longo e com diferentes agentes de polinização, beija-flores, mariposas e abelhas, respectivamente. Além destas, *P. occidentalis*, que apresenta tubo da corola considerado curto, também foi agrupada neste clado. Resultados semelhantes foram verificados por estudos prévios envolvendo marcadores moleculares derivados de regiões nucleares (Chen *et al*, 2007, Kriedt *et al*, 2014).

O tamanho do tubo da corola em espécies de *Petunia* está relacionado a diferentes síndromes florais. Sabe-se que a adaptação a diferentes condições ambientais bem como a adaptação a diferentes polinizadores pode ter dirigido a diversificação de espécies deste gênero e do gênero relacionado, *Calibrachoa* (Fregonezi *et al*, 2013). Na reconstrução de caráter ancestral foi observado que o ancestral do gênero *Petunia* deveria ter apresentado tubo da corola curto e polinização por abelhas e essas características forma mantidas pela maioria das espécies. Contudo, a passagem para tubo longo foi verificada na linhagem ancestral do clado *tubo longo* e *P. occidentalis* representa uma reversão à condição ancestral, da mesma forma que esta espécie ocupou uma nova área na distribuição geográfica do gênero.

Em relação ao surgimento das diferentes síndromes florais, um padrão evolutivo mais complexo foi observado e mais estudos são necessários sobre este tópico. A partir de um ancestral melitófilo, observou-se o surgimento da esfingofilia e da ornitofilia e a reversão em dois eventos independentes à condição ancestral. Um destes eventos foi observado na espécie *P. occidentalis* e acompanha a presença de tubo da corola curto e coloração purpúrea das flores, mas o segundo caso envolve a espécies *P. secreta* que apresenta tubo longo, flores magenta e ocupa uma área considerada como parte da distribuição ancestral do gênero, em simpatia com outras espécies de tubo longo e muito próxima da distribuição de espécies de terras baixas do clado *tubo curto*. Não foi possível determinar a origem da ornitofilia e da esfingofilia no grupo a partir do conjunto de dados analisado.

Para compreender melhor a história evolutiva do gênero *Petunia*, realizamos também uma reconstrução de área ancestral para o gênero a partir da árvore filogenética multilocos.

Estudos anteriores sugerem que os primeiros processos de divergência em *Petunia* ocorreram muito recentemente (aproximadamente há 2 milhões de anos - Lorenz-Lemke *et al.* 2010). Desta forma, as modificações paleoclimáticas ocorridas durante o Quaternário tiveram uma importante influência sobre os padrões de distribuição e diversificação do gênero.

A região do Pampa, parte do Rio Grande do Sul, todo o território do Uruguai e algumas províncias da Argentina, caracterizada pela presença de plantas herbáceas e totalmente localizada em terras de baixa altitude (até 500 m acima do nível do mar), foi identificada como a área de origem dos primeiros processos de divergência em *Petunia*. Resultado semelhante foi encontrado quando a ênfase do processo de diversificação foi dada à separação dos gêneros na tribo Petunieae. Posteriormente, ao menos dois processos independentes de colonização ocorreram nas terras altas do Planalto Sul-Brasileiro. O processo de dispersão do Pampa em sentido às pastagens subandinas orientais parece ser um processo recente e exclusivo dentro *Petunia*, tendo a espécie *P. occidentalis* surgido após a colonização das encostas subandinas por um ancestral comum com a subespécie *P. axilaris* ssp. *subandina*. Já os processos de diversificação e colonização da região dos Campos de Cima da Serra e a expansão até a Serra da Mantiqueira observados no clado *tubo curto* teriam sofrido influência de eventos de expansão e contração da Floresta com Araucária durante o Pleistoceno (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

V. 3. Estudos intraespecíficos no gênero *Petunia*

Duas ou mais populações tendem a evoluir gradual e lentamente até se tornarem unidades evolutivas independentes através de um processo denominado especiação. Contudo, nem sempre a formação de novas espécies é facilmente detectada. Como a identificação das espécies é comumente baseada em características morfológicas e comportamentais, muitas vezes o verdadeiro número de espécies pode ser super ou subestimado. A delimitação precisa das espécies é de fundamental importância para a maioria dos estudos ecológicos, evolutivos e de conservação.

Embora recentes estudos moleculares realizados no gênero *Petunia* tenham auxiliado na delimitação de alguns grupos taxonômicos, a análise de múltiplos indivíduos e marcadores moleculares com o objetivo de circunscrever e delimitar espécies ainda não

havia sido tentada. Não há um consenso quanto ao número de espécies no gênero *Petunia* e diferentes taxonomistas clássicos apoiam diferentes composições. A classificação com base em caracteres morfológicos tem originado inconsistências entre os taxonomistas no reconhecimento de nomes válidos para determinadas espécies, mesmo quando dados moleculares são considerados (por exemplo, Ando *et al.*, 2005; Stehmann *et al.*, 2009).

A utilização de polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) no nosso estudo para a delimitação intraespecífica em *Petunia* provou ser eficaz na identificação de um grande número de polimorfismos. Uma maior distribuição da variabilidade intraespecífica, principalmente em espécies com distribuição geográfica restrita, reforçou a hipótese de diversificação recente do gênero, além de corroborar as hipóteses de diversificação associadas à adaptação a microambientes e síndromes de polinização.

Comparado com cpDNA, os marcadores AFLP foram mais eficazes em determinar a delimitação das espécies de *Petunia*, com menor percentual de compartilhamento de polimorfismos e maior precisão na correlação morfologia X componente genético. O cpDNA, por outro lado, foi eficiente em corroborar a delimitação de algumas espécies como *P. bajeensis*, *P. littoralis*, e *P. integrifolia*.

Nossos resultados separam os indivíduos das morfologias de *P. scheideana* e *P. guarapuavensis* em grupos uniformes distintos, apoiando a proposição de que, apesar de compartilharem características morfológicas com ampla variação (Stehmann *et al.*, 2009), devem ser consideradas duas espécies independentes (Ando & Hashimoto, 1995).

As análises de agrupamento Bayesiana e Coordenadas Principais (PCoA) a partir dos perfis de AFLP permitiram a visualização de grupos genéticos em número menor que o esperado a partir das diferentes morfologias consideradas. Este resultado reforça a ideia de um grupo recentemente divergente que compartilha grande número de polimorfismos ancestrais. Em ambas as análises ficou clara uma maior variabilidade genética em espécies originárias da região central de distribuição do gênero.

Os trabalhos que compõem essa tese contribuíram significativamente para o entendimento taxonômico e evolutivo do gênero *Petunia*, apontando a necessidade de uma reclassificação de *P. patagonica* em um gênero diferente de *Petunia*, fornecendo a mais extensa e robusta reconstrução filogenética para o gênero até os dias de hoje, bem como

identificando a variabilidade genética intraespecífica e determinando a circunscrição das diferentes espécies do gênero.

Os resultados aqui apresentados e os marcadores implementados abriram novas perspectivas de análise e trouxeram novas ferramentas para abordar questões ainda pendentes neste intrigante gênero de plantas. As qualidades em relação ao cultivo e transformação genética que fizeram de *Petunia hybrida* um modelo para estudos genéticos e moleculares, associadas à diversidade de processos evolutivos encontrados na estruturação do grupo, dinâmica populacional e padrões de distribuição geográfica, fazem das espécies silvestres de *Petunia* modelos perfeitos para estudos evolutivos e populacionais.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPS I E V)

Acosta M, Ordonez A, Cocucci A & Moscone E (2006) Chromosome reports in South American Nicotianeae (Solanaceae), with particular reference to *Nierembergia*. *Ann Mo Bot Gard* 93: 634-646.

Ando T & Hashimoto G (1995) *Petunia guarapuavensis* (Solanaceae): a new species from planalto of Parana and Santa Catarina, Brazil. *Brittonia* 47: 328–334.

Ando T & Hashimoto G (1996) A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* 48: 217–223.

Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suarez E & Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96: 289–297.

Aoki C, Hattori K (1991) Attempt to classify *Petunia* species on the basis of corolla shape. *Jpn J Breed* 41: 433–442.

Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, London, 447pp.

Barboza GE & Hunziker AT (1993) Estudios en Solanaceae XXXIV. Revisión taxonomica de *Fabiana*. *Kurtziana* 22: 109–153.

Brummitt RK (1989) Report of the Committee for Spermatophyta: 36. *Taxon* 38: 301.

Cameron KM (2010) On the value of taxonomy, phylogeny, and systematics to orchid conservation: Implications for China's Yachang Orchid Reserve. *Botanical Review*, New York, pp 165- 173.

Chen FC & Li WH (2001) Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees. *Am J Hum Genet* 68: 444–456.

Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L & Ando T (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (Solanaceae) based on the sequence of the *Hfl* gene. *J Plant Res* 120: 385-397.

Compagnucci RH (2011) Atmospheric circulation over Patagonia from the Jurassic to present: a review through proxy data and climatic modeling scenarios. *Bot J Linn Soc* 103: 229–249.

Cosa de Gastiazoro MT (1991) Estudio morfoanatómico de órganos vegetativos en Cestroideae (Solanaceae). I. Tribu Nicotianeae. *Kurtziana* 21: 111-152.

Degnan JH & Rosenberg NA (2006) Discordance of species trees with their most likely gene trees. *PLoS Genet* 2: 762–776.

DeSalle R, Egan MG & Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos Trans R Soc London B* 360: 1905–1916.

Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA (2004) A primer of conservation genetics. Cambridge. University Press. 220pp.

Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL & Freitas LB (2013) Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Bot J Linn Soc* 171: 140–153.

Gadagkar SR, Rosenberg MS & Kumar S (2005) Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J Exp Zool* 304B: 64–74.

Graham A (2010) A natural history of the New World: The ecology and evolution of plants in the Americas. The University of Chicago Press, Chicago.

Gübitz T, Hoballah ME, Dell’Olivo A & Kuhlemeier C (2009) *Petunia* as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. 2^oed. Springer, New York, pp 29- 49.

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.

Hilton H & Hey J (1997) A multilocus view of speciation in the *Drosophila virilis* species group reveals complex histories and taxonomic conflicts. *Genet Res* 70: 185–194.

Hunziker AT (2001) The genera of Solanaceae. ARG Gantner, Verlag KG, Ruggell.

Koopman WJM (2005) Phylogenetic signal in AFLP data sets. *Syst Biol* 54: 197–217.

Kriedt RA, Cruz GMQ, Bonatto SL & Freitas LB (2014) Novel transposable elements in Solanaceae: evolutionary relationships among Tnt1-related sequences in wild *Petunia* species. *Plant Mol Biol Rep* 32: 142–152.

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.

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.

Millán R (1941) Revisión de las especies del género *Nierembergia* (Solanaceae). *Darwiniana* 5: 487–547.

Olmstead RG, Bohs L, Magid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF & Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57: 1159–1181.

Orr HA (2001) The genetics of species differences. *Trends Ecol Evol* 16: 343–350.

Reeves PA & Richards CM (2011) Species delimitation under the general lineage concept: an empirical example using wild North American hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). *Syst biol* 60: 45–59.

Robertson K, Goldberg EE & Igić B (2011) Comparative evidence for the correlated evolution of polyploidy and self-compatibility in Solanaceae. *Evolution* 65: 139–155.

Rokas A, Williams BL, King N & Carroll SB (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425: 798–804.

Rokas A & Carroll SB (2005). More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Mol Biol Evol* 22: 1337–1344.

Särkinen T, Bohs L, Olmstead RG & Knapp S (2013) A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evol Biol* 13: 214.

Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL & Freitas LB (2014a). 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.

Segatto ALA, Ramos-Fregonezi AMC, Bonatto SL & Freitas LB (2014b). Molecular insights into the purple-flowered ancestor of Garden Petunias. *Am J Bot* 10: 119-127.

Shaffer HB & Thomson RC (2007) Delimiting species in recent radiations. *Syst Biol* 56: 896–906.

Smith SA, Beaulieu JM & Donoghue MJ (2009) Mega-phylogeny approach for comparative biology: An alternative to supertree and supermatrix approaches. *BMC Evol Biol* 9: 37–49.

Spegazzini CL (1897) *Nierembergia patagonica*. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, La Plata* 3: 557.

Stehmann JR (1987) *Petunia exserta* (Solanaceae): Uma nova espécie do Rio Grande do Sul, Brasil. *Napaea* 2: 19–21.

Stehmann JR (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.

Stehmann JR & Semir J (1997) A new species and new combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon* 7: 417–419.

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*. 2° ed. Springer, New York, pp 1–28.

Stehmann JR & Bohs L (2007) Nuevas Combinaciones en Solanaceae. In: Zuloaga FO, Morrone O & Belgrano MJ (eds.) *Novedades taxonómicas y nomenclaturales para la flora vascular del cono sur de sudamérica*. *Darwiniana* v. 45, pp 240–241.

Tate JA, Acosta MC, McDill J, Moscone EA, Simpson BB & Cocucci AA (2009) Phylogeny and character evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): molecular, morphological, and cytogenetic evidence. *Syst Bot* 34: 198–206.

Watanabe H, Ando T, Iida S, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Hashimoto G & Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. J Jpn Soc Hortic Sci 65: 625-634.

Turchetto C, Segatto ALA, Telles MPC, Diniz-Filho JAF & Freitas LB (2014a) Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: A comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation. In press.

Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, Kuhlemeier C, Solís-Neffa VG, Speranza PR, Bonatto SL & Freitas LB (2014b). Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). Mol Ecol 23: 374–389.

Wijnands DO & Bos JJ (1986) Proposal to conserve 7436 *Petunia* with *P. nyctaginiflora* as Typ. Cons. (Solanaceae). Taxon 35: 748-749.

Wijsman HJW (1982) On the Interrelationships of certain Species of *Petunia*. I. Taxonomic notes on the Parental Species of *Petunia hybrida*. Acta Bot Neerl 31: 477-490.

Wijsman HJW (1983) On the Interrelationships of certain Species of *Petunia*. II. Experimental Data: crosses between Different taxa. Acta Bot Neerl 32: 97-107.

Wijsman HJW & Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in *Petunia* group. Acta Bot Neerl 34: 337-349.