

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

Estrutura populacional em espécies de *Petunia* com distribuição costeira: adaptação à salinidade ou isolamento por distância?

Dissertação 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 título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

SEBASTIÁN GUZMÁN RODRÍGUEZ

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre, Dezembro de 2020.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Molecular (LEM), Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e contou com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, programa PRONEX) e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS. A bolsa de mestrado foi concedida pelo CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora, a Prof. Dra. Loreta B. de Freitas, por todo o seu apoio durante estes dois anos e meio. Por ter acreditado e confiado em mim, por toda a ajuda, os recursos providenciados e por ter me ensinado tanto. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa concedida para os meus estudos no Brasil. Ao Prof. Dr. Sandro Bonatto por toda a ajuda, as discussões e os conselhos recebidos. Agradeço aos meus colegas no Laboratório de Evolução Molecular, Carolina, Analu, Luana, Geraldo, Alice, Marcelo, Pedro, por fazer de minha estada e de meu dia-a-dia uma experiência memorável. Um agradecimento muito especial para a Prof. Dra. Caroline Turchetto e a Dra. Giovanna Giudicelli por todo seu apoio, suas impagáveis contribuições tanto a este trabalho quanto ao meu crescimento como profissional e como pessoa.

Agradeço a minha família e meus amigos que ainda desde a distância continuaram me dando força e suporte sempre que precisei. Aos meus pais, este trabalho também é deles.

RESUMO

A compreensão dos processos de diversificação começa por entender os padrões de distribuição divergentes da diversidade genética das populações que levam ao isolamento de indivíduos ou subpopulações. Diferentes processos podem levar ao isolamento, e podem ser reconhecidos pelas marcas que deixam no genoma dos organismos. Porém, esse reconhecimento pode ser complicado devido ao fato de que diferentes processos podem ter lugar em distintos tempos e afetar diferentes partes do genoma. Os principais padrões de isolamento são o isolamento por distância (IBD), o isolamento por adaptação (IBA), e o isolamento por colonização (IBC). A Planície Costeira do Atlântico Sul tem uma complexa história de regressões e transgressões marinhas que fazem deste um lugar ideal para testar hipóteses sobre a importância de cada um destes padrões na evolução das espécies. Trabalhos recentes envolvendo o táxon costeiro *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* sugerem a predominância de mecanismos adaptativos para a colonização de novas terras emersas, mas quais são as pressões seletivas e qual é a fonte das diferenças fenotípicas entre este táxon e seu grupo irmão, *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, cuja distribuição é continental, são perguntas que ainda esperam ser respondidas. Mediante o uso de bibliotecas genômicas de ampla cobertura para as duas subespécies e de múltiplas aproximações analíticas, descrevemos aqui um cenário evolutivo complexo no qual forças seletivas e neutras agiram no processo de diversificação e origem do táxon costeiro. Fatores ecológicos plausíveis são sugeridos por atuarem na diversificação e se propõe que as duas subespécies passem a ser tratadas como espécies diferentes com base em suas histórias evolutivas e diferenciação genômica, tanto neutra como adaptativa. Pela primeira vez, um refúgio datado do Pleistoceno é descrito no sul do Brasil e, a partir dele se descreve a colonização da Planície Costeira do Atlântico Sul, desde a costa sul de Santa Catarina, Brasil, até a costa norte do Uruguai.

ABSTRACT

Understanding the processes of diversification begins by understanding the divergent distribution patterns of the populations' genetic diversity, which leads to the isolation of individuals or subpopulations. Different processes can lead to isolation and can be recognized by the marks they leave on the genomes. However, this recognition can be complicated because different processes can occur at different times and affect different genomic portions. The main isolation patterns are isolation-by-distance (IBD), isolation-by-adaptation (IBA), and isolation-by-colonization (IBC). The South Atlantic Coastal Plain has a complex history of marine regressions and transgressions that make this an ideal area to test hypotheses about each pattern's importance on the species evolution. A recently published work on the coastal taxon *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* suggests that adaptive mechanisms predominate during the colonization of newly emerged lands, but the selective pressures and the source of the phenotypic differences between this taxon and its sister group, *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, whose distribution is continental, are still open questions. Using genomic libraries with wide coverage for the two subspecies and with multiple analytical approaches, we describe a complex evolutionary scenario in which selective and neutral forces acted in the process of coastal species diversification and origin. Plausible ecological factors are suggested as they acted on diversification, and it is proposed that the two subspecies be considered different species based on their different evolutionary histories and genomic neutral and adaptive components. For the first time, a Pleistocene refuge is described in southern Brazil and, from it, the colonization of the South Atlantic Coastal Plain is described, from the southern Santa Catarina (Brazil) to the northern Uruguay coasts.

SUMÁRIO

Resumo	IV
Abstract	V
1. Introdução	1
1.1 Plantas costeiras	1
1.2 O gênero <i>Petunia</i> Juss. (Solanaceae)	2
1.3 A Planície Costeira do Atlântico Sul	6
1.4 Objetivos	10
2. Capítulo 1	11
3. Considerações Finais	56
4. Referências Bibliográficas	59

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de novas linhagens dentro de uma população começa com o estabelecimento de padrões divergentes de distribuição genética que levam ao isolamento de algumas sub-populações. Esse isolamento ocorre de diferentes maneiras e responde a vários processos. Dentre os diferentes processos podem ser destacados o isolamento por distância (IBD) e o isolamento pelo meio ambiente (IBE). O IBD é apresentado como resultado de limitações na dispersão dos organismos e, portanto, da diferenciação genética gradual em toda a população em uma estrutura de evolução neutra (e.g. Fukunaga et al., 2005; Cureton et al., 2006; Chybicki et al., 2009). Por outro lado, o IBE resulta da divergência genética dentro de uma população devido à adaptação de uma parte desta a certas condições ambientais às quais o resto da população não está sujeito, razão pela qual as pressões seletivas são aquelas que separam ambas as populações (Byars et al., 2009; Freeland et al., 2010; Orsini et al., 2013)

A distinção entre os dois tipos de isolamento é difícil porque seus sinais genéticos podem se sobrepor e é possível que mais de um desses processos opere na divergência de duas linhagens, mas pode ser avaliado mediante uma aproximação de genética de paisagens (Manel et al., 2003; Balkenhol et al., 2016). A adaptação local, que contribui para o isolamento geográfico, pode levar à especiação ecológica e a especiação ecológica incipiente pode revelar um padrão de IBE (Nosil et al., 2009). Se o isolamento pelo ambiente for detectado em loci genéticos presumidamente neutros, isto sugere que a diferenciação genética está ocorrendo fora das "ilhas de genes" respondendo à seleção (Rieseberg & Burke, 2001; Wu, 2001) e que as diferenças ecológicas são limitantes do fluxo gênico entre as populações. Esse padrão pode surgir por meio de dispersão reduzida ou estabelecimento em ambientes diferentes da população de origem (Wang & Bradburd, 2014). Já o estabelecimento e distribuição de espécies em paisagens lineares e uni-dimensionais como os ambientes costeiros podem favorecer o desenvolvimento de padrões de IBD (Austrich et al., 2020)

1.1. Plantas costeiras

As espécies costeiras com frequência tem se originado a partir de ancestrais não adaptados às condições de alta salinidade presentes em áreas adjacentes ao litoral (e.g., Cazé et al., 2016; Mäder et al., 2013; Meireles & Manos, 2018; Ramos-Fregonezi et al., 2015) e é comum observar que as populações que habitam as bordas da distribuição são mais diferenciadas em relação às demais, em geral de ocorrência mais central e próximas ao ponto considerado como origem (e.g., Ossa et al., 2017; Palma-Silva et al., 2009; Pinheiro et al., 2011; Salgueiro et al., 2004; Silva-Arias et al., 2017).

Assim, um dos mecanismos mais relevantes para a separação das populações que habitam o interior do continente das populações costeiras é a impraticabilidade na formação de híbridos, quer por barreiras geográficas que inviabilizam a transferência do pólen, quer por atributos inerentes à biologia de cada linhagem como diferenciação no tempo de floração ou mesmo mecanismos adaptativos que impedem o desenvolvimento dos híbridos nos territórios de cada parental respectivamente (Lowry et al., 2008; 2009).

As plantas que habitam a costa Atlântica na América do Sul tiveram sua distribuição sob a influência dos ciclos glaciais e interglaciais do Pleistoceno que foram responsáveis por fortes mudanças no nível do mar e na formação dos mananciais de água doce ao longo da costa (Ribeiro et al., 2011). Principalmente nas regiões nordeste e sudeste do Brasil, observou-se a formação de refúgios onde condições de estabilidade climática permitiram a manutenção das espécies (Carnaval & Moritz, 2008). Já na região sul do Brasil e especialmente considerando espécies de campos poucos trabalhos tem descrito a existência de refúgios (Turchetto-Zolet et al., 2013) e os padrões filogeográficos propostos para as espécies de plantas se restringem à descrição da variabilidade (e.g., Silva-Arias et al., 2017; 2020) ou à colonização do ambiente costeiros (e.g., Mäder et al., 2013; Ramos-Fregonezi et al., 2015).

1.2 O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae)

Petunia é um gênero endêmico do sul da América do Sul, reconhecido globalmente pela planta ornamental petúnia-de-jardim, um híbrido artificial interespecífico cultivado desde o século XIX. A distribuição de *Petunia* é limitada aos campos de três regiões principais que variam em altitude: entre 0 e 500 m de elevação,

na região conhecida como Pampa no Uruguai, algumas províncias ocidentais da Argentina e parte do estado do Rio Grande do Sul no Brasil; de 500 a 900 m acima do nível do mar, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, no Brasil; e em altitudes acima de 900 m de elevação, nos campos subtropicais dos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Além disso, três táxons isolados são distribuídos em áreas separadas: *P. axillaris* ssp. *subandina*, distribuída na região subandina da Argentina; *P. occidentalis*, distribuído nas regiões sub-andinhas da Bolívia e da Argentina; e *P. mantiqueirensis* que ocorre nas pastagens das montanhas da Floresta Atlântica, Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil (Stehmann et al., 2009; Reck-Kortmann et al., 2014).

A circunscrição morfológica das espécies dentro do gênero não é fácil e não há consenso entre os taxonomistas sobre o número de táxons de *Petunia*. Ao longo do tempo, as diferenças no habitat, distribuição geográfica e alguns detalhes das estruturas reprodutivas e vegetativas levaram a muitas mudanças na composição do gênero, variando entre 19 (Ando et al., 2005) e 14 espécies (Stehmann et al., 2009), dependendo do autor. Recentemente uma nova espécie foi descrita para os campos abertos da Província de Corrientes, Argentina, *P. correntina* (Greppi et al., 2019), cuja morfologia e características ecológicas a posicionariam entre as petúnias de ocorrência em baixas altitudes e relacionadas ao grupo *P. integrifolia*.

As relações filogenéticas de *Petunia* têm sido amplamente discutidas e é sugerido que o gênero pode ser dividido em dois clados, quando a análise é baseada total ou preferencialmente em marcadores moleculares plastidiais, com um grupo de espécies ocorrendo em terras baixas, de 0 a 700 m de elevação, e outro em terras altas, com elevação acima de 700 m (Ando et al., 2005; Lorenz-Lemke et al., 2010). No entanto, a alta prevalência de polimorfismos ancestrais, bem como a possibilidade de introgressão dos elementos genômicos do cloroplasto e a relativamente recente diversificação do gênero, dificultam o perfeito entendimento das relações filogenéticas e torna os clados fracamente suportados. Quando marcadores nucleares são incluídos na análise, diferentes relacionamentos evolutivos emergem entre as espécies (Kulcheski et al., 2006; Chen et al., 2007). De acordo com a análise de Reck-Kortmann et al. (2014),

combinando um elevado número de marcadores do cloroplasto e de sequências nucleares, e a totalidade dos taxa aceitos até então para o gênero, a árvore filogenética foi dividida em dois clados principais, fortemente relacionados à morfologia floral, particularmente o comprimento do tubo da corola, onde o primeiro clado é composto pelas espécies de tubo longo e a espécie *P. occidentalis*, e o segundo clado formado pelas espécies de tubo curto, sendo este subdividido em dois clados internos suportados pela altitude onde as espécies são encontradas.

Diferentes processos de especiação e diversificação tem sido descritos para o gênero *Petunia*, sendo o clado composto por espécies de tubo longo da corola fortemente relacionado à adaptação a diferentes polinizadores (Fregonezi et al., 2013), enquanto que as espécies do clado de tubo curto estariam sob a influência dos eventos climáticos do Pleistoceno (Barros et al., 2015 e 2020).

Petunia integrifolia (Hook.) Schinz & Thell é uma espécie polinizada por abelhas que tem flores roxas e faz parte do clado de espécies com tubo da corola curto, subclado de terras baixas (Reck-Kortmann et al., 2014). Segundo Stehmann & Bohs (2007), a espécie é composta por duas subespécies: *P. integrifolia integrifolia* (daqui em diante tratada apenas como *P. integrifolia*, Fig.1) e *P. integrifolia depauperata* (a partir daqui chamada apenas de *P. depauperata*, Fig.1). Estes dois taxa já vem sendo estudados em detalhes quanto à origem (Longo et al., 2014; Ramos-Fregonezi et al., 2015), processos de diversificação (Silva-Arias et al., 2017) e circunscrição taxonômica (Segatto et al., 2017) baseado em polimorfismos de sequência ou marcadores microssatélites, sem que diversas questões pudessem ser respondidas.

A subespécie *P. depauperata* é o único taxon de *Petunia* a ter uma distribuição endêmica em ambientes costeiros. Esta subespécie é associada com pastagens arenosas, dunas e formações rochosas, em solos pobres e com altas concentrações de sal, ao lado de lagoas e ambientes marinhos, de Laguna (Santa Catarina, Brasil) até Chuí, na fronteira entre o Brasil e Uruguai. A distribuição geográfica e o estabelecimento de linhagens evolutivas neste táxon são o resultado das dinâmicas complexas associadas com os ciclos de transgressões e regressões marinhas ocorridos no Oceano Atlântico durante o Pleistoceno (Ramos-Fregonezi et al., 2015). Já *P. integrifolia* tem uma

distribuição restrita ao interior do continente, em vários substratos e locais perturbados, tais como beiras de estradas ou campos de cultivo (Segatto et al., 2017). Estudos anteriores sugerem que as populações costeiras de *P. depauperata* divergiram há aproximadamente 400.000 anos, a partir de linhagens de *P. integrifolia*, por um processo de colonização seguido de isolamento ou reforçado por fortes pressões seletivas que diminuíram o fluxo de genes entre as duas linhagens (Ramos-Fregonezi et al., 2015). A quais pressões estas linhagens teriam respondido, no entanto, ainda é uma questão de debate.

Considerando os processos micro-evolutivos que teriam levado à diversificação do complexo *Petunia integrifolia* parece que esta esteve relacionada com a colonização de novos ambientes, seguindo um padrão de colonização a partir do interior para a costa em avanços sucessivos, como a dinâmica marinha no costa Atlântica durante o Pleistoceno (Silva-Arias et al., 2017). Ainda permanece em aberto a questão sobre quais são os fatores ambientais mais importantes que explicariam a divergência das populações de *P. depauperata* e se é possível achar genes específicos relacionados a este processo adaptativo.

Em relação à circunscrição destas duas subespécies, Stehmann & Bohs (2007) argumentaram que as diferenças morfológicas observadas entre estas duas taxa não seriam suficientemente fortes para elevá-las ao status de espécies, que os polimorfismos na forma e tamanho da flor e nas estruturas vegetativas principalmente seriam apenas respostas fisiológicas decorrentes à adaptação a gradientes de salinidade. Por outro lado, Segatto et al. (2017) mostraram que, baseado em marcadores moleculares e na identificação de nichos preferenciais, estas duas subespécies constituem linhagens evolutivas e ecológicas independentes, cuja morfologia diferenciada poderiam sustentar o status de espécies. Embora, bastante fundamentado e suportado pela diversidade genética e evolutiva, este último trabalho analisou apenas uma pequena parcela do genoma, deixando margem para questões em relação à extensão destes polimorfismos.



Figura 1. Vista geral e detalhe da flor de *P. integrifolia*. À esquerda, *P. integrifolia* ssp. *depauperata*. À direita, *P. integrifolia* ssp. *integrifolia*. Note-se o contraste nos ambientes habitados por cada subespécie.

1.3 A Planície Costeira do Atlântico Sul

A Planície Costeira do Atlântico Sul (PCAS) é a maior planície costeira da América do Sul, cobrindo aproximadamente 33.000 km², entre 28°S e 34°S (Cabrera & Willink, 1980). É uma planície plana ocupada principalmente por grandes sistemas lacustres costeiros. Estende-se na direção sudoeste-nordeste (SO-NE) por aproximadamente 600 km e tem uma largura média de 60-70 km na porção centro-sul e 15-20 km na porção norte (Mäder et al., 2013). Geologicamente constitui uma placa contínua desde o Cabo Polônio (Uruguai) até o Farol de Santa Marta (sul de Santa

Catarina, Brasil). Durante sua formação, múltiplos eventos de expansões e regressões marinhas influenciaram sua topografia e, por fim, a distribuição geográfica das espécies que nela habitam. Sabe-se também que em ambientes litorâneos um dos maiores desafios para a vegetação é a concentração de sal e a pressão osmótica derivadas de um solo altamente salino (Boyce 1954; Barbour 1978; Humphreys 1982; Wilson & Sykes 1999).

A geomorfologia da PCAS se caracteriza por dois sistemas deposicionais: os leques aluviais e o sistema de tipo laguna-barreira (Tomazelli & Villwock, 2005). O sistema de leques aluviais está a oeste da PCAS e marca a transição entre as terras altas continentais e os sistemas de laguna-barreira. Os leques aluviais são encontrados ao norte da PCAS e recebem sedimentos da Bacia do Paraná a través do Planalto da Serra Geral (terras altas de aproximadamente 1000 m, de origem vulcânica e sedimentária do Paleozóico e Mesozóico). Os leques aluviais ao sul da cidade de Porto Alegre (RS) recebem sedimentos do escudo Sul-rio-grandense, escudo pré cambriano de origem ígnea e metamórfica (Tomazelli & Villwock, 2005).

A característica mais relevante da PCAS é a presença de lagunas costeiras, algumas de grandes dimensões como a Lagoa dos Patos e a Lagoa Mirim (Fig.2), onde são depositados os sedimentos arenosos provenientes dos principais rios da região como o Camaquã, Jacuí e Jaguarão. Estas lagunas formaram-se mediante processos de transgressão e regressão do nível do mar, diretamente relacionado com a ocorrência dos períodos glaciais e interglaciais durante Pleistoceno e Holoceno. A primeira barreira, Laguna-Barreira I, teve origem há 400 mil anos (Ka A.P.) logo após uma grande transgressão marinha que cobriu até a região da cidade de Porto Alegre, ficando emersos apenas os morros graníticos que circundam a cidade na atualidade. A Laguna-Barreira II foi formada há 325 Ka A.P. após uma transgressão marinha menor que a anterior. Já a formação da Laguna-Barreira III ocorreu há cerca de 120 Ka A.P. e está relacionada com a formação das barreiras e restingas que fecham os grandes sistemas lagunares da atualidade. Por fim, há 7-8 Ka A.P., já no Holoceno, ocorreu o último ciclo de transgressão-regressão que formou a Laguna-Barreira IV da qual faz parte a praia oceânica atual, sendo uma área que sofre o alto impacto da ação marinha e eólica

(Fig.2). Nas proximidades do litoral existem campos de dunas bem desenvolvidos e extensos, com dunas semi-estabilizadas pela vegetação, assim como dunas ativas conhecidas como ‘dunas transgressivas’ devido a migração desde a costa até o interior do continente ocasionada pelos ventos que sopram na região em diferentes direções (Hesp et al., 2005; Martinho, 2008).

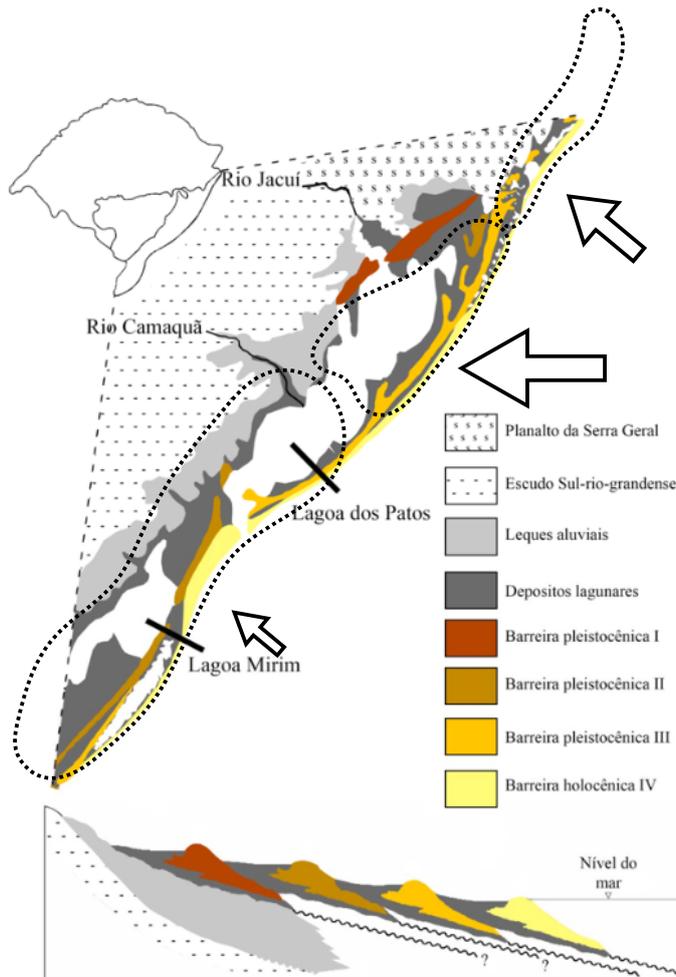


Figura 2. Esquema da geomorfologia da Planície Costeira do Atlântico Sul modificado de (Tomazelli and Villwock, 2005; Tomazelli and Dillenburg, 2007), em vista aérea (parte superior) e secção transversal (parte inferior). Aparecem marcadas com linhas sólidas as principais lagunas da PCAS. As linhas ponteadas representam as divisões achadas por Ramos-Fregonezi (2015) para as populações de *P. depauperata*. As setas representam a direção e força relativa dos ventos em cada uma destas secções da PCAS.

O clima da PCAS pertence ao regime temperado subtropical, com uma grande amplitude térmica que vai desde 0°C no inverno até mais de 35°C no verão. A precipitação é relativamente uniforme ao longo do ano, mas com algumas variações regionais. No litoral norte, as escarpas da Serra Geral geram maior umidade que se relaciona com a produção de precipitações orográficas que são mais intensas durante o verão (Camargo, 2002). Na parte central e sul do litoral, no entanto, os períodos de chuvas mais intensos ocorrem no inverno devido à penetração frontal de ciclones migratórios extra-tropicais (Grimm et al., 1998). Desta forma, a PCAS pode ser dividida em três setores: o Norte (desde Torres até Cidreira), o Centro (desde Palmares do Sul até São José do Norte), e o Sul (desde Rio Grande até Chuí).

Dentro dos fatores mais importantes que determinam o clima da PCAS estão o Anticiclone Tropical Sul Atlântico (ATSA), o Anticiclone Polar Migratório (APM) e a Depressão Térmica Semi-permanente do Chaco (depressão do Chaco). O ATSA é um centro de alta pressão composto de massas de ar quente e úmido. O APM é um centro de alta pressão alimentado por massas de ar frio, que tem comportamento migratório em direção a nordeste. Este deslocamento do APM gera a formação de dois centros de alta pressão que produzem um centro de baixa pressão no meio (frentes frias) e são acompanhados de ventos ciclônicos, instabilidades climáticas e precipitações. O ATSA ocorre predominantemente na primavera e verão e um gradiente de pressão deste com a depressão de Chaco geram ventos com sentido Leste (L) – NE ao longo de toda a PCAS. Durante o outono e inverno, o APM é mais ativo e então predominam os ventos ciclônicos em direção sul (S) – SO (Camargo 2002; Martinho 2008). Estas variações dos ventos ao longo da PCAS podem transportar de forma diferente a areia nos campos de dunas (Martinho, 2008). No setor Norte da PCAS os ventos provenientes do Norte (N) – NE e S – SO são os mais importantes, produzindo um transporte de areia com direção noroeste (NO). Em Imbé e Tramandaí (setor Norte), os ventos provenientes do NE apresentam maior velocidade e frequência, produzindo um transporte potencial com direção SO. Em Mostardas (setor Centro), encontra-se a localidade com maior impacto do vento, que apresenta as maiores frequências de ventos com velocidades superiores a 17 m/s e a menor quantidade de tempos calmos; esta é também a região que apresenta

uma ampla variação na direção do vento que leva a um transporte em geral com direção a oeste (O). Em Rio Grande (limite sul do setor Centro), encontra-se a localidade com os ventos mais fracos da PCAS, com direções opostas que terminam quase se anulando entre si. Nesta área, o transporte de areia é muito pequeno, com direção NO. O Chuí (setor Sul) está exposto com maior frequência a ventos provenientes do L – NE, mas os ventos provenientes do S, embora menos frequentes, têm maior velocidade e são mais determinantes, promovendo um transporte potencial com direção N – NO.

1.4 OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o entendimento dos processos evolutivos que originaram a diversidade no gênero *Petunia*, particularmente na sua distribuição costeira.

Objetivos específicos

- a) Determinar a diversidade genética das populações de *P. integrifolia* e *P. depauperata* usando dados de SNPs (single nucleotide polymorphisms).
- b) Determinar a estrutura populacional destas taxa e identificar as causas desta estrutura.
- c) Identificar barreiras geográficas e/ou ecológicas ao fluxo gênico entre as populações e/ou grupos de populações destas taxa.
- d) Identificar loci potencialmente relacionados à adaptação à salinidade em *P. depauperata* uma vez que sua distribuição é costeira.

2. CAPÍTULO 1 - Artigo

"The answer is blowing in the wind: historical and current population structure in a coastal species". Sebastián Guzmán, Giovanna C. Giudicelli, Caroline Turchetto, Aureliano Bombarely, Loreta B. Freitas

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico *Molecular Ecology*

Abstract

Speciation starts with patterns of diverging genetic distribution, which promotes the isolation of some individuals or subpopulations. Such isolation may occur followed by different processes and pressures. Isolation-by-distance (IBD), isolation-by-adaptation (IBA), and isolation-by-colonization (IBC) have been recognized as the main divergence patterns, but it is not easy to distinguish which one is the main pattern as each one can act at different points in time or even at the same time. Using an extensive genome coverage from a *Petunia* species complex with coastal and inland distribution, and multiple analytical approaches on population genomics and phylogeography, we showed a complex interplay between neutral and selective forces acting on the divergence process. We suggested plausible ecologic drivers for such divergence and argued that the two *P. integrifolia* subspecies could be regarded as separate species based on their evolutionary history. For the first time, we found and described a Pleistocene refuge in the southernmost South Atlantic coastal plain in Brazil and Uruguay.

Keywords: Pampa, plant diversification, South Atlantic coastal plain, Solanaceae, population genomics, phylogeography

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, usando ferramentas da genômica de populações e de análises filogeográficas em um par de *taxa* evolutivamente relacionados, mas com distribuição divergente, um litorâneo e outro continental. Estas duas subespécies de *Petunia* (Solanaceae) apresentam características morfológicas distintas (Segatto *et al.*, 2017), embora não tenham sido elevadas à condição de espécies independentes (Stehmann & Bohs, 2007; Stehmann *et al.*, 2009). Com base em uma ampla cobertura genômica, obtida pela técnica de genotyping-by-sequencing (GBS), nós demonstramos que existem diferenças significativas em seus padrões de diversidade e histórias evolutivas e investigamos quais possíveis causas desta divergência.

Os polimorfismos obtidos por GBS, traduzidos na forma de mutações de sítio único (SNPs), revelaram altos níveis de divergência entre os *taxa* e forte estruturação populacional para a subespécie costeira. Tal estruturação foi relacionada à distribuição geográfica das populações. Analisando separadamente os *loci* potencialmente neutros e aqueles sob seleção (outliers), nós conseguimos identificar padrões de diversificação diferentes entre os *taxa*, o que sugere um papel importante das diferenças ambientais no processo de diversificação. As análises de estrutura populacional feitas usando os *loci* neutros ressaltaram principalmente a separação que existe entre as subespécies, no entanto as mesmas análises considerando os outliers mostram, além da clara separação entre as subespécies, separações locais mais específicas, principalmente com relação às populações costeiras, recuperando agrupamentos previamente descritos em trabalhos anteriores usando uma cobertura restrita do genoma de cloroplasto (Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015) ou microssatélites (Silva-Arias *et al.*, 2017).

Os grupos de populações identificados a partir dos outliers podem ser interpretados como produto de condições ambientais específicas a cada porção da costa, em um processo de adaptação local. Para testar esta hipótese, nós conduzimos uma análise de modelos lineares generalizados mistos (GLMM), comparando as distâncias genéticas entre as populações com diferentes grupos de variáveis ambientais (climáticas e de solo), bem como suas respectivas distâncias geográficas, e um modelo nulo. Os resultados desta análise apontaram cenários complexos, onde uma conjunção de fatores,

combinando a distância geográfica e distintas variáveis ambientais, explicariam as diferenças genéticas das populações estudadas. Particularmente, as diferenças nos outliers entre as populações foi melhor explicada pela distância geográfica combinada a parâmetros de umidade.

Por fim, nós caracterizamos os outliers procurando sua localização em um genoma de referência e anotamos funcionalmente aqueles *loci* próximos a regiões codificadoras com o objetivo de identificar possíveis funções biológicas. Aproximadamente 53% dos outliers foram encontrados próximos a regiões codificadoras e, destes, 49% foram modificações não-sinônimas. Assim, nós sugerimos que estes genes sejam explorados em maior profundidade de maneira a determinar sua expressão diferencial nos ambientes em que as mutações são observadas.

O manuscrito apresentado nesta dissertação amplia o conhecimento dos processos de diversificação no gênero *Petunia*, particularmente sobre a colonização e diversificação na Planície costeira do Atlântico Sul (PCAS), no Brasil e Uruguai, aportando informações históricas e ecológicas que influenciaram sua distribuição e estrutura populacional. Ao mesmo tempo, sugere possíveis explicações para a manutenção dos grupos de populações encontrados, os quais estão relacionados a eventos geológicos históricos na formação da PCAS e também condições ecológicas contemporâneas. Nosso trabalho suporta os achados de estudos prévios e acrescenta uma significativa contribuição no sentido de aumentar o suporte estatístico e genômico de tais análises, permitindo aprofundar aspectos fundamentais do processo evolutivo, como a inferência e identificação de marcadores potencialmente sob seleção e suas prováveis funções biológicas, e permitindo gerar novas hipóteses e linhas de pesquisa específicas.

Estes resultados ressaltam a complexidade do processo evolutivo, no qual múltiplos fenômenos em distintas escalas, tem lugar e se retroalimentam (por exemplo, a recombinação e o desequilíbrio de ligação em oposição à seleção de *loci* específicos e deriva genética). Consequentemente, nosso trabalho também ressalta a importância da obtenção de dados completos do genoma dos organismos de forma a esclarecer o papel

1 de cada um dos fenômenos evolutivos na identificação e descrição da história evolutiva
2 das espécies e grupos.

3 Nossos resultados, no que se refere à estrutura populacional e variabilidade
4 genética das subespécies, reforçam a ideia de que estes dois *taxa* correspondem a
5 grupos evolutivamente independentes e, por tanto, sua circunscrição atual como
6 subespécies deveria ser revista levando em consideração as informações e as análises
7 aqui contidas.

8 Outros trabalhos realizados em espécies de plantas costeiras (Baxter *et al.*, 2010;
9 Lexer *et al.*, 2014) revelaram padrões de diversificação similares aos aqui descritos,
10 sugerindo que tais padrões podem estar relacionados à colonização de ambientes
11 costeiros. Mais ainda, um estudo (Mäder *et al.*, 2013) envolvendo uma espécie do
12 gênero irmão de *Petunia*, cuja distribuição na PCAS é a mesma do taxon costeiro aqui
13 analisado, reporta tendências similares, incluindo a possibilidade de que as regiões
14 continentais teriam servido de refúgio durante os ciclos de transgressões/regressões
15 marinhas do Pleistoceno e Holoceno e permitindo a colonização da PCAS em ondas de
16 migração e estabelecimento à medida que as terras se tornaram disponíveis. Da mesma
17 forma, para ambos os *taxa* da PCAS, a expansão da distribuição ao longo da costa
parece estar relacionada com o aumento na temperatura e umidade logo após das
regressões marinhas.

18 Desta forma, parece viável propor que os processos de diversificação de *Petunia*
19 na PCAS estão ligados às variáveis de clima mais que às de solo. Tal fato já foi descrito
20 para outras linhagens de ocorrência em ambientes costeiros (Baxter *et al.*, 2010; Lowry
21 *et al.*, 2008; 2009; Ab-Shukor *et al.*, 1988). Contudo, experimentos de transplante
22 recíproco entre as subespécies de *Petunia* da costa e do continente poderiam ajudar a
23 determinar o grau de especialização e adaptação destes *taxa*, bem como identificar o
24 papel da plasticidade fenotípica nestes organismos.

25 Finalmente, seria de grande importância estudar outros grupos de plantas
26 oriundos da mesma região a fim de testar os padrões evolutivos aqui discutidos e
27 permitindo traçar um panorama geral sobre a história e funcionamento ecológico da

18 PCAS e dos ecossistemas adjacentes, sobre tudo em um cenário de mudanças climáticas
19 globais e de alterações antrópicas no uso dos solos.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41 **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Introdução e Considerações Finais)**

- 42 Ab-Shukor NA, Kay QON, Stevens DP, Skibinski DOF (1988) Salt tolerance in natural
43 populations of *Trifolium repens* L. *New Phytol* 109:483–490.
- 44 Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E,
45 Suárez E, Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia* sensu Jussieu
46 (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96:289–297.
- 47 Austrich A, Mora M, Mapelli FJ, Fameli A, Kittlein MJ (2020) Influences of landscape
48 characteristics and historical barriers on the population genetic structure in the
49 endangered sand-dune subterranean rodent *Ctenomys australis*. *Genetica*
50 148:149-164.
- 51 Balkenhol N, Cushman SA, Storfer A, Waits LP (2016) Introduction to landscape
52 genetics—concepts, methods, applications. In: Balkenhol N, Cushman SA, Storfer
53 AT, Waits LP (eds) *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*. John
54 Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 1–8.
- 55 Barbour MG (1978) Salt spray as a microenvironmental factor in the distribution of
56 beach plants at Point Reyes, California. *Oecologia* 32:213–224.
- 57 Barros MJF, Silva-Arias GA, Fregonezi JN, Turchetto-Zolet AC, Iganci JRV, Diniz-
58 Filho JAF and Freitas LB (2015) Environmental drivers of diversity in subtropical
59 highland grasslands: a comparative analysis of *Adesmia*, *Calibrachoa*, and *Petunia*.
60 *Perspect Plant. Ecol. Evol. Syst.* 17:360-368.
- 61 Barros MJF, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Fregonezi JN, Diniz-
62 Filho JAF and Freitas LB (2020) Phylogenetic niche conservatism and plant
63 diversification in South American subtropical grasslands along multiple climatic
dimensions. *Gen. Mol. Biol.* 43: e20180291
- 64 Baxter I, Brazelton JN, Yu D, Huang YS, Lahner B, Yakubova E, Li Y, Bergelson J,
65 Borevitz JO, Nordborg M *et al.* (2010) A coastal cline in sodium accumulation in
66 *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter
67 *AtHKT1;1*. *PLoS Genetics* 6:e1001193.
- 68 Boyce SG (1954) The salt spray community. *Ecol. Monogr.* 24:29–67.
- 69 Byars SG, Parsons Y, Hoffmann AA (2009) Effect of altitude on the genetic structure of
70 an Alpine grass, *Poa hiemata*. *Ann. Bot.* 103(6):885–899.
- 71 Cabrera AL, Willink A (1980) *Biogeografía de America Latina*. Washington DC: OEA

- 64 Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current
65 biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J Biogeogr* 35:1187–1201.
- 66 Cazé ALR, Mäder G, Nunes TS, Queiroz LP, Oliveira G, Diniz-Filho JAF, Bonatto SL,
67 Freitas LB (2016) Could refuge theory and rivers acting as barriers explain the
68 genetic variability distribution in the Atlantic forest? *Mol Phylogen Evol* 101:
69 242-251.
- 70 Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G,
71 Marchesi E, Bullrich L, Ando T (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia*
72 (Solanaceae) based on the sequence of the HF1 gene. *J Plant Res* 120: 385–397.
- 73 Chybicki IJ, Trojankiewicz M, Oleksa A, Dzialuk A, Burczyk J (2009) Isolation-by-
74 distance within naturally established populations of European beech (*Fagus*
75 *sylvatica*). *Bot.* 87(8):791–798
- 76 Cureton AN, Newbury HJ, Raybould AF, Ford-Lloyd BV (2006) Genetic structure and
77 gene flow in wild beet populations: the potential influence of habitat on transgene
78 spread and risk assessment. *J Appl Ecol* 43(6):1203–1212
- 79 Freeland JR, Biss P, Conrad KF, Silvertown J (2010) Selection pressures have caused
80 genome-wide population differentiation of *Anthoxanthum odoratum* despite the
81 potential for high gene flow. *J Evol Biol* 23:776–782
- 82 Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL, Freitas LB (2013) Biogeographical history and
83 diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical pampas
84 grassland. *Bot J Linn Soc* 171:140–153.
- 85 Fukunaga K, Hull J, Vigouroux Y, Matsuoka Y, Sanchez J, Liu K, Buckler ES, Doebley
86 J (2005) Genetic Diversity and Population Structure of Teosinte. *Genet.*
169(4):2241–2254.
- 87 Greppi JA, Hagiwara JC, Stehmann JR. 2019. A new species of *Petunia* (Solanaceae)
88 from Corrientes, Argentina. *Phytotaxa* 414: 289-295.
- 89 Humphreys MO (1982) The genetic basis of tolerance to salt spray in populations of
90 *Festuca rubra* L. *New Phytol.* 91:287–296.
- 91 Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano
92 FM, Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss.
93 (Solanaceae). *Genetica* 126: 3–14.

- 87 Lexer C, Wüest RO, Mangili S, Heuertz M, Stölting KN, Pearman PB, Forest F,
88 Salamin N, Zimmermann NE and Bossolini E (2014) Genomics of the divergence
89 continuum in an African plant biodiversity hotspot, I: drivers of population
90 divergence in *Restio capensis* (Restionaceae). *Mol Ecol*, 23, 4373-4386.
- 91 Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM,
92 Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern
93 South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia*
94 (*Solanaceae*). *Mol Ecol* 19:5240–5251.
- 95 Longo D, Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Bonatto SL, Freitas LB (2014) Phylogeography
96 of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 174: 199–
97 213.
- 98 Lowry D, Hall MC, Salt DE, Willis JH (2009) Genetic and physiological basis of
99 adaptive salt tolerance divergence between coastal and inland *Mimulus guttatus*.
100 *New Phytol* 183:776–788.
- 101 Lowry D, Modliszewski J, Wright K, Wu C and Willis J (2008) The strength and genetic
102 basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philos Trans R Soc Lond*
103 *B* 363:3009–3021.
- 104 Mäder G, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Bonatto SL and Freitas LB (2013)
105 Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of
106 *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evol*
107 *Biol* 13: 178.
- 108 Manel S, Schwartz MK, Luikart G and Taberlet P (2003) Landscape genetics:
109 combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol* 18:189–
197.
- 110 Meireles JE and Manos PS (2018) Pervasive migration across rainforest and sandy
111 coastal plain *Aechmea nudicaulis* (Bromeliaceae) populations despite contrasting
112 environmental conditions. *Mol Ecol* 27:1261-1272.
- 113 Nosil P, Funk DJ, and Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous
114 genomic divergence. *Mol Ecol* 18:375 – 402 .
- 115 Orsini L, Vanoverbeke J, Swillen I, Mergeay J and De Meester L (2013) Drivers of
116 population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation,
117 isolation by adaptation and isolation by colonization. *Mol Ecol* 22:5983-5999.

- 110 Ramos-Fregonezi AMC, Fregonezi JN, Cybis GB, Fagundes NJR, Bonatto SL and
111 Freitas LB (2015) Were sea level changes during the Pleistocene in the South
112 Atlantic Coastal Plain a driver of speciation in *Petunia* (Solanaceae)? BMC Evol
113 Biol 15:92.
- 113 Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL, Freitas LB
114 (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: new insights into the evolutionary
115 history of the genus *Petunia*. Mol Phylogenet Evol 81:19–28.
- 115 Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB (2011) Phylogeography of the
116 endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary
117 history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. Heredity 106:46–57.
- 117 Rieseberg LH and Burke JM (2001) Commentary: A genic view of species integration. J
118 Evol Biol 14:883–886 .
- 118 Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro MMN and Margis R (2004) Even
119 population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia*
120 *uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rainforest.
121 Divers Distrib 10: 201–210.
- 121 Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Turchetto C and Freitas LB (2017) Multiple markers,
122 niche modelling, and bioregions analyses to evaluate the genetic diversity of a plant
123 species complex. BMC Evol Biol 17:234.
- 123 Silva-Arias GA, Reck-Kortmann M, Carstens BC, Hasenack H, Bonatto SL, Freitas LB
124 (2017) From inland to the coast: Spatial and environmental signatures on the
125 genetic diversity in the colonization of the South Atlantic Coastal Plain.
126 Perspect Plant Ecol Syst 28:47-57.
- 126 Stehmann JR, Bohs L (2007) Nuevas combinaciones en Solanaceae. Darwiniana
127 45:240–1.
- 127 Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB, Semir J (2009) The genus *Petunia*. In:
128 Gerats T, Strommer J (eds) *Petunia Evolutionary, Developmental and Physiological*
129 *Genetics*, Springer, Heidelberg. pp 1–28.
- 129 Tomazelli LJ and Dillenburg SR (2007) Sedimentary facies and stratigraphy of a last
130 interglacial coastal barrier in south Brazil. Mar Geol 244:33–45.
- 131 Tomazelli LJ and Villwock JA (2005) Mapeamento geológico de planícies costeiras: o
132 exemplo da costa do Rio Grande do Sul. Gravel 3:109–115.

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

136 Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical
137 patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol Ecol* 22:1193–
1213.

138 Wang IJ and Bradburd GS(2014) Isolation by environment. *Mol Ecol* 23:5649–5662.

139 Wilson JB and Sykes MT (1999) Is zonation on coastal sand dunes determined
140 primarily by sand burial or by salt spray? A test in New Zealand dunes. *Ecol Lett*
2:233–236.

141 Wu CI (2001) The genic view of the process of speciation. *J Evol Biol* 14:851–865.

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

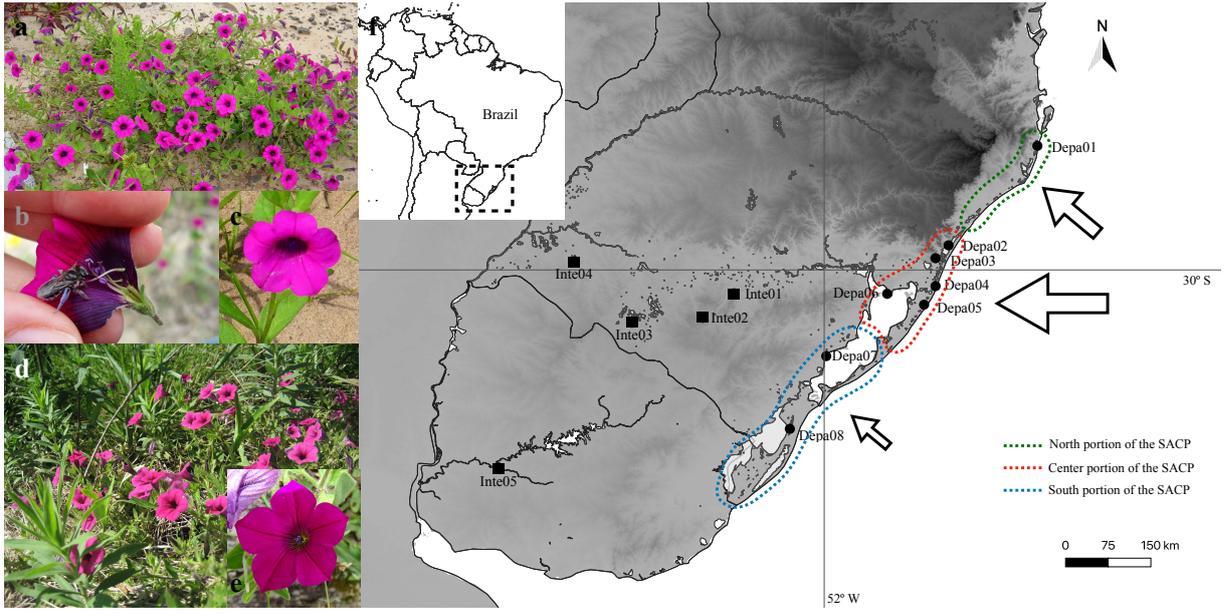
544

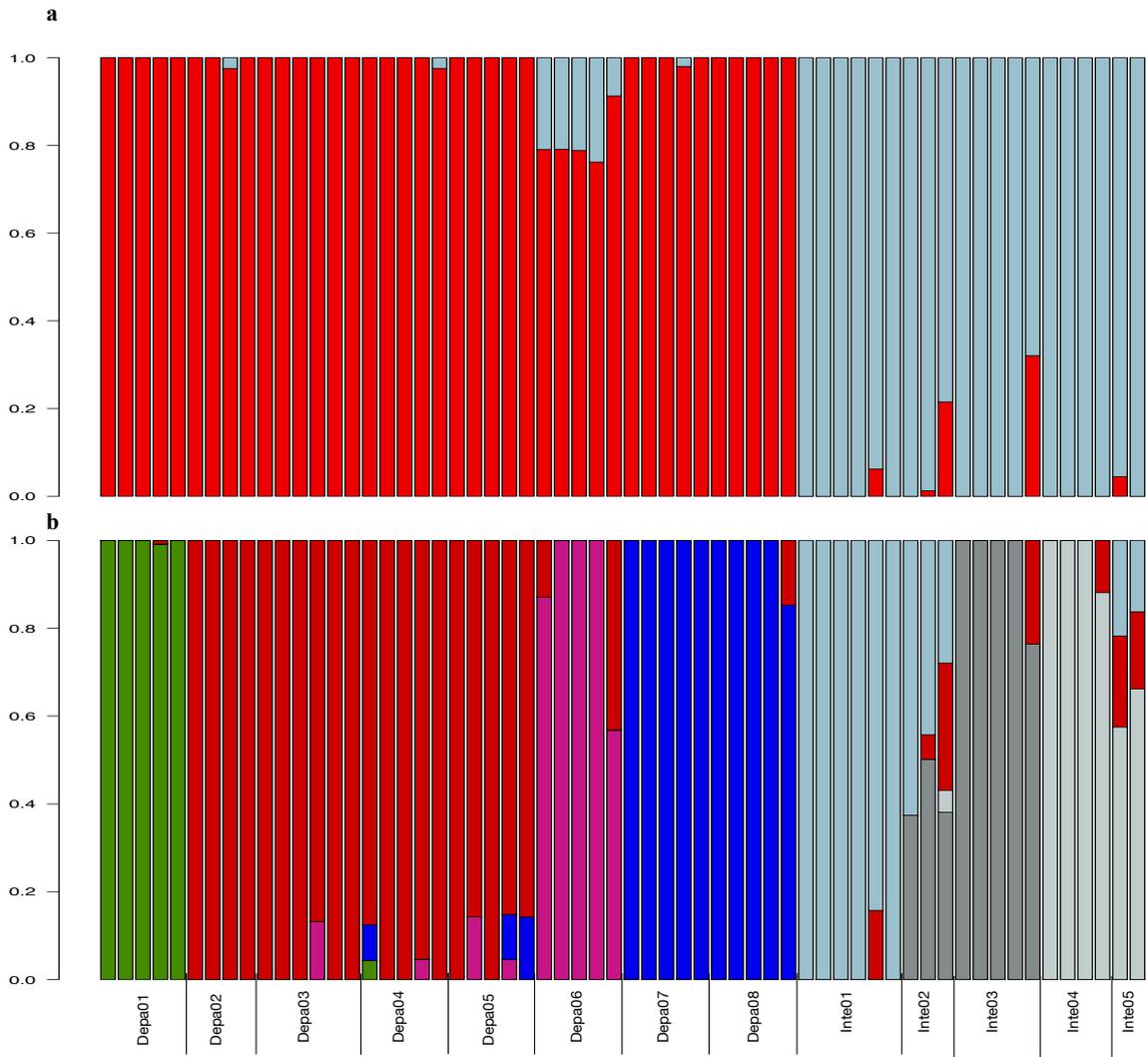
545

546

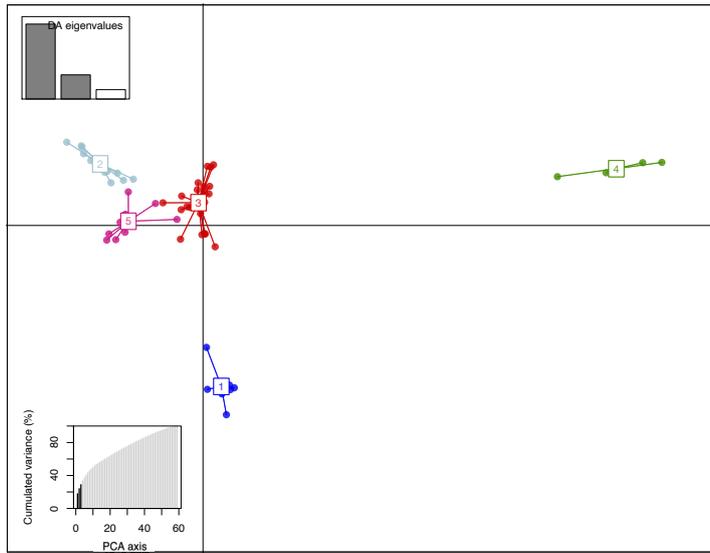
547

548





a



b

