

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

**Filogeografia, diversidade genética e estruturação populacional de *Petunia altiplana*
(Solanaceae)**

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.

LUANA SOUSA SOARES

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

Porto Alegre, março de 2021.

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

Ao fim de mais uma jornada chega o momento de agradecimento, a todos que de alguma forma influenciaram e ajudaram na minha caminhada.

Primeiramente preciso agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) pela oportunidade de acesso a um ensino de excelência (foi o que me trouxe aqui). E às instituições de financiamento a pesquisa que resistem a mingua, principalmente ao CNPq, que permitiu minha permanência e dedicação exclusiva a ciência.

Agradeço e muito a minha orientadora, Loreta, por ter me recebido, acolhido, e ter sido uma orientadora incrível, sempre presente e contribuindo com o máximo!

Agradeço a todos os amigos do LEM, (que fizeram muita falta no durante esse período de isolamento, mas que estão sempre a uma mensagem de distância): Aléxia, Alice, Analu, Carolzinha, Carol, Geraldo, Pedro e Sebastián. Muito obrigada a todos vocês, e muitas saudades dos bolos!

Tenho que agradecer também menino João Pedro, que carrega junto comigo um pedacinho de Goiás nesse estado, e está sempre a uma porta de distância para sofrer e junto.

Aos meus amigos espalhados por aí, que estamos sempre crescendo juntos e nos apoiando!

Agradeço a todos os meus professores que me guiaram e contribuíram para o enriquecimento do meu conhecimento, em especial para meu amigo, professor e antigo orientador Iderval, que me despertou o amor pela genética e evolução e está sempre disponível para uma discussão, uma companhia para congresso, uma ajudinha ou uma opinião.

Agradeço meus pais pelo apoio e incentivo ao estudo desde sempre.

Finalmente, a todos que, de forma direta ou indireta, participaram dessa conquista, o meu sincero obrigada!

RESUMO

Mudanças climáticas associadas com os ciclos glaciais e interglaciais durante o Pleistoceno influenciaram fortemente o processo evolutivo no planeta. Na América do Sul, apesar de não ter ocorrido a formação de grandes placas de gelo na superfície, as variações climáticas impactaram a estrutura populacional, a demografia e levaram a especiação e diversificação de várias espécies. Os Campos de Cima da Serra no sul da América do Sul constituem um tipo distinto de vegetação, com grande diversidade e elevado número de espécies endêmicas. A região sofreu uma grande influência dos ciclos climáticos do Pleistoceno onde, atualmente, vê-se um mosaico entre espécies de campo e da Floresta de Araucárias. A alternância de ciclos glaciais, com clima seco e frio, e interglaciais, quando as temperaturas foram mais amenas e a umidade maior, permitiram, respectivamente, a expansão dos campos do sul para o norte e a expansão das florestas sobre estes campos, levando as espécies adaptadas a áreas abertas para refúgios em elevações superiores, com condições mais favoráveis, onde diversificaram em alopatria. O gênero *Petunia* (Solanaceae) com suas 14 espécies herbáceas e adaptadas às áreas abertas teve origem nas terras baixas (<500 m acima do nível do mar) e migrou de forma secundária para os campos de maior elevação. No presente trabalho, nós avaliamos a diversidade genética, estruturação populacional e história demográfica de uma espécie de *Petunia* que habita os Campos de Cima da Serra e tem sua distribuição fragmentada pelo Rio Pelotas, *P. altiplana*, através da análise de marcadores plastidiais e nucleares e utilizando uma abordagem filogeográfica e modelagens evolutivas. Foram sequenciadas três regiões do DNA de cloroplasto e analisados dez loci de microssatélites nucleares. Os índices de diversidade genética básicos para cada tipo de marcador foram estimados. Além disso, nós empregamos estimativas de estruturação populacional, fluxo gênico histórico e atual e testamos cenários evolutivos alternativos com populações coletadas em ambas as margens do Rio Pelotas e cobrindo a totalidade da distribuição geográfica da espécie. Nós identificamos uma rápida expansão populacional e os dados plastidiais revelaram que o Rio Pelotas agiu como uma barreira geográfica efetiva formando dois grupos populacionais de acordo com as margens do rio. Também observamos um compartilhamento de polimorfismo ancestral, principalmente baseado em marcadores nucleares. Observamos migração e fluxo genético entre populações próximas e o melhor modelo evolutivo indica que a espécie se originou na margem sul e posteriormente migrou para a margem norte sob influência do Pleistoceno. Assim, sugerimos que o Rio Pelotas possa ter atuado também como um corredor de dispersão e colonização para essa espécie.

ABSTRACT

Climatic changes associated with glacial and interglacial cycles during the Pleistocene strongly influenced the evolutionary process worldwide. In South America, despite it did not suffer with extensive ice sheets covering lands, climatic variations impacted the population structure, drove speciation and diversification, and influenced the historical demography of several species. The Subtropical Highland Grasslands in the southern South America are a distinct type of vegetation with high diversity and numerous endemic species, which undergo great influence from the Pleistocene climatic cycles. Currently, the region is a mosaic between open field species and Araucaria Forest. The alternation of glacial cycles, with dry and cold climate, and interglacial cycles, when temperatures were warmer and humidity was higher, allowed, respectively, the field expansion from south to north and the forest expansion over these fields, taking species adapted to open areas for refugia at higher elevations, where more favorable conditions were found and such species diversified in allopatry. The genus *Petunia* (Solanaceae) with its 14 herbaceous species adapted to open areas has originated in the lowlands (<500 m above sea level) and secondarily migrated to the higher elevations. We sequenced three plastid regions and genotyped ten nuclear microsatellite loci. The basic genetic diversity indices for each marker type were estimated. In addition, we employed population structure estimates, historical and current gene flow, and tested alternative evolutionary scenarios with populations collected on both Pelotas River riverbanks and covering the entire species geographic distribution. We identified a rapid population expansion and plastid data revealed that the Pelotas River acted as an effective geographical barrier, forming two population groups according to the riverbanks. We also observed an ancestral polymorphism sharing, mainly based on nuclear markers. We observed migration and gene flow between nearby populations and the best evolutionary model stated that species has originated in southern riverbank and later migrated to northern riverside under the Pleistocene influence. We suggest that the Pelotas River may have acted also as a dispersal and colonising corridor for this species.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Pleistoceno e sua influência na diversificação de espécies	1
1.2 Barreiras filogeográficas e seus efeitos	2
1.3 Rios como barreiras	3
1.4 O gênero <i>Petunia</i> Juss. (Solanaceae).....	4
1.5 Rio Pelotas	5
1.6 Os Campos de Cima da Serra	5
1.5 Marcadores moleculares	6
1.6 Objetivos.....	7
2. CAPÍTULO 2 - Artigo científico em preparação para submissão ao periódico Botanical Journal of the Linnean Society, título: “ <i>Past climate changes and geographical barriers: the evolutionary history of a highland grassland nightshade species</i> ”	8
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS para os capítulo 1 e 3	12

INTRODUÇÃO

1.1 Pleistoceno e sua influência na diversificação de espécies

O Quaternário é dividido em Holoceno e Pleistoceno, abrange os últimos 1,8 milhões de anos e é caracterizado por grandes alterações climáticas com a ocorrência de períodos mais frios e secos (ciclos glaciais) intercalados com períodos mais quentes e húmidos (ciclos interglaciais). Os efeitos dessas mudanças variaram dependendo da latitude e da topografia das regiões. Altas latitudes foram cobertas por extensas camadas de gelo e as regiões temperadas e tropicais foram comprimidas próximas à linha do Equador. Essas alterações climáticas tiveram um impacto fundamental na história evolutiva das espécies em todo o globo e envolveram consideráveis e complexas mudanças demográficas, com efeitos estocásticos e seletivos na variabilidade genética de diversas espécies. Populações e linhagens se extinguiram, alelos foram perdidos em eventos fundadores e de gargalo de garrafa, mutações ocorreram e se espalharam ao longo do tempo sob o efeito da seleção e expansão populacional (Hewitt 2000; 2004; Willis & Niklas 2004).

Três potenciais cenários evolutivos têm sido sugeridos como resposta aos ciclos de fragmentação e re-expansão da distribuição das espécies. O primeiro é a persistência da espécie, onde a espécie teria sofrido a fragmentação de sua distribuição a cada ciclo de contração-expansão, falhando em gerar diferenciação genética ou restaurando a diversidade após mistura de populações, o que resultaria em uma aparente estase evolutiva. O segundo cenário seria de extinção, com o isolamento resultando em populações muito pequenas para sobreviverem. Já o terceiro cenário prevê a ocorrência de especiação alopátrica, no qual o isolamento geográfico levaria a uma diferenciação genética entre populações que seriam então incapazes de manter fluxo gênico ou expandir (Roy *et al.* 1996; Willis & Niklas 2004).

Os efeitos das mudanças climáticas do Quaternário são bem conhecidos na América do Norte e Europa, com vários exemplos de refúgios, rotas de colonização e expansão populacional após períodos glaciais, principalmente considerando espécies florestais (Dumolin-Lapègue *et al.* 1997; Petit 2003; McLachlan *et al.* 2005; Gonzales *et al.* 2008). Apesar de o Neotrópico não ter sido exposto a glaciações extensivas, as variações climáticas promoveram consideráveis alterações na estrutura populacional, impulsionando a especiação e diversificação dos grupos, e influenciando a demografia de várias espécies principalmente durante o Pleistoceno (Clapperton 1993; Iriondo 1999; Bush & Oliveira 2006; Hoorn *et al.* 2010; Lima-Rezende *et al.* 2019).

Um importante efeito do Pleistoceno na América do Sul foi a expansão dos campos durante os períodos glaciais. A Floresta Atlântica Brasileira foi significativamente reduzida

durante os períodos mais frios, sendo substituída por espécies campestres mais adaptados ao frio e baixa umidade, permitindo que espécies de campo dominassem o Sul e Sudeste do Brasil durante os períodos glaciais do Pleistoceno (Behling 2002; Werneck 2011). Espécies de campo, durante esses períodos, tiveram a oportunidade de expandir sua distribuição (Barros *et al.* 2015). Com o aquecimento e aumento da umidade durante os períodos interglaciais, as espécies florestais avançaram sobre os campos, voltando a dominar a paisagem. Por sua vez, as espécies de campo ficaram refugiadas em locais de maior elevação, onde a temperatura e a umidade baixas formaram refúgios para espécies especialistas em áreas abertas (Behling, 2002), permitindo a especiação e diferenciação de linhagens em um modelo alopátrico (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

1.2 Barreiras filogeográficas e seus efeitos

A distribuição geográfica e diversidade das espécies dependem, simultaneamente, de condições ecológicas locais e de parâmetros históricos inerentes a cada espécie (Taberlet *et al.* 1998). A especiação em alopatria (Diamond 1977) é tipicamente descrita como a presença de uma barreira geográfica dividindo as populações. Essa separação é normalmente assumida como o primeiro passo para promover especiação ou estruturação (Slatkin 1987; Coyne & Orr 2004). As barreiras representam regiões ecologicamente inadequadas às espécies que afetam seu limite de distribuição (Kirkpatrick & Barton 1997). Essa interrupção pode ocorrer por barreiras físicas ou ecológicas que levem a níveis diferentes de estruturação populacional (Pyron & Burbrink 2010).

As barreiras ecológicas dizem respeito à resposta dos organismos a variações ambientais de grande escala que levam à fragmentação de uma população a partir de áreas ecologicamente inadequadas (Pyron & Burbrink 2010). Essa separação geográfica pode ocorrer por qualquer fragmentação do nicho, como por exemplo mudanças climáticas drásticas que levam a população a refúgios (Waltari *et al.* 2007; Ruiz-Sanchez *et al.* 2012). Assim, as populações são isoladas em regiões com condições ecológicas diferentes que impactam a distribuição da espécie (Knowles 2001; Gee 2004; Wiens & Graham 2005).

Já as barreiras físicas são relacionadas a fatores extrínsecos que determinam o limite de dispersão de uma espécie, onde a dispersão entre habitats potencialmente favoráveis é limitada por uma característica topológica, geográfica ou fisiogeográfica, como rios, soergimento de montanhas ou istmos (Moritz *et al.* 2000; Soltis *et al.* 2006; Mairal *et al.* 2017). Essas barreiras

são menos prováveis de estarem sujeitas a grandes mudanças em curtas escalas de tempo em relação à existência de uma espécie (Lemmon *et al.* 2007; Pyron & Burbrink 2010).

A dispersão é uma das principais características populacionais que permitem avaliar o fluxo gênico e tem efeitos substanciais na estruturação da diversidade genética e sua distribuição no espaço. Uma restrição à dispersão que leve à redução ou interrupção do fluxo gênico, acarretará na diminuição da diversidade genética dentro das populações e o aumento da diferenciação entre elas (Broquet & Petit 2009). Esses efeitos serão especialmente sentidos em populações com baixo tamanho efetivo populacional, podendo aumentar o endocruzamento e levar à depressão endogâmica ou mesmo à extinção (Freeland & Petersen 2011). A forma como cada espécie consegue lidar com o surgimento de barreiras ao fluxo gênico varia de acordo com sua biologia. Muitas espécies têm uma tolerância limitada às variações estruturais e são incapazes de ultrapassar essas barreiras, resultando em limitações da dispersão e mudanças genéticas dentro e entre populações (Heidinger *et al.* 2013; Fahrig 2017; Brunke *et al.* 2019).

As plantas têm uma grande diversidade na forma de dispersão (Croteau 2010). Espécies que possuem uma capacidade limitada de fluxo gênico, por necessitarem de agentes externos para polinização e/ou dispersão das sementes ou propágulos, demonstram mais facilmente os efeitos das barreiras filogeográficas (Nazareno *et al.* 2017; 2019; Lowe *et al.* 2018), com o fluxo de pólen podendo influenciar a estruturação da diversidade entre populações (Freeland *et al.* 2012; Godoy *et al.* 2018).

1.3 Rios como barreiras

Alfred R. Wallace, em 1854, a partir da observação de espécies de primatas da região amazônica, sugeriu que os rios poderiam servir como barreiras, restringindo ou reduzindo os cruzamentos entre indivíduos de diferentes populações. Desde então, numerosos trabalhos trouxeram evidências do papel exercido pelos rios na delimitação geográfica, distribuição e delimitação de espécies ao redor do mundo (Dufresnes *et al.* 2019; Li *et al.* 2019) e, principalmente, na região da bacia Amazônica (Ayres & Clutton-Brock 1992; Gascon *et al.* 2000; Moraes *et al.* 2016; Nazareno *et al.* 2017; Bartoletti *et al.* 2018; Godinho & da Silva 2018) e Floresta Atlântica Brasileira (Pellegrino *et al.* 2005; Lacerda *et al.* 2007; Thomé *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.* 2011; Cazé *et al.* 2016).

O atual traçado e as mudanças no curso dos grandes rios ao longo do tempo contribuem para explicar a distribuição e estruturação da variabilidade genética em diversas espécies de animais e plantas. Alguns rios servem como fortes barreiras, bloqueando completamente o fluxo

gênico entre as populações (Gascon *et al.* 2000; Torres-Pérez *et al.* 2007; Moraes *et al.* 2016; Godinho & da Silva 2018), enquanto outros parecem não ser barreiras efetivas (Colombi *et al.* 2010; Moraes *et al.* 2016). Dependendo da dinâmica pluvial sazonal, o rio pode ser uma barreira efetiva em um determinado período e deixar de ser em outro (Gascon *et al.* 2000).

Rios como barreiras ao fluxo gênico têm sido menos frequentemente observados nos campos do sul da América do Sul, apesar de alguns rios ou mesmo paleo-rios possam ser indicados como tendo influenciado o nível estrutural das populações ou mesmo servido de corredores para a dispersão de algumas espécies (Beheregaray *et al.* 2002; Mäder *et al.* 2013; Roratto *et al.* 2015; Brusquetti *et al.* 2018; Austrich *et al.* 2020).

1.4 O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae)

O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) é endêmico do sul da América do Sul e as relações evolutivas entre suas 14 espécies já foram amplamente discutidas (Ando *et al.* 2005; Kulcheski *et al.* 2006; Lorenz-Lemke *et al.* 2010; Fregonezi *et al.* 2013; Reck-Kortmann *et al.* 2014). A diversificação das espécies tem sido proposta como recente (Lorenz-Lenke *et al.* 2010; Särkinen *et al.* 2013) e fortemente influenciada por interações ecológicas (Fregonezi *et al.* 2013; Barros *et al.* 2015, 2020). Os eventos climáticos do Pleistoceno tem sido sugeridos como responsáveis pela diferenciação de muitas das linhagens intra e interespecíficas no gênero (Turchetto *et al.* 2014; Ramos-Fregonezi *et al.* 2015; Silva-Arias *et al.* 2017) e mesmo implicados na origem e diversificação do gênero (Reck-Kortmann *et al.*, 2014; 2015).

A análise filogenética mais extensiva e inclusiva (Reck-Kortmann *et al.* 2014) para o gênero propõe a divisão das espécies em dois clados principais, fortemente suportados pelo comprimento do tubo da corola. Uma das espécies do clado de tubo curto é *Petunia altiplana* (Figura 1) que pode ser encontrada entre 800 e 1.200 m de elevação, em áreas abertas dos Campos de Cima da Serra, nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. As plantas crescem expostas diretamente à luz do sol, em ambientes que tem sido afetados por atividades humanas como beiras de estradas e afloramentos rochosos em meio a campos de pastoreio. Essa espécie pode ser considerada uma pioneira (Stehmann *et al.* 2009) e tem o Rio Pelotas cortando sua distribuição geográfica. Um estudo baseado em sequências de espaçadores intergênicos de cloroplasto sugeriu que o Rio Pelotas poderia atuar como uma barreira filogeográfica para a espécie, uma vez que foram encontrados dois grupos de haplótipos na comparação de populações de ambas as margens do Rio (Lorenz-Lemke *et al.* 2010).

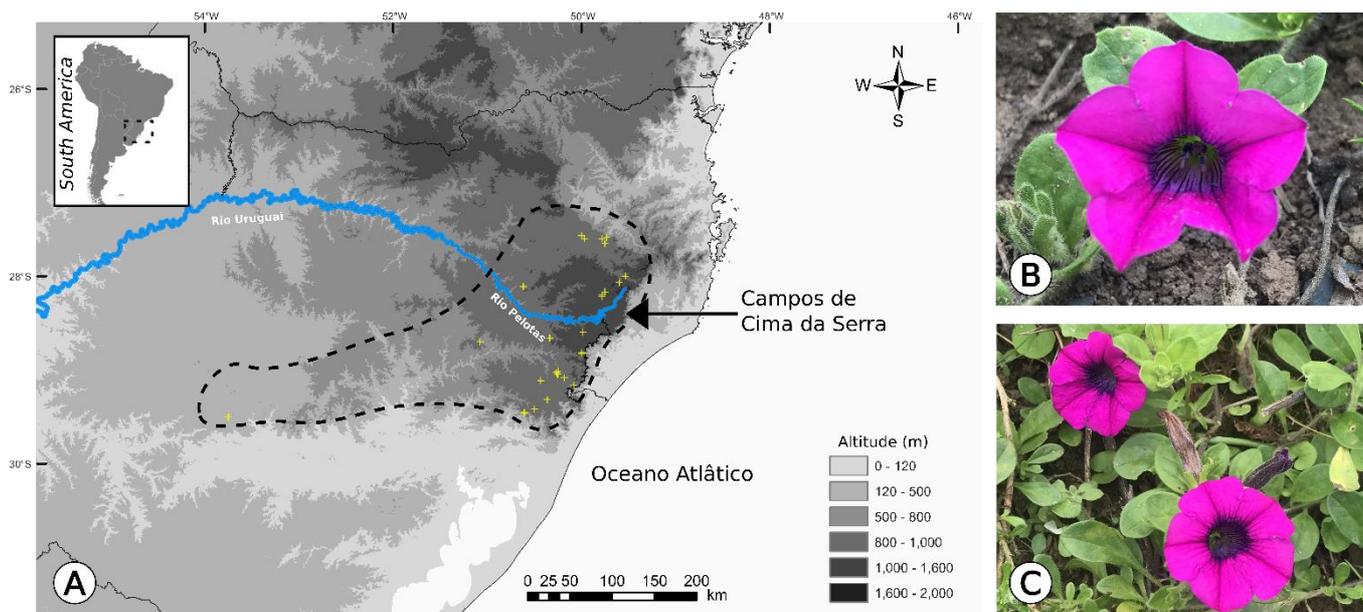


Figura 1. Mapa de distribuição (A) de *Petunia altiplana* (B e C). Área pontilhada é a região conhecida da distribuição da espécie. Cruzes amarelas representam os pontos de coleta utilizados nesse trabalho. Os Campos de Cima da Serra é a região mais escura apontada pela seta, em altitudes maiores que 1000 m.

1.5 Rio Pelotas

O Rio Pelotas (Figura 1) nasce a 64 km do Oceano Atlântico e tem sua cabeceira na escarpa erosiva da Serra Geral a 1.500 – 1.600 metros acima do nível do mar. A partir de sua origem, o rio segue em direção a noroeste pelos Campos de Cima da Serra por cerca de 450 km até encontrar o Rio Canoas e com este formar o Rio Uruguai (Persia & Neiff 1986; Kröhling *et al.* 2011). A bacia hidrográfica do Rio Pelotas tem aproximadamente 35.800 km² nos estados de Santa Catarina (62% da extensão) e Rio Grande do Sul (38%), integrando a porção superior da bacia do Rio Uruguai. A estimativa para o estabelecimento do curso do Rio Pelotas na região data do Quaternário, como parte dos movimentos associados ao soerguimento da Serra do Mar (Persia & Neiff 1986). Não foram encontrados registros de outras mudanças no curso do Rio Pelotas após esse período.

1.6 Os Campos de Cima da Serra

Os Campos de Cima da Serra (*Subtropical Highland Grasslands*) são uma formação que se estende do Rio Grande do Sul até Santa Catarina, em zonas de elevação superiores a 800 m (Figura 1). Esses campos pertencem ao domínio fitoecológico da Floresta Atlântica Brasileira

e apresentam uma vegetação típica de áreas montano e alto-montano, com espécies em sua maioria apresentando porte herbáceo. As famílias Asteraceae, Poaceae e Fabaceae predominam na região (Boldrini *et al.* 2009), formando mosaicos com a Floresta de Araucária, na qual o pinheiro-brasileiro, *Araucaria angustifolia*, é o elemento florestal dominante. Esta região conta com uma grande diversidade de espécies e diversos endemismos (Iganci *et al.* 2011; Andrade *et al.* 2019). A dinâmica das alterações climáticas durante o Pleistoceno na região foi responsável pela formação dos Campos de Cima da Serra, com uma expansão destes há cerca de mil anos (Behling 2002). Atualmente, eles se encontram ameaçados pela introdução de espécies exóticas, pelo avanço das monoculturas e outras atividades agrícolas, por queimadas e pelo florestamento com *Pinus taeda* (Barros *et al.* 2015; Boldrini *et al.* 2009), comprometendo principalmente as espécies endêmicas da região (Andrade *et al.* 2015).

1.5 Marcadores moleculares

A variação genética em marcadores moleculares é frequentemente usada para inferir padrões de fluxo gênico em uma espécie ou em grupos de espécies (Avise 2000; Al-Samarai & Al-Kazaz 2015). Processos geográficos históricos como divisão da população, distribuição e colonização em longas distâncias são esperadas produzirem padrões distintos de distribuição em alelos e as relações entre eles (Templeton *et al.* 1995). Esses processos, portanto, podem ser inferidos a partir de padrões de variação genética. O DNA mitocondrial e de cloroplasto são normalmente usados nesses estudos, pois são herdados de forma uniparental e, frequentemente, não sofrem recombinação (Derepas & Dulieu 1992; Avise *et al.* 2016). Essas características permitem, potencialmente, a reconstrução de genealogias uniparentais capazes de revelar relações hierárquicas claras entre os indivíduos e têm permitido inferir sobre processos históricos e padrões recentes de fluxo gênico em diversas espécies (Irwin 2002; Fregonezi *et al.* 2013; Barros *et al.* 2015; Moreno *et al.* 2018; Stefenon *et al.* 2019; Rana *et al.* 2020; Deng *et al.* 2020).

O fluxo gênico dentro e entre populações pode, também, ser avaliado através da análise de marcadores biparentais do tipo microssatélites, considerando que esses refletem uma história mais recente da demografia da espécie. Os microssatélites, ou polimorfismos de sequências repetidas simples (*simple sequence repeats* - SSRs), são elementos abundantes no genoma dos eucariotos e consistem de pequenos motivos de DNA (uma a seis nucleotídeos) repetidos lado a lado. Esses marcadores são caracterizados como fragmentos que exibem variação de tamanho de acordo com a expansão ou contração da região repetida. Além disso, essas sequências apresentam características interessantes para abordagens populacionais, evidenciando eventos

históricos como o efeito fundador, gargalos de garrafa e deriva genética (Al-Samarai & Al-Kazaz 2015).

Os marcadores plastidiais, que são mais conservados quando comparados com os microssatélites, já se mostraram eficientes na interpretação histórica de espécies de *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Mäder *et al.*, 2013; Turchetto *et al.* 2014; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015). Devido à herança materna do cloroplasto e à dispersão limitada de sementes observada no gênero (Stehmann *et al.* 2009), a análise das sequências plastidiais permite interpretar os padrões que moldaram a diversidade genética histórica dessas espécies desde sua origem até o presente (Ramos-Fregonezi *et al.* 2015). Por sua vez, os microssatélites tem revelado diversos aspectos da dinâmica populacional dessas espécies (Silva-Arias *et al.* 2017).

1.6 Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o entendimento dos processos evolutivos que originaram a diversidade no gênero *Petunia*, particularmente migração e colonização de novos ambientes, com especial ênfase para a espécie *Petunia altiplana*.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a diversidade genética e a estruturação populacional de *P. altiplana* ao longo de toda a distribuição geográfica da espécie;
- b) Avaliar os impactos que as mudanças climáticas do Pleistoceno tiveram sobre as populações de *P. altiplana*;
- c) Entender o papel do Rio Pelotas na estruturação e história demográfica de *P. altiplana*
- d) Avaliar o fluxo gênico entre as populações de *P. altiplana* considerando populações da mesma margem e populações de margens opostas do Rio Pelotas.

2. CAPÍTULO 2

Past climate changes and geographical barriers: the evolutionary history of a highland grassland nightshade species

Luana S. Soares & Loreta B Freitas

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico
Botanical Journal of the Linnean Society

Abstract

Climate changes and associated glacial and interglacial cycles during the Pleistocene strongly influence the evolutionary process worldwide. The subtropical highland grasslands (SHG) in southern South America constitute a distinct vegetation type with great diversity and endemic plant species. The genus *Petunia* (Solanaceae) had origin in lowland grasslands and secondarily migrated to SHG and other grasslands. Herein we described the evolutionary history of a short corolla tube and SHG representative species, *P. altiplana*, distributed throughout a river-fragmented wide area. We investigated the *P. altiplana* genetic diversity and structure based on plastid and nuclear markers to evaluate the Pleistocene climate cycles influence and the river role on species demography, employing phylogeographical and approximate Bayesian computation approaches. We found a rapid population expansion and plastid data revealed that the river acted as an effective geographical barrier forming two population groups according the riverbank they are from. We also found ancestral polymorphism sharing, mainly based on nuclear markers. We observed migration and gene flow between close populations and the best evolutionary model states that species got origin in the southern riverside and posteriorly migrated to the northern riverbank under the Pleistocene influence.

Keywords: genetic diversity – microsatellites – subtropical highland grasslands – Pleistocene – rivers as barriers – phylogeography – Solanaceae

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Petunia* surgiu nas terras baixas (< 500 m acima do nível do mar) no sul da América do Sul e, posteriormente migrou para os campos de maior altitude (Reck-Kortmann *et al.* 2014) durante o Pleistoceno (Lorenz-Lemke *et al.* 2010; Särkinen *et al.* 2013). Essa migração para terras mais altas foi acompanhada também da colonização de novos ambientes (Segatto *et al.* 2014; Ramos-Fregonezi *et al.* 2015). As histórias evolutiva e demográfica dessas espécies foram fortemente influenciadas pelas mudanças climáticas do Pleistoceno (Fregonezi *et al.* 2013; Backes *et al.* 2019), que tiveram a distribuição e estrutura de sua diversidade também impactada pelas condições ecológicas de cada área (Barros *et al.* 2015, 2020) ou ecorregião (Segatto *et al.* 2017). Na América do Sul, a ocorrência dos ciclos climáticos do Pleistoceno impactaram a estrutura populacional, a demografia e a diversificação de várias linhagens (Bush & Oliveira 2006; Beheregaray 2008; Hoorn *et al.*, 2010; Rull 2011; Lima-Rezende *et al.* 2019). O clima frio e úmido dos ciclos glaciais favoreceram as espécies de campo, que ampliaram sua distribuição (Behling 2002; Barros *et al.* 2015, 2020), enquanto os ciclos interglaciais permitiram o crescimento das espécies adaptadas a condições mais quentes e úmidas (Behling 2002), fragmentando a distribuição das espécies de campo e levando à especiação em alopatria (Lorenz-Lemke *et al.* 2010).

No presente trabalho, nós avaliamos a diversidade genética, estruturação populacional e história demográfica de uma espécie de *Petunia* que habita os Campos de Cima da Serra, *P. altiplana*, através da análise de marcadores plastidiais e nucleares utilizando uma abordagem filogeográfica e modelagens evolutivas. Essa espécie tem uma distribuição bastante ampla e ocorre em diferentes níveis de elevação (800 a 1.200 m acima do nível do mar) na divisa entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, sua distribuição é interrompida pela presença de um rio, o Rio Pelotas, que separa suas populações. Um trabalho anterior (Lorenz-Lemke *et al.* 2010) sugeriu que esse rio poderia servir como uma barreira filogeográfica para a espécie, uma vez que, embora uma amostragem limitada em número de populações e indivíduos, dois haplogrupos foram observados. Nenhum marcador nuclear havia antes sido avaliado para *P. altiplana*.

Para essa espécie, assim como para todo o gênero (Reck-Kortmann *et al.* 2014) e particularmente para as espécies de *Petunia* que habitam os campos de altitude (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Fregonezi *et al.* 2013; Backes *et al.* 2019), observou-se forte influência dos eventos climáticos ocorridos durante o Pleistoceno, especialmente no que diz respeito à expansão e contração do tamanho populacional. Os períodos mais frios e secos favoreceram expansão das populações de *P. altiplana* nos Campos de Cima da Serra. A espécie mostrou um crescimento

populacional durante os últimos 20 mil anos, ampliando sua distribuição no sentido sul-norte. Resultados como a alta diversidade genética observada tanto para as sequências dos espaçadores plastidiais como para os microssatélites nucleares, principalmente nas populações distribuídas na margem direita do Rio Pelotas, dão suporte a essa conclusão uma vez que são esperados para populações em expansão (Chiang *et al.* 2004; Slatyer *et al.* 2013; Väli *et al.* 2019). Além desses, outros resultados embasam tal conclusão como, por exemplo, o formato de estrela da rede de haplótipos, os valores significativos e negativos dos testes de neutralidade e, por fim, as estimativas temporais do tamanho populacional efetivo.

Foram observadas pequenas taxas de endogamia para as populações de *P. altiplana*, com excesso de heterozigotos na maioria delas, o que, de certa forma, já era esperado devido à auto-incompatibilidade da espécie (Robertson *et al.* 2011). Como outras espécies de *Petunia* (Turchetto *et al.* 2014; Rodrigues *et al.* 2018), *P. altiplana* também depende de polinizador para sua reprodução. As características florais de *P. altiplana* indicam que ela é polinizada por abelhas (Stehmann *et al.* 2009) e, embora não tenham sido conduzidos estudos formais para a identificação do polinizador efetivo da espécie, abelhas solitárias de pequeno porte dos gêneros *Callonychium*, *Haxantheda* e *Anthrenoides* são frequentemente observadas visitando as flores da espécie, com as duas primeiras coletando ativamente o pólen (J. R. Stehmann, com. pess.). O fluxo de pólen mediado por abelhas aumenta as chances de polinização cruzada, sendo refletido em altos índices de diversidade genética, o que foi observado entre as populações de *P. altiplana*. O fato de ser polinizada por abelhas de pequeno porte, cuja capacidade de voo e comportamento de coleta de pólen (Rodrigues *et al.* 2018; Araújo *et al.* 2019) aumentam as chances de cruzamentos dentro da mesma população, ajuda a explicar a estruturação genética e o fluxo gênico observados em *P. altiplana*. Nesse mesmo sentido, a ausência de estruturas para dispersão ativa das sementes que caem todas próximas à planta-mãe, reforça a estruturação populacional.

Os dados plastidiais evidenciaram a efetividade do Rio Pelotas como uma barreira filogeográfica para *P. altiplana*, embora os dados de microssatélites não tenham corroborado a formação de grupos de populações de acordo com as margens em que ocorrem. Os diferentes tempos de coalescência de cada um desses genomas (Dumolin *et al.* 1995) podem explicar essa aparente incongruência. O genoma de cloroplasto em espécies de *Petunia* é maternalmente herdado (Derepas & Dulieu 1992) e o sistema de auto-incompatibilidade é do tipo reconhecimento do próprio/não próprio, onde o pistilo reconhece e rejeita o pólen próprio aceitando o não próprio para fecundação cruzada (Williams *et al.* 2015), independentemente da

origem do cloroplasto dos dois indivíduos envolvidos, estratégias que reforçam a hipótese para explicar a diferença encontrada entre genomas.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem também que o Rio Pelotas possa ter atuado como um corredor de dispersão para a espécie, com populações da margem sul do rio tendo dispersado e colonizado a margem norte, seguindo uma rota no limite dos Campos de Cima da Serra, sempre em áreas elevadas. Apesar de *P. altiplana* não possuir mecanismos de dispersão a longas distâncias, suas sementes são pequenas e podem ser levadas pelo vento, um padrão que já foi observado em outras espécies do gênero cuja distribuição é linear (Silva-Arias *et al.* 2017). Além disso, as populações mais próximas têm maior similaridade genética, sugerindo um modelo de migração *step-stone*. Mais ainda, no conjunto geral dos resultados, foi observado, fluxo gênico ancestral e atual entre populações das duas margens do Rio.

Aqui nós propusemos um cenário evolutivo e demográfico para *Petunia altiplana* que destaca a importância dos eventos climáticos passados e o papel do Rio Pelotas na estrutura e distribuição da diversidade genética da espécie. Nossos resultados ajudam a traçar um padrão geral para as espécies do gênero, fundamentado principalmente nas interações ecológicas, em especial as condições climáticas e o modo de reprodução. Por tratarem-se de marcadores genéticos pontuais, ainda restam lacunas a serem preenchidas que apenas uma avaliação mais ampla do genoma poderá preencher. Assim, sugere-se que esta espécie seja analisada com base em marcadores derivados do sequenciamento de nova geração, incluindo polimorfismos neutros e potencialmente sob seleção para que conclusões mais definitivas possam ser alcançadas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Samarai FR and Al-Kazaz AA (2015) Molecular Markers: an Introduction and Applications. *Eur J Mol Biotechnol* 9:118–130. doi: 10.13187/ejmb.2015.9.118
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E and Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96:289–97. doi: 10.1093/aob/mci177
- Andrade BO, Koch C, Boldrini II, Vélez-Martin E, Hasenack H, Hermann JM, Kollmann J, Pillar VD, Overbeck GE (2015) Grassland degradation and restoration: a conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. *Natureza & Conservação* 13: 95-104.
- Andrade BO, Bonilha CL, Overbeck GE, Vélez-Martin E, Rolim RG, Bordignon SAL, Schneider AA, Vogel Ely C, Lucas DB, Garcia EN, Santos ED, Torchelsen FP, Vieira MS, Silva Filho PJS, Ferreira PMA, Trevisan R, Hollas R, Campestrini S, Pillar VD, Boldrini II. (2019) Classification of South Brazilian grasslands: Implications for conservation. *Applied Vegetation Science* 22: 168-184.
- Araújo FF, Oliveira R, Mota T, Stehmann JR, Schlindwein C (2019) Solitary bee pollinators adjust pollen foraging to the unpredictable flower opening of a species of *Petunia* (Solanaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 129: 273-287.
- Austrich A, Mora MS, Mapelli FJ, Fameli A and Kittlein MJ (2020) Influences of landscape characteristics and historical barriers on the population genetic structure in the endangered sand-dune subterranean rodent *Ctenomys australis*. *Genetica* 148:149–164. doi: 10.1007/s10709-020-00096-1
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*.
- Avise JC, Bowen BW and Ayala FJ (2016) In the light of evolution X: Comparative phylogeography. *Proc Natl Acad Sci* 113:7957–7961. doi: 10.1073/pnas.1604338113
- Ayres JM and Clutton-Brock TH (1992) River Boundaries and Species Range Size in Amazonian Primates. *Am Nat* 140:531–537
- Backes A, Mäder G, Turchetto C, Segatto AL, Fregonezi JN, Bonatto SL and Freitas LB (2019) How diverse can rare species be on the margins of genera distribution? *AoB Plants*. doi: 10.1093/aobpla/plz037
- Barros MJF, Silva-Arias GA, Fregonezi JN, Turchetto-Zolet AC, Iganci JRV, Diniz-Filho JAF and Freitas LB (2015) Environmental drivers of diversity in Subtropical Highland Grasslands. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 17:360–368. doi: 10.1016/j.ppees.2015.08.001
- Barros MJF, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Fregonezi JN, Diniz-Filho JAF and Freitas LB (2020) Phylogenetic niche conservatism and plant diversification in South American subtropical grasslands along multiple climatic dimensions. *Genet Mol Biol*. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2018-0291
- Bartoleti LF de M, Peres EA, Fontes F von HM, da Silva MJ and Solferini VN (2018) Phylogeography of the widespread spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae) in South America indicates geologically and climatically driven lineage diversification. *J Biogeogr* 45:1246–1260. doi: 10.1111/jbi.13217
- Beheregaray LB, Sunnucks P and Briscoe DA (2002) A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 269:65–73. doi: 10.1098/rspb.2001.1838
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17:3754–3774. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03857.x

- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177:19–27. doi: 10.1016/S0031-0182(01)00349-2
- Boldrini, I.I (2009) A flora dos campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar, V.D.P.; Müller, S.C.; Castilhos, Z.M.C. & Jacques, A.V.A. (eds.). *Campos Sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade*. MMA, Brasília. Pp. 63-77.
- Broquet T and Petit EJ (2009) Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:193–216. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120324
- Brunke J, Radespiel U, Russo I-R, Bruford MW and Goossens B (2019) Messing about on the river: the role of geographic barriers in shaping the genetic structure of Bornean small mammals in a fragmented landscape. *Conserv Genet* 20:691–704. doi: 10.1007/s10592-019-01159-3
- Brusquetti F, Netto F, Baldo D and Haddad CFB (2018) What happened in the South American Gran Chaco? Diversification of the endemic frog genus *Lepidobatrachus* Budgett, 1899 (Anura: Ceratophryidae). *Mol Phylogenet Evol* 123:123–136. doi: 10.1016/j.ympev.2018.02.010
- Bush MB and Oliveira PE de (2006) The rise and fall of the Refugial Hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. *Biota Neotrop*. doi: 10.1590/S1676-06032006000100002
- Cazé ALR, Mäder G, Nunes TS, Queiroz LP, de Oliveira G, Diniz-Filho JAF, Bonatto SL and 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. doi: 10.1016/j.ympev.2016.05.013
- Chiang Y-C, Schaal BA, Ge XJ and Chiang T-Y (2004) Range expansion leading to departures from neutrality in the nonsymbiotic hemoglobin gene and the cpDNA trnL-trnF intergenic spacer in *Trema dielsiana* (Ulmaceae). *Mol Phylogenet Evol* 31:929–942. doi: 10.1016/j.ympev.2003.09.017
- Clapperton CM (1993) Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 101:189–208. doi: 10.1016/0031-0182(93)90012-8
- Colombi VH, Lopes SR and Fagundes V (2010) Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. *Genet Mol Biol* 33:785–789.
- Coyne JA and Orr HA (2004) *Speciation*, 1o. OUP USA, Sunderland, MA.
- Croteau EK (2010) Causes and Consequences of Dispersal in Plants and Animals. *Nat Educ Knowl* 3:12.
- Deng Y, Liu T, Xie Y, Wei Y, Xie Z, Shi Y and Deng X (2020) High Genetic Diversity and Low Differentiation in *Michelia shiluensis*, an Endangered Magnolia Species in South China. *Forests* 11:469. doi: 10.3390/f11040469
- Derepas A and Dulieu H (1992) Inheritance of the Capacity to Transfer Plastids by the Pollen Parent in *Petunia hybrida* Hort. *J Hered* 83:6–10. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111158
- Diamond JM (1977) Continental and Insular Speciation in Pacific Land Birds. *Syst Zool* 26:263. doi: 10.2307/2412673
- Dufresnes C, Mazepa G, Jablonski D, Sadek RA and Litvinchuk SN (2019) A river runs through it: tree frog genomics supports the Dead Sea Rift as a rare phylogeographical break. *Biol J Linn Soc* 128:130–137. doi: 10.1093/biolinnean/blz076

- Dumolin S, Demesure B and Petit RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor Appl Genet* 91:1253–1256. doi: 10.1007/BF00220937
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Come V Le and Petit RJ (1997) Phylogeographic Structure of White Oaks Throughout the European Continent. *Genetics* 146:1475–1487.
- Fahrig L (2017) Ecological Responses to Habitat Fragmentation Per Se. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 48:1–23. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110316-022612
- Freeland JR and Petersen SD (2011) *Molecular Ecology*, 2nd ed. Wiley-Blackwell
- Freeland JR, Biss P and Silvertown J (2012) Contrasting Patterns of Pollen and Seed Flow Influence the Spatial Genetic Structure of Sweet Vernal Grass (*Anthoxanthum odoratum*) Populations. *J Hered* 103:28–35. doi: 10.1093/jhered/esr111
- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto S and Freitas LB (2013) Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Bot J Linn Soc* 171:140–153.
- Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, da Silva MNF, Bogart JP, Lougheed SC, Peres CA, Neckel S and Boag PT (2000) Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proc Natl Acad Sci* 97:13672–13677. doi: 10.1073/pnas.230136397
- Gee JM (2004) Gene flow across a climatic barrier between hybridizing avian species, California and gambel's quail (*Callipepla californica* and *C. gambelii*). *Evolution (N Y)* 58:1108. doi: 10.1554/03-385
- Godinho MB de C and da Silva FR (2018) The influence of riverine barriers, climate, and topography on the biogeographic regionalization of Amazonian anurans. *Sci Rep* 8:3427. doi: 10.1038/s41598-018-21879-9
- Godoy FM de R, Lenzi M, Ferreira BHDS, Silva LV Da, Zanella CM and Paggi GM (2018) High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 187:672–688. doi: 10.1093/botlinnean/boy037
- Gonzales E, Hamrick JL and Chang S-M (2008) Identification of glacial refugia in south-eastern North America by phylogeographical analyses of a forest understorey plant, *Trillium cuneatum*. *J Biogeogr* 35:844–852. doi: 10.1111/j.1365-2699.2007.01834.x
- Heidinger IMM, Hein S, Feldhaar H and Poethke H-J (2013) The genetic structure of populations of *Metrioptera bicolor* in a spatially structured landscape: effects of dispersal barriers and geographic distance. *Conserv Genet* 14:299–311. doi: 10.1007/s10592-013-0449-z
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913. doi: 10.1038/35016000
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* 359:183–195. doi: 10.1098/rstb.2003.1388
- Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartin I, Sanchez-Meseguer A, Anderson CL, Figueiredo JP et al. (2010) Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. *Science (80-)* 330:927–931. doi: 10.1126/science.1194585
- Iganci JRV, Heiden G, Miotto STS, Pennington RT (2011) Campos de Cima da Serra: the Brazilian subtropical grassland shows an unexpected level of plant endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 378-393.
- Iriondo M (1999) Climatic changes in the South American plains: Records of a continent-scale oscillation. *Quat Int* 57–58:93–112. doi: 10.1016/S1040-6182(98)00053-6
- Irwin DE (2002) Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution (N Y)* 56:2383–2394. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00164.x

- Kirkpatrick M and Barton NH (1997) Evolution of a Species 'Range. *Am Nat* 150:1–23. doi: 10.1086/286054
- Knowles LL (2001) Genealogical portraits of speciation in montane grasshoppers (genus *Melanoplus*) from the sky islands of the Rocky Mountains. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 268:319–324. doi: 10.1098/rspb.2000.1364
- Kröhling D, Brunetto E, Galina G and Zalazar MC (2011) Palaeosurface analysis on the Cretaceous basaltic plateau on the Upper Río Uruguay Basin (NE Argentina and Southern Brazil). *Geociências* 30:31–46.
- 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. doi: 10.1007/s10709-005-1427-2
- Lacerda, D.R., Marini, M.A., Santos, F.R., 2007. Mitochondrial DNA corroborates the species distinctiveness of the Planalto (*Thamnophilus pelzelni* Hellmayr, 1924), the sooretama (*T. ambiguus* Swainson, 1825) slaty-antshrikes (Passeriformes: Thamnophilidae). *Braz. J. Biol.* 67, 873–882.
- Lemmon EM, Lemmon AR and Cannatella DC (2007) Geological and climatic forces driving speciation in the continentally distributed trilling chorus frogs (*Pseudacris*). *Evolution* (N Y) 61:2086–2103. doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00181.x
- Li Y-C, Ye W-J, Jiang C-G, Zeng Z, Tian J-Y, Yang L-Q, Liu K-J and Kong Q-P (2019) River Valleys Shaped the Maternal Genetic Landscape of Han Chinese. *Mol Biol Evol* 36:1643–1652. doi: 10.1093/molbev/msz072
- Lima-Rezende CA, Rocha AV, Júnior AFC, Martins É de S, Vasconcelos V and Caparroz R (2019) Late Pleistocene climatic changes promoted demographic expansion and population reconnection of a Neotropical savanna-adapted bird, *Neothraupis fasciata* (Aves: Thraupidae). *PLoS One* 14:e0212876. doi: 10.1371/journal.pone.0212876
- Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL and Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Mol Ecol* 19:5240–5251. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04871.x
- Lowe AJ, Breed MF, Caron H, Colpaert N, Dick C, Finegan B, Gardner M, Gheysen G, Gribel R, Harris JBC et al. (2018) Standardized genetic diversity-life history correlates for improved genetic resource management of Neotropical trees. *Divers Distrib* 24:730–741. doi: 10.1111/ddi.12716
- Mäder G, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Bonatto SL and Freitas LB (2013) Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evol Biol* 13:178. doi: 10.1186/1471-2148-13-178
- Mairal M, Sanmartín I, Herrero A, Pokorny L, Vargas P, Aldasoro JJ and Alarcón M (2017) Geographic barriers and Pleistocene climate change shaped patterns of genetic variation in the Eastern Afrotropical biodiversity hotspot. *Sci Rep* 7:45749. doi: 10.1038/srep45749
- McLachlan JS, Clark JS and Manos PS (2005) molecular indicators of tree migration capacity under rapid climate change. *Ecology* 86:2088–2098. doi: 10.1890/04-1036
- Moraes LJCL, Pavan D, Barros MC and Ribas CC (2016) The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. *J Biogeogr* 43:2113–2124. doi: 10.1111/jbi.12756
- Moreno EMS, de Freitas LB, Speranza PR and Solís Neffa VG (2018) Impact of Pleistocene geoclimatic events on the genetic structure in mid-latitude South American plants:

- insights from the phylogeography of *Turnera sidoides* complex (Passifloraceae, Turneroideae). Bot J Linn Soc. doi: 10.1093/botlinnean/boy062
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ and Smith TB (2000) Diversification of Rainforest Faunas: An Integrated Molecular Approach. Annu Rev Ecol Syst 31:533–563. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.31.1.533
- Nazareno AG, Dick CW and Lohmann LG (2017) Wide but not impermeable: Testing the riverine barrier hypothesis for an Amazonian plant species. Mol Ecol 26:3636–3648. doi: 10.1111/mec.14142
- Nazareno AG, Dick CW and Lohmann LG (2019a) Tangled banks: A landscape genomic evaluation of Wallace’s Riverine barrier hypothesis for three Amazon plant species. Mol Ecol 28:980–997. doi: 10.1111/mec.14948
- Nazareno AG, Dick CW and Lohmann LG (2019b) Tangled banks: A landscape genomic evaluation of Wallace’s Riverine barrier hypothesis for three Amazon plant species. Mol Ecol 28:980–997. doi: 10.1111/mec.14948
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morano, M., Yonenaga-Yassuda, Y., Sites Jr., J.W., 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae: Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. Biol. J. Linn. Soc. 85, 13–26.
- Persia D and Neiff JJ (1986) The Uruguay River System. In: Davies BR and Walker KF (eds) The Ecology of River Systems. Springer Netherlands, pp 599–621
- Petit RJ (2003) Glacial Refugia: Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. Science (80-) 300:1563–1565. doi: 10.1126/science.1083264
- Pyron RA and Burbrink FT (2010) Hard and soft allopatry: physically and ecologically mediated modes of geographic speciation. J Biogeogr no-no. doi: 10.1111/j.1365-2699.2010.02336.x
- Ramos-Fregonezi AM, Fregonezi JN, Cybis GB, Fagundes NJ, Bonatto SL and 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. doi: 10.1186/s12862-015-0363-8
- Rana HK, Luo D, Rana SK and Sun H (2020) Geological and Climatic Factors Affect the Population Genetic Connectivity in *Mirabilis himalaica* (Nyctaginaceae): Insight From Phylogeography and Dispersal Corridors in the Himalaya-Hengduan Biodiversity Hotspot. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.01721
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL and de Freitas LB (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. Mol Phylogenet Evol 81:19–28. doi: 10.1016/j.ympev.2014.08.022
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Stehamnn JR, Greppi JA, Freitas LB (2015) Phylogenetic relationships of *Petunia patagonia* (Solanaceae) revealed by molecular and biogeographical evidence. Phytotaxa 222: 17-32.
- Ribeiro, R.A., Lemos-Filho, J.P., Ramos, A.C.S., Lovato, M.B., (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. Heredity 106, 46–57.
- Robertson K, Goldberg EE, Igić B (2011) Comparative evidence for the correlated evolution of polyploidy and self-compatibility in Solanaceae. Evolution 65: 139-155.
- Rodrigues DM, Caballero-Villalobos L, Turchetto C, Assis Jacques R, Kuhlemeier C, Freitas LB (2018) Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? AoB Plants 10: ply057.

- Roratto PA, Fernandes FA and de Freitas TRO (2015) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys torquatus*: an evaluation of the riverine barrier hypothesis. *J Biogeogr* 42:694–705. doi: 10.1111/jbi.12460
- Roy K, Valentine JW, Jablonski D and Kidwell SM (1996) Scales of climatic variability and time averaging in Pleistocene biotas: implications for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 11:458–463. doi: 10.1016/0169-5347(96)10054-9
- Ruiz-Sanchez E, Rodriguez-Gomez F and Sosa V (2012) Refugia and geographic barriers of populations of the desert poppy, *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae). *Org Divers Evol* 12:133–143. doi: 10.1007/s13127-012-0089-z
- Rull V (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends Ecol Evol* 26:508–513. doi: 10.1016/j.tree.2011.05.011
- Särkinen T, Bohs L, Olmstead RG and Knapp S (2013) A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evol Biol* 13:214. doi: 10.1186/1471-2148-13-214
- Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Turchetto C and Freitas LB (2017) Multiple markers, niche modelling, and bioregions analyses to evaluate the genetic diversity of a plant species complex. *BMC Evol Biol* 17:234. doi: 10.1186/s12862-017-1084-y
- Silva-Arias GA, Reck-Kortmann M, Carstens BC, Hasenack H, Bonatto SL and Freitas LB (2017) From inland to the coast: Spatial and environmental signatures on the genetic diversity in the colonization of the South Atlantic Coastal Plain. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 28:47–57. doi: 10.1016/j.ppees.2017.06.006
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* (80-) 236:787–792. doi: 10.1126/science.3576198
- Slatyer RA, Hirst M and Sexton JP (2013) Niche breadth predicts geographical range size: a general ecological pattern. *Ecol Lett* 16:1104–1114. doi: 10.1111/ele.12140
- Soltis DE, Morris AB, Mclachlan JS, Manos PS and Soltis PS (2006) Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Mol Ecol* 15:4261–4293. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03061.x
- Stefenon VM, Klabunde G, Lemos RPM, Rogalski M and Nodari RO (2019) Phylogeography of plastid DNA sequences suggests post-glacial southward demographic expansion and the existence of several glacial refugia for *Araucaria angustifolia*. *Sci Rep* 9:2752. doi: 10.1038/s41598-019-39308-w
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB and Semir J (2009) *The Genus Petunia*. Petunia. Springer New York, New York, NY, pp 1–28
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A and Cosson J (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol Ecol* 7:453–464. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x
- Templeton AR, Routman E and Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140:767–782. doi: 10.1093/genetics/140.2.767
- Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R., Giovanelli, J.G., Haddad, C.F., Baldissera, F.A., Alexandrino, J., 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 1018–1031.
- Torres-Pérez F, Lamborot M, Boric-Bargetto D, Hernández CE, Ortiz JC and Palma RE (2007) Phylogeography of a mountain lizard species: an ancient fragmentation process mediated by riverine barriers in the *Liolaemus monticola* complex (Sauria: Liolaemidae). *J Zool Syst Evol Res* 45:72–81. doi: 10.1111/j.1439-0469.2006.00392.x
- Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, Kuhlemeier C, Solís-Neffa VG, Speranza PR, Bonatto SL, Freitas LB (2014) Diversification in the South American Pampas: The

- genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology* 23: 374–389.
- Turchetto C, Segatto ALA, Mäder G, Rodrigues DM, Bonatto SL and Freitas LB (2016) High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: implications for conservation. *AoB Plants* 8:plw002. doi: 10.1093/aobpla/plw002
- Väli Ü, Dombrovski V, Dzmitranok M, Maciorowski G and Meyburg B-U (2019) High genetic diversity and low differentiation retained in the European fragmented and declining Greater Spotted Eagle (*Clanga clanga*) population. *Sci Rep* 9:3064. doi: 10.1038/s41598-019-39187-1
- Waltari E, Hijmans RJ, Peterson AT, Nyári ÁS, Perkins SL and Guralnick RP (2007) Locating Pleistocene Refugia: Comparing Phylogeographic and Ecological Niche Model Predictions. *PLoS One* 2:e563. doi: 10.1371/journal.pone.0000563
- Werneck FP (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quat Sci Rev* 30:1630–1648. doi: 10.1016/j.quascirev.2011.03.009
- Wiens JJ and Graham CH (2005) Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:519–539. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102803.095431
- Williams JS, Wu L, Li SL, Sun P, Kao T-H (2015) Insight into SRNase-based self-incompatibility in *Petunia*: Recent findings and future directions. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-6.
- Willis KJ and Niklas KJ (2004) The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* 359:159–172. doi: 10.1098/rstb.2003.1387