

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

Hibridação e especiação em *Petunia* e grupos relacionados: uma abordagem filogenômica

Pedro Henrique Pezzi
Orientadora: Prof.^a Dr.^a 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 Genética e Biologia Molecular.**

Porto Alegre
Outubro de 2023

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no laboratório da Professora Doutora Stacey Smith na Universidade do Colorado em Boulder (Boulder, Colorado, EUA). O trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PRONEX) e pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM). A bolsa de doutorado foi concedida pelo CNPq e a bolsa de doutorado no exterior pela CAPES-PRINT/UFRGS.

Agradecimentos

Agradeço às agências de fomento CNPq pela bolsa de doutorado e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche.

À European Society of Evolutionary Biology (ESEB) e à Society for the Study of Evolution (SSE) pelos auxílios financeiros para participar de eventos científicos e financiar projetos.

À minha orientadora Loreta por ter confiado em mim e por todas as oportunidades que me proporcionou. Foram muitos ensinamentos e discussões enriquecedoras que, com certeza, levarei para toda minha carreira científica.

Ao PPGBM, ao Elmo e ao Gabriel por toda assistência e ajuda durante esses anos de doutorado.

A todo o pessoal do LEM que esteve presente por algum momento nesses quatro anos: Aléxia, Alice, Analu, Carol Schnitzler, Carol Turchetto, Clarissa, Clênio, Geraldo, Giovanna, João Pedro, Luana, Luize e Sebastián. Pelos bolos, cafezinhos, fofocas, colaborações e risadas compartilhadas.

À professora Stacey Smith e aos membros do laboratório (Agnes, Chelsea, Jes, Jesse, Kyle, Luke e Sukuan) pela ótima recepção e pelas colaborações.

À Martha pela hospitalidade, amizade, caronas e viagens pelo Colorado durante os seis meses do sanduíche.

À Aisha e à Penélope, por manterem um pouco da minha sanidade durante os piores períodos da pandemia.

Aos meus amigos fora da academia pelo incentivo, risadas, abraços e momentos compartilhados.

A todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para que esse projeto fosse possível.

Ao Leonardo por todo apoio, incentivo, conhecimentos compartilhados e pela paciência. Mesmo com a distância física que a academia pode causar às vezes, sempre estivemos perto.

À minha família por todo suporte durante esses anos. Esse trabalho não seria possível sem o imenso incentivo e apoio deles. Amo vocês!

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Objetivos.....	15
<i>Objetivo geral</i>	15
<i>Objetivos específicos</i>	15
Capítulo 1	16
<i>A convoluted tale of hybridization between two Petunia species from a transitional zone in South America</i>	16
Capítulo 2	18
<i>Natural hybridization and the evolutionary dynamics of southern South American grasslands species under climate changes and habitat fragmentation</i>	18
Capítulo 3	20
<i>How do novel species arise in a biodiversity hotspot? Unraveling the hybridization and rapid speciation processes in Petunia</i>	20
Capítulo 4	22
<i>How does hybridization impact species delimitation? Insights from the Petunia long corolla tube clade</i>	22
Capítulo 5	24
<i>Incomplete lineage sorting and hybridization as drivers of tree discordance in Petunia and related genera (Petunieae, Solanaceae)</i>	24
Considerações finais	26
Referências – Introdução e Considerações finais	30

Resumo

Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA, pudemos perceber que a hibridação entre linhagens evolutivas distintas é muito mais frequente do que imaginávamos, desempenhando um papel fundamental na diversificação das espécies. Os efeitos da hibridação abrangem um espectro amplo de consequências, podendo tanto levar espécies à extinção devido à ruptura genética, quanto introduzir alelos adaptativos, permitindo a colonização de novos ambientes. Nesta tese, nosso objetivo foi investigar o papel da hibridação na história evolutiva do gênero *Petunia* e seus gêneros relacionados, *Calibrachoa* e *Fabiana*. *Petunia* é um sistema modelo para estudos em filogeografia e especiação na América do Sul devido à ampla distribuição e grande diversidade de espécies. Para atingir nossos objetivos, utilizamos dados de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP; *single nucleotide polymorphisms*) obtidos por meio do *genotyping-by-sequencing* (GBS) e transcriptomas de diversas espécies. Cada capítulo abordou o tema sob diferentes perspectivas: no capítulo 1, investigamos a hibridação em duas espécies do clado de tubo curto da corola em uma área de transição entre biomas; no capítulo 2, analisamos a hibridação entre duas subespécies de *P. axillaris* e as consequências para sua conservação em um cenário de mudanças climáticas; no capítulo 3, investigamos a possível origem híbrida de uma população com variação na coloração da corola e discutimos o processo de especiação em um *hotspot* de *Petunia*; no capítulo 4, examinamos os efeitos da amostragem de híbridos na delimitação de espécies; e no capítulo 5, utilizamos dados transcriptômicos de espécies de *Petunia*, *Calibrachoa* e *Fabiana* para compreender as razões por trás da discordância nas árvores filogenéticas desse clado. Nossos resultados indicaram que o fluxo gênico interespecífico foi comum e constante no grupo, mas muitas vezes esses sinais podem ser difíceis de detectar devido ao alto nível de segregação incompleta de linhagens (ILS; *incomplete lineage sorting*) causado pelo rápido processo de diversificação dessas espécies. Esta tese elucidou o processo de diversificação e especiação de um grupo carismático de plantas da América do Sul, destacando como a hibridação é um mecanismo essencial a ser considerado para entender a história evolutiva das plantas.

Abstract

With advancements in DNA sequencing technologies, evolutionary biologists realized that hybridization between different evolutionary lineages is far more frequent than previously imagined, playing a crucial role in the diversification of species. The effects of hybridization encompass a wide spectrum of consequences: it can lead species to extinction due to genetic disruption, or lead to speciation and adaptive alleles introgression, allowing the colonization of new environments. In this thesis, we aimed to investigate the role of hybridization in the evolutionary history of *Petunia* and its related genera, *Calibrachoa* and *Fabiana*. *Petunia* serves as a model system for phylogeography and speciation studies in South America due to its wide geographic distribution and remarkable species diversity. To achieve our objectives, we employed single nucleotide polymorphisms (SNP) data acquired through genotyping-by-sequencing (GBS) and transcriptomes from multiple species. Each chapter addressed the hybridization topic from distinct perspectives: in chapter 1, we explored gene flow in two species of the short corolla tube clade in a transitional zone between biomes; in chapter 2, we analyzed the hybridization between two subspecies of *P. axillaris* and the implications for the taxa conservation in the context of climate change; in chapter 3, we investigated the potential hybrid origin of a population exhibiting corolla color variation and discussed the speciation process in a *Petunia* hotspot; in Chapter 4, we examined the effects of sampling admixed individuals on species delimitation; and in chapter 5, we employed transcriptomic data from species of *Petunia*, *Calibrachoa*, and *Fabiana* to understand the reasons underlying the phylogenetic tree discordance in this clade. Our results indicated that interspecific gene flow was common and recurrent within the group, but these signals can be challenging to discern due to the high degree of incomplete lineage sorting (ILS) resulting from the rapid diversification. This thesis has shed light on the process of diversification and speciation within a charismatic group of South American plants, underscoring how hybridization is an essential mechanism that must be considered when seeking to understand the evolutionary history of plants.

Introdução

Hibridação pode ser definida como a reprodução entre organismos de linhagens geneticamente distintas, dando origem a uma prole com ancestralidade mista (Abbott et al. 2013; 2016). A hibridação sempre foi reconhecida como um processo significativo na diversificação das plantas. Entretanto, com o desenvolvimento de novos marcadores moleculares, o advento de novas análises e um melhor poder computacional, começamos a reconstruir árvores filogenéticas levando em consideração esses eventos de fluxo gênico interespecífico (Linder e Rieseberg, 2004; Edwards et al. 2016). Com isso, pudemos observar que a hibridação desempenhou um papel fundamental na diversificação de diversas linhagens de plantas e ocorre com uma frequência muito maior do que anteriormente imaginado (Soltis e Soltis, 2009; Whitney et al., 2010; Goulet et al., 2016). Além disso, é fundamental destacar que os eventos de hibridação desempenharam um papel significativo na diversificação tanto de linhagens recentes e contemporâneas, quanto em ramos mais profundos da árvore evolutiva das plantas (Stull et al. 2023). Investigar esse processo e seus efeitos na diversificação das plantas é um desafio de grande importância, tanto para a compreensão dos processos evolutivos que deram origem à biodiversidade atual quanto para a conservação dessas espécies.

Os cenários que levam espécies distintas a hibridar e as consequências desse fluxo gênico são altamente variáveis (Rieseberg e Willis 2007; Abbott et al. 2013; Soltis 2013). A formação de híbridos pode ocorrer em uma região de contato entre as espécies parentais, chamada zona híbrida (Abbott, 2017) ou ocorrer em uma região contínua de ocorrência simpátrica das espécies (Milne et al. 1999). Além disso, também há evidências de que o fluxo gênico não precisa ser constante para que tenha efeitos significativos na diversificação de linhagens. Mesmo eventos raros de hibridação podem causar grandes efeitos na história evolutiva de uma linhagem (Porreta e Canestrelli 2023).

Em relação às consequências da hibridação, ela pode ser descrita como uma “faca de dois gumes” (Schley et al., 2022). Por um lado, a hibridação pode ser responsável pela diminuição da diversidade genética de espécies, pela ruptura de barreiras reprodutivas, pela fusão de linhagens evolutivamente distintas e até mesmo pela extinção de populações ou espécies (Levin et al. 1996; Vuillaume et al. 2015; Todesco et al. 2016; Vallejo-Marín e Hiscock 2016).

Por outro lado, a hibridação pode facilitar a diversificação levando a um aumento da diversidade genética de populações, aumentando as chances de adaptação local com inovações evolutivas e, conseqüentemente, o substrato genômico para especiação (Brawand et al. 2014; Marques et al., 2019). Esse efeito é causado pela transferência de novos alelos, resgate de pequenas populações endogâmicas, formação de zonas híbridas estáveis e novas linhagens híbridas (Mallet 2007; Abbott et al. 2013; Frankham 2015). A transferência de material genético entre espécies, denominada introgressão, ocorre por meio do retrocruzamento de híbridos com uma ou ambas as espécies parentais (Twyford e Ennos 2012; Harrison e Larson 2014). Esse processo permite que as espécies aproveitem um novo conjunto genético, diminuindo a dependência exclusiva de mutações *de novo* ou de variações genéticas já existentes para a adaptação (Tigano e Friesen 2016). O destino do material genético introgridido depende das forças evolutivas que atuam sobre eles; se aumentarem a aptidão da espécie, provavelmente serão mantidos pela seleção natural, caracterizando a introgressão adaptativa (Suarez-Gonzales et al. 2018). Além disso, a hibridação pode levar a um aumento da área de distribuição das espécies devido a novas adaptações, permitindo a espécie ocupar uma diversidade maior de habitats (Pfennig et al. 2016; Pierce et al. 2017).

A percepção de que a árvore da vida é, na verdade, uma rede e não uma árvore composta apenas por bifurcações fez surgir diversos métodos para estimar essas redes filogenéticas (Hibbins e Hahn 2022). Esses novos métodos levam em consideração o fluxo gênico interespecífico e a segregação incompleta de linhagens (ILS; "*incomplete lineage sorting*" em inglês). Esses dois processos são difíceis de serem diferenciados e representam duas das principais razões para a discordância encontrada em filogenias (Galtier e Daubin 2008). Ao contrário da hibridação, na qual um alelo é introduzido em outra espécie após o evento de especiação, a ILS ocorre quando duas ou mais linhagens não coalescem na sua população ancestral mais recente, ou seja, o alelo estava presente antes do evento de especiação (Figura 1).

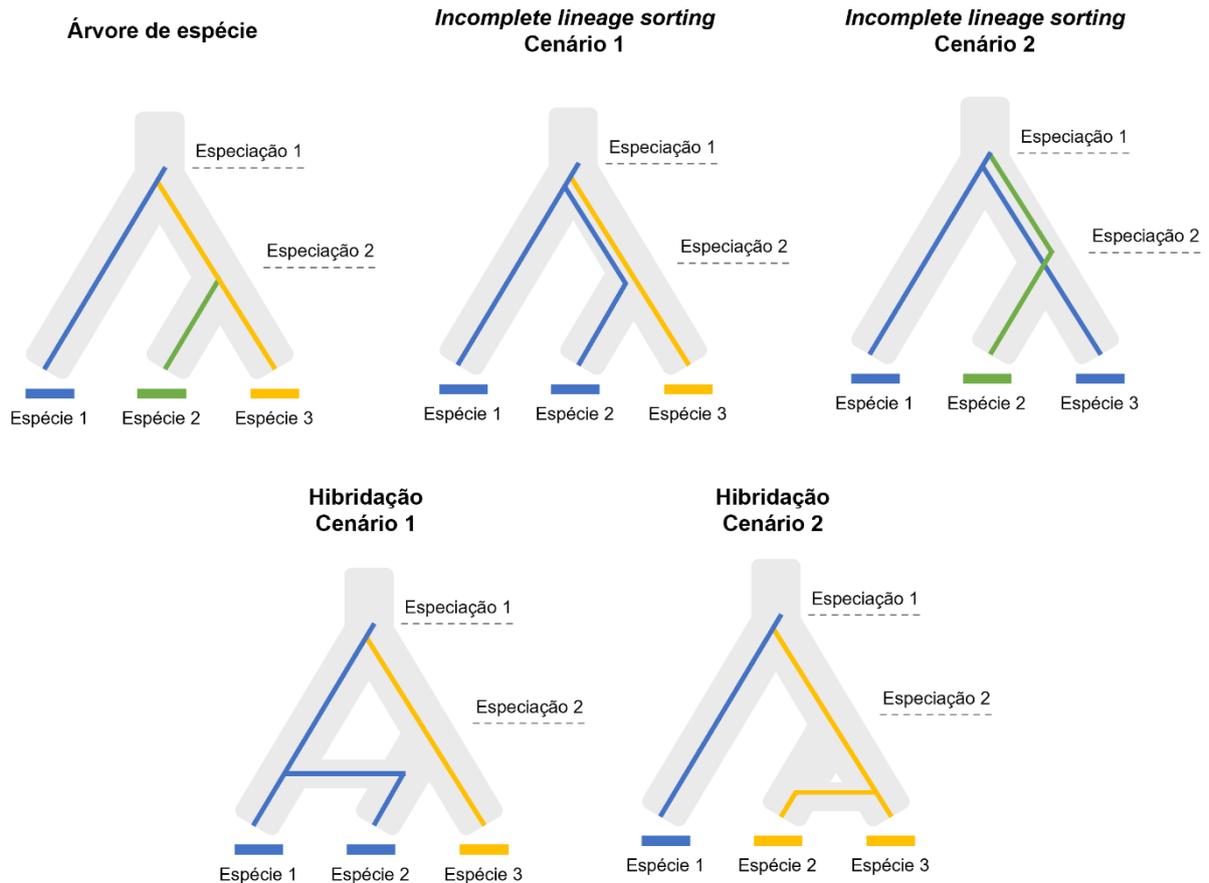


Figura 1. Esquema gráfico ilustrando como a segregação incompleta de linhagens (ILS; *incomplete lineage sorting*) e a hibridação podem resultar em árvores discordantes em relação à árvore de espécies. Na árvore de espécies, ocorreram dois eventos de especiação. No cenário 1 de ILS, apesar de a espécie 2 ser a espécie irmã da espécie 3, a árvore indica que ela está mais próxima da espécie 1. No cenário 2 de ILS, a árvore sugere que a espécie 3 está mais próxima da espécie 1. Nos casos de hibridação, o cenário 1 apresenta um padrão muito semelhante ao cenário 1 de ILS, mas neste caso, ocorreu a introgressão da espécie 1 para a espécie 2. No cenário 2 de hibridação, houve fluxo gênico entre as espécies irmãs 2 e 3. Detectar esses eventos de hibridação é muito difícil, pois, como essas espécies são irmãs, é possível confundir o fenômeno com o compartilhamento de polimorfismos presentes no ancestral no momento do evento de especiação 2.

Apesar dos grandes avanços—tanto metodológicos quanto na quantidade e qualidade dos dados genômicos—, estimar a evolução reticulada continua sendo um grande desafio (Kong e Kubatko 2021), especialmente em eventos de especiação rápida nos quais o nível

de ILS é elevado (Cai et al. 2021). Essa complexidade se deve ao fato de que, ao estimar redes filogenéticas, primeiro precisamos calcular a árvore de espécies, que representa a "média" das árvores de genes, e estimar os eventos de fluxo gênico, que seriam análogos à "variância" das árvores de genes (Blair e Ané 2020). Isso explica em grande parte a complexidade envolvida na inferência de redes filogenéticas.

O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) é composto por 16 espécies e mundialmente conhecido pela espécie ornamental *P. hybrida*, um híbrido de *P. axillaris* e um membro do clado de *P. integrifolia* (Stehmann et al. 2009; Segatto et al. 2014a; Bombarely et al. 2016). As espécies do gênero estão distribuídas nas regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, com dois centros de diversidade no sul do Brasil: a Serra do Sudeste, no bioma Pampa, e a Serra Geral de Santa Catarina, no domínio Mata Atlântica (Stehmann et al. 2009). As espécies do gênero são diploides, possuem o mesmo número cromossômico $2n=14$ (Stehmann et al. 2009) e baixa diversidade genética (Kulcheski et al. 2006; Lorenz-Lemke et al. 2006; 2010; Stehmann et al. 2009; Longo et al. 2014). *Petunia* apresenta grande diversificação floral e de polinizadores, além de intervalos geográficos de distribuição e especificidade de habitat para algumas espécies (Fregonezi et al. 2013).

A diversidade de *Petunia* foi significativamente influenciada pelos ciclos glaciais-interglaciais do Pleistoceno. Durante os períodos mais secos e frios, os campos se expandiram em sua distribuição, e se fragmentaram nos períodos mais quentes e úmidos em decorrência do crescimento da floresta com *Araucaria* (Behling 2002). Esse processo levou as espécies ao isolamento e subsequente especiação, em um processo alopátrico. Esse processo ocorreu em um curto tempo na escala evolutiva (Lorenz-Lemke et al. 2010; Särkinen et al. 2013), resultando em espécies que não são completamente isoladas reprodutivamente, permitindo que ainda exista fluxo gênico entre elas.

A filogenia do gênero revelou uma divisão em dois clados em relação à morfologia do tubo da corola (Reck-Kortmann et al. 2014). O clado de tubo longo reúne espécies com diferentes colorações de corola, sendo branca para *P. axillaris*, vermelha para *P. exserta* e púrpura para *P. secreta*, e esta coloração está associada a diferentes síndromes florais, esfingofilia, ornitofilia e melitofilia, respectivamente (Stuurman et al. 2004; Gübitz et al. 2009; Klahre et al. 2011). Já o clado de tubo curto é formado por um número maior de espécies, todas com coloração purpúrea da corola e baixa diversidade morfológica. Todas as espécies deste clado são melitófilas e algumas compartilham o mesmo polinizador. Estudos

com espécies desse clado mostraram uma subdivisão em relação à altitude: terras baixas e terras altas (altitudes menores e maiores que 500 m, respectivamente) (Kulcheski et al. 2006; Reck-Kortmann et al. 2014).

O isolamento reprodutivo entre espécies e populações é importante para manter a integridade genética das espécies e esse isolamento pode ocorrer por diferentes barreiras que restringem o fluxo gênico em plantas (Baack et al. 2015). O próprio isolamento geográfico, as diferentes síndromes de polinização e altos níveis de endogamia já foram descritas como barreiras de isolamento que impedem o fluxo gênico para algumas espécies do gênero *Petunia* (Ando 2001; Dell’Olivo et al. 2011; Turchetto et al. 2015a).

Entretanto, as barreiras pós-zigóticas para cruzamentos interespecíficos em *Petunia*, ao menos sob condições controladas, são fracas ou até mesmo inexistentes, sugerindo que estes cruzamentos podem ocorrer em condições naturais também. Embora híbridos naturais tenham sido descritos como raros (Lorenz-Lemke et al. 2006), estudos mais recentes mostram que eventos de hibridação em *Petunia* podem ser mais frequentes do que antes se imaginava (Segatto et al. 2014b; Turchetto et al. 2015b, 2019b; Giudicelli et al. 2019; Teixeira et al. 2019). Muitos dos eventos de hibridação na natureza são identificados pela morfologia intermediária desses híbridos, principalmente entre *P. exserta* e *P. axillaris* subsp. *axillaris* (Figura 2); no entanto, em casos de hibridação ancestral ou em situações nas quais não podemos nos basear na morfologia desses indivíduos, a detecção de híbridos se torna uma tarefa mais complexa.

Os eventos de hibridação já relatados para o gênero são entre as espécies do clado de tubo longo da corola. Apesar das espécies serem polinizadas por diferentes agentes, essa barreira não é suficiente para impedir a formação de híbridos interespecíficos na natureza. A distribuição geográfica dessas espécies se sobrepõe e podem ser encontradas em simpatria em algumas regiões (Reck-Kortmann et al. 2014). Apesar dos avanços no conhecimento em relação aos híbridos de *Petunia* de tubo longo, ainda há lacunas no conhecimento sobre como a hibridação tem moldado a evolução desse grupo, especialmente no que se refere ao destino dos híbridos formados e ao papel das linhagens híbridas nas populações e no estabelecimento de novos *taxa*.



Figura 2. Morfologia canônica de *Petunia exserta* (esquerda) e *P. axillaris* (direita). Híbridos interespecíficos (centro) podem apresentar uma variedade de fenótipos, desde morfologia intermediária entre as espécies parentais até morfologia idêntica a um dos pais após várias gerações de retrocruzamento.

No clado do tubo curto da corola, eventos de hibridação interespecífica já foram sugeridos entre *P. interior* e *P. guarapuavensis* devido à observação de indivíduos com morfologia intermediária entre as espécies (Ando e Hashimoto 1996). Além disso, observações em campo e o compartilhamento de marcadores moleculares levantaram a hipótese de hibridação entre as espécies *P. interior* e *P. inflata* (Segatto et al. 2014b; Segatto et al. 2017). Essas espécies são evolutivamente muito próximas com divergência recente (Longo et al. 2014; Reck-Kortmann et al. 2014), compartilham diversas características morfológicas (Stehmann et al. 2009) e podem ser encontradas em simpatria na região noroeste do Rio Grande do Sul e sudoeste de Santa Catarina. Apesar do compartilhamento de polimorfismos genéticos entre elas, a hipótese de hibridação interespecífica no clado de tubo curto ainda não foi testada.

Devido à rápida especiação, ampla distribuição geográfica, diversidade de polinizadores e habilidade de hibridação, o gênero *Petunia* tornou-se um sistema modelo para o estudo da evolução e especiação na América do Sul. Junto a *Petunia*, *Calibrachoa* e *Fabiana* formam um grupo monofilético dentro da Tribo Petunieae de Solanaceae—embora as relações entre esses três gêneros ainda não estejam resolvidas—que divergiram entre 14,5 e 7,5 milhões de anos atrás (Särkinen et al. 2013). *Calibrachoa*, assim como *Petunia*, também se tornou um grupo importante para entender os processos de especiação e os processos filogeográficos na região (e.g., Fregonezi et al. 2013; Backes et al. 2019; Mäder e

Freitas 2019), e compartilha diversas características com seu grupo irmão: diversificou-se rapidamente, possui uma diversidade de polinizadores, tem espécies raras e endêmicas e habita uma grande diversidade de regiões, com ampla sobreposição com espécies de *Petunia*. Originalmente, *Calibrachoa* havia sido descrita como parte do gênero *Petunia*. No entanto, devido à diferença em números cromossômicos, $2n=18$, ela foi separada em outro gênero (Wijsman e De Jong 1985; Stehman et al. 2009).

Fabiana é o terceiro gênero que forma esse clado e, assim como *Calibrachoa*, também possuem nove pares de cromossomos ($2n=18$). No entanto, esse gênero possui uma distribuição disjunta e características que a diferenciam de seus gêneros irmãos: ausência de folhas ou folhas pequenas, caules fotossintéticos e crescimento em solos pobres em matéria orgânica (Alaria et al. 2022). A morfologia floral também é bastante distinta dos demais, tanto em cor como em formato (**Figura 3**).



Figura 3. Distribuição Geográfica de *Petunia* (linha azul), *Calibrachoa* (área sombreada amarela) e *Fabiana* (área sombreada verde), acompanhada por espécies representativas de cada gênero: *Petunia altiplana*, *Calibrachoa eglandulata* e *Fabiana bryoides* (Créditos das fotos: Lucas C. Wheeler).

Na presente tese, utilizamos *Petunia* (bem como *Calibrachoa* e *Fabiana* no capítulo 5) como grupo modelo para investigar a diversificação de plantas no sul da América do Sul.

Durante esta pesquisa, exploramos o impacto da hibridação a partir de diversas perspectivas, incluindo a formação de zonas híbridas, a especiação com fluxo gênico, a hibridação ancestral, bem como a delimitação de espécies e questões relacionadas à conservação. Esta tese contribui para a compreensão de tópicos cruciais na diversificação de plantas na região neotropical, uma região que, apesar de abrigar a maior biodiversidade do planeta (Rull 2011), permanece pouco estudada.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi compreender a história evolutiva do gênero *Petunia* e investigar como a hibridação interespecífica pode estar relacionada à adaptação e diversificação desse grupo.

Objetivos específicos

- a) Entender o processo de especiação e a possível hibridação entre *P. interior* e *P. inflata* nas zonas de contato de transição de biomas;
- b) Avaliar os efeitos de diferentes zonas de contato entre subespécies de *P. axillaris* sob a perspectiva da conservação;
- c) Investigar a origem evolutiva da população *P. sp2*, população que apresenta uma variação na cor da corola da flor;
- d) Compreender o processo de especiação do clado do tubo longo na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, Brasil, uma região que abriga grande diversidade de espécies de *Petunia*;
- e) Investigar a possível origem híbrida da *P. sp3*, população com morfologia intermediária entre duas espécies raras de *Petunia*;
- f) Entender como a amostragem de indivíduos híbridos afeta a delimitação de espécies no clado do tubo longo de *Petunia*;
- g) Explorar a origem da discordância de árvores do clado *Petunia-Calibrachoa-Fabiana* e explorar o papel da possível hibridação ancestral na diversificação do grupo.

Capítulo 1

A convoluted tale of hybridization between two *Petunia* species from a transitional zone in South America

Pedro Henrique Pezzi, Sebastián Guzmán-Rodríguez, Giovanna Câmara Giudicelli, Caroline Turchetto, Aureliano Bombarely, Loreta Brandão de Freitas

Artigo publicado no periódico *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* (Qualis A1; IF 3.6)

Resumo

Espécies que divergiram recentemente podem hibridar nas suas zonas de contacto se não tiverem atingido o isolamento reprodutivo completo. *Petunia inflata* e *P. interior* são espécies proximamente relacionadas com distribuição geográfica restrita na Argentina e no sul do Brasil. Essas espécies compartilham características morfológicas, marcadores genéticos, polinizadores e ocupam uma área de transição entre os campos do Pampa e a Mata Atlântica brasileira. Neste trabalho, usamos dados genômicos para verificar os limites das espécies, identificar possíveis híbridos e esclarecer o processo de especiação. Nós caracterizamos 59 indivíduos de zonas alopátricas e de contato usando *genotyping-by-sequencing*, o que resultou em 21.759 polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*; SNP) neutros usados para realizar análises de estruturação populacional, análises demográficas e análises de hibridação. Nossos resultados indicaram que estas espécies pertencem a linhagens evolutivas distintas que hibridaram após contato secundário. A distância geográfica, a altitude e o clima explicam a divergência genética entre as espécies. A análise de sobreposição de nicho revelou que, embora estas espécies tenham distribuições sobrepostas e preferências de habitat semelhantes, elas são mais distintas do que o esperado pelo acaso, rejeitando a hipótese do conservadorismo de nicho. A análise demográfica sugeriu que as mudanças climáticas do Pleistoceno promoveram a diversificação das espécies, mas elas entraram em contato secundário durante o Holoceno. O contato secundário levou a um fluxo gênico limitado entre as espécies e à introgressão bidirecional. A expansão da distribuição do ancestral dessas espécies para uma zona de transição entre biomas, associada a faixas de altitude e fragmentação de habitat promoveu especiação e diferenciação de nicho.

Capítulo 2

Natural hybridization and the evolutionary dynamics of southern South American grasslands species under climate changes and habitat fragmentation

Giovanna Câmara Giudicelli*, Pedro Henrique Pezzi*, Sebastián Guzmán-Rodríguez, Caroline Turchetto, Aureliano Bombarely, Loreta Brandão Freitas

* Esses autores contribuíram igualmente para este trabalho.

Manuscrito submetido ao periódico *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* (Qualis A1; IF 3.6)

Resumo

A hibridação natural em plantas pode impactar a diversidade genética e morfológica. Por um lado, pode levar ao surgimento de novas populações mais bem adaptadas; por outro lado, pode levar espécies à extinção. Devido ao aquecimento global, muitas espécies migram para novas áreas, o que pode representar um desafio para plantas com baixa capacidade de dispersão. Além disso, a fragmentação de habitats pelo uso da terra pode criar tanto barreiras para o fluxo gênico quanto eliminar barreiras naturais contra a hibridação. Neste trabalho, analisamos duas subespécies representantes de espécies herbáceas dos campos do sul da América do Sul com o objetivo de avaliar o impacto das zonas de contato e a possível hibridação na história evolutiva e dinâmica populacional. Discutimos nossos resultados sob a perspectiva das futuras mudanças climáticas, mudanças na diversidade genética e morfologia floral, e a conservação dos campos. Nossos resultados indicaram que a hibridação natural na área em que as subespécies ocorrem próximas impacta a diversidade genética e morfológica de ambas as espécies, as quais terão respostas diferentes às mudanças climáticas. Se, por um lado, alterações na diversidade podem manter um dos táxons em sua área de maior adequação no cenário futuro, para o outro táxon, isso pode aumentar o risco de extinção ou, pelo menos, causar mudanças profundas.

Capítulo 3

How do novel species arise in a biodiversity hotspot? Unraveling the hybridization and rapid speciation processes in *Petunia*

Pedro Henrique Pezzi, Leonardo Tresoldi Gonçalves, Alice Backes, Giovanna Câmara Giudicelli, Caroline Turchetto, Aureliano Bombarely, Loreta Brandão de Freitas

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Evolution* (Qualis A1; IF 3.3)

Resumo

Petunia apresenta uma oportunidade única para estudar a especiação numa região diversa com várias espécies que apresentam diferentes síndromes de polinizadores. Recentemente, descobrimos uma população próxima a um *hotspot* de biodiversidade exibindo uma grande variação na coloração da corola, do roxo claro ao roxo escuro, sugerindo uma origem híbrida. Utilizamos *genotyping-by-sequencing* em vários indivíduos para entender a origem da população e os padrões de especiação de *Petunia*. A análise da estruturação genética revelou que esta população apresenta um componente genético próprio e único, e os métodos de detecção de hibridação produziram resultados conflitantes. Esse conflito sugere altos níveis de segregação incompleta de linhagens (*incomplete lineage sorting*; ILS) devido à rápida especiação na região. Além disso, testamos 12 modelos demográficos para compreender os padrões de divergência entre as linhagens de *Petunia* e descobrimos que a maioria das espécies divergiu na presença de fluxo gênico. A população compartilha o haplótipo do fator de transcrição *AN2* com uma espécie de flor roxa. Assim, a variação de cor observada dentro do grupo surge devido às influências de um gene diferente na via ou de outros fatores extrínsecos. Demonstramos que a alta diversidade de *Petunia* nesta região resulta de interações complexas entre especiação rápida e especiação com fluxo gênico e que a evolução de diferentes cores de flores nesta área provavelmente ocorreu múltiplas vezes através de mecanismos genéticos distintos.

Capítulo 4

How does hybridization impact species delimitation? Insights from the *Petunia long corolla tube* clade

Pedro Henrique Pezzi, Leonardo Tresoldi Gonçalves, Giovanna Câmara Giudicelli,
Caroline Turchetto, Aureliano Bombarely, Loreta Brandão de Freitas

**Manuscrito a ser submetido ao periódico *Systematic
Biology* (Qualis A1; IF 6.5)**

Resumo

Apesar da delimitação de espécies ser uma tarefa complexa, ela é crucial para a compreensão da biodiversidade. No entanto, este desafio intensifica-se quando os limites das espécies são confundidos pela hibridação, uma vez que a maioria dos métodos de delimitação de espécies não leva em conta o fluxo gênico. O gênero *Petunia* oferece uma oportunidade única para investigar o impacto do fluxo gênico na diversificação e delimitação de espécies devido às diversas classes híbridas encontradas na natureza, mesmo entre espécies com síndromes de polinização distintas. Este estudo teve como objetivo reconstruir as relações filogenéticas entre múltiplas linhagens de *Petunia* dentro do clado do tubo longo da corola e avaliar o efeito da amostragem de indivíduos híbridos nas análises de delimitação de espécies. Utilizamos dados de *genotyping-by-sequencing* de 315 indivíduos abrangendo diferentes linhagens e zonas de contato. Nossos resultados revelaram uma rápida diversificação e níveis substanciais de segregação incompleta de linhagens (*incomplete lineage sorting*; ILS) entre essas *taxa*. Além disso, estas espécies sofreram extensa hibridação, tanto antiga quanto recente. Utilizamos BFD* para delimitar espécies, e descobrimos que a estimativa de número de espécies é superestimada independentemente da presença de indivíduos híbridos. Em conclusão, destacamos o grande desafio de delinear os limites das espécies, indicando que mesmo com os avanços genômicos, a taxonomia integrativa continua essencial para delimitar as espécies, particularmente em taxa propensos à hibridação.

Capítulo 5

Incomplete lineage sorting and hybridization as drivers of tree discordance in *Petunia* and related genera (Petunieae, Solanaceae)

Pedro Henrique Pezzi, Lucas Clayton Wheeler, Loreta Brandão de Freitas, Stacey Dewitt Smith

**Manuscrito a ser submetido ao periódico *Molecular
Phylogenetics and Evolution* (Qualis A1; IF 4.1)**

Resumo

Apesar da história abrangente de divergência entre espécies, estudos filogenéticos frequentemente revelam topologias distintas entre regiões do genoma. As fontes dessas discordâncias de árvores são variáveis, mas a segregação incompleta de linhagens (*incomplete lineage sorting*; ILS) e a hibridação estão entre as de maior importância biológica. *Petunia* é sistema clássico para estudar a hibridação no sul da América do Sul, e embora estudos de campo sugiram que a hibridação seja comum, a extensão da reticulação dentro de *Petunia* e seus gêneros relacionados nunca foi avaliada sob uma perspectiva filogenética. Neste estudo, utilizamos dados transcriptômicos de 11 espécies de *Petunia*, 16 espécies de *Calibrachoa* e 10 espécies de *Fabiana* para elucidar as relações entre essas espécies e investigar se a hibridação desempenhou um papel importante na diversificação do clado. Identificamos que a discordância de árvores dentro dos gêneros pode ser explicada por altos níveis de ILS devido à sua rápida diversificação e eventos de hibridação ancestral. Além disso, análises de redes filogenéticas indicaram hibridação entre *Petunia* e *Calibrachoa*, gêneros que possuem números cromossômicos distintos. Embora esses gêneros não possam hibridar nos tempos atuais, a hibridação ancestral pode ter sido benéfica para a adaptação, uma vez que compartilham o mesmo habitat e história de vida.

Considerações finais

Neste trabalho, abordamos a história evolutiva do gênero *Petunia*, com ênfase no papel da hibridação no processo de diversificação do grupo. Ao longo dos cinco capítulos resultantes deste trabalho, conseguimos demonstrar o rápido processo de diversificação do gênero e a fraca barreira reprodutiva entre suas espécies. A ausência de barreiras reprodutivas não diminui a validade dessas espécies como entidades distintas. Neste contexto, a hibridação foi e continua sendo um processo comum na evolução deste grupo de plantas, possivelmente desempenhando um papel fundamental em seu sucesso evolutivo. Devido à diversidade de polinizadores, características florais e adaptações a diferentes ambientes, juntamente com o fluxo gênico entre as espécies, esse grupo se apresenta como um ótimo sistema modelo para estudos evolutivos na região sul da América do Sul.

A ideia de que as redes filogenéticas representam a diversificação das espécies de forma mais precisa do que as filogenias com apenas bifurcações não é recente, mas tem ganhado cada vez mais força com evidências de dados genômicos (Goulet et al. 2016). Em *Petunia*, o padrão não foi diferente: existiam evidências de fluxo gênico entre diferentes espécies (e.g., Turchetto et al. 2019; Teixeira et al. 2020; Caballero-Villalobos et al. 2021), mas com dados genômicos, pudemos observar que a hibridação foi muito mais prevalente do que antes imaginávamos e não restrita às espécies *P. axillaris* e *P. exserta*.

Em alguns casos, a detecção de híbridos é mais simples do que em outros, como no caso dos híbridos de primeira geração (F1), que possuem metade do material genético de um dos parentais e outra metade do outro parental, como foi exemplificado nos capítulos 2 e 4, que abordaram híbridos F1 de *P. axillaris* e *P. parodii*, bem como híbridos de *P. exserta* e *P. secreta*, respectivamente. Em situações em que a hibridação não é tão evidente, identificar esses eventos e determinar quais espécies estão envolvidas, torna-se um processo consideravelmente mais complexo. No capítulo 1, indicamos a ocorrência de hibridação após um contato secundário entre *P. interior* e *P. inflata*. No entanto, no capítulo 5, ao analisar dados de transcriptomas, os resultados sugerem a presença de alto nível de segregação incompleta de linhagens (ILS; *incomplete lineage sorting*) e hibridação ancestral, o que poderia explicar parcialmente o resultado de hibridação encontrado no capítulo 1. Por outro lado, no capítulo 3, embora haja evidências de fluxo gênico entre as diferentes espécies, os diferentes métodos utilizados para detectar híbridos apontam para resultados conflitantes. Isso demonstra a complexidade e o poder da Ciência: nem sempre os dados convergem para

a mesma narrativa, e nosso papel como cientistas é compreender esses resultados de forma coesa e significativa.

Nossos resultados indicaram que a hibridação foi recorrente ao longo do processo evolutivo de *Petunia*, inclusive entre espécies que possuem diferentes síndromes de polinização (capítulos 3 e 4) ou diferentes espécies de polinizadores dentro da mesma síndrome (capítulo 2). Síndromes de polinização se referem a um conjunto de características florais, como forma, cor, odor e recompensas florais, que atraem diferentes grupos funcionais de polinizadores (Fenster et al. 2004). Apesar de o isolamento floral representar uma forte barreira ao fluxo gênico (Christie et al. 2022), ele não impede completamente a ocorrência de hibridação em *Petunia*. As barreiras reprodutivas em plantas são formadas por uma combinação de fatores, e avaliar a força de cada uma dessas barreiras reprodutivas em *Petunia* representa um próximo passo importante para uma melhor compreensão da divergência das espécies. Embora todas as espécies possam produzir híbridos F1 férteis em ambientes controlados (Gerats e Vandebussche 2005), os retrocruzamentos e híbridos de segunda geração (F2) podem estabelecer barreiras significativas (Jiménez-López et al. 2023), que precisam ser avaliadas para compreender como as espécies mantêm suas identidades genéticas apesar do constante fluxo gênico, como observado entre *P. axillaris* e *P. exserta* (capítulos 3 e 4).

Há espécies endêmicas e raras em *Petunia*, tanto no clado de tubo longo (Turchetto et al. 2015b), quanto no clado de tubo curto (Souza et al. 2022). Nesta pesquisa, abordamos o tema da conservação de diferentes maneiras. Primeiramente, investigamos como as futuras mudanças climáticas podem impactar a distribuição geográfica de *P. axillaris* e *P. parodii* (capítulo 2) e como zonas híbridas podem ser fontes importantes de variação genética, contribuindo para a adaptação a novas condições ambientais. Na segunda abordagem, exploramos como a hibridação pode afetar a maneira como delimitamos as espécies e, conseqüentemente, influenciar o status de conservação dessas espécies (Stanton et al. 2019). No capítulo 4, nossos resultados não corroboraram nossas hipóteses iniciais, revelando que a amostragem de linhagens híbridas pode levar a uma superestimativa do número de espécies. Isso ressalta a importância de reconhecer que nenhum método isolado será capaz de delimitar as espécies de forma precisa. Portanto, precisamos utilizar métodos integrativos que combinem dados genéticos, morfológicos, ecológicos e geográficos para uma compreensão mais completa e precisa da diversidade das espécies.

Também identificamos a ocorrência de hibridação entre *P. secreta* e *P. exserta*, resultando na formação de *P. sp3* (capítulo 4). Estas duas espécies são consideradas raras e endêmicas da Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, e apresentam distintas síndromes de polinização: *P. secreta*, de coloração roxa, é polinizada por abelhas, enquanto *P. exserta*, de coloração vermelha, é polinizada por beija-flores. Na mesma região, as espécies *P. exserta* e *P. axillaris* (uma espécie com ampla distribuição geográfica) formam híbridos, e estudos evidenciaram uma introgressão diferencial de genes de *P. axillaris* para *P. exserta* (Cabarello-Villalobos et al. 2021). No entanto, os impactos do fluxo gênico entre estas duas espécies raras não foram avaliados, um passo crucial para a conservação dessas espécies, já que hibridação em espécies raras tem consequências mais drásticas e potencialmente irreversíveis (Levin et al. 1996).

Além das novas mutações e da variação genética já presente nas espécies, a introgressão emerge como um mecanismo crucial para a adaptação das espécies (Suarez-Gonzalez et al. 2018). A detecção de eventos de hibridação é complexa devido à ILS, mas identificar os alelos introgridos é ainda mais desafiador, uma vez que os sinais estão no nível do gene, em vez de envolver múltiplos genes. Apesar dessas limitações, a identificação de eventos de introgressão adaptativa pode esclarecer o papel da hibridação na diversificação deste grupo.

Mesmo com a utilização de marcadores moleculares de nova geração e métodos sofisticados para detectar hibridação e construir redes filogenéticas, é comum nos depararmos com resultados conflitantes (capítulos 1, 3 e 5). A dificuldade em identificar as espécies envolvidas na hibridação e as discordâncias entre diferentes métodos são desafios bem documentados (Gates et al. 2023). Portanto, podemos argumentar que, no caso de *Petunia* e seus gêneros irmãos *Calibrachoa* e *Fabiana*, pode ser difícil chegar a uma resposta definitiva quanto aos eventos de hibridação, especialmente quando se trata de eventos que envolvem ramos ancestrais, devido à possibilidade de que o sinal filogenético associado a esses eventos tenha sido apagado (ou talvez nunca tenha existido) devido à rápida diversificação do grupo.

Utilizando dados transcriptômicos de *Petunia*, *Calibrachoa* e *Fabiana* resolvemos a relação evolutiva entre os três gêneros e abordamos as fontes da discordância na árvore filogenética do clado (capítulo 5). Apesar de ficar claro que *Petunia* é o gênero irmão de *Calibrachoa* e *Fabiana*, as relações entre as espécies congênicas relevam alto grau de

árvores conflitantes. Parte dessa discordância é proveniente do alto nível de ILS, mas a hibridação também é uma fonte importante de variação. Assim, fica evidente que *Calibrachoa* e *Fabiana* ainda precisam de estudos mais detalhados para entender em uma escala local os efeitos da hibridação na adaptação e ecologia das espécies.

A construção de redes filogenéticas envolvendo espécies dos três gêneros indicou a possibilidade de introgressão de genes de *Petunia* para *Calibrachoa* (capítulo 5). Apesar da contribuição de *Petunia* ter sido baixa (menos de 5% do genoma), é importante notar que esses dois gêneros compartilham diversas semelhanças, como distribuição geográfica, polinizadores e habitats, o que sugere a possibilidade de hibridação durante suas radiações adaptativas. No entanto, um fator que os distingue consideravelmente e que também atua como uma barreira eficaz contra a hibridação é o número cromossômico. A diferença no número de cromossomos impede o pareamento adequado durante a meiose, resultando em um ‘beco sem saída’ em que não seria possível o retrocruzamento do híbrido com as espécies parentais. Mais ainda, não existem poliploides entre as espécies de *Petunia* ou *Calibrachoa* e cruzamentos artificiais entre espécies destes dois gêneros não logram sucesso (Watanabe et al. 1996). No entanto, é importante observar que, em algumas circunstâncias, pode ocorrer o pareamento, caso as espécies compartilhem certa homologia entre seus cromossomos. Apesar de existirem vários estudos que abordam questões cromossômicas, ainda persistem lacunas significativas nesse conhecimento, especialmente no contexto da família Solanaceae (Deanna et al. 2022). Portanto, compreender como ocorreu a diferenciação no número de cromossomos entre *Petunia*, *Calibrachoa* e *Fabiana* é crucial para esclarecer o processo de especiação e avaliar a viabilidade da hibridação entre esses gêneros distintos.

Neste trabalho, empregamos diversas abordagens para investigar o papel da hibridação na diversificação do gênero *Petunia*. Nossos resultados apontam para a ocorrência contínua de hibridação ao longo da evolução do gênero, e identificam múltiplos eventos de hibridação ainda em curso. A combinação de hibridações ancestrais e recentes, juntamente com o elevado nível de ILS, torna o estudo destes eventos desafiador. Entretanto, o uso de dados genômicos e os avanços nas técnicas de avaliação de redes filogenéticas têm o potencial de elucidar essas relações com uma melhor resolução. É evidente que a hibridação desempenha um papel central na diversificação das plantas e, portanto, os evolucionistas devem considerar esses eventos de fluxo gênico interespecífico ao investigar a origem e a diversificação da biodiversidade neotropical.

Referências – Introdução e Considerações finais

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R et al. (2013) Hybridization and speciation. *J Evol Biol* 26:229–246. doi: 10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x
- Abbott RJ (2017) Plant speciation across environmental gradients and the occurrence and nature of hybrid zones. *J Syst Evol* 55:238–258. doi: 10.1111/jse.12267
- Abbott RJ, Barton NH e Good JM (2016) Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. *Mol Ecol* 25:2325–2332. doi: 10.1111/mec.13685
- Alaria A, Chau JH, Olmstead RG, e Peralta IE (2022) Relationships among *Calibrachoa*, *Fabiana* and *Petunia* (Petunieae tribe, Solanaceae) and a new generic placement of Argentinean endemic *Petunia patagonica*. *PhytoKeys*, 194:75–93. doi: 10.3897/phytokeys.194.68404
- Ando T (2001) Reproductive Isolation in a Native Population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88:403–413. doi: 10.1006/anbo.2001.1485
- Ando T e Hashimoto G (1996) A New Brazilian Species of *Petunia* (Solanaceae) from Interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* 48:217. doi: 10.2307/2807818
- Baack E, Melo MC, Rieseberg LH e Ortiz-Barrientos D (2015) The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytol* 207:968–984. doi: 10.1111/nph.13424
- Backes A, Mäder G, Turchetto C, Segatto AL, Fregonezi JN, Bonatto SLe Freitas LB (2019) How diverse can rare species be on the margins of genera distribution?. *AoB Plants* 11:plz037. doi: 10.1093/aobpla/plz037
- Behling H (2002). South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177: 19–27. doi: 10.1016/S0031-0182(01)00349-2
- Blair C e Ané C (2020) Phylogenetic trees and networks can serve as powerful and complementary approaches for analysis of genomic data. *Syst Biol* 69:593–601. doi: 10.1093/sysbio/syz056
- Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao M, Bapaume L, Barry CS, Bliet M, Boersma MR, Borghi L, Bruggmann R et al. (2016) Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nat Plants* 2:16074. doi: 10.1038/nplants.2016.74
- Brawand D, Wagner CE, Li YI, Malinsky M, Keller I, Fan S, Simakov O, Ng AY, Lim ZW, Bezault E et al. (2014) The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature* 513:375–381. doi: 10.1038/nature13726
- Caballero-Villalobos L, Silva-Arias GA, Turchetto C, Giudicelli GC, Petzold E, Bombarely A e Freitas LB (2021) Neutral and adaptive genomic variation in hybrid zones of two ecologically diverged *Petunia* species (Solanaceae). *Bot J Linn Soc* 196:100–122. doi: 10.1093/botlinnean/boaa091
- Cai L, Xi Z, Lemmon EM, Lemmon AR, Mast A, Buddenhagen CE, Liu L, e Davis CC (2021) The perfect storm: gene tree estimation error, incomplete lineage sorting, and ancient gene flow explain the most recalcitrant ancient angiosperm clade, Malpighiales. *Syst Biol* 70:491–507. doi: 10.1093/sysbio/syaa083
- Christie K, Fraser LS e Lowry DB (2022) The strength of reproductive isolating barriers in seed plants: Insights from studies quantifying pre-mating and post-mating reproductive barriers over the past 15 years. *Evol* 76:2228–2243. doi: 10.1111/evo.14565
- Deanna R, Acosta MC, Scaldaferrero M, e Chiarini, F (2022) Chromosome evolution in the family Solanaceae. *Front Plant Sci* 12:787590. doi: 10.3389/fpls.2021.787590

- Dell'Olivo A, Hoballah ME, Gübitz T e Kuhlemeier C (2011) Isolation barriers between *Petunia axillaris* and *Petunia integrifolia* (Solanaceae). *Evolution* (N Y) 65:1979–1991. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01279.x
- Edwards S V., Potter S, Schmitt CJ, Bragg JG e Moritz C (2016) Reticulation, divergence, and the phylogeography–phylogenetics continuum. *Proc Natl Acad Sci* 113:8025–8032. doi: 10.1073/pnas.1601066113
- Frankham R (2015) Genetic rescue of small inbred populations: meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow. *Mol Ecol* 24:2610–2618. doi: 10.1111/mec.13139
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR e Thomson JD (2004) Pollination syndromes and floral specialization. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 35:375–403. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347
- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL e Freitas LB (2013) Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Bot J Linn Soc* 171:140–153. doi: 10.1111/j.1095-8339.2012.01292.x
- Galtier N. e Daubin V (2008) Dealing with incongruence in phylogenomic analyses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 4023–4029. doi: 10.1098/rstb.2008.0144
- Gates DJ, Pilson D, e Smith SD (2023). Hybridization in *Iochroma*, in: *Species Tree Inference: A Guide to Methods and Applications*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.
- Gerats T e Vandenbussche M (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends Plant Sci* 10:251–256. doi: 10.1016/j.tplants.2005.03.005
- Giudicelli GC, Turchetto C, Teixeira MC e Freitas LB (2019) Morphological and genetic characterization in putative hybrid zones of *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* and subsp. *parodii* (Solanaceae). *Bot J Linn Soc* 191:353–364. doi: 10.1093/botlinnean/boz057
- Goulet, BE, Roda F, e Hopkins, R (2017) Hybridization in plants: old ideas, new techniques. *Plant Physiol* 173:65–78. doi: 10.1104/pp.16.01340
- Gübitz T, Hoballah ME, Dell'Olivo A e Kuhlemeier C (2009) *Petunia* as a Model System for the Genetics and Evolution of Pollination Syndromes. *Petunia*. Springer New York, New York, NY, pp 29–49
- Harrison RG and Larson EL (2016) Heterogeneous genome divergence, differential introgression, and the origin and structure of hybrid zones. *Mol Ecol* 25:2454–2466. doi: 10.1111/mec.13582
- Hibbins MS e Hahn MW (2022). Phylogenomic approaches to detecting and characterizing introgression. *Genetics* 220:iyab173. doi: 10.1093/genetics/iyab173
- Jiménez-López FJ, Arista M, Talavera M, Cerdeira Morellato LP, Pannell JR, Viruel J e Ortiz Ballesteros PL (2023). Multiple pre-and postzygotic components of reproductive isolation between two co-occurring *Lysimachia* species. *New Phytol* 238:874–887. doi: 10.1111/nph.18767
- Klahre U, Gurba A, Hermann K, Saxenhofer M, Bossolini E, Guerin PM e Kuhlemeier C (2011) Pollinator Choice in *Petunia* Depends on Two Major Genetic Loci for Floral Scent Production. *Curr Biol* 21:730–739. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.059
- Kong S e Kubatko LS (2021) Comparative performance of popular methods for hybrid detection using genomic data. *Syst Biol* 70:891–907. doi: 10.1093/sysbio/syaa092
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e Freitas LB (2006) Molecular Phylogenetic Analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126:3–14. doi: 10.1007/s10709-005-1427-2

- Levin DA, Francisco-Ortega J e Jansen RK (1996) Hybridization and the Extinction of Rare Plant Species. *Conserv Biol* 10:10–16. doi: 10.1046/j.1523-1739.1996.10010010.x
- Linder CR e Rieseberg LH (2004) Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *Am J Bot* 91:1700–1708. doi: 10.3732/ajb.91.10.1700
- Longo D, Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Bonatto SL e Freitas LB (2014) Phylogeography of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 174:199–213. doi: 10.1111/boj.12115
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e 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. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03100.x
- Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL e 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. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04871.x
- Mäder G e Freitas LB (2019) Biogeographical, ecological, and phylogenetic analyses clarifying the evolutionary history of *Calibrachoa* in South American grasslands. *Mol Phylogenet Evol* 141:106614. doi: 10.1016/j.ympev.2019.106614
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature* 446:279–283. doi: 10.1038/nature05706
- Marques DA, Meier JJ, e Seehausen O (2019). A combinatorial view on speciation and adaptive radiation. *Trends Ecol Evol* 34:531–544. doi: 10.1016/j.tree.2019.02.008
- Milne RI, Abbott RJ, Wolff K e Chamberlain DF (1999) Hybridization among Sympatric Species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: Morphological and Molecular Evidence. *Am J Bot* 86:1776. doi: 10.2307/2656674
- Pfennig KS, Kelly AL e Pierce AA (2016) Hybridization as a facilitator of species range expansion. *Proc R Soc B Biol Sci* 283:20161329. doi: 10.1098/rspb.2016.1329
- Pierce AA, Gutierrez R, Rice AM e Pfennig KS (2017) Genetic variation during range expansion: effects of habitat novelty and hybridization. *Proc R Soc B Biol Sci* 284:20170007. doi: 10.1098/rspb.2017.0007
- Porretta D e Canestrelli D (2023) The ecological importance of hybridization. *Trends Ecol Evol in press*: 1–12. doi: 10.1016/j.tree.2023.07.003
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL e de Freitas LB (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Mol Phylogenet Evol* 81:19–28. doi: 10.1016/j.ympev.2014.08.022
- Rieseberg, LH, e Willis, JH (2007). Plant speciation. *Science*, 317: 910–914. doi: 10.1126/science.1137729
- Rull V (2011). Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends Ecol Evol* 26: 508–513. doi: 10.1016/j.tree.2011.05.011
- Särkinen T, Bohs L, Olmstead RG e Knapp S (2013) A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evol Biol* 13:1–15. doi: 10.1186/1471-2148-13-214
- Schley RJ, Twyford AD, e Pennington RT (2022) Hybridization: a ‘double-edged sword’ for Neotropical plant diversity. *Bot J Linn Soc* 199:331–356. doi: 10.1093/botlinnean/boab070
- Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL e Freitas LB (2014b) 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. doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.011
- Segatto ALA, Ramos-Fregonezi AMC, Bonatto SL e Freitas LB (2014a) Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *Am J Bot* 101:119–127. doi: 10.3732/ajb.1300223
- Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Turchetto C e Freitas LB (2017) Multiple markers, niche modelling, and bioregions analyses to evaluate the genetic diversity of a plant species complex. *BMC Evol Biol* 17:234. doi: 10.1186/s12862-017-1084-y
- Soltis PS (2013) Hybridization, speciation and novelty. *J Evol Biol* 26:291–293. doi: 10.1111/jeb.12095
- Soltis PS e Soltis DE (2009) The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annu Rev Plant Biol* 60:561–588. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092039
- Souza A, Giudicelli GC, Teixeira MC, Turchetto C, Bonatto SL e Freitas LB (2022) Genetic diversity in micro-endemic plants from highland grasslands in southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 199:235–251. doi: 10.1093/botlinnean/boab057
- Stanton DW, Frandsen P, Waples RK, Heller R, Russo IRM, Orozco-terWengel PA, Pedersen C-ET, Siegismund HR e Bruford MW (2019) More grist for the mill? Species delimitation in the genomic era and its implications for conservation. *Conserv Genet* 20:101–113. doi: 10.1007/s10592-019-01149-5
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB e Semir J (2009) *The Genus Petunia. Petunia*. Springer New York, New York, NY, pp 1–28
- Stull GW, Pham KK, Soltis PS, e Soltis DE (2023) Deep reticulation: the long legacy of hybridization in vascular plant evolution. *Plant J* 114: 743–766. doi: 10.1111/tpj.16142
- Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C e Kuhlemeier C (2004) Dissection of Floral Pollination Syndromes in *Petunia*. *Genetics* 168:1585–1599. doi: 10.1534/genetics.104.031138
- Suarez-Gonzalez A, Lexer C e Cronk QCB (2018) Adaptive introgression: a plant perspective. *Biol Lett* 14:20170688. doi: 10.1098/rsbl.2017.0688
- Teixeira MC, Turchetto C, Hartke S, Schnitzler CK e Freitas LB (2019) Morphological and genetic perspectives of hybridization in two contact zones of closely related species of *Petunia* (Solanaceae) in southern Brazil. *Acta Bot Brasilica* 33:734–740. doi: 10.1590/0102-33062019abb0143
- Teixeira MC, Turchetto C, Maestri R e Freitas LB (2020) Morphological characterization of sympatric and allopatric populations of *Petunia axillaris* and *P. exserta* (Solanaceae). *Bot J Linn Soc* 192:550–567. doi: 10.1093/botlinnean/boz064
- Tigano A, e Friesen VL (2016) Genomics of local adaptation with gene flow. *Mol Ecol* 25: 2144–2164. doi: 10.1111/mec.13606
- Todesco M, Pascual MA, Owens GL, Ostevik KL, Moyers BT, Hübner S, Heredia SM, Hahn MA, Caseys C, Bock DG et al. (2016) Hybridization and extinction. *Evol Appl* 9:892–908. doi: 10.1111/eva.12367
- Turchetto C, Lima JS, Rodrigues DM, Bonatto SL e Freitas LB (2015a) Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). *Ann Bot* 115:939–948. doi: 10.1093/aob/mcv025
- Turchetto C, Schnitzler CK e Freitas LB (2019) Species boundary and extensive hybridization and introgression in *Petunia*. *Acta Bot Brasilica* 33:724–733. doi: 10.1590/0102-33062019abb0124

- Turchetto C, Segatto ALA, Beduschi J, Bonatto SL e Freitas LB (2015b) Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants* 7:plv084. doi: 10.1093/aobpla/plv084
- Twyford AD e Ennos RA (2012) Next-generation hybridization and introgression. *Heredity* (Edinb) 108:179–189. doi: 10.1038/hdy.2011.68
- Vallejo-Marín M e Hiscock SJ (2016) Hybridization and hybrid speciation under global change. *New Phytol* 211:1170–1187. doi: 10.1111/nph.14004
- Vuillaume B, Valette V, Lepais O, Grandjean F e Breuil M (2015) Genetic Evidence of Hybridization between the Endangered Native Species *Iguana delicatissima* and the Invasive *Iguana iguana* (Reptilia, Iguanidae) in the Lesser Antilles: Management Implications. *PLoS One* 10:e0127575. doi: 10.1371/journal.pone.0127575
- Watanabe H, Ando T, Iida SI, Suzuki A, Buto KI, Tsukamoto T, Hashimoto G e Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *J Japan Soc Hort Sci* 65:625–634. doi: 10.2503/jjshs.65.625
- Whitney KD, Ahern JR, Campbell LG, Albert LP e King MS (2010) Patterns of hybridization in plants. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 12:175–182. doi: 10.1016/j.ppees.2010.02.002
- Wijsman HJW e De Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot Neerl* 34:337–349. doi: 10.1111/j.1438-8677.1985.tb01925.x