

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAROLINA KAISER SCHNITZLER

**ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL GERACIONAL DE *Petunia*
axillaris, *Petunia exserta* E SEUS HÍBRIDOS NATURAIS NA REGIÃO DE
GUARITAS, RS**

Porto Alegre
Novembro de 2018

CAROLINA KAISER SCHNITZLER

**ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL GERACIONAL DE *Petunia*
axillaris, *Petunia exserta* E SEUS HÍBRIDOS NATURAIS NA REGIÃO DE
GUARITAS, RS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre

Novembro de 2018

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética – UFRGS e financiado com recursos do CNPq, CAPES, FAPERGS, PPGBM-UFRGS e Instituto de Biociências, UFRGS.

RESUMO

A hibridação interespecífica é um processo evolutivo que ocorre naturalmente e frequentemente em espécies de plantas, sendo um dos principais eventos promotores de diversidade em Angiospermas. Na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, região central do bioma Pampa, ocorrem duas espécies do gênero *Petunia* (Solanaceae). Estas são plantas herbáceas, anuais, que apresentam características morfológicas associadas a diferentes polinizadores. *Petunia axillaris* tem flores brancas e atrai mariposas para sua polinização; *Petunia exserta* possui flores vermelhas e é polinizada por beija-flores. Enquanto que as plantas da primeira espécie se distribuem por todo o Pampa, a segunda espécie é endêmica da Serra do Sudeste. O microambiente em que se desenvolvem também é diferente, com *P. exserta* crescendo no interior de cavernas nas torres areníticas que formam a região, enquanto *P. axillaris* ocorre nos topos e faces das mesmas torres ou em campos abertos no restante do Pampa. Indivíduos híbridos, com coloração da corola intermediária entre as duas espécies são observados em duas torres na Serra do Sudeste. O objetivo deste trabalho foi contribuir para o entendimento do processo de hibridação entre estas espécies na região de simpatria, sua origem e consequências. Para isto foram coletadas populações isoladas das duas espécies, compostas por indivíduos de morfologia típica de cada uma, e as duas populações de co-ocorrência, estas em duas gerações, 2011 e 2015. Estes indivíduos foram analisados através de sua caracterização morfológica quanto à cor da corola e por seus genótipos baseados em polimorfismos de microssatélites nucleares. Os resultados obtidos indicaram que cada zona de contato apresenta constituições morfológica e genética diferentes e que em ambos eventos de hibridação recente ocorrem a cada ano. Em ambos também foram evidentes eventos de introgressão e não foi observada correlação entre a cor da flor e a composição genética dos indivíduos híbridos.

ABSTRACT

Interspecific hybridization is an evolutionary process occurring naturally and frequently in plant species, being one of the main diversity drivers in Angiosperm. In the Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, central region in the Pampas, two *Petunia* (Solanaceae) species occur in sympatry. These species are annual and herbaceous plants that display morphological characteristics associated to different pollinators. *Petunia axillaris* has white flowers and attracts moths, whereas *P. exserta* has red and hummingbird-pollinated flowers. The plants of *P. axillaris* are widely distributed throughout the Pampas and *P. exserta* is endemic to the Serra do Sudeste. The microenvironment in which these species grow is also different, with *P. exserta* inhabiting inside caves in arenitic towers that form the region, whereas *P. axillaris* occurs on top and faces of the same towers or in open fields in the rest of the Pampas. Hybrid individuals, with intermediary corolla colour (dark to pale pink), are observed in two towers in the Serra do Sudeste. The main aim of the present work was to understand the hybridization process between these species in the sympatric distribution and the origin and consequences of hybridization. For this, isolated populations of the two species were collected, composed only by typical individuals of each species, and the two co-occurrence populations, during two generations, 2011 and 2015. These individuals were analysed based on the corolla colour and polymorphisms of nuclear microsatellites. The results indicated that each contact zone has different morphological and genetic constitutions and that in both recent hybridization events occur every year. In both, introgression and ancient hybridization were detected and no correlation was observed between flower colour and the genetic composition of hybrid individuals.

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO	1
<i>Pampa e Serra do Sudeste</i>	1
<i>Organismos de estudo</i>	1
<i>Hibridação interespecífica</i>	3
OBJETIVOS	4
MATERIAIS E MÉTODOS	4
<i>Populações de estudo</i>	4
<i>Extração de DNA e amplificação dos marcadores microsatélites</i>	6
<i>Análises estatísticas</i>	7
<i>Diversidade genética</i>	7
<i>Padrões de mistura genética para detecção de híbridos</i>	7
<i>Comparação entre diferentes gerações e correlação genótipo/fenótipo</i>	7
RESULTADOS	8
<i>Diversidade genética</i>	8
<i>Estrutura populacional</i>	9
DISCUSSÃO	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ANEXO 1	21

INTRODUÇÃO

Pampa e Serra do Sudeste

O bioma Pampa se estende por regiões do sul do Brasil, Uruguai e Argentina, incluindo a Serra do Sudeste em sua distribuição (PILLAR *et al.*, 2009). Na região Sul do Brasil, os campos do bioma Pampa abrangiam uma área de 218.700 km²; porém algumas estimativas afirmam que persistem apenas 40% da vegetação nativa. Essa redução é atribuída principalmente à conversão dos campos sulinos em lavouras e silvicultura, assim como ao uso inapropriado pela pecuária (OVERBECK *et al.*, 2007; PILLAR & LANGE, 2015).

A Serra do Sudeste, também conhecida como Escudo Rio-grandense, está localizada na região sudeste do Rio Grande do Sul e é caracterizada por formações rochosas que datam do Pré-Cambriano até o Holoceno; além da deposição de sedimentos, possui vasta diversidade geomorfológica que promove grande variedade de substratos, contribuindo para a diversidade biológica dos tipos vegetacionais na região (HOLZ, 1999; PAIM *et al.*, 2000; WAECHTER, 2002). A posição geográfica desta região é compreendida no limite virtual para a vegetação tropical, localizada no paralelo 30° Sul, resultando em uma flora natural composta por um mosaico de campos, vegetação arbustiva e diferentes tipos florestais (CABRERA & WILLINK, 1980; TEIXEIRA *et al.*, 1986; LEITE & KLEIN, 1990). O mesmo paralelo é compreendido como limite entre o bioma Mata Atlântica e o bioma Pampa na classificação brasileira (IBGE, 2004).

Organismos de estudo

A família Solanaceae L., composta por 99 gêneros e cerca de 3000 espécies (APG, 2009), teve sua origem na América do Sul entre 65 e 85 milhões de anos, coincidindo com separação da Gondwana durante o Terciário, Cretáceo tardio (OLMSTEAD *et al.*, 2013). Apesar de ser um grupo predominantemente do Novo Mundo, apresenta distribuição cosmopolita, sendo a América do Sul um dos principais centros de diversidade e endemismos (SCHMID & HUNZIKER, 2001). Diversos de seus gêneros e espécies possuem importância econômica, quer participando da alimentação humana e animal, quer por sua utilização como plantas ornamentais (WU & TANKSLEY, 2010). O gênero *Petunia* Juss. é composto por 14 espécies exclusivamente sul-americanas, sendo a maioria delas encontradas no sul do Brasil, distribuídas em dois centros principais de diversidade: os campos altitudinais da borda

oriental do planalto catarinense e os afloramentos rochosos areníticos (conglomerado) da Serra do Sudeste (STEHMANN *et al.*, 2009).

As espécies *Petunia exserta* Stehmann e *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb são plantas anuais e estão entre aquelas que ocorrem na Serra do Sudeste, sendo a primeira exclusiva dessa região (STEHMANN *et al.*, 2009) e a segunda mais amplamente distribuída pelo Pampa (TURCHETTO *et al.*, 2014a,b). Essas espécies são muito próximas evolutivamente (RECK-KORTMANN *et al.*, 2014), compartilhando uma série de características morfológicas como o tubo da corola longo e hipocrateriforme, hábito ereto ou ascendente, pólen amarelo, folhas basais e apicais com tamanhos e formas diferentes (heterofilia), pedúnculos frutíferos eretos com cápsulas grandes (mais de 9 mm de comprimento) e sementes pequenas (com menos de 0,5 mm de comprimento), além de apresentarem distribuição simpátrica em parte de suas distribuições (SEGATTO *et al.*, 2014).

Petunia axillaris é a espécie conhecida como parental das petúnias de jardim e é, juntamente com *P. integrifolia*, a espécie do gênero que apresenta maior distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil, Uruguai, Argentina e Bolívia (ANDO, 1996). *Petunia exserta* ocorre em áreas extremamente restritas da Serra do Sudeste, habitando reentrâncias rochosas sombreadas (cavernas) nas torres areníticas das formações Guaritas e Minas, município de Caçapava do Sul. Na área de sobreposição das distribuições destas duas espécies, observa-se que *P. axillaris* ocorre apenas no topo e nas faces das torres, em solo profundo e rico, exposta à luz solar (TURCHETTO *et al.*, 2014a), enquanto que *P. exserta* é encontrada apenas dentro das cavernas (SEGATTO *et al.*, 2014), em um ambiente totalmente inóspito às demais espécies do gênero, onde cresce em solo raso e seco, protegida da luz, chuva e ventos (STEHMANN *et al.*, 2009).

As principais diferenças entre as duas espécies, além da distribuição, restringem-se a adaptações atrativas a polinizadores diferentes (síndromes de polinização; FENSTER *et al.*, 2004), sendo as flores de *P. axillaris* brancas e fragrantas ao entardecer, adequadas à esfingofilia (SINK, 1984; STEHMANN, 1999; VENAIL *et al.*, 2010; HERMANN & KUHLEMEIER, 2011) e as de *P. exserta* possuindo uma série de características adaptadas à ornitofilia, como a corola vermelha com borda do limbo reflexa e anteras e estilete fortemente exsertos e não produzindo aroma (STEHMANN, 1987; LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006).

Hibridação interespecífica

A hibridação interespecífica é um processo evolutivo que pode ocorrer naturalmente, especialmente em grupos de plantas com divergência recente, em maior ou menor grau, dependendo da presença de mecanismos que previnem a fecundação entre diferentes espécies (MALLET, 2008; SOLTIS & SOLTIS, 2009). No caso das espécies *P. axillaris* e *P. exserta*, apesar das diferentes síndromes florais, tem sido observada sistematicamente a ocorrência de híbridos interespecíficos em pelo menos duas populações na região da Serra do Sudeste (aqui denominadas CO1 e CO2; Figura 1, Tabela 1). Estas duas populações se caracterizam pela presença de indivíduos com morfologia típica de *P. axillaris* se desenvolvendo na área externa das cavernas e indivíduos típicos de *P. exserta* crescendo no interior destes abrigos juntamente com outros cuja morfologia floral, ao menos no que concerne à coloração das flores, podem ser considerados intermediários entre ambas as espécies. Baseado em marcadores moleculares, estes indivíduos intermediários foram classificados como híbridos interespecíficos (LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006; SEGATTO *et al.*, 2014; TURCHETTO *et al.*, 2015b). Estudos da morfologia floral a partir de medidas lineares e de morfometria geométrica confirmaram esta classificação (M.C. TEIXEIRA, comunicação pessoal).

Um amplo estudo realizado nestas duas populações, considerando a variabilidade genética a partir de microssatélites nucleares de uma única geração de indivíduos, não só confirmou sua condição de híbridos, como determinou a influência do processo de hibridação interespecífica na diversidade destas espécies e em seu processo de especiação (dados não publicados de nosso grupo de pesquisa). Foram encontrados indivíduos híbridos de primeira geração, indivíduos resultantes do cruzamentos entre híbridos e produtos de retrocruzamento com ambas as espécies parentais, tanto no nível molecular (TURCHETTO *et al.*, 2015b; polimorfismos de nucleotídeos simples: L.M. CABALLERO-VILLALOBOS *et al.*) como em relação à morfologia floral (M.C. TEIXEIRA *et al.*). É importante destacar que o nosso grupo de trabalho estuda estas populações desde 2002 e que nestes dois pontos de ocorrência os indivíduos de morfologia intermediária são observados todos os anos, variando tanto em fenótipo como em quantidade, mas sempre presentes (TURCHETTO *et al.*, 2015b).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi contribuir para o entendimento do processo de hibridação interespecífica observado na região de simpatria da distribuição das espécies *P. axillaris* e *P. exserta*.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos tivemos:

- 1) Estimar parâmetros de diversidade genética a partir dos polimorfismos observados em microssatélites nucleares;
- 2) determinar a estrutura populacional na zona de contato entre as duas espécies;
- 3) comparar a diversidade genética das populações simpátricas com a das populações alopátricas das duas espécies;
- 4) caracterizar e analisar temporalmente mudanças que possam ocorrer na diversidade genética das populações na área de co-ocorrência, considerando duas gerações de cruzamentos interespecíficos naturais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Populações de estudo

As coletas foram realizadas na Serra do Sudeste (Figura 1; Tabela 1), durante os períodos de floração das espécies de setembro a dezembro, em duas populações de co-ocorrência, CO1 e CO2, três populações alopátricas de *P. axillaris* (denominadas PaIS, totalizando 43 indivíduos) e cinco populações alopátricas de *P. exserta* (chamadas PeIS, com um total de 51 indivíduos). Foram consideradas populações alopátricas os aglomerados de plantas de uma espécie ocorrendo em torre ou sítio em que indivíduos da outra espécie não ocorreriam e cuja composição era de apenas indivíduos de morfologia típica de cada espécie, considerando todos os atributos diagnósticos de acordo com STEHMANN *et al.*, 2009. De CO1 e CO2 foram coletadas folhas de todos os indivíduos adultos, independentemente de sua morfologia tendo sido estes classificados de acordo com sua posição espacial em relação à

caverna, interna ou externamente e pela coloração de suas flores. As amostras de populações alopátricas foram coletadas na estação reprodutiva de 2011, enquanto que duas gerações foram coletadas nas zonas de contato, 2011 (sendo 25 indivíduos da CO1 e 18 da CO2) e 2015 (totalizando 22 indivíduos de CO1 e 24 de CO2).

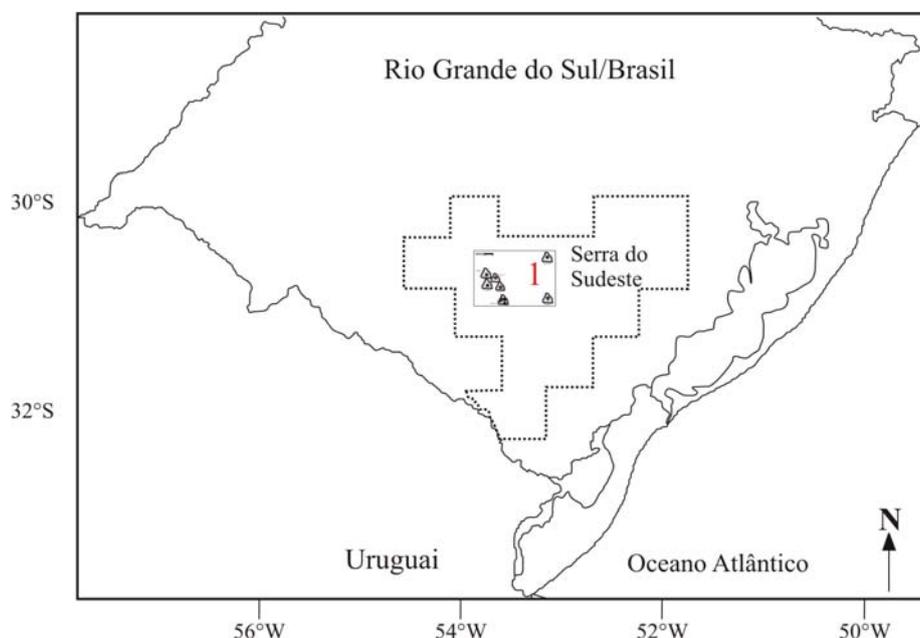


Figura 1. Localização geográfica da Serra do Sudeste, em detalhe as populações estudadas (1).

Tabela 1. Localidades dos indivíduos de *Petunia* coletados na natureza e analisados neste estudo.

Populações	Coordenadas Geográficas	N indivíduos (2011/2015)
PaIS1	30° 50' 20.938"S / 53° 30' 14.914"W	17*
PaIS2	30° 50' 10.886"S / 53° 30' 18.512"W	15*
PaIS3	30° 50' 20.430"S / 53° 30' 13.390"W	15*
CO1	30° 53' 48.153"S / 53° 25' 16.080"W	25/22
CO2	30° 50' 13.761"S / 53° 30' 15.036"W	18/24
PeIS1	30° 50' 20.190"S / 53° 30' 12.318"W	8*
PeIS2	30° 49' 56.000"S / 53° 29' 47.000"W	7*
PeIS3	30° 50' 22.000"S / 53° 30' 12.000"W	12*
PeIS4	30° 50' 12.422"S / 53° 30' 22.484"W	6*
PeIS5	30° 50' 09.000"S / 53° 30' 24.000"W	18*
Total amostrado		187

PaIS – fenótipo visualmente típico de *P. axillaris* em populações isoladas na região das Guaritas; PeIS - fenótipo visualmente típico de *P. exserta* em populações isoladas. CO - populações em co-ocorrência. * Populações amostradas apenas em 2011.

Extração de DNA e amplificação dos marcadores microssatélites

De cada indivíduo foram coletadas entre cinco e oito folhas jovens que foram desidratadas em sílica gel, pulverizadas com nitrogênio líquido e conservadas a -20°C. A extração de DNA seguiu o protocolo CTAB descrito por Roy *et al.* (1992). Os DNAs extraídos foram analisados em gel de agarose corado com GelRed (BIOTIUM INC., FREEMONT, CA, USA) e em espectrofotômetro Nanodrop (THERMO FISCHER SCI. CO., WALTHAM, MA, USA) para avaliar sua qualidade e concentração.

Os indivíduos foram genotipados com sete *loci* de microssatélites polimórficos (PM8, PM21, PM167, PM173, PM177, PM188 e PM195; Tabela 2), previamente descritos (BOSSOLINI *et al.*, 2011), usando os protocolos estabelecidos para essas espécies por TURCHETTO *et al.* (2015b). Os fragmentos amplificados foram desnaturados e separados por eletroforese capilar em sequenciador automático 3500 DNA Analyser (APPLIED BIOSYSTEMS CO., FOSTER CITY, CA, USA) usando como referência o marcador GeneScan 500 LIZ (APPLIED BIOSYSTEMS) e o programa GENEMARKER Demo 1.97 (SOFTGENETICS, STATE COLLEGE, PA, USA).

Tabela 2. Caracterização dos marcadores microssatélites utilizados na genotipagem dos indivíduos de *Petunia axillaris*, *P. exserta* e seus híbridos interespecíficos..

Cromossomo	Locus	Sequência dos Primers	Ta (°C)	Repetição
I	PM188	D: CCCAACCATTGGCTACAGCC R: GGACAACACAATACAATCTCTGC	51	(CTT) ₈
I	PM195	D: GCCTTTCGCCGCTGTCCTG R: GAGCAAATCGTGACCGTTGG	50	(GAA) ₆
II	PM21	D: CTACCGGTAGGCAGTAGTTGC R: CCTCGACCTTCTTCCTGAC	50.5	(TAC) ₈
IV	PM8	D: TCTGCAAACCTCAAAGCCAA R: ACATGCCATGCACTTTTGAG	50	(AAGA) ₁₀
IV	PM173	D: CAGCGCTATCAACAGCAG R: GTGAGAGGCAAGTGATTGG	51	(GCA) ₆
V	PM167	D: CTCACTAACCAACTTCACC R: CTAAGAAGCTTAAGAGTG	52	(TTC) ₁₂
V	PM177	D: CCCTTACTCTCTTCTTCACC R: GAACTATGAACCATAGCTCTC	50	(CA) ₁₁

Ta – Temperatura de anelamento

Análises estatísticas

Diversidade genética

Análises estatísticas descritivas como o número de alelos (N), número de alelos privados (E), riqueza alélica (R), diversidade genética (GD), variação de tamanho alélico e o coeficiente de endogamia (F_{IS} ; WEIR & COCKERHAM, 1984) foram calculadas utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Valores de heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram testados com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (EXCOFFIER & LICHER, 2010), assim como a Análise da Variância Molecular com 10.000 permutações (AMOVA; EXCOFFIER *et al.*, 1992). Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados com correção de Bonferroni também no ARLEQUIN. Nestas análises nós consideramos de forma independente as populações das zonas de contato, CO1 e CO2, por ano de amostragem, e as populações isoladas de cada espécie como grupos (PeIS e PaIS).

Padrões de mistura genética para detecção de híbridos

Para identificar grupos genéticos e híbridos foi realizada uma análise Bayesiana de agrupamento no software STRUCTURE 2.3.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000), assumindo frequências alélicas correlacionadas. O número de grupos (K) foi avaliado de 1 a 10 com 10 corridas independentes por valor de K. Foram utilizadas 1.000.000 repetições de Cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC), sendo as primeiras 250.000 descartados como *burn in*. O melhor valor de K foi obtido por ΔK (EVANNO *et al.*, 2005) utilizando o programa STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (EARL & VON HOLDT, 2012). Os indivíduos foram classificados de acordo com metodologia proposta por BURGARELLA *et al.* (2009), de forma que indivíduos com $q \geq 0.90$ foram classificados como *P. axillaris*, aqueles com $q \leq 0.10$ como *P. exserta* e todos com $0.10 < q < 0.90$ como híbridos.

Comparação entre diferentes gerações e correlação genótipo/fenótipo

Os índices de diversidade e a proporção de híbridos em relação aos de morfologia típica de cada espécie foram comparados através de um teste de Kruskal–Wallis usando o software IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0. O perfil genético de cada indivíduo baseado

no padrão de amplificação dos microssatélites (genótipo) foi correlacionado com a cor da corola. Para tanto, os indivíduos foram classificados de acordo com seu padrão RGB (red-green-blue color chart) de coloração da corola variando de vermelho puro (morfologia de *P. exserta*) a branco (coloração de *P. axillaris*) e cinco classes de cores intermediárias (conforme M.C. TEIXEIRA, comunicação pessoal; Figura 2).



Figura 2. Variação na coloração das flores de *P. exserta* (margem esquerda), híbridos A a E e *P. axillaris* (margem direita) encontradas nas zonas de contato. Plantas de *P. exserta* e *P. axillaris* das populações alopátricas apresentaram coloração uniforme, vermelha ou branca, respectivamente.

RESULTADOS

Diversidade genética

Os sete loci aqui estudados foram polimórficos tanto para as populações isoladas das duas espécies como em ambas as áreas de co-ocorrência (Tabela 3; Anexo 1). Nas populações isoladas de *P. axillaris* foram encontrados em média sete alelos por locus, sendo um total de oito alelos exclusivos desta espécie. Já as populações isoladas de *P. exserta* não apresentaram alelos exclusivos e a média de alelos por locus foi significativamente menor que em *P. axillaris*. A diversidade genética média, considerando todos os loci, foi maior PaIS que em PeIS, enquanto que a riqueza alélica foi equivalente em ambas as espécies. Em ambas as espécies diversos loci estiveram em desequilíbrio de Hardy-Weinberg em virtude do déficit de heterozigotos. O coeficiente de endogamia foi elevado em ambas as espécies, com o F_{IS} em *P. exserta* sendo em média cerca de duas vezes maior que em *P. axillaris*.

Considerando de forma independente as duas zonas de co-ocorrência em cada uma das gerações analisadas, CO1 em 2011 apresentou em média seis alelos por locus, sendo três alelos não identificados nas populações isoladas de *P. axillaris* ou *P. exserta* ou mesmo em CO2 neste ano. Por sua vez, CO2 em 2011 apresentou uma média de cinco alelos por locus, com apenas um alelo não ainda identificado. A riqueza alélica foi equivalente entre os dois sítios de coleta. Da mesma forma, a diversidade genética não foi diferente nos sítios CO1 e em CO2 no ano de 2011, que apresentaram diversos loci em desequilíbrio de Hardy-Weinberg por déficit de heterozigotos e elevados valores de F_{IS} , sendo este maior em CO1 que em CO2.

Na geração de 2015, não houve diferença significativa no número médio de alelos comparado com a geração de 2011 em ambas CO1 e CO2, mas novos alelos foram identificados nestes dois sítios. Não houve diferenças significativas na diversidade genética e na riqueza alélica nas duas zonas de co-ocorrência comparando as duas gerações, tanto em CO1 como em CO2. Na geração de 2015, CO1 e CO2 apresentaram valores equivalentes de riqueza alélica, mas CO1 apresentou maior diversidade genética que CO2. Novamente, ambos os sítios apresentaram-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, devido ao excesso de homozigotos, e elevados valores de F_{IS} , sendo agora o maior valor deste encontrado em CO2.

Todas as comparações acima descritas foram feitas usando o teste de Kruskal–Wallis ($\alpha = 0,05$).

Tabela 3. Diversidade genética média por população

	PaIS	PeIS	CO1		CO2	
			2011	2015	2011	2015
N	50	35	44	43	36	34
E	8	0	3	5	1	3
R	5,76	4,24	5,91	6,12	5,13	4,86
GD	0,66	0,49	0,70	0,74	0,51	0,61
F_{IS}	0,38	0,73	0,57	0,49	0,51	0,56

PaIS - *P. axillaris* isolada; PeIS - *P. exserta* isolada; CO - sítios de co-ocorrência; N - total de alelos encontrados; E - total de alelos privados; R - riqueza alélica média; GD - diversidade genética; F_{IS} - coeficiente de endogamia médio.

Estrutura populacional

Na análise da estruturação da diversidade genética pelo teste de AMOVA comparando as populações isoladas de cada espécie e os sítios de contato considerando a geração de 2011, observa-se que a maior diferenciação genética é devida à diferenciação entre indivíduos dentro das populações (76,31%), com um $F_{ST} = 0,23$ ($P < 0,05$). Da mesma forma que em relação à geração de 2015 (78,76%) com $F_{ST} = 0,21$ ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa na comparação das duas gerações considerando os valores de F_{ST} .

Os indivíduos das zonas de contato foram classificados de acordo com a cor da corola usando uma tabela RGB em *P. exserta* (vermelhos), *P. axillaris* (brancos) e cinco classes de híbridos (cores intermediárias, de rosa escuro a rosa claro; Figura 2) e identificados por ano de coleta ou geração (Figura 3, Tabela 4). As variações no número de indivíduos adultos nas zonas de contato de uma geração para a outra e entre as zonas considerando a mesma geração não foram significativas. Na CO1 houve a predominância de indivíduos com a morfologia de

P. axillaris em ambas as gerações, enquanto que em CO2 a morfologia de *P. exserta* foi prevalente tanto em 2011 como em 2015. Em 2011, os indivíduos de coloração intermediária foram igualmente numerosos em CO1 e em 2015 em CO2. As cinco classes de híbridos foram observadas nas duas gerações e nos dois pontos em proporções variadas, com exceção do híbrido B, observado apenas na CO2 em ambas as gerações.

A análise Bayesiana da composição genética dos indivíduos e grupos (Figura 4) indicou hibridização entre *P. axillaris* e *P. exserta* em ambas as zonas de contato para as duas gerações analisadas, 2011 e 2015. Foram considerados híbridos, independentemente da morfologia floral, aqueles indivíduos que apresentaram componentes genéticos na faixa de $0,1 < q < 0,9$, sendo $q \geq 0,90$ *P. axillaris* e $q \leq 0,10$ como *P. exserta*.

Na geração de 2011, foram identificados cinco indivíduos híbridos (20% dos indivíduos) em CO1 e apenas três (17% dos indivíduos) na zona de contato CO2. Em 2015, na CO1 foram identificados apenas dois indivíduos híbridos (9%) do total desta zona de contato e, em CO2, novamente três indivíduos preencheram os critérios para serem considerados híbridos (13%). Não houve correspondência entre a classificação genética e a classificação morfológica baseada na cor da corola.

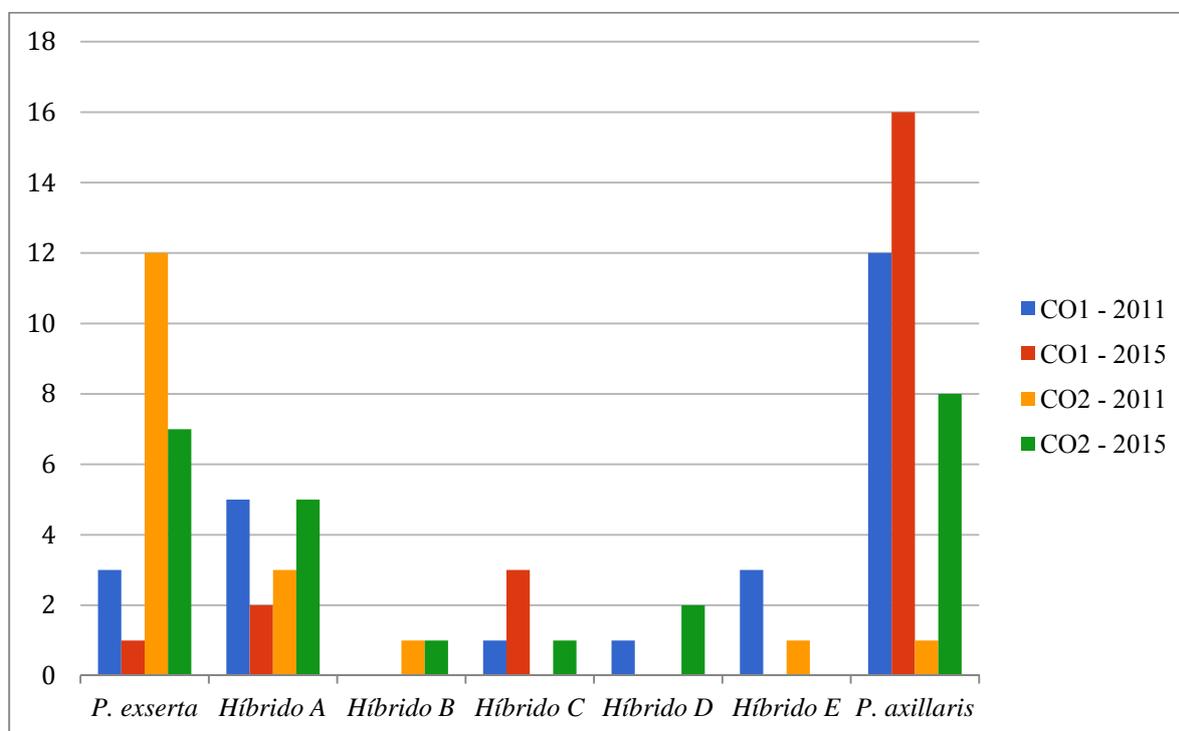


Figura 3. Histograma da classificação da coloração da corola entre os morfotipos típicos e as classes de híbridos em cada população de co-ocorrência e geração.

Tabela 4. Classificação morfológica dos indivíduos nas zonas de contato baseada na classificação da cor da corola por ano de amostragem.

População	Coleta de 2011		Coleta de 2015	
	Código	Classificação	Código	Classificação
CO1	1A	<i>P. axillaris</i>	1B	<i>P. axillaris</i>
	2A	Híbrido A	2B	<i>P. axillaris</i>
	3A	<i>P. axillaris</i>	3B	<i>P. axillaris</i>
	4A	<i>P. axillaris</i>	4B	<i>P. axillaris</i>
	5A	<i>P. axillaris</i>	5B	<i>P. axillaris</i>
	6A	<i>P. axillaris</i>	6B	<i>P. axillaris</i>
	7A	<i>P. exserta</i>	7B	<i>P. axillaris</i>
	8A	Híbrido D	8B	<i>P. axillaris</i>
	9A	<i>P. axillaris</i>	9B	<i>P. axillaris</i>
	10A	Híbrido A	10B	<i>P. axillaris</i>
	11A	<i>P. axillaris</i>	11B	<i>P. axillaris</i>
	12A	Híbrido E	12B	<i>P. axillaris</i>
	13A	<i>P. axillaris</i>	13B	<i>P. axillaris</i>
	14A	<i>P. exserta</i>	14B	<i>P. axillaris</i>
	15A	Híbrido A	15B	<i>P. axillaris</i>
	16A	Híbrido A	16B	<i>P. axillaris</i>
	17A	Híbrido A	17B	<i>P. exserta</i>
	18A	<i>P. exserta</i>	18B	Híbrido C
	19A	<i>P. axillaris</i>	19B	Híbrido A
	20A	Híbrido E	20B	Híbrido C
	21A	Híbrido E	21B	Híbrido A
	22A	Híbrido C	22B	Híbrido C
	23A	<i>P. axillaris</i>		
	24A	<i>P. axillaris</i>		
	25A	<i>P. axillaris</i>		
Total indivíduos	25		22	
CO2	26A	<i>P. exserta</i>	23B	<i>P. axillaris</i>
	27A	<i>P. exserta</i>	24B	<i>P. axillaris</i>
	28A	<i>P. exserta</i>	25B	<i>P. axillaris</i>
	29A	<i>P. exserta</i>	26B	<i>P. axillaris</i>
	30A	Híbrido A	27B	<i>P. axillaris</i>
	31A	Híbrido B	28B	<i>P. axillaris</i>
	32A	<i>P. exserta</i>	29B	<i>P. axillaris</i>
	33A	<i>P. exserta</i>	30B	<i>P. axillaris</i>
	34A	<i>P. exserta</i>	31B	<i>P. exserta</i>
	35A	<i>P. exserta</i>	32B	<i>P. exserta</i>
	36A	<i>P. exserta</i>	33B	<i>P. exserta</i>
	37A	Híbrido A	34B	<i>P. exserta</i>
	38A	<i>P. exserta</i>	35B	<i>P. exserta</i>
	39A	Híbrido A	36B	<i>P. exserta</i>
	40A	<i>P. exserta</i>	37B	<i>P. exserta</i>
	41A	Híbrido E	38B	Híbrido A
	42A	<i>P. exserta</i>	39B	Híbrido A
	43A	<i>P. axillaris</i>	40B	Híbrido D
			41B	Híbrido B
			42B	Híbrido C
			43B	Híbrido A
			44B	Híbrido A
		45B	Híbrido D	
		46B	Híbrido A	
Total indivíduos	18		24	

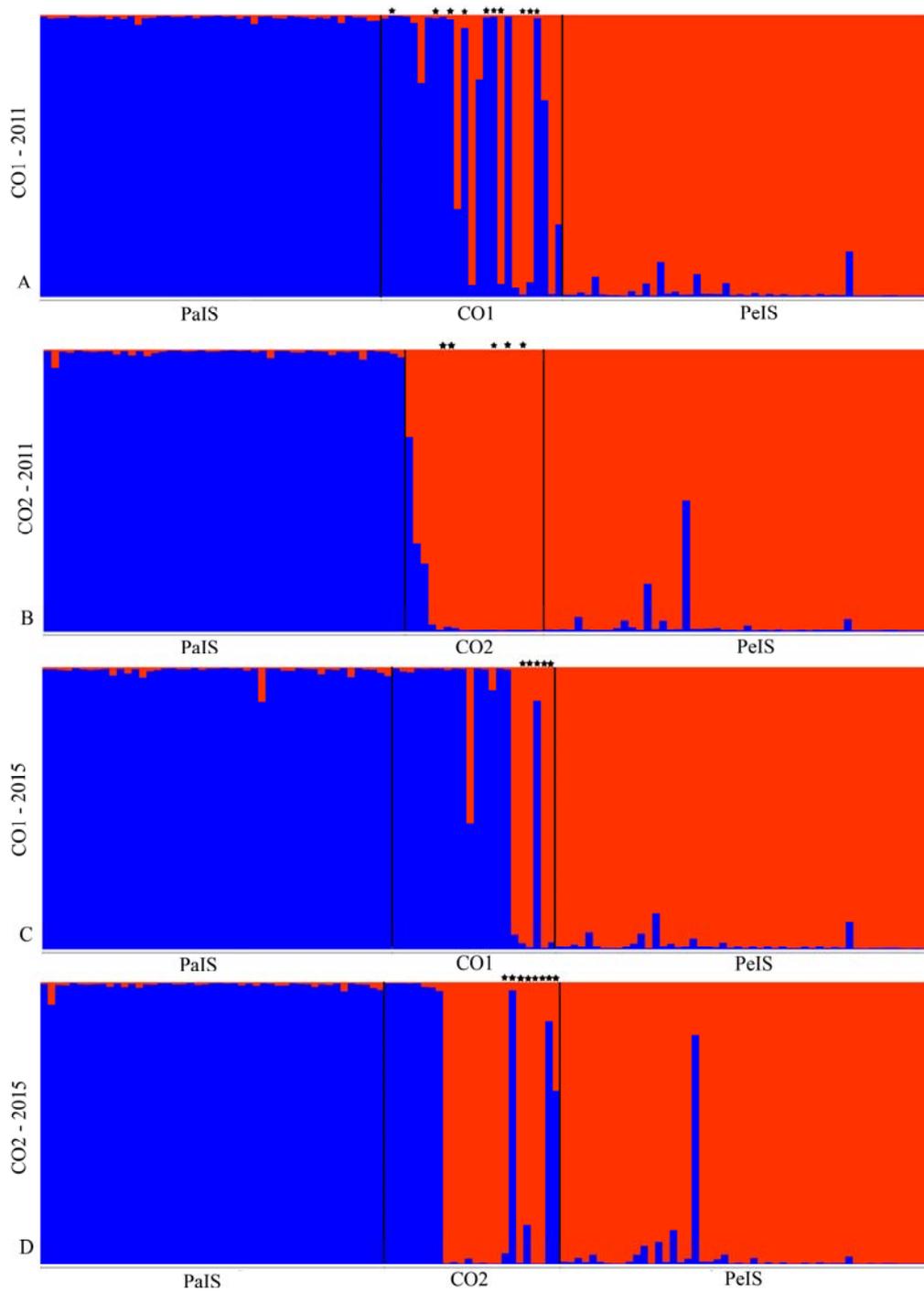


Figura 4. Estrutura populacional como observada através da análise de agrupamento Bayesiano a partir de dados de microssatélites para as populações isoladas de *P. axillaris* e *P. exserta* e seus híbridos de duas zonas de contato em duas gerações de coleta (2011 e 2015). Indivíduos assinalados com * indicam morfologia intermediária da corola observada pela cor. Barras verticais separam as populações e diferentes cores indicam os componentes genéticos de acordo com o melhor valor de K (K = 2).

DISCUSSÃO

A região da Serra do Sudeste apresenta uma grande quantidade de espécies endêmicas (GUADAGNIN *et al.*, 2000; PAZ *et al.*, 2008) e tem sido descrita, particularmente no caso do gênero *Petunia*, como um dos centros de diversidade do grupo (STEHMANN *et al.*, 2009). Nesta região são encontradas quatro espécies de *Petunia* que representam todas as síndromes florais do gênero, *P. axillaris* (esfingófila; VENAIL *et al.*, 2010), *P. exserta* (ornitófila; LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006), *P. secreta* e *P. integrifolia*, ambas melitófilas mas com alta divergência em seus polinizadores efetivos (RODRIGUES *et al.*, 2018a, b). Ainda nesta região podem ser encontrados híbridos interespecíficos envolvendo pelo menos três destas espécies (C. TURCHETTO *et al.*, comunicação pessoal).

Diversos trabalhos tem sido conduzidos para caracterizar genética (LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006; SEGATTO *et al.*, 2014; TURCHETTO *et al.*, 2014a; 2015b; 2016) e morfológicamente (M.C. TEIXEIRA *et al.*, dados não publicados) as espécies de *Petunia* da região, com o objetivo principal de elucidar os padrões e processos de diversificação do gênero e o papel da biologia reprodutiva para tanto (FREGONEZI *et al.*, 2013). Até o momento, este é o primeiro trabalho a traçar uma avaliação da diversidade genética ao longo do tempo, considerando que estas espécies são anuais. Aqui nós descrevemos a diversidade genética em dois sítios onde, comprovadamente, ocorrem cruzamentos interespecíficos entre *P. axillaris* e *P. exserta* considerando duas gerações de cruzamentos que resultaram na produção de indivíduos com morfologia atípica, intermediária entre as espécies, nos anos de 2011 e 2015, através de marcadores genéticos altamente variáveis e informativos para identificar híbridos (TURCHETTO *et al.*, 2015b). Nós também comparamos esta diversidade com populações isoladas compostas apenas por indivíduos de morfologia típica de cada espécie.

Nossos resultados indicaram que os sítios de contato se diferenciam entre si e em relação às espécies em seus sítios isolados, confirmaram a diferenciação genética entre as espécies e ainda revelaram elevados níveis de endocruzamento em todas as populações analisadas. O endocruzamento em zonas de contato entre espécies diferentes tem sido apontado por diversos autores como uma estratégia das espécies para manterem seus limites e evitarem a introgressão (LOWE & ABBOTT, 2004; MARTIN & WILLIS, 2007), sendo isto inclusive já apontado para as espécies aqui descritas (SEGATTO *et al.*, 2014; TURCHETTO *et al.*, 2015a). Além disso, o endocruzamento, principalmente a autofecundação, pode ser

considerado como uma estratégia altamente efetiva para o estabelecimento de espécies ou linhagens na colonização de novos ambientes (KAMRAN-DISFANI & AGRAWAL, 2014).

Petunia axillaris é descrita como auto-incompatível na maior parte de sua distribuição (ANDO *et al.*, 1998; KOKUBUN *et al.*, 2006), mas na região das Guaritas, em simpatria com *P. exserta*, a espécie apresenta elevados níveis de endocruzamento (TURCHETTO *et al.*, 2015b). Da mesma forma, *P. exserta* é uma espécie de elevados índices de endocruzamento (C. TURCHETTO *et al.*, comunicação pessoal), podendo inclusive se autofecundar (M.C. TEIXEIRA *et al.*, comunicação pessoal).

Além do endocruzamento e autofecundação que resultariam nos níveis de estruturação e diferenciação populacional, a forma com as sementes de *Petunia* são dispersas, caindo próximas à planta-mãe (processo de barocoria; VAN DER PIJL, 1982), a dormência secundária já descrita para *P. hybrida* (GIRARD, 1990) e a formação de bancos de sementes multigeracionais (D.M. RODRIGUES *et al.*, comunicação pessoal) poderiam explicar a diversidade genética encontrada nestas espécies e populações.

Embora com síndromes florais bastante diferenciadas de acordo com as características morfológicas de *P. axillaris* e *P. exserta*, respectivamente, alguns resultados e observações apontam que existe uma grande complexidade na interação entre planta e seus polinizadores no gênero (RODRIGUES *et al.*, 2018a). Beija-flores que são tidos como os polinizadores efetivos de *P. exserta* (LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006; STEHMANN *et al.*, 2009) tem a alta capacidade de aprendizado (GRANT & TEMELES, 1992), sendo vistos muitas vezes coletando néctar em plantas cuja síndrome floral não é aquela tradicionalmente ligada a estes animais (CRONK & OJEDA, 2008). Nosso grupo dispõe de diversas observações de beija-flores visitando e coletando néctar em populações de *P. axillaris* ao longo de sua distribuição, embora não tenhamos evidências da polinização efetiva destas plantas ou da possibilidade destes animais terem capturado pólen. Por outro lado, recentemente, membros do nosso grupo obtiveram resultados da resposta à luz ultravioleta de flores das diferentes classes de híbridos aqui analisadas e verificaram que pelo menos três delas (C, D e E) poderiam ser identificadas por insetos noturnos como as mariposas que polinizam *P. axillaris*. Nada se sabe até o momento sobre a produção de aroma floral nos híbridos, que é a característica principal de *P. axillaris* na atração das mariposas *Manduca sexta* (KLAHRE *et al.*, 2011; AMRAD *et al.*, 2016).

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam estabilidade na diversidade genética

das populações dos dois sítios de co-ocorrência e mostram que, embora a hibridação interespecífica tenha sido responsável em ambos pela constituição genética, os mecanismos de estabelecimento são diferentes. Observou-se uma maior proximidade genética entre os indivíduos de CO2 e *P. exserta*. O sítio de CO2 se encontra geograficamente muito próximo de outras populações de *P. exserta* (SEGATTO *et al.*, 2014) e mais distante de populações de *P. axillaris* (TURCHETTO *et al.*, 2015b), o que poderia explicar um aumento nos retrocruzamento com *P. exserta* e uma prevalência de seu componente genético entre as plantas de morfologia intermediária. Já o sítio CO1 é uma torre mais isolada em relação às demais da área, não havendo outras populações de *P. exserta* próximas.

Eventos recentes de hibridação interespecífica ficaram evidenciados na presença de híbridos de primeira geração, assim como eventos antigos que foram observados pela introgressão em ambas as espécies nas zonas de contato, quando os resultados genéticos e morfológicos são comparados. A introgressão foi mais frequentemente observada em *P. exserta* e diferentes condições podem ser levantadas para explicar isto. Já foram descritas diferenças na produção de sementes em relação à direção dos cruzamentos entre estas espécies, sendo *P. axillaris* doadora de pólen e *P. exserta* a planta mãe a melhor das combinações (WATANABE *et al.*, 2001). Uma outra hipótese é de que seleção pelo ambiente onde os híbridos se desenvolvem possa estar atuando, considerando que os indivíduos com morfologia intermediária sempre foram encontrados no interior das cavernas, um ambiente onde apenas *P. exserta* se desenvolve (STEHMANN *et al.*, 2009). Por fim, a seleção exercida pelos polinizadores não pode ser descartada e estes podem estar promovendo fluxo gênico unidirecional baseado nas características tanto das espécies como das diferentes classes de híbridos, como descrito para outras espécies em situações semelhantes (CRUICKSHANK *et al.*, 2014). Também, o resultado observado pode ser a combinação de todas estas hipóteses, resultando no padrão de cruzamentos interespecíficos e introgressão recorrentes na formação de duas zonas de contato persistentes e estáveis, com características próprias e diferenciadas, influenciando na diversidade de duas espécies bem estabelecidas em uma região de simpatria.

Este estudo levantou diversas questões que deverão ser abordadas em estudos futuros na região, tanto do ponto de vista genético-molecular como da morfologia e biologia reprodutiva das espécies envolvidas e de seus híbridos na zona de contato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMRAD, A., et al. Gain and loss of floral scent production through changes in structural genes during pollinator-mediated speciation. **Current Biology**, v. 26, p. 3303–3312, 2016.

ANDO, T. Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 47, p. 19-30, 1996.

ANDO, T., et al. Differentiation in the degree of self-incompatibility in *Petunia axillaris* (Solanaceae) occurring in Uruguay. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 49, p. 37–47, 1998.

APG - THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

BOSSOLINI, E., et al. High-resolution linkage maps of the model organism *Petunia* reveal substantial synteny decay with the related genome of tomato. **Genome**, v. 54, p. 327-340, 2011.

BURGARELLA, C., et al. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). **Journal of Heredity**, v. 102, p. 442–452, 2009.

CABRERA, A.L.; WILLINK, A. **Biogeografia da America Latina**, 2. ed. OEA, Washington, 1980.

CRONK, Q.; OJEDA, I. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 715–727, 2008.

CRUICKSHANK, T.E.; HAHN, M.W. Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3133-3157, 2014.

EARL, E.A.; VON HOLDT, B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetic Resources**, v. 4, p. 359–361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FENSTER, C.B., et al. Pollination syndromes and floral specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, p. 375-403, 2004.

FREGONEZI, J.N., et al. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, p. 140-153, 2013.

GIRARD, J. Study of the inheritance of seed primary dormancy and the ability to enter secondary dormancy in *Petunia*: influence of temperature, light and gibberellic acid on dormancy. **Plant Cell and Environment**, v. 13, p. 827-832, 1990.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GRANT V & TEMELES EJ Foraging ability of rufous hummingbirds on hummingbirds flowers and hawkmoth flowers. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 9400- 9404, 1992.

GUADAGNIN, D.L.; LARocca, J.; SOBRAL, M. Flora vascular de interesse para a conservação na bacia do arroio João Dias: avaliação ecológica rápida. In: **Minas do Camaquã, um estudo multidisciplinar**, Ronchi LH e Lobato AOC (eds). UNISINOS, São Leopoldo, p. 71- 84, 2000.

HERMANN, K.; KUHLEMEIER, C. The genetic architecture of natural variation in flower morphology. **Plant Biology**, v. 14, p. 60-65, 2011.

HOLZ, M. **Do mar ao deserto: a evolução do Rio Grande do Sul no tempo geológico**. 1. ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) Mapa de Biomas. ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas_murais/biomas.pdf (13 agosto 2018)

KAMRAN-DISFANI, A.; AGRAWAL, A.F. Selfing, adaptation and background selection in finite populations. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, p. 1360-1371, 2014.

KLAHRE, U., et al. Pollinator choice in *petunia* depends on two major genetic loci for floral scent production. **Current Biology**, v. 21, p. 730-739, 2011.

KOKUBUN, H., et al. Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. **Journal of Plant Research**, v. 119, p. 419-43, 2006.

LEITE, P.F.; KLEIN, R.M. Vegetação. In: **Geografia do Brasil: Região Sul** ed. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, p. 113-150, 1990.

LORENZ-LEMKE, A.P., et al. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 4487-4497, 2006.

LOWE, A.J.; ABBOTT, R.J. Reproductive isolation of a new hybrid species, *Senecio*

eboracensis Abbott & Lowe (Asteraceae). **Heredity**, v. 92, p. 386–395, 2004.

MALLET, J. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidences for the ease of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, p. 2971–2986, 2008.

MARTIN, N.H.; WILLIS, J.H. Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric *Mimulus* species. **Evolution**, v. 61, p. 68–82, 2007.

OLMSTEAD, R.G. Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, p. 80-102, 2013.

OVERBECK, G.E., et al. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v.9, p.101–116, 2007.

PAIM, P.S.G.; CHEMALE, F.; LOPES, R.C. A Bacia do Camaquã. In: Holz, M.; Rios, L.F. (eds) **Geologia do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 231-274, 2000.

PAZ, A.L.G.; ROMANOWSKI, H.P.; MORAIS, A.B.B. Nymphalidae, Papilionidae e Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea) da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotropical**, v. 8, p. 141- 149, 2008.

PILLAR, V.D.; LANGE, O. (Org) **Os Campos Do Sul**. 1^a ed. Porto Alegre: Rede Campos Sulinos - UFRGS, 2015.

PILLAR, V.D., et al. (Org) **Campos Sulinos Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade**, 1^a ed., Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 175–198, 2009.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.

RECK-KORTMANN, M., et al. Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 81, p. 19-28, 2014.

RODRIGUES, D.M., et al. Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? **AoB Plants**, v. 10, ply057, 2018a.

RODRIGUES, D.M., et al. Can the reproductive system of a rare and narrowly endemic plant species explain its high genetic diversity? **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, p. 180-187, 2018b.

ROY, A., et al. Segregating Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 173–180, 1992.

SCHMID, R.; HUNZIKER, T.A. Genera Solanacearum: The Genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System. **Taxon**, v. 50, p. 1294-1295, 2001.

SEGATTO, A.L.A., et al. Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic

identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 70, p. 504-512, 2014.

SINK, K.C. *Petunia*. In: Sink, K.C. (ed) **Petunia** Monographs on Theoretical and Applied Genetics, Berlin, p. 3-9, 1984.

STEHMANN, J.R., et al. The genus *Petunia*. In: Gerats, T.; Strommer, J. (eds). **Petunia. Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics**, Springer, New York, p. 1-28, 2009.

STEHMANN, J.R. *Petunia exserta* (Solanaceae): Uma nova espécie do Rio Grande do Sul, Brasil. **Napaea**, v. 2, p. 19-21, 1987.

STEHMANN, J.R. **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*. Tese (Doutorado em Ciências - Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. The role of hybridization in plant speciation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 561–588, 2009.

TEIXEIRA, M.B., et al. Vegetação. In: **Levantamento de recursos naturais**. IBGE, Rio de Janeiro, p. 541-620, 1986.

TURCHETTO, C., et al. Diversification in the South American Pampas: The genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). **Molecular Ecology**, v. 23, p. 374-389, 2014a.

TURCHETTO, C., et al. Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: A comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 16, p. 75-82, 2014b.

TURCHETTO, C., et al. Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 115, p. 939-948, 2015a.

TURCHETTO, C., et al. Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. **AoB Plants**, v. 7, plv084, 2015b.

TURCHETTO, C., et al. High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: implications for conservation. **AoB Plants**, v. 8, plw002, 2016.

VAN DER PIJL, L. **Principles of dispersal in higher plants**. 3. ed. Springer-Verlag, New York, p. 217, 1982.

VENAIL, J.; DELL'OLIVO, A.; KUHLEMEIER, C. Speciation genes in the genus *Petunia*. **Philosophical Transactions of the Royal society**, v. 365, p. 461–468, 2010.

WAECHTER, J.L. Padrões geográficos na flora atual do Rio Grande do Sul. **Ciência &**

Ambiente, v. 24, p. 93-108, 2002.

WATANABE, H., et al. Cross-compatibility of *Petunia exserta* with other *Petunia* taxa. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 70, p. 33–40, 2001.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

WU, F.; TANKSLEY, S.D. Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. **BMC Genomics**, v. 11, p. 182-193, 2010.

Anexo 1

Índices de diversidade genética por população e ano a partir dos dados obtidos com sete marcadores microssatélites

Pop	Locus	Cr	SR	E	N	GD	R	H _O	H _E	F _{IS}
Pa15	PM177	V	202-256	4	18	0,76	11,71	0,63	0,76	0,16
	PM188	I	124-145	1	8	0,83	7,46	0,46	0,83*	0,44
	PM195	I	199-214	0	4	0,57	3,62	0,22	0,56*	0,6
	PM21	II	125-131	0	3	0,6	2,99	0,42	0,6*	0,26
	PM8	IV	163-183	0	4	0,65	3,98	0,38	0,64*	0,41
	PM167	V	291-306	1	6	0,7	5,33	0,44	0,7*	0,36
	PM173	IV	154-178	2	7	0,51	5,19	0,29	0,51*	0,42
Pe15	PM177	V	212-256	0	11	0,87	9,3	0,17	0,86*	0,79
	PM188	I	124-139	0	5	0,32	3,81	0,08	0,31*	0,75
	PM195	I	175-214	0	4	0,18	3,03	0,03	0,18*	0,78
	PM21	II	125-137	0	3	0,42	2,33	0,09	0,42*	0,77
	PM8	IV	175-179	0	2	0,26	1,99	0,03	0,26*	0,85
	PM167	V	294-306	0	4	0,59	3,68	0,15	0,59*	0,73
	PM173	IV	166-196	0	6	0,75	5,53	0,27	0,75*	0,63
CO1 2011	PM177	V	214-250	1	10	0,84	8,74	0,37	0,83*	0,55
	PM188	I	121-142	0	6	0,62	5,84	0,12	0,61*	0,8
	PM195	I	193-214	1	6	0,78	5,83	0,33	0,77*	0,57
	PM21	II	125-137	0	4	0,46	3,9	0,24	0,46*	0,48
	PM8	IV	163-183	0	4	0,7	3,91	0,45	0,7*	0,35
	PM167	V	279-303	1	7	0,68	6,54	0,2	0,67*	0,69
	PM173	IV	166-196	0	7	0,83	6,58	0,36	0,82*	0,56
CO2 2011	PM177	V	212-256	1	9	0,77	9	0,29	0,76*	0,62
	PM188	I	121-136	0	5	0,65	4,99	0,05	0,63*	0,91
	PM195	I	175-214	0	5	0,36	5	0,29	0,36	0,2
	PM21	II	125-137	0	3	0,44	2,99	0,11	0,43*	0,75
	PM8	IV	163-179	0	3	0,47	3	0,33	0,47	0,3
	PM167	V	285-306	0	6	0,72	5,94	0,5	0,72*	0,31
	PM173	IV	166-196	0	5	0,65	5	0,41	0,64*	0,36
CO1 2015	PM177	V	212-258	1	11	0,9	11	0,52	0,89*	0,42
	PM188	I	124-142	0	6	0,73	6	0,57	0,73*	0,22
	PM195	I	193-214	0	5	0,71	4,99	0,09	0,69*	0,87
	PM21	II	125-131	0	3	0,55	3	0,38	0,55	0,31
	PM8	IV	163-183	0	4	0,72	4	0,27	0,71*	0,62
	PM167	V	279-309	4	9	0,77	8,86	0,31	0,76*	0,59
	PM173	IV	166-196	0	5	0,78	5	0,45	0,77*	0,42
CO2 2015	PM177	V	212-256	0	10	0,82	9,56	0,39	0,81*	0,52
	PM188	I	124-142	0	5	0,56	4,86	0,31	0,55*	0,43
	PM195	I	190-214	1	5	0,67	4,98	0,2	0,66*	0,69
	PM21	II	119-128	1	3	0,51	2,87	0,2	0,5*	0,59
	PM8	IV	175-179	0	2	0,5	2	0,16	0,49*	0,66
	PM167	V	291-306	0	4	0,58	5	0,28	0,57*	0,51
	PM173	IV	166-199	1	5	0,61	4,75	0,29	0,6*	0,52

Pop – código da população; Cr – localização cromossômica; SR – variação no tamanho dos alelos em pares de bases; E – número de alelos privados; N – número total de alelos; GD – diversidade genética; R – riqueza alélica; H_O – heterozigosidade observada; H_E – heterozigose esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{IS} – coeficiente de endogamia; * valores significativos de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni (P < 0,05).