



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**PROCESSOS DE DIVERSIFICAÇÃO DE PLANTAS DO CONE SUL**

GIOVANNA CÂMARA GIUDICELLI

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Loreta Brandão de Freitas

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Turchetto

Porto Alegre, agosto de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**PROCESSOS DE DIVERSIFICAÇÃO DE PLANTAS DO CONE SUL**

GIOVANNA CÂMARA GIUDICELLI

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Loreta Brandão de Freitas

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Turchetto

Porto Alegre, agosto de 2019.

"Porém, antes de chegar ao verso final já havia compreendido que não sairia jamais daquele quarto, pois estava previsto que a cidade dos espelhos (ou das miragens) seria arrasada pelo vento e desterrada da memória dos homens no instante em que Aureliano Babilônia acabasse de decifrar os pergaminhos, e que tudo estava escrito neles era irrepetível desde sempre e para sempre, porque as estirpes condenadas a cem anos de solidão não tinham uma segunda chance sobre a terra."

(Cem anos de solidão, Gabriel García Márquez)

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

---

Este trabalho foi primordialmente executado no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e no Department of Horticulture da Virginia Tech (Blacksburg, VA, Estados Unidos). Tivemos como fontes financiadoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS, a Pró-reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da UFRGS e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## AGRADECIMENTOS

---

Sempre me esforcei dar o meu melhor em cada situação que vivi. Muitas vezes, porém, esforço não é suficiente: você precisa contar com a **sorte**. Eu tive o imenso privilégio de ter muita sorte durante os quatro anos do meu doutorado. O meu esforço e a minha sorte me permitiram, nos últimos quatro anos, ter muitas coisas às quais sou grata: o vínculo com o PPGBM, a bolsa de doutorado concedida pelo CNPq, a bolsa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE) concedida pela CAPES e os diferentes auxílios concedidos pela PROPESQ. Tudo isso certamente possibilitou o meu crescimento acadêmico, mas os meus maiores agradecimentos são para as diferentes **pessoas** que acompanharam esse processo.

À **Loreta**, que como boa mãe acreditou no meu potencial e me ofereceu a oportunidade de florescer no mundo das petúnias. À **Caroline**, que como boa irmã mais velha estava ao meu lado nos momentos que mais precisei. Me sinto muito grata pela grande influência dessas duas mulheres na minha trajetória acadêmica.

Aos amigos do LEM, **Aléxia, Alice, Ana Laura, Ana Lúcia, Ana Luíza, Analu, Ariadne, Carolina, Clênio, Daniele, Elise, Geraldo, Gustavo, Lauís, Lina, Luana, Maikel, Marcelo, Pedro, Sara e Sebastián**: obrigada por tão bons momentos vividos. Eu gostaria de sempre poder trabalhar em um lugar tão bom (e cheio de bolos) como o nosso. Ao **Elmo**, por toda dedicação e apoio.

Ao **Aureliano**, que confiou no meu trabalho e me recebeu tão bem na Virginia Tech durante o período do doutorado sanduíche, assim como aos demais membros do laboratório: **Alicia, Earl, Elijah, Lisa, Silvia e Tomas**.

Obrigada a todos inumeráveis **amiguinhos** que me ofereceram palavras gentis, abraços apertados, muitas risadas e, eventualmente, alguns puxões de orelha. Tenho muita sorte de poder contar com pessoas tão brilhantes próximas de mim. Em especial, agradeço aos amigos com os quais mais dividi xícaras de café e infinitos desabafos: **Tiago e Thayne**.

Às minhas famílias, **Câmara Giudicelli e Piaggio**. Eu realmente não sei o que eu faria sem todo o apoio incondicional (e algumas tretas) que vocês me proporcionam.

Ao **Phelipe**, meu pilar. “*Agora se você me diz: ‘era capaz de imaginar a vida sem ele?’ E posso dizer que não sei como iria viver. Viveria, evidentemente, mas não sei como.*”

Ao colaborador esquecido.

## SUMÁRIO

---

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| RESUMO .....  | 7                                    |
| ABSTRACT .....  | 8                                    |
| CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL .....  | 9                                    |
| CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....  | 11                                   |
| 1. Objetivo geral .....   | 11                                   |
| 2. Objetivos específicos .....  | 11                                   |
| CAPÍTULO 3: Influence of climate changes on the potential distribution of a widespread grassland species in South America .....               | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| CAPÍTULO 4: Morphological and genetic characterization in putative hybrid zones of two <i>Petunia axillaris</i> (Solanaceae) subspecies ..... | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| CAPÍTULO 5: Refuge theory and riverine barrier hypothesis clarify the genetic diversity in plants from South America grasslands .....         | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 137                                  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULOS 1 E 6).....   | 143                                  |

## RESUMO

---

Os padrões de distribuição da diversidade genética são moldados por um conjunto de diferentes fatores que influenciam a dinâmica evolutiva dos taxa. Entender quais processos evolutivos levaram à diferenciação entre populações e à manutenção de linhagens genéticas isoladas permite a compreensão do papel de diferentes forças atuando na manutenção da história evolutiva das espécies e um melhor entendimento dos processos de diversificação. O objetivo geral desta tese foi identificar e compreender os processos de diversificação que moldaram a diversidade nos campos do Sul da América do Sul através da variabilidade genética de *Petunia axillaris* subsp. *parodii*, táxon amplamente distribuído na região estudada. Os objetivos específicos deste trabalho foram (a) inferir como as oscilações climáticas do Pleistoceno influenciaram a dinâmica populacional e a história evolutiva do complexo *P. axillaris*, (b) investigar as potenciais zonas híbridas entre *P. axillaris* subsp. *parodii* e *P. P. axillaris* subsp. *axillaris*, buscando evidências genéticas e morfológicas de migração e/ou hibridação entre estes taxa, e (c) identificar linhagens evolutivas de *P. axillaris* subsp. *parodii* e compreender quais processos influenciaram a dinâmica evolutiva da diferenciação destas linhagens. Para tanto, realizamos experimentos e análises envolvendo a detecção de polimorfismos genéticos e dados ecológicos através das seguintes técnicas: modelagem de nicho ecológico e identificação de biorregiões, amplificação e análise de loci de microssatélites e sequenciamento de ampla cobertura do genoma. Os resultados obtidos foram divididos em três artigos científicos, contemplando cada um dos objetivos específicos da tese, e permitiram identificar como os eventos climáticos do Pleistoceno moldaram os padrões de diversificação dos campos do Sul da América do Sul através de processos ecológicos, eventos de hibridação e quebras filogeográficas. Essa tese trouxe evidências para o entendimento dos mecanismos de diversificação e especiação em plantas do Cone Sul, além de abrir perspectivas de trabalhos futuros.

## ABSTRACT

---

A set of different factors influences the evolutionary dynamics of taxa and shapes the genetic diversity distribution. Understanding which evolutionary processes led to differentiation between populations and the maintenance of isolated genetic lineages allows the comprehension of the evolutionary forces acting on the diversification processes. The main aim of this thesis was to identify and understand which diversification processes shaped the diversity in the grasslands of the southern South America through the genetic variability of *Petunia axillaris* subsp. *parodii*, a widely distributed taxon from this region. The specific goals of this study were (a) to infer how Pleistocene climate fluctuations influenced on the population dynamics and evolutionary history of the *P. axillaris* complex, (b) to investigate the potential hybrid zones between *P. axillaris* subsp. *parodii* and *P. axillaris* subsp. *axillaris*, searching for genetic and morphological evidences of migration and/or hybridization between these taxa, and (c) to identify *P. axillaris* subsp. *parodii* evolutionary lineages and understand which processes influenced on the evolutionary dynamics of the differentiations among those lineages. To do that, we performed experiments and analyzes involving the detection of genetic polymorphisms and ecological data through the following techniques: ecological niche modeling and bioregion identification; amplification and analysis of microsatellite loci; and broad genome sequencing. The results obtained were divided into three scientific articles, covering each of the specific goals and allowed to identify how the Pleistocene climatic events shaped the diversification patterns of the southern South American fields through ecological processes, climate events, hybridization, and phylogeographic breaks. This thesis has provided some further evidence on the mechanisms of diversification and speciation in plants from the Southern Cone and also opened some perspectives for future works.



## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

---

O conhecimento do padrão de distribuição da diversidade genética permite inferir sobre os diferentes processos de diversificação envolvidos na dinâmica e manutenção da história evolutiva de linhagens genéticas isoladas (Avise, 2000). Dentro desse contexto, inferências filogeográficas têm contribuído para estudos dos fatores que influenciaram o panorama demográfico e evolutivo de diferentes biomas. Entretanto, poucos estudos têm abordado os processos de diversificação que moldaram os padrões atuais de diversidade dos campos na região sul da América do Sul (Overbeck *et al.*, 2007; Speranza *et al.*, 2007; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Estas regiões sofreram ciclos de expansão e contração promovidos pelas oscilações climáticas e geológicas ocorridas durante o Pleistoceno, que conseqüentemente influenciaram a distribuição espacial e a composição genética das populações naturais (Behling, 2002; Behling & Pillar, 2007).

Para compreender os processos de diversificação que moldaram a diversidade nos campos do Sul da América do Sul, utilizamos como modelo uma espécie de *Petunia* Juss. (Solanaceae), que é um gênero endêmico da região (Stehmann *et al.*, 2009). Os processos evolutivos em *Petunia* têm sido estudados utilizando diferentes marcadores moleculares, revelando padrões de diversificação recente e baixa diferenciação genética (Kulcheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Reck-Kortmann *et al.*, 2014). Estudos sobre os processos de diversificação e especiação no gênero *Petunia* revelaram uma forte influência das mudanças climáticas do Pleistoceno e de diferenças ecológicas ao longo da distribuição geográfica de cada espécie (Turchetto *et al.*, 2014b; Barros *et al.*, 2015; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015; Segatto *et al.*, 2017). Somam-se a isto, eventos de hibridação natural ao longo da história evolutiva das espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006, Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2015b; 2019).

Algumas espécies de *Petunia* são endêmicas de áreas muito restritas e associadas a regiões fitoecológicas específicas, enquanto outras espécies apresentam ampla distribuição geográfica, como é o caso de *P. axillaris*. A análise de caracteres florais permite reconhecer três subespécies para *P. axillaris*: *P. axillaris* subsp. *axillaris* (em diante, *P. axillaris*), *P. axillaris* subsp. *parodii* (em diante, *P. parodii*) e *P. axillaris* subsp. *subandina* (em diante, *P. subandina*). As subespécies podem ser reconhecidas comparando o tamanho do tubo da corola (mais curto em *P. axillaris*), os estames didínamos (ausentes em *P. parodii*) e o

formato dos lobos das corolas, que são diferentes para cada subespécie. Além disso, os três taxa ocorrem em áreas geográficas adjacentes e foram reconhecidos como linhagens evolutivas distintas em um estudo filogeográfico baseado em marcadores plastidiais e nucleares. Estas linhagens apresentam dinâmicas populacionais distintas e o processo de divergência entre elas foi provavelmente influenciado pelas oscilações climáticas do Pleistoceno (Ando, 1996; Stehmann *et al.*, 2009; Turchetto *et al.*, 2014a, b).

Indivíduos que apresentam morfologia intermediária entre *P. parodii* e *P. axillaris* foram previamente descritos e sugeridos como prováveis híbridos entre estas taxa. Os indivíduos foram observados em duas principais localidades, em regiões adjacentes às distribuições geográficas das subespécies: ao longo do Rio Negro (Uruguai) e na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil (Kokubun *et al.*, 1997, 2006; Turchetto *et al.*, 2014a). *Petunia parodii* e *P. axillaris* apresentam alta variabilidade intrapopulacional ao longo de suas distribuições geográficas e as diferenças morfológicas entre elas refletem suas distintas histórias evolutivas (Turchetto *et al.*, 2014a, b). Entretanto, análises baseadas em marcadores plastidiais e nucleares revelaram que as subespécies têm alto compartilhamento de polimorfismos ancestrais (Turchetto *et al.*, 2014a). O fato de os marcadores utilizados neste estudo serem limitados a poucas regiões do genoma sugere que eles possam não ter sido suficientes para identificar fluxo gênico recente entre as duas subespécies em suas áreas de contato.

O presente estudo utilizou como modelo o táxon *Petunia parodii*, que está amplamente distribuído em dois biomas de campos do sul da América do Sul: os Pampas e o Chaco. *Petunia parodii* é autocompatível, polinizada por mariposas e apresenta frutos capsulares que contém centenas de sementes que se dispersam por autocoria (Ando, 1996; Kokubun *et al.*, 2006; Stehmann *et al.*, 2009; Turchetto *et al.*, 2014a). Diferentes componentes genéticos foram observados em *P. parodii* quando comparada a outras espécies de *Petunia* usando dados de microssatélites (Turchetto *et al.*, 2015a), embora poucos indivíduos tenham sido analisados neste estudo, não abrangendo a distribuição geográfica completa do taxon. Conhecer a distribuição da diversidade genética de *P. parodii* pode auxiliar na compreensão dos diferentes processos de divergência que ocorreram entre linhagens genéticas distintas de plantas dos campos do sul da América do Sul.

## CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

---

### 1. Objetivo geral

Identificar e compreender os processos de diversificação que moldaram a diversidade nos campos do sul da América do Sul através da variabilidade genética de *Petunia parodii*.

### 2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

(a) Inferir como as oscilações climáticas do Pleistoceno influenciaram a dinâmica populacional e a história evolutiva do complexo *P. axillaris*;

(b) Investigar as potenciais zonas híbridas entre *P. parodii* e *P. axillaris*, buscando evidências genéticas e morfológicas de migração e/ou hibridação entre estas taxa;

(c) Identificar linhagens evolutivas de *P. parodii* e compreender quais processos influenciaram a dinâmica evolutiva da diferenciação destas linhagens.

## CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Conhecer o padrão de distribuição da diversidade genética possibilita inferir sobre os processos envolvidos na manutenção da história evolutiva das espécies. Este padrão é moldado por um conjunto de diferentes fatores que afetam a dinâmica evolutiva das taxa. Entender os processos evolutivos que levam à diferenciação entre populações e à manutenção de linhagens genéticas isoladas permite a compreensão do papel de diferentes forças atuando na manutenção dessas linhagens e um melhor entendimento dos processos de diversificação (Avice, 2000; 2009). Diante desse contexto, a presente tese teve como objetivo principal reconhecer os processos de diversificação que influenciaram a distribuição da diversidade nos campos do sul da América do Sul. Para cumprir nosso objetivo usamos diferentes abordagens para investigar a distribuição da variabilidade genética de *Petunia parodii*, táxon amplamente distribuído na região estudada.

A distribuição geográfica de uma espécie é um importante fator que influencia sua variabilidade genética e a história evolutiva. Espécies amplamente distribuídas tendem a apresentar uma maior variabilidade genética que espécies relacionadas, mas com distribuição restrita (Maki *et al.*, 1999). Esta ideia é bastante difundida, embora nem sempre verdadeira, pois há vários casos de espécies com ampla distribuição geográfica e baixos níveis de variabilidade (Gitzendanner & Soltis, 2000). Atualmente, a maioria dos organismos possui uma distribuição disjunta, característica da espécie ou determinada pela descontinuidade do habitat. Em espécies com distribuição espacial contínua, o endocruzamento está restrito a pequenas distâncias limitadas pelo alcance da dispersão. Isto é especialmente relevante em plantas, onde as sementes representam a principal forma de dispersão que, na maioria dos casos, está restrita a curtas distâncias (Cain *et al.*, 2000). No caso das espécies de *Petunia*, em particular de *P. parodii*, a distribuição geográfica é bastante ampla, incluindo dois biomas de campos abertos e cerca de 441 mil km<sup>2</sup> de extensão. A dispersão desta espécie é bastante limitada, uma vez que suas sementes não apresentam dispersores a longas distâncias, em geral caindo próximas à planta mãe após a abertura da cápsula que as contém (van der Pijl, 1982). A diversidade genética de *P. parodii* é menor que a observada na subespécie *P. axillaris*, baseado em dados de marcadores plastidiais e algumas regiões nucleares (Turchetto *et al.*, 2014a), mas semelhante à de outras espécies do gênero, embora o estudo baseado em microssatélites nucleares (Turchetto *et al.*, 2015a) tenha incluído poucos indivíduos e populações. No **Capítulo 4**, descrevemos a diversidade genética para populações

consideradas híbridas entre *P. parodii* e *P. axillaris* de acordo com a morfologia apresentada pelos indivíduos e comparamos estes índices aos obtidos por populações alopátricas das duas subespécies. Nesse estudo, confirmamos que a diversidade genética de *P. parodii* é mesmo inferior à de *P. axillaris* e também menor que a estimada para os híbridos entre as duas nas zonas de contato. Associamos a baixa diversidade de *P. parodii* à autocompatibilidade descrita para o táxon (Kokubun *et al.*, 2006), enquanto que *P. axillaris* teria, no mínimo, um sistema de cruzamento misto em algumas populações (Turchetto *et al.*, 2015a) e autoincompatível na maioria de sua distribuição (Kokubun *et al.*, 2006). No **Capítulo 5**, avaliamos a diversidade genética das populações de *P. parodii* distribuídas nos Pampas e no Chaco através de uma ampla cobertura do genoma pela técnica de GBS (*Genotyping-by-Sequencing*) e observamos valores similares de diversidade, quando comparados com outras espécies de plantas avaliadas pela mesma técnica (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2018), sendo estes índices mais altos entre as populações dos Pampas, em especial para aquelas que ocorrem mais ao sul da distribuição (em território uruguaio). A maior diversidade observada nesta região, assim como a estruturação geográfica observada nas populações de *P. parodii*, podem ser consequência da formação de refúgios durante os ciclos glaciais do Pleistoceno com posterior colonização para novas áreas, como proposto para outras espécies destes biomas (Speranza *et al.*, 2007; Camps *et al.*, 2018) e para o gênero *Petunia* como um todo (Reck-Kortmann *et al.*, 2014).

A fragmentação do habitat pode influenciar a variabilidade genética, reduzindo-a através de eventos do tipo efeito de gargalo. O efeito fundador, a deriva genética e o fluxo gênico restrito podem aumentar o isolamento genético das populações e, conseqüentemente, sua divergência (Ellstrand, 2014). A fragmentação e as mudanças nas paisagens, tanto naturais quanto provocadas pela ação humana, tem reduzido o tamanho populacional e aumentado o isolamento espacial de muitas espécies (Lowe *et al.*, 2005; Farwig *et al.*, 2008). Em plantas, um tamanho populacional pequeno e o isolamento espacial podem levar à erosão genética decorrente da deriva, do aumento nos níveis de endocruzamento, do reduzido nível de fluxo gênico, da ruptura dos processos de polinização e do aumento da probabilidade de extinções locais (Ellstrand & Elam, 1993; Young *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2005). Ao longo de sua distribuição geográfica, *P. parodii* encontra diversas barreiras e descontinuidades da paisagem, uma vez que os biomas onde ocorre são áreas altamente impactadas por atividades humanas, como plantações, criação de gado e mesmo edificações (Vallejos *et al.*, 2015; Carlucci *et al.*, 2016), além de barreiras naturais como rios e mudanças na paisagem como um

todo (Speranza *et al.*, 2007; Camps *et al.*, 2018). De modo geral, as populações desta e de outras espécies de *Petunia* consistem em pequenos isolados de poucos indivíduos (Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2014a; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019). A descontinuidade da distribuição e o isolamento espacial das populações suportam os achados dos **Capítulos 3 e 5**, onde o efeito fundador, fixação aleatória de linhagens e elevados índices de endocruzamento são descritos e permitiram a identificação de rios atuando como barreiras filogeográficas no **Capítulo 5**.

As oscilações climáticas afetaram de maneira diversa as diferentes regiões do globo, dependendo da distância em que estas se encontram em relação ao Equador, da massa continental, e da presença ou ausência de cadeias de montanhas. Durante o Último Máximo Glacial, a maior parte do Hemisfério Norte foi coberta por gelo (Hewitt, 1996). O Hemisfério Sul, no entanto, não foi submetido a extensivas glaciações, embora seu clima tenha sido consideravelmente modificado (Clapperton, 1993). A drástica redução de temperatura e umidade durante os períodos glaciais permitiram a expansão de espécies adaptadas a campos. Durante todo o período glacial, a vegetação de campo era abundante na regiões costeira e sobre o escudo continental, enquanto espécies tropicais arbóreas eram praticamente inexistentes (Behling, 2002; Pennington *et al.*, 2004). Por outro lado, as condições climáticas mais quentes e úmidas dos períodos interglaciais promoveram contração das espécies adaptadas ao clima frio e seco, que se restringiram a regiões de altitude, enquanto espécies de florestas tropicais ocuparam as áreas antes predominadas por vegetação campestre (Thode *et al.*, 2014; Cazé *et al.*, 2016). Esses ciclos de expansão de contração das espécies de campos e florestas permitiu a formação de refúgios (Miles *et al.*, 2004; Carnaval *et al.*, 2009) e promoveu especiação em alopatria (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2016). No **Capítulo 3** foram descritos os impactos das oscilações climáticas do Pleistoceno sobre as subespécies de *P. axillaris*, mostrando que os taxa responderam diferentemente aos ciclos glaciais e interglaciais do período, tendo a adequabilidade de seu nicho climático sido alterado de forma variada. Já no **Capítulo 4**, nossos resultados sugerem que os ciclos de expansão e retração dos campos promoveram o contato entre as subespécies *P. parodii* e *P. axillaris*, permitindo eventos de hibridação entre elas e originando as populações de indivíduos com morfologia intermediária. Estes mesmos eventos suportam a existência de linhagens genéticas isoladas em refúgios glaciais do Pleistoceno, como observado no **Capítulo 5**, dando origem às linhagens filogeográficas encontradas entre os Pampas e o Chaco e separando as populações dos Pampas em função dos rios que cortam a região.

Estudos anteriores revelaram que as subespécies de *P. axillaris* são linhagens genéticas distintas (Turchetto *et al.*, 2014a), relacionadas às diferenças morfológicas e às condições climáticas atuais correspondentes a cada táxon (Turchetto *et al.*, 2014b). Portanto, inicialmente analisamos como as oscilações climáticas do Pleistoceno influenciaram a dinâmica populacional e a história evolutiva das linhagens filogeográficas do complexo *Petunia axillaris* (**Capítulo 3**). Neste estudo sugerimos que as distribuições geográficas atuais das subespécies de *P. axillaris* correspondem a biorregiões relacionadas a divergências de nicho climático. Este resultado corrobora a hipótese de que a diversidade de espécies e a variabilidade genética em *Petunia* estão relacionadas a condições climáticas estáveis e específicas (Barros *et al.*, 2015; Barros *et al.*, in press). Os cenários de distribuição geográfica futura para as subespécies indicam que suas diversidades genéticas poderão ser afetadas principalmente pela fragmentação de seus habitats. As regiões de ocorrência das subespécies são caracterizadas por extensa atividade econômica, o que pode agravar ainda mais os efeitos de fragmentação tendo em vista a baixa capacidade de dispersão de *P. axillaris* (van der Pijl, 1982).

Outra consequência importante da fragmentação do habitat é a possibilidade de colocar em contato taxa espacialmente isoladas, permitindo a hibridação por contato secundário e diversos autores têm discutido o papel do fluxo gênico inter e intraespecífico no estabelecimento de linhagens evolutivos e no surgimento de novas espécies (ver revisão em Ellstrand, 2014). A hibridação é um importante fenômeno na história evolutiva das espécies vegetais, ocorrendo em cerca de 25% das espécies (Mallet, 2005) e tendo um duplo papel na dinâmica da biodiversidade (Seehausen, 2008). Em locais onde ocorrem cruzamentos de populações geneticamente distintas podem ser formadas zonas híbridas, onde linhagens independentes são capazes de trocar genes por um longos períodos de tempo sem perderem sua identidade fenotípica (Mebert, 2008). Por um lado, zonas híbridas podem criar nova diversidade genotípica, mover adaptações genéticas entre espécies e mesmo gerar novas espécies que representam linhagens recombinantes estáveis (Rieseberg, 1997; Avise 2004), mas por outro, podem diminuir o número de espécies, colapsando as existentes e reduzindo a especiação pela quebra do desequilíbrio de ligação entre os *loci* (Harrison & Bogdanowicz, 1997).

Estudos sobre hibridação natural em *Petunia* destacaram a importância desse evento na história evolutiva das espécies do gênero (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2015b). Os estudos de Kokubun *et al.* (1997; 2006) revelaram indivíduos de

morfologia intermediária entre *P. parodii* e *P. axillaris* nas regiões do Rio Negro (Uruguai) e ao sul do Rio Grande do Sul (Brasil). Estes autores atribuíram a existência dessas morfologias a eventos de hibridação por contato secundário, enquanto Turchetto *et al.* (2014a) sugeriram que as diferenças morfológicas encontradas nestas áreas, em comparação às regiões onde as subespécies ocorrem em alopatria, refletiriam adaptações aos diferentes tipos de solos. As análises de modelagem ecológica de *P. parodii* e *P. axillaris* obtidas nesta tese sugeriram que a divergência entre as subespécies ocorreu de forma contínua ao longo do tempo (**Capítulo 3**). Diante desse contexto, nós investigamos os indivíduos que apresentam morfologia intermediária entre *P. parodii* e *P. axillaris* para inferir como possíveis eventos de hibridação contribuíram para a diversificação dessas taxa (**Capítulo 4**) e encontramos evidências morfológicas e genéticas suportando a divergência entre *P. parodii* e *P. axillaris* com eventos ocasionais de hibridação, embora não tenha sido observado fluxo gênico recente entre as subespécies. A ausência de híbridos de primeira geração (**Capítulo 4**) pode ser devida à distância atual entre as populações canônicas das duas subespécies, uma vez que nas áreas em que os híbridos ocorrem existe uma lacuna na distribuição de cada uma (**Capítulo 3**).

Barreiras e desconexões entre as populações surgidas de processos geológicos, bem como os episódios climáticos ocorridos durante o Pleistoceno, são considerados eventos importantes na distribuição da variabilidade genética e estruturação populacional de muitas espécies. Os resultados iniciais obtidos nesta tese (**Capítulo 3**) nos permitiram avaliar as consequências dos eventos climáticos do Pleistoceno para as subespécies de *P. axillaris*. Os três taxa que compõem este complexo estão distribuídos em regiões geográficas adjacentes (Ando, 1996; Turchetto *et al.*, 2014a, b), mas apenas *P. parodii* ocorre em dois biomas de campo distintos, os Pampas e o Chaco. A continuidade geológica destas regiões se manifesta através de características geomorfológicas, fisiográficas e edáficas (Suertegaray & Silva, 2009). A variação no substrato geológico e na altitude contribuem para a diversidade de espécies vegetais da região, que apresenta poucas barreiras geográficas significativas. Uma possível barreira é o Rio Uruguai, largo componente da Bacia Del Plata e cuja extensão coincide com os limites entre os Pampas e o Chaco. A região desta bacia hidrográfica sofreu alterações significativas durante as flutuações climáticas do Pleistoceno (Veroslavsky & Ubilla, 2007), que podem ter influenciado a história evolutiva de espécies de campos, ora permitindo ora impedindo sua dispersão ou de seus polinizadores. Além disso, um estudo revelou diferentes componentes genéticos para *P. parodii* usando dados de microssatélites, embora poucos indivíduos tenham sido amostrados (Turchetto *et al.*, 2015b). Diante deste



contexto, buscamos investigar como os eventos do Pleistoceno afetaram a dinâmica evolutiva das linhagens de *P. parodii* e testamos a hipótese de rios atuando como barreiras filogeográficas ao fluxo gênico entre populações atuais (**Capítulo 5**). Este estudo sugere três linhagens genéticas distintas para *P. parodii*, que são resultado da existência de refúgios do Pleistoceno e da atuação de rios como barreiras. Nossos resultados corroboram outros estudos filogeográficos realizados nos Pampas e no Chaco, que revelaram importantes áreas de refúgios glaciais durante o Pleistoceno e que atualmente apresentam alta diversidade genética, bem como demonstram a importância dos rios da região como barreiras filogeográficas (Speranza *et al.*, 2007; Cosacov *et al.*, 2010; Roratto *et al.*, 2015; Peçanha *et al.*, 2017; Camps *et al.*, 2018; Brusquetti *et al.*, 2019).

Tomados em conjunto, nossos resultados permitiram identificar como os eventos climáticos do Pleistoceno moldaram os padrões de diversificação dos campos do sul da América do Sul através de processos ecológicos, eventos de hibridação e quebras filogeográficas. Assim como outras espécies do gênero (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Segatto *et al.*, 2014; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015), *P. parodii* é um bom modelo para estudar a diversidade de plantas dos campos do sul da América do Sul. Mais ainda, o cenário futuro traçado para a subespécie (**Capítulo 3**) sugere uma redução de sua área de ocorrência e, diante do atual cenário de aquecimento global, pode-se sugerir que a fragmentação da distribuição de *P. parodii* poderá aumentar o isolamento de suas populações resultando em mais altos níveis de endocruzamento e redução da variabilidade genética, provocando a extinção de populações locais.

Este trabalho como um todo trouxe mais algumas evidências para o entendimento dos mecanismos de diversificação e especiação em plantas do Cone Sul, além de abrir algumas perspectivas de trabalhos futuros. Embora tenha contribuído para elucidar a origem das morfologias intermediárias entre subespécies encontradas em algumas populações, a cobertura genômica ainda foi limitada (**Capítulo 4**) e análises dos híbridos entre *P. parodii* e *P. axillaris*, usando sequenciamento de nova geração possibilitarão conhecer e caracterizar a história de hibridação e especiação entre estas duas taxa em maior profundidade. Além disso, algumas análises realizadas no **Capítulo 5** revelaram a existência de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) que estão sob seleção. Embora uma avaliação inicial tenha revelado padrões de divergência e estruturação populacional semelhantes aos obtidos com os SNPs neutros, estes marcadores poderão ser úteis na investigação de processos adaptativos na evolução do táxon quando combinados a análises ecológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULOS 1 E 6)

---

- Ando T (1996) Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *APG* 47: 19-30.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd edition. Sinauer & Associates, Massachusetts, 541 pp.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, London. p. 447.
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeog.* 36: 3-15.
- Barros MJF, Silva-Arias GA, Fregonezi JN, Turchetto-Zolet AC, Iganci JRV, Diniz-Filho JAF, & Freitas LB (2015) Environmental drivers of diversity in Subtropical Highland Grasslands. *PPEES*. 17: 360-368.
- Barros MJF, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Fregonezi JN, Diniz-Filho JAF & Freitas LB (2019) Phylogenetic niche conservatism and plant diversification in South American subtropical grasslands along multiple climatic dimensions. *GMB*, in press.
- Behling H, Pillar VD (2007) Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the southern Brazilian highland and their implication for conservation and management of modern *Araucaria* forest and grassland ecosystems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 362: 243-251.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeog. Palaeoclimatol.* 177: 19-27.
- Brusquetti F, Netto F, Baldo D & Haddad CFB. (2019) The influence of Pleistocene glaciations on Chacoan fauna: genetic structure and historical demography of an endemic frog of the South American Gran Chaco. *Biol J Linnean Soc.* 126: 404-416.
- Cain ML, Milligan BG & Strand AE (2000) Long-distance seed dispersal in plant populations. *Am J Bot.* 87: 1217-1227.
- Camps GA, Martínez-Meyer E, Verga AR, Sérsic AN & Cosacov A (2018) Genetic and climatic approaches reveal effects of Pleistocene refugia and climatic stability in an old giant of the Neotropical Dry Forest. *Biol J Linnean Soc.* XX: 1-20.
- Carlucci MB, Luza AL, Hartz SM & Duarte LDS (2016) Forests, shrublands and grasslands in southern Brazil are neglected and have specific needs for their conservation. Reply to Overbeck et al.. *Nat Con.* 14: 155-157.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodriguez MT & Moritz C (2009) Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Cazé ALR, Mäder G, Nunes TS, Queiroz LP, Oliveira G, Diniz-Filho JAF, Bonatto SL & Freitas LB (2016) Could refuge theory and rivers acting as barriers explain the genetic variability distribution in the Atlantic Forest? *Mol Phylogenet Evol.* 101: 242-251.
- Clapperton CM (1993) Nature of environmental changes in South America at the last Glacial Maximum. *Palaeogeog. Palaeoclimatol.* 101: 189-208.
- Cosacov A, Sérsic AN, Sosa V, Johnson LA & Cocucci AA (2010) Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *J Biogeogr.* 37: 1463-1477
- Ellstrand NC & Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 24: 217-242.
- Ellstrand NC (2014) Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *Am. J. Bot.* 101: 737-753.

- Farwig N, Braun C & Bohning-Gaese K (2008) Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). *Conserv. Genet.* 9: 317-326.
- Fernández-Mazuecos M, Mellers G, Vigalondo B, Sáez L, Vargas P & Glover BJ (2018) Resolving recent plant radiations: power and robustness of Genotyping-by-Sequencing. *Syst. Biol.* 67: 250-268.
- Gitzendanner MA & Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot.* 87: 783-792.
- Harrison RG & Bogdanowicz SM (1997) Patterns of variation and linkage disequilibrium in a field cricket hybrid zone. *Evolution* 51: 493-505.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linnean Soc* 58: 247-276.
- Kokubun H, Ando T, Kohyama S, Vatanabe H, Tsukamoto T and Marchesi E (1997) Distribution of Intermediate Forms of *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* and subsp. *parodii* (Solanaceae) in Uruguay Revealed by Discriminant analysis. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica.* 48, 173-185.
- Kokubun H, Nakano M, Tsukamoto T, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L, Basualdo IL, Kao TH and Ando T (2006) Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. *Journal of Plant Research.* 119, 419-430.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126: 3-14.
- Lorenz-Lemke AP, Mader G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol.* 15: 4487-4497.
- Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL & Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Mol. Ecol.* 19: 5240-5251.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE & Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling evidence and predicted theory for Neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273.
- Maki M, Morita H, Oiki S & Takahashi H (1999) The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis* section *Flavae* (Liliaceae). *Am J Bot.* 86: 287-292.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20: 229-237.
- Mebert K (2008) Good species despite massive hybridization: genetic research on the contact zone between the watersnakes *Nerodia sipedon* and *N. fasciata* in the Carolinas, USA. *Mol. Ecol.* 17: 1918-1929.
- Miles L, Grainger A & Phillips O (2004) The impact of global climate change on tropical forest biodiversity in Amazonia. *Global Ecol Biogeogr.* 13: 553-565.
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, et al. (2007) Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *PPEES.* 9: 101-116.
- Peçanha WT, Althoff SL, Galiano D, Quintela FM, Maestri R, Gonçalves GL & Freitas TRO (2017) Pleistocene climatic oscillations in Neotropical open areas: Refuge isolation in the rodent *Oxymycterus nasutus* endemic to grasslands. *PLoS ONE* 12: e0187329.
- Pennington RT, Lavin M, Prado DE, Pendry CA, Pell SK & Butterworth CA (2004) Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show

- patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359: 515-537.
- Ramos-Fregonezi AMC, Fregonezi JN, Cybis GC, Fagundes NJR, Bonatto SL & Freitas LB (2015) Were sea level changes during the Pleistocene in the South Atlantic Coastal Plain a driver of speciation in *Petunia* (Solanaceae)? *BMC Evol Biol* 15: 92.
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Mol Phylogenet Evol.* 81: 19-28.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 28: 359-389.
- Rodrigues DM, Turchetto C, Lima JS & Freitas LB (2019) Diverse yet endangered: pollen dispersal and mating system reveal inbreeding in a narrow endemic plant. *Plant Ecol & Divers.* 12: 1-10.
- Roratto PA, Fernandes FA & Freitas TRO (2015) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys torquatus*: an evaluation of the riverine barrier hypothesis. *J Biogeogr* 42.
- Seehausen O, Takimoto G, Roy D & Jokela J (2008). Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Mol. Ecol.* 17: 30-44.
- Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta* (2014b) *Mol Phylogenet Evol.* 70: 504–512.
- Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Turchetto C & 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.
- Speranza PR, Seijo JG, Grela IA & Solís-Neffa VG (2007) Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *J Biogeogr* 34: 427-436.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB and Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Second edition. Springer, New York, p. 1-28.
- Suertegaray DMA & Silva LAP (2009) Tchê Pampa: histórias da natureza gaúcha. In: Pillar VD, Muller SC, Castilhos ZMS, Jacques AVA (Eds.), *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, p. 403.
- Teixeira MC, Mäder G, Silva-Arias GA, Bonatto SL & Freitas LB (2016) Effects of past climate on *Passiflora actinia* (Passifloraceae) populations and insights into future species management in the Brazilian Atlantic forest. *Bot. J. Linn. Soc.* 180: 348-364.
- Thode VA, Silva-Arias GA, Turchetto C, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL & Freitas LB. (2014) Genetic diversity and ecological niche modelling of the restricted *Recordia reitzii* (Verbenaceae) from southern Brazilian Atlantic forest. *Bot. J. Linn. Soc.* 176: 332-348.
- Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, Kuhlemeier C, Solís-Neffa VG, Speranza, PR, Bonatto SL and Freitas LB (2014a) Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Mol Ecol.* 23: 374-389.
- Turchetto C, Segatto AL, Telles MPC, Diniz-Filho JAF and Freitas LB (2014b) Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: A comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation. *PPEES.* 16: 75-82.

- Turchetto C, Lima JS, Rodrigues DM, Bonatto SL and Freitas LB (2015a) Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). *Ann Bot* 115: 939-948.
- Turchetto C, Segatto ALA, Beduschi J, Bonatto SL and Freitas LB (2015b) Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants* 7: plv084.
- Turchetto C, Segatto ALA, Silva-Arias GA, Beduschi J, Kuhlemeier C, Bonatto SL and Freitas LB (2019) Contact zones and their consequences: hybridization between two ecologically isolated wild *Petunia* species. *Bot J Lin Soc* 190: 421-435.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F & Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* 22: 1193-1213.
- Vallejos M, Volante JN, Mosciaro MJ, Vale LM, Bustamante ML & Paruelo JM (2015) Transformation dynamics of the natural cover in the Dry Chaci ecoregion: a plot level geo-database from 1976 to 2012. *J Arid Environ.* 123: 3-11.
- van der Pijl L (1982) Principles of dispersal in higher plants. Berlin: Springer-Verlag.
- Veroslavsky G & Ubilla M (2007) A 'snapshot' of the evolution of the Uruguay River (Del Plata Basin): the Salto depositional sequence (Pleistocene, Uruguay, South America). *Quaternary Sci Rev* 26: 2913-2923.
- Ward M, Dick CW, Gribel R & Lowe AJ (2005) To self, or not to self. A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. *Heredity* 95: 246-254.
- Young AG, Boyle T & Brown AHD (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 10: 413-418.