

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

**Diversidade genética no tempo e no espaço: especiação, zonas híbridas e persistência de espécies de plantas em diferentes habitats restritos aos Campos Sulinos.**

Lina María Caballero Villalobos

Orientadora: Dra. Loreta B. Freitas

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Porto Alegre, Dezembro de 2020.

## **INSTITUÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e na Section of Population Genetics, Center of Life and Food Sciences, Universidade Técnica de Munique, Alemanha. O projeto foi financiado com recursos do CNPq, CAPES, PPGBM-UFRGS e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PRONEX). A bolsa de doutorado foi concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*"Un árbol nos recuerda que para crecer hacia lo alto,  
hacia lo espiritual, lo abstracto,  
es necesario estar bien arraigado en la tierra,  
en lo concreto, en la materia.  
Es al igual que el ser humano, un ser que une cielo y tierra.  
Es el portador del fruto acabado, y al mismo tiempo,  
está en pleno proceso de desarrollo.  
Nosotros, como seres humanos,  
somos la máxima expresión de la creación y al mismo tiempo  
estamos aún en proceso de crecimiento".*

Friedrich Nietzsche

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido realizado sem a participação de muitas pessoas que, de uma ou outra forma, colaboraram nestes cinco anos. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Ministério da Educação, pela bolsa concedida durante meus estudos no Brasil e uma parte dos estudos na Alemanha. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

Agradeço muito a minha orientadora, Prof. Dra. Loreta B. Freitas por confiar na realização deste trabalho, e em geral pela paciência e dedicação, e por toda a valiosa ajuda e compreensão durante estes anos nos quais a vida me levou para novos caminhos, os quais ela aceitou, devido ao valor e a importância que estas mudanças teriam na minha vida acadêmica e pessoal. Agradeço com todo o coração e admiração ao Dr. Gustavo Silva-Arias e a Prof. Dra. Caroline Turchetto pelos aprendizados, pelas discussões, pelos conselhos, pelas soluções, pelo companheirismo neste percorrer do tempo. Foi muito grato tê-los como colegas de trabalho, e agradeço muito pelas suas palavras para me motivar e conseguir superar as múltiplas dificuldades derivadas de me tornar uma pesquisadora de uma área na qual terminei “caindo” mais pela curiosidade e necessidade, que mesmo por vocação. Também agradeço muito ao Prof. Dr. Aurélien Tellier por me receber no seu grupo de trabalho, pelos espaços proporcionados e pelo todo o seu valioso apoio.

Agradeço à Equipe Editorial da Revista Acta Biológica Colombiana, da Universidade Nacional de Colômbia, em especial à Prof. Dra. Nubia Matta e o Prof. Dr. John Charles Donato por sua confiança e por me permitir realizar meu doutorado. Sou grata por toda sua paciência e ajuda durante os anos distantes que eu consegui trabalhar mesmo na distância.

Aos meus amigos do LEM, Alice, Ana Laura, Daniele, Geraldo, Lauís, Maikel, Marcelo, Giovanna e Sara. Ao Elmo, por toda sua ajuda e disposição de sempre. Aos amigos da seção de Genética de Populações da Universidade Técnica de Munique, foi muito bom compartilhar momentos de aprendizados e de diversão com eles, Sona, Hanna, Diala, Remco, Kevin, Thibaut, Kai, Usman, Daniela e Silke.

Agradeço às amigas Alice Backes, Caroline Turchetto, Camila Inácio e Mabel Baéz pelo seu apoio geral, boas conversas, momentos inesquecíveis durante este tempo do

Doutorado, compartilhamos muitos momentos agradáveis no Brasil, valorizo a sua companhia mesmo na distância. Agradeço pelo apoio e ótimos momentos aos amigos/família da Alemanha: Sandra, Edgardo, Karem, Soizig, Leonardo, William, Birgit, Fabio e Mechtild Overbeck. Agradeço muito ao Gerhard por ter feito parte do meu caminhar durante boa parte do tempo do meu doutorado, seu apoio e energia foram extremamente importantes nesse momento para mim.

Agradeço à minha amada família na Colômbia, agradeço por entender minha ausência e por todo o seu amor, apoio moral, pela sua força mesmo nas situações complexas e difíceis, nas quais eu não tenho conseguido acompanhar por ir atrás da vida acadêmica e da ciência. Agradeço muito a minhas irmãs Claudia, Tati, Aleja e a minha tia Ana por toda a ajuda no cuidado da “ague” e dos meus pais. Agradeço muito ao Carlos e a Yolima pelo apoio de sempre para a realização das nossas carreiras como cientistas, também por cuidar com tanta dedicação do Pongo e da Aurora durante este tempo. Finalmente, não existem as palavras para agradecer pela dedicação, apoio e persistência do meu querido Gustavo e minha adorada Julieta, agradeço muito sua paciência, sua força, sua luz, sua motivação e seu amor para superar todas as dificuldades durante este tempo de aprendizados juntos, por sempre me acompanhar e me abraçar no meio dos meus encontros e desencontros durante este tempo; o Gustavo foi meu maior suporte em cada assunto pessoal e acadêmico durante o desenvolvimento desta tese, foi quem sempre me ensinou, me exigiu, teve paciência, e me incentivou para ir num caminho sempre para frente e quem acreditou na minha capacidade como pesquisadora.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	7
GENERAL ABSTRACT .....	9
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
OBJETIVOS .....	31
ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA TESE .....	32
CAPÍTULO 1.....	36
Neutral and adaptive genomic variation in hybrid zones of two ecologically diverged wild <i>Petunia</i> .	
CAPÍTULO 2.....	118
South Brazilian grasslands threatened by Climate Change: habitat suitability and genetic diversity loss predictions in eight wild nightshades.	
CAPÍTULO 3.....	297
Genetic differentiation and phylogeographic patterns of coastal plants in South America: a broad-scale overview and lessons from two co-distributed nightshades with different life form and demographic histories	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	387
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	392

## RESUMO GERAL

Entender a associação que existe entre os dados moleculares e as forças evolutivas geradas pelo ambiente é um método importante para melhorar a compreensão da dinâmica espacial das espécies e suas histórias evolutivas. A interação entre as espécies e seu ambiente pode gerar diversos padrões demográficos, os quais são observáveis em diferentes escalas espaciais e temporais. O principal objetivo desta tese foi inferir como a dinâmica espaço-temporal, conforme sugerido pelo passado, presente e futuro, contribuiu para a distribuição da diversidade genética, para a estrutura populacional e demográfica de diferentes espécies de plantas da região dos Campos Sulinos no Brasil. Adicionalmente, aprofundamos a investigação da genética populacional de várias plantas dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* (Solanaceae), incluindo a diversidade genética, diferenciação populacional e fluxo gênico. Com o objetivo de fazer uma ampla representação dos processos que modelam a diversidade vegetal dos Campos Sulinos, buscou-se entender processos evolutivos como seleção, fluxo gênico e deriva genética em espécies com histórias e relações ecológicas diferenciadas. Para tanto, foram avaliados marcadores moleculares com diferentes características e abrangência temporal. No primeiro capítulo, através do uso da técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS), foram investigados os padrões de diversidade genética, estrutura populacional, fluxo gênico e demografia histórica de duas espécies, *P. axillaris* e *P. exserta*, as quais podem hibridar na natureza em uma área restrita do Pampa, Rio Grande do Sul. No segundo capítulo, foram abordadas a genética de populações e a genética de paisagens de oito espécies provenientes de ambientes contrastantes e associadas com habitats restritos aos Campos Sulinos com a finalidade de entender os possíveis efeitos das mudanças climáticas na distribuição, diversidade genética e na estrutura populacional dessas espécies. Neste caso, foram comparadas duas espécies de ampla distribuição geográfica exclusivas dos campos da Planície Costeira do Sul do Brasil, *C. heterophylla* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata*, duas espécies raras e micro-endêmicas da região da Serra do Sudeste dentro do Pampa, *P. exserta* e *P. secreta*, e quatro espécies raras e micro-endêmicas dos Campos de Cima da Serra, *C. eglandulata*, *C. sendtneriana*, *C. serrulata* e *C. sphatulata*. Foram obtidas previsões preocupantes sobre o impacto das mudanças climáticas na distribuição, diversidade genética e estrutura populacional das espécies provenientes das diferentes unidades fitogeográficas dos Campos Sulinos. Considerando as rápidas mudanças climáticas atuais, tais evidências

podem contribuir de forma significativa para o estabelecimento de estratégias de manejo e conservação de espécies vegetais em geral com base no estabelecimento de projeções e simulações de flutuação na diversidade genética das espécies de petúnias do bioma Pampa e dos Campos de Cima da Serra. No terceiro capítulo, os taxa *C. heterophylla* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata* foram usadas como modelos. Estas duas petúnias são ecologicamente semelhantes e co-distribuídas na Planície Costeira do Atlântico Sul (SACP), e foram escolhidas com a finalidade de avaliar os fatores históricos e contemporâneos que contribuem para a divergência e diferenciação genética de plantas nos campos da planície costeira. Para isto, integramos dados publicados de sequências de cloroplasto e microssatélites nucleares com a modelagem de adequabilidade de habitat para investigar o impacto das mudanças climáticas passadas no atual padrão filogeográfico e na genética da paisagem. Além disso, revisamos a literatura científica publicada sobre diversificação e filogeografia de plantas distribuídas preferencialmente em regiões costeiras sul-americanas de forma a identificar fatores históricos e contemporâneos que contribuíram para a divergência e diferenciação genética nestes ecossistemas, integrando a revisão da literatura para as plantas costeiras da América do Sul com os padrões das duas petúnias costeiras. Desta forma, foram ampliadas as perspectivas sobre a dinâmica de expansão-contração da flora da SACP durante o Pleistoceno-Holoceno e sobre a importância da geografia e os fatores climáticos como condutores das relações evolutivas e a diferenciação genética das plantas costeiras. Em conjunto, os tópicos abordados nesta tese permitiram aprofundar os estudos sobre os padrões de distribuição da diversidade genética e da estrutura populacional num contexto espacial-temporal para diferentes biomas da região sul do Brasil, assim como evidenciaram a estreita relação entre variáveis ambientais, padrões ecológicos e história evolutiva de diferentes espécies de petúnias. Os resultados forneceram diversas evidências sobre os processos de especiação e de diversificação nos Campos Sulinos, assim como a urgente necessidade de conservar a biodiversidade desta região considerando as projeções das mudanças na distribuição, diversidade genética e estrutura populacional devidas às mudanças climáticas para as diferentes espécies de petúnias.

## GENERAL ABSTRACT

Understanding the association between molecular data and the evolutionary forces induced by the environment is an important method to improve the knowledge on the species spatial dynamics and their evolutionary histories. The interaction between species and their environment can generate different demographic patterns, which are observable at different spatial and temporal scales. The main objective of this dissertation was to infer how the spatio-temporal dynamics, deduced from past, present, and future distributions, contributed to the genetic diversity, population structure, and demography of plant species in the Campos Sulinos in Brazil. As these data are crucial for any species conservation and sustainable use, we further investigated the population genetics of several species of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae), including their genetic diversity, population differentiation, and gene flow. In order to build a broad representation of the processes that shape plant diversity in the Campos Sulinos, we used molecular markers with different characteristics and coalescence times to evaluate evolutionary processes such as selection, gene flow, and genetic drift in species displaying different ecological histories and evolutionary relationships. In the first chapter, using a genotyping by sequencing (GBS) technique, we estimated the genetic diversity, population structure, gene flow, and historical demography of *P. axillaris* and *P. exserta*, two species that can hybridize naturally in a restricted area from the Pampa in Rio Grande do Sul. In the second chapter, we addressed the population genetics and landscape genetics of eight species sampled from contrasting environment and associated with habitats restricted to the Campos Sulinos in order to understand the effects of Climate Change effects on their geographical distribution, genetic diversity, and population structure. For this chapter we studied two taxa endemic to the coastal plain in Southern Brazil with wide geographical distribution: *C. heterophylla* and *P. integrifolia* subsp. *depauperata*; two rare and micro-endemic species from the Serra do Sudeste region: *P. exserta* and *P. secreta*; and four rare and micro-endemic species from the Campos de Cima da Serra: *C. eglandulata*, *C. sendtneriana*, *C. serrulata* and *C. sphaulata*. The predictions we obtained were worrying and in light of the current fast climatic changes, this evidence can contribute significantly to establish plant management and conservation strategies based on the projections and simulations, particularly those using petunia species from the Pampa and Campos de Cima da Serra. In the third chapter, we used the taxa *C.*

*heterophylla* and *P. integrifolia* subsp. *depauperata* as models. These two petunias are ecologically similar and co-distributed in the Coastal Plain of the South Atlantic (SACP), and therefore chosen to evaluate the historical and contemporary factors that contribute to the divergence and genetic differentiation of plants in the Southern fields. To this end, we integrated published data on chloroplast sequences and nuclear microsatellites along with habitat suitability modelling to investigate the impact of past climatic fluctuations on the current phylogeographic patterns and landscape genetics. Also, we reviewed the published scientific literature on diversification and phylogeography of species that are preferably distributed in South American coastal regions in order to identify historical and contemporary factors that could have contributed to the divergence and genetic differentiation in these ecosystems, while contrasting such factors with the patterns observed for these two coastal petunias. Thus, we increased the perspectives on the SACP flora expansion-contraction during the Pleistocene-Holocene, the geography and climate as drivers of evolutionary relationships, and the genetic differentiation of coastal plants. Together, the topics covered in this dissertation added information on the distribution patterns of genetic diversity and population structure in a spatio-temporal context for different biomes in the Southern Brazil, as well as showing the close relationship between environmental variables, ecological patterns, and evolutionary history of different species of petunias. Considering the projections on distribution shifts, genetic diversity, and population structure due to climate changes for these petunias species, these results provided evidence about the speciation and diversification processes in the Campos Sulinos, while highlighting the urgent need to preserve the biodiversity from this region.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Diversificação e especiação de plantas nos Campos Sulinos do Brasil

A região denominada de “Campos Sulinos” é a principal formação vegetacional na parte sul do Brasil e inclui as vegetações campestres de duas ecorregiões diferentes: o Pampa e os campos de altitude ou “Campos de Cima da Serra”, estes últimos parte da Mata Atlântica (Overbeck *et al.*, 2007; Iganci *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2019). O conjunto destas duas formações campestres naturais é encontrado em uma área de transição de clima subtropical para tropical (Cabrera and Willink, 1980), fazendo parte da grande região de campos a qual se estende em direção ao Uruguai e o centro-leste da Argentina, conhecidas coletivamente como pastagens do Rio da Prata (Soriano *et al.*, 1992).

Os Campos Sulinos estão localizados na porção sul da região Neotropical, sendo uma região biogeográfica cuja história teve a influência de múltiplas mudanças geológicas e litológicas, flutuações climáticas históricas, uma estrutura de relevo complexa, além de um manejo no qual a vegetação está submetida a fortes distúrbios (Paim *et al.*, 2000; Boldrini, 2009), o que levou ao desenvolvimento de uma formação vegetal distinta e com uma composição biótica única.

Esta região no Sul do Brasil apresenta uma grande diversificação na composição florística e alta riqueza de espécies vegetais (Iganci *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2019), o que tem sido principalmente associado à alta diversidade no substrato geológico e à variação de altitude (Suertegaray and Silva, 2009; Barros *et al.*, 2015). Os diferentes tipos de solos são recobertos por variadas fitofisionomias campestres, gerando uma estrutura vegetacional muito diversa nestas áreas, em sua maioria compostas por estratos herbáceos contínuos, principalmente gramíneas (Andrade *et al.*, 2019). Em toda a região, as famílias botânicas mais frequentemente encontradas são Poaceae, Asteraceae, Fabaceae e Cyperaceae (Boldrini, 2009).

Alguns trabalhos tem analisado os padrões de variação genética em espécies oriundas dos Campos Sulinos, como *Passiflora* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Barros *et al.*, 2018), *Petunia* e *Calibrachoa* (Fregonezi *et al.*, 2013; Segatto *et al.*, 2017; Mäder and Freitas, 2019), *Aechmea* (Goetze *et al.*, 2016) e *Adesmia* (Iganci *et al.*, 2013). Estes estudos têm demonstrado a importância de realizar abordagens de genética de populações, filogeografia e biogeografia para compreender os processos evolutivos ocorridos na região. Especialmente

devido à heterogeneidade dos habitats que existem na região sul do Brasil, podem-se condicionar gradientes ambientais diferenciais, que possivelmente favoreceram a diferenciação das áreas fitoecológicas e até mesmo os eventos de especiação nos Campos Sulinos.

Considerando que os padrões de distribuição das plantas no espaço e no tempo são críticos para a compreensão dos processos de especiação (Sanmartín, 2012), espera-se que os padrões de especiação e diversificação nos Campos Sulinos estejam associados à distribuição das plantas no espaço e no tempo. Por isto, é importante levar em conta que, embora as formações campestres do Pampa e dos campos de altitude compartilhem muitas semelhanças ecológicas. As duas áreas diferem quanto a composição de espécies, assim como aos fatores ambientais que são determinantes em cada uma (Barros *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2019). Desta forma, ao serem realizados estudos evolutivos envolvendo plantas dos Campos Sulinos, faz-se necessário considerar as diferenças ambientais e históricas de cada um dos biomas que conformam a região.

As análises filogenéticas e filogeográficas integradas ao desenvolvimento do conhecimento no tempo e da natureza das mudanças climáticas e geológicas têm proporcionado novas perspectivas sobre as forças evolutivas que atuaram na formação de diversos biomas (Byrne *et al.*, 2008). Diversos trabalhos (p/ ex.: Turchetto *et al.*, 2014; Segatto *et al.*, 2017; Mäder and Freitas, 2019) têm demonstrado como é fundamental considerar a forma como a distribuição espaço-temporal da variação genética está conectada ao contexto ecológico, de forma a entender a natureza e o modo da diferenciação intra e interespecífica em espécies vegetais dos Campos Sulinos. No entanto, até o momento, poucos trabalhos foram realizados com foco nas análises em conjunto de informações filogeográficas e ecológicas que permitam aprofundar o conhecimento da história evolutiva de diferentes espécies nos biomas desta região (p/ ex.: Mäder *et al.*, 2013; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013).

## **2. Importância da compreensão das características da paisagem e variáveis climáticas nos processos de diferenciação genética das plantas dos Campos Sulinos**

Processos históricos e ecológicos moldaram os padrões de diversidade genética em espécies de plantas na América do Sul (Sérsic *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2016; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Embora a compressão dos múltiplos sinais que mecanismos como especiação,

migração e recolonização pós-glacial para novos ambientes podem gerar, sua análise é pouco frequente, especialmente para as regiões costeiras ou para os campos de altitude dos Campos Sulinos.

O papel do ambiente na dinâmica da especiação pode ser detectado atualmente usando abordagens empíricas que combinem a divergência populacional em nível molecular e os padrões de divergência ecológica (Runde and Nosil, 2005; Eldon *et al.*, 2013; Hua and Wiens, 2013). Especialmente porque os nichos são conservados em múltiplas escalas filogenéticas (Peterson *et al.*, 1999; Graham *et al.*, 2004; Pearman *et al.*, 2008; Wiens *et al.*, 2010; Peterson, 2011), estudar os efeitos das mudanças climáticas históricas na evolução e conservação de *taxa* vegetais dentro de uma mesma região pode ser de grande utilidade. Além disso, esses dados contribuem também para o entendimento das mudanças de nicho que as espécies enfrentam sob as atuais condições de mudanças climáticas.

Para compreender o nicho das espécies, a modelagem de nicho ecológico é uma ferramenta amplamente utilizada para estimar os requisitos ambientais das espécies (os atributos de nicho abiótico), correlacionando as ocorrências conhecidas das espécies com características ambientais espacialmente explícitas (Guisan and Zimmerman, 2000; Guisan and Thuiller, 2005; Elith and Leathwick, 2009; Peterson, 2011). Este método permite testar hipóteses quantitativas sobre as interações entre as espécies e seu ambiente considerando o espaço e o tempo. Além disso, quando são usadas em conjunto, as informações filogenéticas e/ou filogeográficas e a modelagem de nicho ecológico permitem investigar a conservação ou divergência de nicho durante a evolução (Graham *et al.*, 2004; Wiens and Graham, 2005; Pyron *et al.*, 2015).

As mudanças climáticas afetam a diversidade demográfica e genética de muitas espécies de plantas e, conseqüentemente, influenciaram suas histórias evolutivas (Hewitt and Nichols, 2005; Alsos *et al.*, 2012; Pauls *et al.*, 2013; Schierenbeck, 2017; Anderson and Song, 2020). Embora o efeito das mudanças climáticas do Quaternário sobre a história evolutiva das plantas nos Campos Sulinos não tem sido ainda bem documentado, já são vários os trabalhos baseados na diversidade genética que evidenciam a influência de fatores ambientais na distribuição potencial de uma ampla quantidade de espécies de plantas desses ecossistemas (Barros *et al.*, 2015; 2020; Silva- Arias *et al.*, 2017; Segatto *et al.*, 2017; Giudicelli *et al.*, 2019; Mäder and Freitas, 2019).

O uso em conjunto da informação obtida a partir de dados moleculares e genética de populações com a modelagem de nichos proporciona o avanço do conhecimento e sua aplicação em esforços de conservação da biodiversidade (Pahad *et al.*, 2019). Esta abordagem já tem sido utilizada para avaliar o atual estado de conservação de espécies vegetais na América do Sul (p/ ex.: Morales *et al.*, 2015; Silva Vieira *et al.*, 2020), esclarecer a filogeografia de linhagens relacionadas (p/ ex.: Jakob *et al.*, 2009), bem como para prever futuras perdas de diversidade genética devidas às mudanças climáticas (p/ ex.: Collevatti *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2017). Porém, para espécies dos Campos Sulinos, esta abordagem tem sido escassa (Mäder and Freitas, 2019).

Algumas variáveis bioclimáticas como a altitude, temperatura e precipitação já tem sido relacionadas a sinais filogenéticos, padrões filogeográficos e diferenciação genética em espécies dos Campos Sulinos dos gêneros *Adesmia*, *Petunia* e *Calibrachoa* (Barros *et al.*, 2015; 2020; Silva- Arias *et al.*, 2017). A modelagem de nicho ecológico também evidenciou as relações evolutivas entre linhagens em resposta às flutuações paleoclimáticas do Pleistoceno, indicando as linhagens diferem umas das outras devido principalmente às condições climáticas que experimentaram no passado (Segatto *et al.*, 2017; Giudicelli *et al.*, 2019; Mäder and Freitas, 2019), permitindo apontar alguns dos locais de grande relevância para a conservação e manutenção da diversidade dos Campos Sulinos (Barros *et al.*, 2015; Giudicelli *et al.*, 2019).

### **3. Características dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* como modelos para o estudo dos processos de diversificação e especiação nos Campos Sulinos**

Os gêneros neotropicais *Petunia* e *Calibrachoa* pertencem à tribo Petunieae da família Solanaceae (Olmstead, 2013; Särkinen *et al.*, 2013). Esses gêneros são amplamente conhecidos devido ao cultivo de algumas espécies ornamentais, especialmente *P. hybrida* e algumas variedades de *Calibrachoa*. Além do uso em horticultura, o gênero *Petunia* também é conhecido por ser um modelo para a realização de diversas pesquisas em biologia molecular e genética de plantas (Vandenbussche *et al.*, 2016).

O gênero *Petunia* tem reconhecidas 17 taxa que ocorrem somente no sul da América do Sul, sendo a maioria delas encontradas no sul e sudeste do Brasil (Stehmann *et al.*, 2009; Greppi *et al.*, 2019). Dois centros de diversidade de espécies são reconhecidos para o gênero, ambos associados com vegetação aberta. O primeiro corresponde às terras altas do sul do

Brasil, no norte do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina, e o outro ocorre em terras baixas, incluídas na região do Pampa no sul do Rio Grande do Sul (Stehmann *et al.*, 2009). O gênero tem uma história de divergência recente (Reck-Kortmann *et al.*, 2014), com o principal fator de isolamento entre as espécies sendo atribuído à geografia (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010), seguida da diversificação ecológica (Fregonezi *et al.*, 2013).

Cerca da metade das espécies de *Petunia* é endêmica de regiões muito restritas, sendo que algumas delas são associadas a regiões fitoecológicas específicas (Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2016). Alguns *taxa* crescem em simpatria, inclusive com zonas de contato e híbridos naturais sendo descritos (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Giudicelli *et al.*, 2019).

Por sua vez, o gênero *Calibrachoa*, com a exceção de *C. parviflora*, ocorre exclusivamente no sudeste da América do Sul, apresentando uma distribuição predominantemente subtropical, e suas espécies ocorrendo com maior densidade no sul do Brasil (Tsukamoto *et al.*, 2002; Mäder and Freitas, 2019). Assim como *Petunia*, o gênero *Calibrachoa* colonizou recentemente a faixa geográfica atual e exibe rápida radiação morfológica, com maior diversificação de espécies durante o Pleistoceno (Mäder and Freitas, 2019). No limite sul de sua distribuição, o gênero é amplamente distribuído no Pampa, onde solos rochosos e rasos suportam os campos que se estendem aos campos de altitude (Fregonezi *et al.*, 2013). Além disso, algumas espécies também ocorrem nos campos tropicais das terras altas (THG) e no Chaco (Backes *et al.*, 2019; Mäder and Freitas, 2019). A grande maioria das espécies de *Calibrachoa* possui um padrão de distribuição contínuo, restrito a regiões geográficas associadas a condições ambientais específicas (Mäder and Freitas, 2019).

Análises filogenéticas permitiram realizar reconstruções biogeográficas que apontam uma origem pampeana para *Petunia* e *Calibrachoa* (Reck-Kortmann *et al.*, 2014; Mäder and Freitas, 2019), da mesma forma que para a tribo Petuniae como um todo (Reck-Kortmann *et al.*, 2015), com posterior migração e colonização de terras de maior altitude. Depois da separação, os dois gêneros teriam evoluído de forma independente, convergindo na colonização de áreas de clima subtropical da região pampeana e chegando posteriormente ao planalto catarinense (Fregonezi *et al.*, 2013; Reck-Kortmann *et al.*, 2014; Mäder and Freitas, 2019).

Durante muito tempo, os dois gêneros foram considerados como um só devido à similaridade morfológica e distribuição espacial. Porém, de acordo com o número

cromossômico básico (Wijsman and De Jong, 1985; Wijsman, 1990), as espécies foram divididas em *Petunia* ( $x = 7$ ) e *Calibrachoa* ( $x = 9$ ). Adicionalmente, os gêneros apresentam algumas características morfológicas diferenciais, como cinco estames arranjados em três alturas diferentes e o pólen amarelo em todas as espécies de *Calibrachoa*, diferindo da maior parte das espécies de *Petunia* cujo pólen é violáceo (Stehmann *et al.*, 2009). Também, são evidentes diferenças entre espécies dos dois gêneros no seu hábito, forma da folha, pré-floração e coloração da corola (Stehmann *et al.*, 1997; Ando, 2001; Reis *et al.*, 2002). Entre as características morfológicas que apoiaram a separação dos dois gêneros, são diagnósticas as diferenças nas paredes celulares da testa das sementes, a anatomia foliar e o aspecto do cálice (Stehmann *et al.*, 1997). A separação entre os gêneros está bem suportada por dados moleculares (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006).

Espécies dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* constituem excelentes modelos para estudar especiação ecológica por pressões seletivas promovidas por polinizadores, especialização a condições edáficas e ambientais específicas, bem como para compreender processos puramente neutros como diferenciação e especiação alopátrica por deriva genética durante períodos de isolamento em resposta a ciclos de mudanças climáticas recentes (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Fregonezi *et al.*, 2013). Esta última, parece ser a principal força na diversificação de *Petunia* e *Calibrachoa*. Diversas modelagens ecológicas de nicho indicaram a existência de forte conservadorismo de nicho para diferentes linhagens dentro destes dois gêneros, sendo que se apresentam preferências ambientais relativamente semelhantes, as quais provavelmente se devem ao compartilhamento de nicho ancestral (Turchetto *et al.*, 2014b; Barros *et al.*, 2015; 2020; Segatto *et al.*, 2017; Giudicelli *et al.*, 2019; Mäder and Freitas, 2019). Adicionalmente, análises de conservação de nicho e biorregiões revelaram que o habitat teve um papel muito importante ao longo do tempo na preservação dos limites de diversos *taxa* de *Petunia* e *Calibrachoa* (Barros *et al.*, 2015; Segatto *et al.*, 2017; Mäder and Freitas, 2019), podendo constituir modelos para explicar os padrões evolutivos que promoveram a expansão recente dos Campos Sulinos.

Sabe-se que as oscilações climáticas do Pleistoceno favoreceram a expansão dos ecossistemas dos campos e a paisagem de vegetação aberta no Neotrópico, influenciando a história evolutiva de espécies adaptadas a esses ambientes (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2018). No caso dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*, diferentes trabalhos indicaram que os principais clados são associados a diferentes ambientes no passado e,

portanto, estiveram sob a influência de diferentes condições climáticas que modificaram a composição da paisagem natural (Segatto *et al.*, 2017; Mäder and Freitas, 2019).

Algumas espécies de *Calibrachoa* e *Petunia* possuem distribuições muito restritas, com um número diminuto de indivíduos (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Turchetto *et al.*, 2016; Backes *et al.*, 2019; John *et al.*, 2019), que por vezes ocorrem em simpatria com espécies de distribuição ampla (Segatto *et al.*, 2017; Giudicelli *et al.*, 2019). As espécies *C. sphatulata* e *C. eglandulata*, representadas por poucas populações nos campos de altitude (John *et al.*, 2019), ou *P. exserta* (Segatto *et al.*, 2014) e *P. secreta* (Turchetto *et al.*, 2016), oriundas da Serra do Sudeste, podem ser consideradas casos extremos de distribuição restrita. Porém, *taxa* como as subespécies de *P. axillaris* (Turchetto *et al.*, 2014a), com uma ampla distribuição pelo Pampa e o Chaco argentino, e *P. integrifolia* subsp. *depauperata* (Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015) e *C. heterophylla* (Mäder *et al.*, 2013), cujas distribuições se estendem quase que exclusivamente e por toda a planície costeira do Atlântico Sul, do sul do estado de Santa Catarina até o Uruguai, são exemplos do oposto.

A história evolutiva de algumas espécies desses dois gêneros está relacionadas à diversidade de seus polinizadores (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Hoballah *et al.*, 2007; Gübitz *et al.*, 2009; Fregonezi *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2018a), sendo que são encontradas diferentes síndromes de polinização entre as espécies, podendo ser este um fator crítico na diversificação de *Calibrachoa* (Fregonezi *et al.*, 2013) e *Petunia* (Reck-Kortmann *et al.*, 2014). Correlacionados com as diferentes síndromes de polinização, alguns outros fatores provavelmente envolvidos no isolamento reprodutivo entre as espécies são as mudanças de habitat e as alterações de características florais (Turchetto *et al.*, 2014a; Barros *et al.*, 2015; Segatto *et al.*, 2017; Giudicelli *et al.*, 2019).

Até o momento, apenas indivíduos híbridos entre *Petunia axillaris* e *P. exserta* têm sido encontrados na natureza (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2019a; Teixeira *et al.*, 2019; 2020), mas considerando que a partir de cruzamentos em condições controladas de experimentação não foram encontrados mecanismos de isolamento reprodutivo pós-polinização ou pós-zigóticos entre as espécies de cada gênero (Watanabe *et al.*, 1996; Stehmann *et al.*, 2009), a realização de estudos sobre isolamento reprodutivo e manutenção das espécies de petúnias pode contribuir para a compreensão dos processos de especiação e de conservação da integridade das espécies nos Campos Sulinos.

As espécies de *Petunia* e *Calibrachoa* não possuem mecanismos de dispersão de sementes a longas distâncias, já que seus frutos são deiscentes e as sementes são liberadas diretamente no solo, muito próximas à planta-mãe (Stehmann, 1999; Rodrigues *et al.*, 2018b; Turchetto *et al.*, 2019b). Além disso, estratégias de multiplicação vegetativa também não tem sido observadas para os diferentes *taxa* destes dois gêneros (Stehmann, 1999). Tais fatos tornam necessário estudar as variáveis genéticas e ecológicas na distribuição destas espécies de forma a contribuir para ao conhecimento dos processos de diversificação de plantas dos Campos Sulinos, uma vez que muitos dos *taxa* tem se distribuído e conseguido adaptar a habitats muito diferentes e contrastantes em relação aos seus locais de origem (Reck-Kortmann *et al.*, 2014; Mäder and Freitas, 2019).

Até o presente, a maioria dos estudos filogeográficos dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* utilizaram marcadores neutros, motivo pelo qual o papel da seleção no processo de diversificação pode ter sido subvalorizado. O uso de dados genômicos para estudos populacionais e biogeográficos para estas espécies pode contribuir para o aprofundamento da compreensão dos processos evolutivos como a mutação, deriva genética, fluxo gênico, seleção natural e recombinação. Sabe-se que de forma geral, os dados genômicos aumentaram o potencial de resolução em escala fina da estrutura de populações e determinação dos limites das espécies em outros *taxa* (Seehausen *et al.*, 2014; Andrews *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2018).

#### **4. Especiação com fluxo gênico em espécies do gênero *Petunia* na Serra do Sudeste**

Atualmente, a especiação é vista como um processo complexo e contínuo, com episódios de isolamento reprodutivo ou fluxo gênico afetando diferentes partes do genoma em taxas diferentes (Ravinet *et al.*, 2017). O fluxo gênico pode ser caracterizado como hibridação e introgressão (Mallet, 2005), sendo fenômenos naturais reconhecidos como uma parte importante da evolução das plantas (Gompert *et al.*, 2017), tendo sido, inclusive, sugerido que o fluxo gênico poderia potencialmente facilitar o processo de especiação (Richards *et al.*, 2019). A causa disso seria a introdução de variações adicionais nas características ecológicas, que poderiam promover divergência devido à adaptação a nichos ecológicos distintos. Sob esse raciocínio, a especiação também aconteceria em simpatria e, em particular, com o fluxo contínuo de genes entre espécies divergentes (Papadopulos *et al.*, 2011; Brandvain *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2020).

*Petunia axillaris* subesp. *axillaris* e *P. exserta* são dois *taxa* irmãos que ocorrem em simpatria na região fisiográfica denominada Serra do Sudeste, em meio ao Pampa (Segatto *et al.*, 2014). Através do uso de diferentes marcadores morfológicos e moleculares foram detectados eventos de hibridação natural entre estes dois *taxa* (Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2019a; Teixeira *et al.*, 2019, 2020), tornando-os, desta forma, um sistema ideal para explorar o papel da hibridação na especiação e na adaptação entre espécies que apresentam uma alta diferenciação morfológica e ecológica.

*Petunia exserta* é uma espécie endêmica de uma área conhecida popularmente como “Guaritas”, uma localidade inserida na região fisiográfica do Escudo Sul-Riograndense, ocupando uma área aproximada de 44.000 km<sup>2</sup> que representa aproximadamente um quarto do Pampa no Rio Grande do Sul (Stehmann, 1987; Segatto *et al.*, 2014). Nesta região, a paisagem apresenta um relevo característico devido à complexidade litológica que promoveu a formação de grandes torres de pedra, que constituem a formação rochosa mais antiga do Rio Grande do Sul, datada do Pré-Cambriano (Holz, 1999; Paim *et al.*, 2000).

A filogenia mais recente obtida para o gênero *Petunia* mostra a proximidade evolutiva entre *P. exserta* e *P. axillaris* (Reck-Kortmann *et al.*, 2014), porém as duas espécies apresentam uma divergência morfológica que tem sido associada aos principais polinizadores de cada espécie (Sheehan *et al.*, 2016). As flores de *P. exserta* são vermelhas e brilhantes, não produzem aroma e apresentam outras características estruturais que favorecem a polinização por beija-flores (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006), enquanto as flores brancas de *P. axillaris* emitem um forte odor adocicado ao anoitecer sendo atrativas para mariposas (Venail *et al.*, 2010). Plantas de *P. exserta* crescem dentro de cavernas que se formam nas torres de arenito da região das Guaritas (Stehmann, 1987; Segatto *et al.*, 2014), ficando totalmente protegidas da luz solar direta e das intempéries, enquanto que *P. axillaris* cresce nas áreas abertas, no topo ou faces das mesmas torres (Turchetto *et al.*, 2014a, b). Embora *P. axillaris* tenha sido inicialmente descrita como uma espécie autoincompatível baseado na produção ou não de frutos em experimentos conduzidos a campo, um sistema misto de cruzamento foi observado nas populações das zonas de contato com *P. exserta* a partir do estudo de segregação genética (Turchetto *et al.*, 2015). Por sua vez, *P. exserta* tem sido considerada como uma espécie autocompatível (Watanabe *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 2020), embora até o momento estudos moleculares não tenham sido conduzidos com esta finalidade para suas populações.

Nas Guaritas são encontrados anualmente indivíduos apresentando as características canônicas de *P. axillaris* e *P. exserta* juntamente com indivíduos de morfologia floral intermediária entre elas. Estes indivíduos intermediários apresentam variabilidade fenotípica na coloração das flores e na posição do aparelho reprodutivo (Teixeira *et al.*, 2020). O primeiro registro destes indivíduos foi feito em 2002 (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006) e, desde então, têm sido observados todos os anos nos mesmos locais (Schnitzler *et al.*, 2020). Análises de dados derivados de sequências de cloroplasto e outros marcadores nucleares tem demonstrado que pelo menos alguns destes indivíduos intermediários são realmente híbridos entre *P. exserta* e *P. axillaris* (Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2015; 2019a, b).

Lorenz-Lemke *et al.* (2006) sugeriram pela primeira vez que a morfologia floral intermediária encontrada na área das Guaritas poderia corresponder a indivíduos híbridos. Este estudo foi baseado na análise de sequências de espaçadores intergênicos do DNA de cloroplasto e os autores encontraram que os haplótipos constituíam dois clados principais, provavelmente associados ao *pool* genético de cada espécie. Entretanto, independentemente da morfologia floral, indivíduos da mesma torre apresentavam o mesmo haplótipo, sugerindo uma hibridação extensa mediada pelo fluxo de pólen interespecífico, hipotetizado pelos autores como sendo promovido por beija-flores. Este trabalho também encontrou uma alta diversidade interpopulacional, em concordância com a dispersão limitada das sementes destas espécies, e maiores índices de diversidade e expansão populacional em *P. axillaris*, com *P. exserta* podendo ter passado por um processo de redução seguido de expansão em seu tamanho efetivo.

Segatto *et al.* (2014), analisando os mesmos marcadores plastificais acrescidos de seis regiões nucleares e uma ampla amostragem, muito maior que no trabalho anterior, verificaram um padrão mais complexo de relacionamento entre as espécies e seus híbridos potenciais. Neste estudo, uma taxa maior de migração de *P. exserta* para *P. axillaris* foi detectada, com sinais de introgressão em ambas as espécies, mas com os fenótipos intermediários encontrados novamente apenas dentro das cavernas.

Mais recentemente, um estudo conduzido em dois sítios onde indivíduos com morfologia canônica e intermediária podem ser encontrados simultaneamente foi conduzido utilizando marcadores microsatélites (SSR) nucleares. Este estudo incluiu também populações alopátricas de cada espécie, compostas exclusivamente por indivíduos de morfologia canônica de cada uma delas. Os resultados deste trabalho mostraram que os

indivíduos intermediários são híbridos interespecífico que apresentam um componente genético mais relacionado ao de *P. exserta* e que alguns morfotipos típicos de uma ou de outra espécie mostram sinais genéticos de hibridação (Turchetto *et al.*, 2019a).

Posteriormente e também baseada em polimorfismos de SSR, uma varredura ampla da região das Guaritas incluindo todos os indivíduos adultos encontrados em uma mesma estação reprodutiva e algumas progênies aleatoriamente selecionadas (Turchetto *et al.*, 2019b) permitiu determinar o fluxo de pólen entre estas espécies, além de verificar, através dos perfis genéticos dos indivíduos adultos, em quais populações ou direção se apresentava a maior incidência de migração. Os resultados confirmaram a maior diversidade genética de *P. axillaris*, apesar do déficit de heterozigotos e da alta endogamia serem comuns a ambas as espécies. Dentre as famílias analisadas, as de *P. exserta* apresentaram índices de endogamia ainda mais elevados que aqueles observados entre as famílias de *P. axillaris*, considerando plantas-mãe e suas respectivas progênies. Indivíduos com ancestralidade mista entre as espécies foram identificados tanto nas progênies como entre os adultos de ambas as espécies. A maioria dos adultos híbridos pertencia à geração F<sub>2</sub>, enquanto que retrocruzamentos com *P. axillaris* foram mais frequentes entre as progênies de ambas as espécies.

Fluxo de pólen entre as espécies foi encontrado em ambas as direções, embora os fenótipos intermediários tenham sido encontrados apenas no microhabitat de *P. exserta* no interior das cavernas (Turchetto *et al.*, 2019a, b), sugerindo a existência de seleção pelo ambiente, que seria posterior à fecundação e determinaria a sobrevivência das plantas na natureza. Embora as evidências de adaptação dos organismos ao ambiente sejam abundantes, o papel da seleção ecológica na mediação da formação de espécies permanece controverso. Essa lacuna de conhecimento surge em parte devido à escassez de evidências experimentais que vinculem a seleção ambiental com a criação de barreiras reprodutivas que acabam por levar e manter a diferenciação entre as espécies.

A baixa frequência de hibridação natural entre espécies de *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2019; Turchetto *et al.*, 2019b) sugere a existência de mecanismos eficientes de prevenção ao fluxo gênico interespecífico. Embora os mecanismos de isolamento reprodutivo estabelecidos por adaptação a diferentes polinizadores pareçam ser muito importantes na manutenção da integridade genética entre espécies (Stehmann, 1999; Gübitz *et al.*, 2009; Sheehan *et al.*, 2016), os mecanismos de

isolamento devido à adaptação local até o momento não têm sido corroborados, apesar de já terem sido sugeridos como forma de prevenção na formação de híbridos na natureza (Segatto *et al.*, 2014; Turchetto *et al.*, 2019a). Diante disso, é necessário realizar mais estudos associando análises genômicas para uma melhor compreensão da história evolutiva das zonas de contato entre estas espécies, a fim de avaliar os mecanismos que impedem a formação de um maior número de híbridos naturais e daqueles que levam à manutenção dessas espécies frente ao fluxo genético.

Até o presente, entendimento dos processos de especiação em *Petunia* a partir de uma visão da genética de populações tem sido restrito ao estudo de poucos loci, onde o fator estocástico dos processos ancestrais limita a identificação do papel do isolamento reprodutivo e do fluxo gênico interespecífico. Por outro lado, a genotipagem por sequenciamento (GBS), mesmo que a partir de alguns poucos indivíduos, pode revelar muitas histórias genealógicas em regiões genômicas contíguas o que poderia fornecer uma visão melhor resolvida da história das populações, divergência e introgressão (Brandvain *et al.*, 2014).

A crescente disponibilidade de dados derivados do sequenciamento de alta e baixa cobertura de genomas oferece novas oportunidades para investigar a especiação e o fluxo gênico entre espécies divergentes (Seehausen *et al.*, 2014; Ravinet *et al.*, 2017; Wolf and Ellegren, 2017). A compreensão da genômica de espécies que formam zonas híbridas pode revelar informações sobre a interação evolutiva entre especiação, isolamento reprodutivo e adaptação (Payseur, 2010). No caso das espécies de *Petunia* que apresentam híbridos na natureza, pode acrescentar informações que contribuam para o melhor entendimento do limite destas espécies.

Sabe-se que o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de nova geração está se tornando um meio para determinar se a seleção natural tem como alvo aglomerados de *loci* durante a origem de ecótipos e espécies, principalmente quando eles divergem com fluxo gênico (Payseur and Rieseberg, 2016). Neste contexto, realizar uma aproximação da genômica de populações pode se tornar uma ferramenta importante para determinar quais são as forças evolutivas que contribuem para a manutenção das espécies no Pampa.

## 5. Processos de diversificação e especiação do gênero *Calibrachoa* nos Campos de Cima da Serra

Fatores históricos devido com às mudanças climáticas claramente promoveram expansões e contrações na distribuição das espécies de petúnias em diferentes habitats nos Campos Sulinos (Barros *et al.*, 2015; 2020). Algumas espécies ficaram confinadas em ilhas de altitude nos Campos de Cima da Serra (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Fregonezi *et al.*, 2012), tanto no Sul como no Sudeste brasileiro (John *et al.*, 2019; Backes *et al.*, 2019; Mäder and Freitas, 2019). No entanto, outras espécies conseguiram colonizar ambientes costeiros (Mäder *et al.*, 2013; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015; Silva-Arias *et al.*, 2017), num claro cenário de expansão da distribuição ou mesmo atingir a região subandina na Argentina (Reck-Kortmann *et al.*, 2014).

Os Campos de Cima da Serra, a área de maior elevação na região Sul do Brasil, correspondendo ao limite entre os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, apresentam como principal peculiaridade uma alta afinidade com elementos andinos na sua vegetação (Iganci *et al.*, 2013). Mäder and Freitas (2019) encontraram que a distribuição das espécies de *Calibrachoa*, ao longo das terras altas do leste-sul do Brasil, suporta cenários históricos de repetidas conexões e desconexões entre ecossistemas montanhosos nos intervalos geográficos atuais. Por outro lado, o clima atual dos campos de altitude está sujeito a baixas temperaturas sazonais, incluindo geadas e nevascas que tornam esses ambientes muito distintos quando comparados com os campos das planícies das ecorregiões Pampa e Chaco (Pezza and Ambrizzi, 2005; Barros *et al.*, 2015). Estas características diferenciadas na história e no ambiente dos Campos de Cima da Serra tem permitido que algumas espécies do gênero *Calibrachoa* apresentem uma distribuição geográfica restrita aos campos de altitude (John *et al.*, 2019). Esta relação histórica existe devido ao fato de que durante os períodos interglaciais quentes e úmidos no Sul do Brasil, em meio a uma paisagem tropical e subtropical dominada por florestas, áreas de campo pudessem ser refúgios de vegetação aberta (Behling, 2002). É precisamente nesse cenário que Mäder and Freitas (2019) sugerem que o ancestral de dois clados do gênero *Calibrachoa* teriam colonizado as regiões mais altas dos campos de altitude e posteriormente diversificado, num padrão semelhante ao observado para algumas espécies de *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

Altos índices de endemismo ocorrem nos campos de altitude dos Campos Sulinos (Iganci *et al.*, 2011), os quais estão relacionados com a estabilidade e antiguidade desses

ecossistemas. Também para os campos de altitude foi observada uma forte correlação entre a biodiversidade e uma combinação de clima/altitude (Barros *et al.*, 2015). A diversificação de *taxa* e linhagens evolutivas do gênero *Calibrachoa*, por exemplo, só foi possível nesta área durante o último máximo glacial, quando o clima se tornou mais frio e seco, sendo então favorável para o desenvolvimento de pastagens, permitindo que espécies adaptadas aos campos abertos migrassem para áreas onde as florestas anteriormente predominavam. Durante todo esse período, os campos foram também colonizando elevações mais baixas em direção ao norte mas, com o aquecimento gradual e o aumento da umidade, as florestas novamente se expandiram, restringindo as espécies típicas de campos às regiões de terras altas, onde estão até os dias atuais (Iganci *et al.*, 2013; Reck-Kortmann *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2015; Mäder and Freitas, 2019).

A diversidade genética está diretamente ligada à sobrevivência das espécies por permitir adaptação às mudanças ambientais (Ellstrand and Elam, 1993; Binks *et al.*, 2015). No atual contexto de rápidas mudanças climáticas, estudar os efeitos do aumento da temperatura sobre a distribuição geográfica e a diversidade genética de espécies endêmicas do gênero *Calibrachoa* que ocorrem em habitats específicos dos Campos de Cima da Serra poderá contribuir para uma melhor compreensão da história evolutiva e da influência das mudanças nas variáveis ambientais desta região.

## **6. Processos de diversificação e especiação dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* na Planície Costeira do Atlântico Sul**

A Planície Costeira ou Província Costeira do Rio Grande do Sul é uma espessa faixa de sedimentos sobre as rochas do embasamento do Escudo Sul-Riograndense e Uruguaio. Esta faixa se estende por cerca de 33.000 km<sup>2</sup> de área plana e aproximadamente 600 km de extensão, sendo considerada uma das planícies mais amplas e extensas do mundo (Tomazelli *et al.*, 2000; Weschenfelder *et al.*, 2010a). De todos os substratos ocupados por representantes dos gêneros *Calibrachoa* e *Petunia*, certamente, a Planície Costeira é a área mais recente em termos geológicos (Weschenfelder *et al.*, 2010b), uma vez que estes sedimentos foram formados pela sucessão de eventos transgressivos e regressivos do mar durante as alterações cíclicas de climas frios e quentes do Pleistoceno (Weschenfelder *et al.*, 2014).

As únicas espécies de petúnias que habitam os substratos arenosos da Planície Costeira são *C. heterophylla* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata*. As evidências genéticas conjuntas obtidas até agora para estas espécies apontam para uma história evolutiva moldada por processos demográficos e adaptativos (Silva-Arias, 2016). Embora sejam dois *taxa* que atualmente são co-distribuídos em locais com características de habitat semelhantes, os resultados com diferentes marcadores moleculares mostraram que suas histórias filogeográficas são significativamente diferentes. Por um lado, *C. heterophylla* tem uma diferenciação intraespecífica anterior à colonização da região costeira (Mäder *et al.*, 2013), enquanto que em *P. integrifolia* subsp. *depauperata* o efeito fundador relacionado a um processo único de colonização do ambiente costeiro determinou o nível superior da sua estruturação genética (Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015; Silva-Arias *et al.*, 2017).

Apesar de apresentarem histórias demográficas basais diversas (Mäder *et al.*, 2013; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015), a caracterização da diversidade genética com uso de marcadores do tipo microssatélites indica que alguns processos contemporâneos são concordantes entre as duas espécies, como os sinais de efeito fundador, o isolamento por distância, o isolamento por ambiente e o contato secundário entre linhagens intraespecíficas previamente isoladas (Silva-Arias *et al.*, 2017; Silva-Arias *et al.*, 2020). As análises em conjunto das características de estruturação genética e fluxo gênico em relação às condições físicas e ambientais mostraram uma forte diferenciação das populações nos extremos da distribuição, especialmente àquelas do extremo norte, o que pode ter implicações históricas que permitiriam conhecer melhor a colonização da Planície Costeira do Sul do Brasil.

Silva-Arias *et al.* (2020) realizaram análises de genética de populações para determinar a diversidade e estrutura populacional ao longo da Planície Costeira para *C. heterophylla*, encontrando que a influência das características topográficas na diferenciação populacional está relacionada com a história da deposição da Planície Costeira, motivo pelo qual o fluxo gênico é principalmente restrito às populações que estão próximas e facilitado pelas correntes de vento, mas sem influência aparente dos grandes corpos de água como a Lagoa dos Patos e a Lagoa Mirim no extremo sul do Pampa no Sul do Brasil. Além disso, foi encontrado que regimes diferenciais de precipitação em populações marginais podem promover a diferenciação genética local nesta espécie.

## **7. Importância da compreensão de princípios evolutivos e considerações genéticas com fins de conservação da biodiversidade nos Campos Sulinos**

Embora a alta riqueza de espécies, endemismos e múltiplos serviços ambientais dos Campos Sulinos (Boldrini, 2002; 2009; Iganci *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2015), estes constituem possivelmente um dos ecossistemas menos estudados, porém mais negligenciados, na América do Sul (Giulietti *et al.*, 2005; Overbeck *et al.*, 2007). Ainda assim, suas diferentes características históricas e fitoecológicas permitem que esta região constitua um laboratório conveniente para realizar estudos filogeográficos, demográficos e de genética de populações com a finalidade de ampliar a compreensão da evolução das plantas do Neotrópico.

Diversos métodos de estimativa da biodiversidade têm sido propostos para a identificação de áreas prioritárias para a conservação. Sendo assim, muitos planos de conservação têm atualmente como objetivo a manutenção da variabilidade genética, tendo em vista os processos evolutivos (Mace and Purvis, 2008). Por um lado, muitos trabalhos sugerem utilizar medidas de diversidade e divergência genética para traçar estratégias de conservação para as espécies vegetais (Ramanatha Rao and Hodgkin, 2002; Turchetto *et al.*, 2016; Whitlock *et al.*, 2016; Coates *et al.*, 2018). Por outro lado, considerando que o objetivo fundamental da biologia populacional é desvendar as histórias demográficas das espécies, a dinâmica populacional (Stoffel *et al.*, 2018). Por estes motivos, a investigação da genética populacional, que inclui diversidade genética, diferenciação populacional e grau de fluxo gênico, é crucial na conservação e utilização sustentável de qualquer espécie (p/ ex.: Wuyun *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

Adicionalmente, para temas de conservação de biodiversidade vegetal, deve-se levar em consideração que os padrões de variação genética não podem ser compreendidos sem a consideração explícita da história demográfica das espécies, junto como o conhecimento da atual variação genética, já que estes dois são resultados de vários processos através da história evolutiva de uma espécie (Marko and Hart, 2011). Também devido ao fato de que diferentes regiões genômicas refletem diferentes histórias coalescentes (Harris and Nielsen, 2013), para gerar estratégias de manejo e conservação é importante incorporar simulações baseadas em coalescência que modelem explicitamente os supostos efeitos da paisagem sobre a estrutura genética da população levando em consideração sua história demográfica (Balkenhol and Landguth, 2011; Hoban *et al.*, 2012).

Rissler (2016) sugeriu que uma abordagem integrativa pode produzir resultados mais robustos sobre algumas das questões mais fundamentais da conservação da biodiversidade. Para isso, devem-se necessariamente incorporar campos da geografia, ecologia e história no entendimento da variação genética na natureza. Por este motivo, a incorporação de diferentes conjuntos de dados genéticos é imprescindível na genética das paisagens, sendo que os resultados tradicionais da genética da paisagem podem ser interpretados como um primeiro passo necessário para um entendimento mais abrangente da interação entre trajetórias evolutivas entre paisagens e espécies (Alvarado *et al.*, 2018; Fenderson *et al.*, 2020).

Nos Campos Sulinos os estudos relativos à união destas áreas têm sido escassos (Silva-Arias *et al.*, 2017) e devido a alta heterogeneidade ambiental e a importante influência de variáveis ambientais nas diferentes regiões fitológicas dessa região, faz-se ainda mais necessário aprofundar os estudos interdisciplinares que combinem dados ecológicos e genética da paisagens, de forma a aumentar a compreensão evolutiva das espécies e sua conservação. Outra abordagem importante é o entendimento e a identificação da história de áreas isoladas evolutivamente, podendo assim orientar estratégias e prioridades para a conservação das mesmas (Bermingham and Moritz, 1998; Moritz and Potter, 2013). Por outro lado, compreender processos de hibridação em espécies vegetais dos Campos Sulinos é muito importante para estudos de conservação, pois se sabe que as mudanças climáticas podem aumentar o contato entre espécies, elevando o número de híbridos interespecífico (Taylor *et al.*, 2015; Ryan *et al.*, 2018). Assim, ampliar o conhecimento sobre os processos de hibridização e introgressão em espécies dos Campos Sulinos pode contribuir para monitorar e entender as mudanças na distribuição das espécies, assim como documentar processos de introgressão e adaptação.

A priorização para conservação de espécies deve ser fundamentada com base nos limites de espécies corretamente identificados, aprimorada por uma compreensão da história evolutiva e das relações filogenéticas entre as espécies e linhagens (Moritz and Potter, 2013). Combinado ao fato de que as áreas costeiras, os campos de altitude e da Serra do Sudeste são fortemente influenciados pela atividade humana devido à transformação da paisagem pela agricultura, pecuária, monocultura de espécies arbóreas introduzidas e desmatamento, o que tem mudado a vegetação nativa (Andrade *et al.*, 2015; Menezes *et al.*, 2015), ampliar informações e pesquisas sobre dados demográficos, migração e estruturação populacional em diversas espécies vegetais dos Campos Sulinos permitirá estabelecer estratégias para

priorizar a conservação de grupos que incluam representantes da maior parte da história evolutiva dessas espécies.

Os padrões de diversidade de um bioma são consequência de uma longa e complexa história evolutiva na qual processos ecológicos e forças ambientais externas se encontram envolvidos (Rull, 2011). Portanto, cada vez mais, será importante combinar conhecimentos de processos evolutivos e ecológicos em esforços para sustentar a biodiversidade nos Campos Sulinos, devido à heterogeneidade ambiental de seus ecossistemas. As áreas não florestais na região Sul do Brasil são também de muita importância, não só pela biodiversidade e pelos serviços ecológicos que prestam, mas também pelo contexto da história evolutiva de suas espécies. Não obstante, maiores esforços para realizar estudos de genética de populações e genética da paisagem em espécies destes ecossistemas são necessários, inclusive para identificar áreas prioritárias para conservação e para entender melhor a origem da biodiversidade regional.

## **8. Importância do conhecimento do impacto das mudanças climáticas sobre a diversidade genética e a distribuição das espécies nos Campos Sulinos**

Uma vez que, na atualidade, a alteração antropogênica global e a destruição de habitats naturais estão levando ao declínio de espécies em uma escala sem precedentes (IPPC, 2013; Hautier *et al.*, 2015), definir seus impactos sobre a biodiversidade e distribuição de espécies é atualmente de alta prioridade. Neste contexto, levando em conta que as espécies são caracterizadas não apenas por um grupo distinto de genes, mas também por um conjunto distinto de características ecológicas às quais estão adaptadas, cada vez mais as análises de adequabilidade de nicho ecológico são necessárias para entender o contexto ecológico relacionado com a especiação (Wiens, 2004; Warren *et al.*, 2008). Igualmente, investigar as histórias demográficas nas populações naturais e seus determinantes e consequências é mais crítico do que nunca (Stoffel *et al.*, 2018).

Sabe-se que poucas áreas de campos totalmente naturais existem no Sul e Sudeste do Brasil atualmente (Behling, 2002), além de que nas últimas décadas, cerca de metade da superfície originalmente coberta por campos no Rio Grande do Sul foi transformada em outros tipos de cobertura vegetal (Cordeiro and Hasenack, 2009). Adicionalmente, já se tem conhecimento de que os campos em geral são ecossistemas muito sensíveis às mudanças climáticas (Seddon *et al.*, 2016), principalmente porque a vegetação dos campos é

particularmente limitada por precipitações e padrões de temperatura, bem como pelo seu manejo (Soussana and Lüscher, 2007; Wilcox *et al.*, 2017). Sendo assim, para o futuro, tem sido estabelecida uma influência das mudanças climáticas com consequências importantes para os ecossistemas dos campos em nível global (Gibson and Newman, 2019).

Descrever os padrões de variação genética em populações naturais é o primeiro passo para compreender e planejar esforços do gerenciamento da adaptação e evolução das espécies sob mudanças climáticas (Mimura *et al.*, 2017). Precisamente são esses os motivos pelos quais as considerações genéticas devem orientar as intervenções de conservação sob mudanças climáticas nos Campos Sulinos. É urgente conhecer a habilidade das espécies vegetais em ocupar novos ambientes disponíveis, assim como fundamental para prever como as plantas responderão às mudanças climáticas ou de nicho habitável nesta região. Nos biomas do Sul do Brasil, no contexto de contínua perda de habitat, presença de espécies invasoras e com as mudanças climáticas atuais, a pressão para priorizar os *taxa* para investimento em conservação deve aumentar. É de extrema importância o uso de dados moleculares para fins de conservação, uma vez que estes fornecem evidências claras para entender os princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens, desta forma possibilitado de maneira eficaz a interpretação de possíveis cenários evolutivos (Hansen *et al.*, 2012). Porém, conceitos evolutivos fundamentais, como depressão por endogamia ou exogamia, deriva genética e interações genéticas com o ambiente não tem sido mencionados em políticas de conservação nem planos de recuperação de espécies dos Campos Sulinos tem sido levados em conta até o momento.

No caso de espécies vegetais dos Campos Sulinos que se apresentam em habitats heterogêneos e sob influência de atividades humanas, compreender ou projetar as mudanças que as espécies podem ter em nível genético ao longo do tempo e do espaço será de fundamental importância para gerar estratégias de manejo e conservação. Levando em conta que a teoria da evolução indica que as adaptações aos ambientes locais dependem de um equilíbrio entre seleção e fluxo gênico, realizar estudos sobre o papel destas forças evolutivas em nível de espécies pode contribuir para prever ou avaliar a capacidade das espécies dos Campos Sulinos em se adaptar a ambientes de fortes mudanças. Além disso, os modelos evolutivos ressaltam a natureza dinâmica do limite ambiental de um taxon, que depende da interação do fluxo gênico, seleção e demografia (Davis, 2001).

No panorama atual, onde não se conhecem ainda os possíveis impactos que as mudanças climáticas possam ter para espécies dos Campos Sulinos, destaca-se o valor das abordagens integrativas, que coloquem a taxonomia atual em um contexto evolutivo mais amplo para a região, identificando as espécies e populações que possam estar em maior risco, avaliando e executando estratégias de conservação. Para esta região também, faz-se necessário o conhecimento sobre o potencial de respostas adaptativas às mudanças ambientais das plantas. Finalmente, os estudos de genética de populações e dos padrões demográficos, assim como as possíveis respostas às variações climáticas, são muito importantes para atingir a perfeita compreensão dos padrões históricos de dispersão de sementes, rotas de recolonização, distribuição da diversidade genética e áreas de estabilidade das espécies dos Campos Sulinos.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

Este estudo visa aportar uma síntese dos processos de diferenciação genética relacionados com as particularidades ecológicas de diferentes formações campestres no sul do Brasil. Especificamente, procura relacionar processos demográficos e ecológicos integrando dados genômicos, fenotípicos e ambientais para entender a evolução das plantas na região dos Campos Sulinos.

### 2. Objetivos específicos

- a) Estudar a história evolutiva de *Petunia exserta* e *P. axillaris* com base na informação ao longo do genoma de cada uma delas, distinguindo mecanismos demográficos e seletivos envolvidos nos processos de diferenciação e fluxo gênico, assim como na manutenção das barreiras reprodutivas entre as duas espécies.
- b) Investigar a influência de variáveis ambientais no processo de estruturação genética de espécies que são restritas e especializadas para algumas das formações dos Campos Sulinos, a fim de estudar o impacto que as mudanças climáticas podem ter sobre a estrutura populacional e a diversidade genética.
- c) Examinar padrões filogeográficos em plantas costeiras Sul-Americanas para investigar os possíveis eventos históricos que moldaram os padrões atuais de distribuição geográfica e diversidade genética de duas espécies de petúnias que ocorrem preferencialmente na costa leste da América do Sul.

## ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Este trabalho se constitui na aproximação entre os meus interesses científicos e acadêmicos, realizando estudos na intersecção entre a ecologia, a genética de populações e a biologia evolutiva, com o fim de obter informações sobre os processos de especiação, delimitação de espécies, adaptação e o futuro de espécies vegetais num mundo em rápida mudança climática.

Por isto, a presente tese procura entender processos evolutivos em uma ampla diversidade de espécies, com histórias e realidades ecológicas suficientemente diferenciadas, com o objetivo de fazer uma representação abrangente dos processos que moldaram a diversidade de plantas dos Campos Sulinos. Além disso, os problemas mencionados foram abordados usando marcadores moleculares com diferente resolução e variação do tempo de coalescência. Para atingir os objetivos, interpretar os resultados obtidos e tentar conseguir padrões gerais, o presente trabalho foi dividido em três capítulos distribuídos da seguinte forma:

### **Capítulo 1:**

#### **Neutral and adaptive genomic variation in hybrid zones of two ecologically diverged wild *Petunia*.**

Lina Caballero-Villalobos, Gustavo A. Silva-Arias, Caroline Turchetto, Giovanna C. Giudicelli, Earl Petzold, Aureliano Bombarely, Loreta B. Freitas.

Este artigo foi aceito no periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Recentemente, vários estudos identificaram fluxo gênico entre duas espécies de *Petunia* que se encontram fortemente diferenciadas em nível ecológico e morfológico. O objetivo deste estudo foi avaliar o fluxo gênico entre duas espécies, *P. exserta* e *P. axillaris*, que divergiram recentemente dentro do gênero. Nós conseguimos identificar milhares de SNPs (single nucleotide polymorphisms) obtidos pela técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS) a fim de investigar os papéis relativos do fluxo gênico, da deriva genética e da seleção sobre a estruturação populacional e a diversidade de espécies que

podem hibridar naturalmente. Visamos também expandir o conhecimento sobre os processos demográficos envolvidos na divergência entre *P. exserta* e *P. axillaris*, com especial atenção às populações nas zonas de contato e presença de indivíduos com morfologia intermediária. Em sequência, tendo esclarecido o modelo demográfico, foi feita uma busca por *loci* com sinal de seleção divergente que poderiam estar envolvidos na manutenção das barreiras reprodutivas entre as espécies. Neste estudo foram genotipados 58 indivíduos e os resultados construíram uma base forte para futuras pesquisas sobre o processo de especiação em petúnias silvestres. Concluiu-se que o isolamento reprodutivo é quase completo entre as duas espécies, mas o fluxo gênico está presente devido a um evento recente de contato secundário ocorrido após a divergência, porém numa extensão pouco significativa. A utilização de múltiplos marcadores contribuiu para uma melhor compreensão dos processos evolutivos envolvidos nos cenários de especiação entre estas espécies.

## **Capítulo 2:**

### **South Brazilian grasslands threatened by Climate Change: habitat suitability and genetic diversity loss predictions in eight wild nightshades.**

Lina Caballero-Vilalobos, Loreta B. Freitas, Caroline Turchetto, Gerhard E. Overbeck, Gustavo A. Silva-Arias.

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Global Change Biology*

Neste capítulo avaliamos os efeitos das mudanças climáticas na distribuição, adequabilidade de habitat, diversidade genética e estruturação populacional de quatro espécies dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* que apresentam distribuição nos Campos Sulinos. Neste trabalho foram conduzidas caracterizações da diversidade e da estrutura genética em dois taxa de ocorrência no Pampa e em duas espécies dos campos de altitude subtropicais da Mata Atlântica. O objetivo destas análises foi compreender os possíveis efeitos que as mudanças climáticas futuras poderão ter sobre as espécies vegetais associados com a distribuição geográfica e o habitat especializado no Sul do Brasil. Aqui combinamos modelagem de nicho ecológico e abordagens genéticas populacionais usando dados de

marcadores moleculares para projetar as alterações na diversidade genética de *C. heterophylla* e *P. integrifolia* subesp. *depauperata*, que são *taxa* amplamente co-distribuídos na Planície Costeira do Atlântico Sul, assim como de *C. sphaatulata* e *C. eglandulata* que são espécies endêmicas dos Campos de Cima da Serra. Para cada uma destas espécies foram inferidas as dinâmicas entre as suas populações e a relação desta com variáveis topográficas e climáticas, bem como realizadas projeções dessas dinâmicas para o tempo futuro frente a um cenário de aquecimento global. Estas análises foram realizadas através de um levantamento exaustivo e a modelagem para o futuro sob projeções da mudança do clima nas áreas de estudo. Processos de diferenciação genética promovidos pelo regime diferencial de chuvas nos extremos da distribuição foram inferidos para as espécies costeiras. Como esperado, as espécies com distribuição restrita aos campos de altitude subtropicais foram mais sensíveis às mudanças climáticas. Foi verificado que as alterações climáticas influenciarão os recursos genéticos nos Campos Sulinos, afetando tanto a adequabilidade do habitat quanto a diversidade genética destas espécies. Espera-se, também, que o nível futuro de estruturação genética possa ser inferior ao nível atual. Áreas climáticas estáveis foram identificadas com nível de preservação da diversidade genética maior que o previsto, devendo ser direcionadas como alvo preferencial para receber os esforços de conservação, especialmente para o manejo que favoreça a diversidade genética e que evite a extinção destas espécies. O conhecimento de simulações de distribuição da diversidade genética no futuro para espécies vegetais dos Campos Sulinos pode agregar informações valiosas para apoiar os esforços de conservação e manutenção da biodiversidade na região.

### **Capítulo 3:**

#### **Genetic differentiation and phylogeographic patterns of coastal plants in South America: a broad-scale overview and lessons from two co-distributed nightshades with different life form and demographic histories**

Lina Caballero-Villalobos, Loreta B. Freitas, Gustavo A. Silva-Arias.

Artigo em preparação para ser submetido à revista *BMC Evolutionary Biology*.

Os estudos filogeográficos reúnem diferentes disciplinas para explicar os processos de especiação em escalas espaciais e temporais. Neste artigo revisamos os estudos de filogeografia realizados em espécies de plantas costeiras da América do Sul, apresentando-se um resumo do conhecimento sobre os padrões e processos de diversificação nas áreas costeiras da região. Adicionalmente, integrando diferentes abordagens metodológicas focamos a questão do papel das oscilações climáticas do Pleistoceno sobre os padrões de variabilidade genética e estruturação populacional das únicas espécies dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* que correm amplamente em áreas costeiras, e procuramos possíveis explicações ou compartilhamento de padrões evolutivos ancestrais comuns entre estas duas espécies. Adicionalmente utilizamos dados genéticos de *P. integrifolia* subesp. *depauperata* e *C. heterophylla* a fim de descrever padrões de especiação, migração e colonização para espécies da Planície Costeira do Atlântico Sul. Nestas espécies usadas como modelo de estudo, a quantidade de estrutura genética intraespecífica está relacionada com a distribuição geográfica que foi inferida através da modelagem de adequabilidade do habitat, tanto nos tempos atuais como no passado. A integração de análises preliminares de filogeografia e genética da paisagem junto com a modelagem paleoclimática nas duas espécies evidenciou a expansão independente de múltiplos refúgios, contato secundário e novas percepções sobre a dinâmica de expansão-contração do Pleistoceno-Holoceno e de padrões da história evolutiva da flora na Planície Costeira, revelando que o padrão de estrutura populacional contemporâneo comum pode surgir do processo recente de diferenciação em poucas áreas climáticas estáveis durante o Quaternário detectadas na região. Em conjunto, as análises sobre as duas espécies de petúnias costeiras e o levantamento da literatura identificaram lacunas, tarefas pendentes e perspectivas para melhorar a compreensão dos processos de diversificação e colonização da flora nas regiões costeiras Sul-Americanas.

A última parte da tese é composta por uma discussão geral dos resultados obtidos nos três capítulos, sintetizando os principais achados em relação ao objetivo geral da tese, considerações finais e perspectivas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os três manuscritos gerados nesta tese permitiram ampliar o conjunto de informações sobre os fatores ecológicos e históricos que afetaram a distribuição geográfica, a diversidade e a estrutura genética de populações de plantas herbáceas do Pampa e dos Campos de Cima da Serra nos Campos Sulinos. Nosso trabalho demonstra como o aproveitamento de dados proporcionados por diferentes metodologias de sequenciamento e de inferências a partir de variados métodos estatísticos consegue esclarecer processos responsáveis pela origem e manutenção da biodiversidade dos ecossistemas, altamente importantes, porém negligenciados, dos Campos Sulinos.

Nossos resultados sobre a distribuição espacial que resulta dos processos demográficos sob os quais diferentes espécies de petúnias têm desenvolvido sua história, assim como o entendimento da expansão e contração populacional e do movimento de genes dentro e entre espécies, trazem subsídios para a melhor compreensão dos diversos processos evolutivos envolvidos na diversificação de plantas no Sul do Brasil. Nosso trabalho mostra, também, que a incorporação de abordagens como a genômica populacional (Black *et al.*, 2001), que permitem a identificação de ‘*outlier loci*’, melhora compreensão dos processos de hibridação, adaptação local e demografia histórica das espécies de *Petunia* que apresentam híbridos naturais. O uso de SNPs no estudo de zonas de contato entre *P. axillaris* e *P. exserta* permitiram diferenciar efeitos locus-específicos (seleção) dos efeitos genômicos (deriva genética, fluxo gênico, mudanças no tamanho populacional e endogamia) com maiores detalhes do que aqueles obtidos previamente com o uso de outros marcadores moleculares como sequências plastidiais os microssatélites. A comparação da distribuição da diversidade genética observada em *loci* neutros e em *loci* potencialmente sob seleção permitiu ampliar o entendimento dos mecanismos que geram padrões espaciais nas petúnias, sendo também possível visualizar diferenciação adaptativa e especiação ecológica.

Nossas análises aproveitaram recentes desenvolvimentos metodológicos, como o uso de inferências estatísticas rigorosas (Balkenhol *et al.*, 2009; Peterman *et al.*, 2014), a fim de fornecer uma janela valiosa para aumentar a compreensão do papel desempenhado pelo ambiente na estruturação da diversidade genética de diferentes espécies de petúnias do Pampa que hibridam na Serra do Sudeste e apresentam morfologia, síndrome de polinização e preferência de habitat muito diferentes. Adicionalmente, neste trabalho com diferentes

espécies de petúnias, foram evidenciados os benefícios de realizar estudos genéticos usando espécies ecologicamente diversas, ampliando o conhecimento sobre a diversidade dos Campos Sulinos.

Os resultados obtidos permitiram expandir o conhecimento da história evolutiva de espécies de diferentes ecossistemas do sul do Brasil. Adicionalmente, nossa pesquisa sobre a diversidade genética sob efeitos de mudanças climáticas em diferentes espécies que habitam a Planície Costeira, os campos de altitude e a área das Guaritas indicou que o aquecimento global pode reduzir drasticamente a diversidade e estruturação genética de algumas espécies dos Campos Sulinos, comprometendo sua capacidade de evoluir conforme as condições mudam. Estas descobertas têm implicações importantes sobre como a biodiversidade será afetada pelas mudanças climáticas, além de reforçar a importância de considerar a diversidade genética intraespecífica no planejamento de esforços de conservação nos Campos Sulinos.

Segundo Gaitán-Espitia and Hobday (2020), obter informações sobre o tamanho populacional e a conectividade da paisagem das espécies ou populações alvo de um estudo constitui o primeiro passo, fundamental e determinante, para desenvolver estratégias de gestão baseadas em evidências e intervenções para a conservação de espécies sob às mudanças climáticas. Os resultados dos três trabalhos que compõem esta tese formam um suporte para a realização de programas de monitoramento e de intervenções planejadas em áreas restritas dos Campos Sulinos, já que apresentam informações de linha base que tem sido desenvolvidas sob critérios do conhecimento demográfico, ecológico, de alguns padrões de variação genética (neutra e adaptativa no caso das espécies que hibridam nas Guaritas), assim como a integração de modelagem de adequabilidade de habitat e projeções de perda de diversidade genética e distribuição de espécies sob mudanças climáticas.

Porém, na pesquisa da história evolutiva de espécies herbáceas do Pampa nós conseguimos identificar algumas limitações e nossos resultados salientam a importância de realizar mais esforços a fim de aumentar o conhecimento e conservação do ecossistema. O uso de mais populações e especialmente mais indivíduos por população aumentaria a abrangência dos resultados obtidos, sendo possível capturar todo o espectro genético presente nas espécies estudadas. Além disso, nossos resultados sugerem a necessidade de realizar uma maior quantidade de estudos que consigam integrar dados moleculares com dados de ecologia, fisiologia, morfologia, assim como da utilidade do uso de dados

genômicos para aumentar as informações sobre plantas de ambientes pouco estudados como os Campos Sulinos.

Em vista dos resultados obtidos neste trabalho, propõem-se realizar pesquisas que permitam identificar processos de adaptação local nas espécies. Porém, as abordagens bioinformáticas sozinhas provavelmente não serão bem-sucedidas em encontrar genes responsáveis pelo isolamento reprodutivo (Payseur and Rieseberg, 2016), motivo pelo qual realizar experimentos com expressão diferencial de genes sob estresse abiótico ou com cruzamentos interespecíficos seriam essenciais para identificar *loci* responsáveis pela barreira reprodutiva ou aqueles que permitem adaptação local. Para isto, sugere-se o desenvolvimento de experimentos de transplante recíproco e o aumento das análises a partir de dados genômicos a fim de identificar regiões do genoma responsáveis pelos processos de adaptação aos ambientes sob influência da luz ou da sombra, no caso das espécies da Serra do Sudeste, que podem hibridar, mas que mesmo assim mantêm seus limites específicos. Da mesma forma, seria de utilidade estudar a adaptação local nas margens de distribuição das espécies costeiras. Também, o sequenciamento dos genomas completos destas espécies poderia ser útil para entender qual parte do genoma é responsável pela adaptação, incluindo características como habilidades migratórias, dispersão e a capacidade de se adaptar a temperaturas mais quentes, com uma aplicação significativa em tempos de aquecimento climático global muito mais rápido do que o anteriormente previsto.

Como as diferentes espécies dos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* estudadas nesta tese possuem uma forte diferenciação de nicho e, portanto, estão sob diferentes estresses abióticos, realizar estudos com a finalidade de identificar os genes envolvidos na adaptação específica das diferentes espécies pode ser muito útil para entender a genética subjacente da tolerância ou resposta destes *taxa* sob influência de mudanças climáticas. Além disso, conhecer os genes que contribuem para o isolamento reprodutivo entre as espécies de petúnias pode fornecer informações sobre a base genética da especiação de plantas dos Campos Sulinos e do Neotrópico. Considerando que os ecossistemas dos campos temperados e subtropicais estão entre os ecossistemas mais ameaçados do mundo devido à perda do seu habitat e que nesta tese foram obtidos dados que evidenciam o forte impacto das mudanças globais na diversidade e estruturação genética de diferentes plantas do Pampa e dos Campos de Cima da Serra, é evidente a urgência de aumentar os esforços para realizar uma maior quantidade de estudos que permitam ampliar os conhecimentos sobre a história

evolutiva de espécies vegetais, bem como relacionar as análises filogeográficas com estudos da genética de paisagens em espécies destes ecossistemas, de forma a dar apoio à conservação biológica das comunidades vegetais nestas regiões, ainda mais considerando que as áreas que conservam a fisionomia natural são cada vez mais raras e fragmentadas.

Os resultados sobre os possíveis eventos históricos que ajudaram a moldar os padrões atuais de distribuição geográfica e genética de *C. heterophylla* e *P. integrifolia* subesp. *depauperata*, as duas únicas espécies de petúnias com ampla distribuição costeira, junto com as previsões para diferentes cenários de mudanças climáticas no futuro poderão fornecer subsídios para a conservação *in situ* de espécies vegetais dos Campos Sulinos. No Capítulo 3 buscamos por padrões filogeográficos congruentes com refúgios ou áreas de estabilidade climática para estas duas espécies, sendo possível observar que existem áreas de estabilidade climática que são congruentes também com diferentes cenários no futuro, motivo pelo qual podem apoiar a conservação e manutenção de áreas para a sobrevivência das espécies e diferenciação de populações de petúnias e de diversas espécies de plantas nos Campos Sulinos.

Por outro lado, embora alguns dos resultados deste trabalho aumentem o conhecimento sobre a diversidade genética e tamanho populacional de espécies dos Campos Sulinos, proporcionando subsídios importantes para empreender esforços de conservação tradicional prevenindo extinções locais por meio de intervenções passivas como a sugestão de maior proteção para áreas já conservadas, estes mesmos resultados salientam uma perda excepcionalmente rápida de biodiversidade nos diferentes ecossistemas dos Campos Sulinos, motivo pelo qual seria também recomendável a realização de intervenções mais ativas (p/ ex., fluxo gênico assistido, seleção artificial ou evolução assistida), além da necessidade de integrar as abordagens que podem ser realizadas a partir da genética de populações, genômica e/ou princípios evolutivos e de uma discussão direta com os tomadores de decisões e gestores da conservação.

Infelizmente, até o momento, poucos estudos examinaram os processos de especiação nos Campos Sulinos. Motivo pelo qual, realizar estudos envolvendo outros *taxa* serão cruciais para o desenvolvimento de uma melhor compreensão e, no futuro, para a produção de uma hipótese geral de diversificação na região. Não obstante, também para diversas espécies vegetais dos Campos Sulinos, será necessário empreender uma maior quantidade de abordagens, com estudos consistentes, para quantificar o eixo adaptativo da

diversidade (Moritz and Potter, 2013), pois este será crucial para manter a capacidade de resposta evolutiva aos desafios ambientais rápidos enfrentados pelas espécies sob influência de mudanças climáticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (INTRODUÇÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS)

- Alsos IG, Ehrich D, Thuiller W, Eidesen PB, Tribusch A, Schönswetter P, Lagaye C, Taberlet P and Brochmann C (2012) Genetic consequences of climate change for northern plants. *Proc Biol Sci* 279:2042-2051.
- Alvarado Escobar F, Williams DR, Arroyo-Rodríguez V and Escobar-Hernández F (2018) The role of livestock intensification and landscape structure in maintaining tropical biodiversity. *J Appl Ecol* 55:185-194.
- Anderson JT and Song BH (2020) Plant adaptation to climate change—Where are we?. *J Syst Evol* 58:533-545.
- Ando T (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88:403-413.
- 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* 96:289-297.
- Andrade BO, Koch C, Boldrini II, Vélez-Martin E, Hasenack H, Hermann JM, Kollmann J, Pillar VD and Overbeck GE (2015) Grassland degradation and restoration: a conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. *Nat Conserv* 13:95-104.
- Andrade BO, Bonilha CL, Overbeck GE, Vélez-Martin E, Rolim RG, Bordignon SAL, Schneider AA, Vogel Ely C, Lucas DB, Garcia ÉN, dos Santos ED, Torchelsen FP, Vieira MS, Silva Filho PJS, Ferreira PMA, Trevisan R, Hollas R, Campestrini S, Pillar VD and Boldrini II (2019) Classification of South Brazilian grasslands: implications for conservation. *Appl Veg Sci* 22:168-184.
- Andrews KR, Good JM, Miller MR, Luikart G and Hohenlohe PA (2016) Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat Rev Genet* 17:81-92.
- 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* 11:plz037.
- Balkenhol N and Landguth EL (2011) Simulation modelling in landscape genetics: on the need to go further. *Mol Ecol* 20:667-670.
- Balkenhol N, Waits LP and Dezzani RJ (2009) Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography* 32:818-830.
- 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.
- Barros MJF, Diniz-Filho JAF and Freitas LB (2018) Ecological drivers of plant genetic diversity at the southern edge of geographical distributions: Forestal vines in a temperate region. *Genet Mol Biol* 41:318-326.
- Barros MJF, Silva-Arias GA, Segatto AL, 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* 43:e20180291.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177:19-27.

- Bermingham E and Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol Ecol* 7:367-369.
- Binks RM, Millar MA and Byrne M (2015) Not all rare species are the same: contrasting patterns of genetic diversity and population structure in two narrow-range endemic sedges. *Biol J Linn Soc* 114:873-886.
- Black WC, Baer CF, Antolin MF, DuTeau NM (2001) Population genomics: genome-wide sampling of insect populations. *Annu Rev Entomol* 46:441-469.
- Boldrini IJ (2002) Campos sulinos: caracterização e biodiversidade. In: Araújo EL, Noura ADN, Sampaio EVSB, Gestrari LMS and Carneiro JMT (eds) Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil. 1st Edition. Sociedade Botânica do Brasil, Recife, pp 95-97.
- Boldrini IJ (2009) A flora dos campos do Rio Grande do Sul. In: Campos Sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade. 1st Edition. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Brasília, pp 63-77.
- Brandvain Y, Kenney AM, Fligel L, Coop G and Sweigart AL (2014) Speciation and introgression between *Mimulus nasutus* and *Mimulus guttatus*. *PLoS Genet* 10:e1004410.
- Byrne M, Yeates DK, Joseph L, Kearney M, Bowler J, Williams MAJ, Cooper S, Donnellan SC, Keogh JS, Leys R, *et al.* (2008) Birth of a biome: insights into the assembly and maintenance of the Australian arid zone biota. *Mol Ecol* 17:4398-4417.
- Cabrera AL and Willink A (1980) Biogeografía de América Latina. 2nd edition. Organización de los Estados Americanos, Washington D.C., 122 pp.
- Choi JY, Purugganan M and Stacy EA (2020) Divergent selection and primary gene flow shape incipient speciation of a riparian tree on Hawaii Island. *Mol Biol Evol* 37:695-710.
- Coates DJ, Byrne M and Moritz C (2018) Genetic diversity and conservation units: dealing with the species-population continuum in the age of genomics. *Front Ecol Evol* 6:165.
- Collevatti R, Nabout JC and Diniz-Filho JAF (2011) Range shift and loss of genetic diversity under climate change in *Caryocar brasiliense*, a Neotropical tree species. *Tree Genet Genom* 7:1237-1247.
- Cordeiro JLP and Hasenack H (2009) Cobertura vegetal atual do Rio Grande do Sul. In: Pillar VD, Müller SC, Castilhos ZMS and Jacques AVA (eds) Campos Sulinos: Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 285-299.
- Costa GC, Hampe A, Ledru MP, Martinez PA, Mazzochini GG, Shepard DB, Werneck FP, Moritz C and Carnaval AC (2018) Biome stability in South America over the last 30 kyr: inferences from long-term vegetation dynamics and habitat modelling. *Glob Ecol Biogeogr* 27:285-297.
- Davis MB (2001) Range shifts and adaptive responses to Quaternary Climate Change. *Science* 292:673-679.
- Eldon J, Price JP, Magnacca K and Price DK (2013) Patterns and processes in 500 complex landscapes: testing alternative biogeographical hypotheses through integrated analysis of phylogeography and community ecology in Hawaii. *Mol Ecol* 22:3613-3628.
- Elith J and Leathwick JR (2009) Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annu Rev Ecol Syst* 40:677-697.
- Ellstrand NC and Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann Rev Ecol Syst* 24:217-242.
- Fenderson LE, Kovach AI and Llamas B (2020) Spatiotemporal landscape genetics: investigating ecology and evolution through space and time. *Mol Ecol* 29: 218-246.
- Fregonezi JN, Freitas LB, Bonatto SL, Semir J and Stehmann JR. (2012) Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence. *Taxon* 61:120-130.

- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL 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.
- Fu PC, Gao QB, Zhang FQ, Xing R, Wang JL, Liu HR and Chen SL (2016) Gene flow results in high genetic similarity between *Sibiraea* (Rosaceae) species in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Front Plant Sci* 7:1596.
- Gaitán-Espitia JD and Hobday AJ (2020) Evolutionary principles and genetic considerations for guiding conservation interventions under climate change. *Global Change Biol* 00:1-14.
- Gibson DJ and Newman JA (2019) Grasslands and climate change: an overview. In: Gibson DJ and Newman JA (eds.) *Grasslands and Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 3-18
- Giudicelli GC, Turchetto C, Silva-Arias GA and Freitas LB (2019) Influence of climate changes on the potential distribution of a widespread grassland species in South America. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 41:125496.
- Giulietti AM, Harley RM, De Queiroz LP, Wanderley MDGL and Van Den Berg C. (2005) Biodiversity and Conservation of Plants in Brazil. *Conserv Biol* 19:632-639.
- Goetze M, Schulte K, Palma-Silva C, Zanella CM, Büttow MV, Capra F and Bered F (2016) Diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae) in the Brazilian Atlantic rainforest: a case study in *Aechmea* subgenus *Ortgiesia*. *Mol Phylogenet Evol* 98:346-357.
- Gompert Z, Mandeville EG and Buerkle CA (2017) Analysis of population genomic data from hybrid zones. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 48:207-229.
- Graham CH, Ron SR, Santos JC, Schneider CJ and Moritz C (2004) Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution* 58:1781-1793.
- Greppi JA, Hagiwara JC and Stehmann JR (2019) A new species of *Petunia* (Solanaceae) from Corrientes, Argentina. *Phytotaxa* 414:289-295.
- Guisan A and Zimmerman NE (2000) Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol Modell* 135:147-186.
- Guisan A and Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol Lett* 8:993-1009.
- Gübitz T, Hoballah ME, Dell'Olivo A and Kuhlemeier C (2009) *Petunia* as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In: Gerats T and Strommer J (eds) *Petunia*. Springer, New York, pp 29-49.
- Hansen MM, Olivieri I, Waller DM, Nielsen EE and The GeM Working Group (2012) Monitoring adaptive genetic responses to environmental change: monitoring adaptive responses. *Mol Ecol* 21:1311-1329.
- Harris K and Nielsen R (2013) Inferring demographic history from a spectrum of shared haplotype lengths. *PLoS Genet* 9:e1003521.
- Hautier Y, Tilman D, Isbell F, Seabloom EW, Borer ET and Reich PB (2015) Anthropogenic environmental changes affect ecosystem stability via biodiversity. *Science* 348:336-340.
- Hewitt GM and Nichols RA (2005) Genetic and evolutionary impacts of climate change. In: Lovejoy TE and Hannah L (eds) *Climate change and biodiversity*. Yale University Press, New Haven and London, pp. 176-192.
- Hoballah ME, Gübitz T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell'Olivo A, Arnold M and Kuhlemeier C (2007) Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *Plant Cell* 19:779-790.

- Hoban SM, McCleary TS, Schlarbaum SE, Anagnostakis SL and Romero-Severson J (2012) Human-impacted landscapes facilitate hybridization between a native and an introduced tree: landscape facilitates interspecific hybridization. *Evol Appl* 5:720-731.
- Holz M (1999) Do mar ao deserto- a evolução do Rio Grande do Sul no tempo geológico. UFRGS, Porto Alegre, 142 pp.
- Hua X and Wiens JJ (2013) How does climate influence speciation? *Am Nat* 182:1-12.
- Iganci JRV, Heiden G, Miotto STS and Pennington RT (2011) Campos de Cima da Serra: the Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism: endemism in the Campos de Cima da Serra. *Bot J Linn Soc* 167:378-393.
- Iganci JRV, Miotto STS, Souza-Chies TT, Särkinen TE, Simpson BB, Simon MF and Pennington RT (2013) Diversification history of *Adesmia* ser. *psoraleoides* (Leguminosae): evolutionary processes and the colonization of the southern Brazilian highland grasslands. *S African J Bot* 89:257-264.
- IPCC (2013) Climate change 2013: The physical science basis. intergovernmental panel on climate change, Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report (AR5). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- Jakob SS, Martinez-Meyer E and Blattner FR (2009) Phylogeographic analyses and paleodistribution modeling indicate Pleistocene in situ survival of *Hordeum* species (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or spatial restriction. *Mol Biol Evol* 26:907-923.
- John AL de W, Mäder G, Fregonezi JN and Freitas LB (2019) Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil. *Genet Mol Biol* 42:108-119.
- Johnson JS, Krutovsky KV, Rajora OP, Gaddis KD and Cairns DM (2018) Advancing biogeography through population genomics. In: Rajora OP (ed) *Population Genomics*. Springer, Cham, Switzerland, pp 539-585.
- 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.
- Leal BSS, Palma da Silva C and Pinheiro F (2016) Phylogeographic studies depict the role of space and time scales of plant speciation in a highly diverse Neotropical region. *Crit Rev Plant Sci* 35:215-230.
- Lima JS, Ballesteros-Mejia L, Lima-Ribeiro MS and Collevatti RG (2017) Climatic changes can drive the loss of genetic diversity in a Neotropical savanna tree species. *Global Change Biol* 23:4639-4650.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM and Freitas LB (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Ann Bot* 95:799-806.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis: *Petunia* hybridization and evolution. *Mol Ecol* 15:4487-4497.
- 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.

- Mace GM and Purvis A (2008) Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Mol Ecol* 17:9-19.
- 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.
- Mäder G and Freitas LB (2019) Biogeographical, ecological, and phylogenetic analyses clarifying the evolutionary history of *Calibrachoa* in South American grasslands. *Mol Phylogenet Evol* 141:106614.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol* 20:229-237.
- Marko PB and Hart MW (2011) The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends Ecol Evol* 26:448-456.
- Menezes LS, Müller SC and Overbeck GE (2015) Floristic and structural patterns in South Brazilian coastal grasslands. *An Acad Bras Ciênc* 87:2081-2090.
- Mimura M, Yahara T, Faith DP, Vázquez-Domínguez E, Colautti RI, Araki H, Javadi F, Núñez-Farfán J, Mori AS, Zhou S, *et al.* (2017) Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evol Appl* 10:121-139.
- Morales NS, Fernández IC, Carrasco B and Orchard V (2015) Combining niche modelling, land-use change, and genetic information to assess the conservation status of *Pouteria splendens* populations in Central Chile. *Int J Ecol* 2015:ID612194.
- Moritz CC and Potter S (2013) The importance of an evolutionary perspective in conservation policy planning. *Mol Ecol* 22:5969-5971.
- Olmstead RG (2013) Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. *Bot J Linn Soc* 171: 80-102.
- Overbeck G, Muller S, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar V, Blanco C, Boldrini I, Both R and Forneck E (2007) Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 9:101-116.
- Pahad G, Montgelard C and van Vuuren BJ (2019) Phylogeography and niche modelling: reciprocal enlightenment. *Mammalia* 84:10-25.
- Paim PSG, Chemale F and Lopes RC (2000) A Bacia do Camaquã. In: Holtz M, De Ros LF (eds) *Geologia do Rio Grande do Sul*. UFRGS, Porto Alegre, pp 231-274.
- Papadopulos AST, Baker WJ, Crayn D, Butlin RK, Kynast RG, Hutton I and Savolainen V (2011) Speciation with gene flow on Lord Howe Island. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:13188-13193.
- Pauls SU, Nowak C, Bálint M and Pfenninger M (2013) The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Mol Ecol* 22: 925-946.
- Payseur BA. 2010. Using differential introgression in hybrid zones to identify genomic regions involved in speciation: differential introgression in hybrid zones. *Mol Ecol Resour* 10:806-820.
- Payseur BA and Rieseberg LH (2016) A genomic perspective on hybridization and speciation. *Mol Ecol* 25:2337-2360.
- Pearman PB, Guisan A, Broennimann O and Randin CF (2008) Niche dynamics in space and time. *Trends Ecol Evol* 23:149-158.
- Peterman WE, Connette GM, Semlitsch RD and Eggert LS (2014) Ecological resistance surfaces predict fine-scale genetic differentiation in a terrestrial woodland salamander. *Mol Ecol* 23:2402-2413.
- Peterson AT, Soberón J and Sanchez-Cordero V (1999) Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285:1265-1267.

- Peterson AT (2011) Ecological niche conservatism: a time-structured review of evidence. *J Biogeogr* 38:817-827.
- Pezza AB and Ambrizzi T. 2005. Dynamical conditions and synoptic tracks associated with different types of cold surge over tropical South America. *Int J Climatol* 25:215-241.
- Pyron RA, Costa GC, Patten MA and Burbrink FT (2015) Phylogenetic niche conservatism and the evolutionary basis of ecological speciation. *Biol Rev* 90:1248-1262.
- Ramanatha Rao V and Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 68:1-19.
- 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.
- Ravinet M, Faria R, Butlin RK, Galindo J, Bierne N, Rafajlović M, Noor MAF, Mehlig B and Westram AM (2017) Interpreting the genomic landscape of speciation: a road map for finding barriers to gene flow. *J Evol Biol* 30:1450-1477.
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Mol Phylogenet Evol* 81:19-28.
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Stehmann JR, Greppi JA and Freitas LB (2015) Phylogenetic relationships of *Petunia patagonica* (Solanaceae) revealed by molecular and biogeographical evidence. *Phytotaxa* 222:17.
- Reis C dos, Sajo M das G and Stehmann JR (2002) Leaf structure and taxonomy of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae). *Braz Arch Biol Technol* 45:59-66.
- Richards EJ, Servedio MR and Martin CH (2019) Searching for sympatric speciation in the genomic era. *BioEssays* 41:1900047.
- Rissler LJ (2016) Union of phylogeography and landscape genetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:8079-8086.
- Rodrigues DM, Caballero-Villalobos L, Turchetto C, Assis Jacques R, Kuhlemeier C and Freitas LB (2018a) Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? *AoB Plants*:ply057.
- Rodrigues DM, Turchetto C, Callegari-Jacques SM and Freitas LB (2018b) Can the reproductive system of a rare and narrowly endemic plant species explain its high genetic diversity? *Acta Bot Bras* 32: 180-187.
- Rull V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends Ecol Evol* 26:508-513.
- Rundle HD and Nosil P (2005) Ecological speciation. *Ecol Lett* 8:336-352.
- Ryan SF, Deines JM, Scriber JM, Pfrender ME, Jones SE, Emrich SJ and Hellmann JJ. (2018) Climate-mediated hybrid zone movement revealed with genomics, museum collection, and simulation modeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:E2284-E2291.
- Sanmartín I (2012) Historical biogeography: evolution in time and space. *Evo Edu Outreach* 5:555-568.
- 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.
- Schierenbeck KA (2017) Population-level genetic variation and climate change in a biodiversity hotspot. *Ann Bot* 119:215-228.
- Schnitzler CK, Turchetto C, Teixeira MC and Freitas LB. (2020) What could be the fate of secondary contact zones between closely related plant species?. *Genetics Mol Biol* 43(2):e20190271.

- Seddon AWR, Macias-Fauria M, Long PR, Benz D and Willis KJ (2016) Sensitivity of global terrestrial ecosystems to climate variability. *Nature* 531:229-232.
- Seehausen O, Butlin RK, Keller I, Wagner CE, Boughman JW, Hohenlohe PA, Peichel CL, Saetre GP, Bank C, Brännström Å, *et al.* (2014) Genomics and the origin of species. *Nat Rev Genet* 15:176-192.
- Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Mol Phylogenet Evol* 70:504-512.
- 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.
- Sérsic AN, Cosacov A, Cocucci AA, Johnson LA, Pozner R, Avila LJ, Sites JW and Morando M (2011) Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biol J Linn Soc* 103:475-494.
- Sheehan H, Moser M, Klahre U, Esfeld K, Dell’Olivo A, Mandel T, Metzger S, Vandenbussche M, Freitas L and Kuhlemeier C (2016) MYB-FL controls gain and loss of floral UV absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nat Genet* 48:159-166.
- Silva-Arias GA, Caballero-Villalobos L, Giudicelli GC and Freitas L (2020) Landscape and climatic features drive genetic differentiation processes in a South American coastal plant. *bioRxiv* 2020.07.02.
- 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.
- Silva-Arias GA (2016) Genética de paisagens de espécies da planície costeira do Atlântico Sul. UFRGS, Porto Alegre, 46 pp.
- Silva Vieira JP, Schnadelbach AS, Mendes Hughes F, Jardim JG, Clark LG and De Oliveira RP (2020) Ecological niche modelling and genetic diversity of *Anomochloa marantoidea* (Poaceae): filling the gaps for conservation in the earliest-diverging grass subfamily. *Bot J Linn Soc* 192:258-280.
- Soriano A, León RJC, Sala OE, Lavado RS, Deregibus V, Cahupé MA, Scaglia OA, Velazquez CA and Lemcoff JH (1992) Río de la Plata grasslands. In: Coupland RT (ed) *Ecosystems of the world. Natural grasslands*. Elsevier, New York, pp 367-407.
- Soussana JF and Lüscher A (2007) Temperate grasslands and global atmospheric change: a review. *Grass Forage Sci* 62:127-134.
- Stehmann JR (1987) *Petunia exserta* (Solanaceae): Uma nova espécie do Rio Grande do Sul, Brasil. *Napaea* 2:19-21.
- Stehmann JR, Semir J, Stehmann JR and Semir J (1997) A new species and new combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon* 7:417.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave and Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis*. Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. 242 pp.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB and Semir J (2009) The Genus *Petunia*. In: Gerats T and Strommer J (eds) *Petunia*. Springer, New York, pp 1-28.

- Stoffel MA, Humble E, Paijmans AJ, Acevedo-Whitehouse K, Chilvers BL, Dickerson B, Galimberti F, Gemmell NJ, Goldsworthy SD, Nichols HJ, *et al* (2018) Demographic histories and genetic diversity across pinnipeds are shaped by human exploitation, ecology and life-history. *Nature Commun* 9:4836.
- Suertegaray DMA and Silva LAP (2009) Tchê Pampa: histórias da natureza gaúcha. In: Pillar VP, Müller SC, Castilhos ZMS and Jacques AVA (eds) *Campos Sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade*. 1st edition. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 42-59.
- Taylor SA, Larson EL and Harrison RG (2015) Hybrid zones: windows on climate change. *Trends Ecol Evol* 30:398–406.
- Teixeira MC, Turchetto C, Hartke S, Schnitzler CK and Freitas LB (2019) Morphological and genetic perspectives of hybridization in two contact zones of closely related species of *Petunia* (Solanaceae) in southern Brazil. *Acta Bot Bras* 33:734-740.
- Teixeira MC, Turchetto C, Maestri R and Freitas LB (2020) Morphological characterization of sympatric and allopatric populations of *Petunia axillaris* and *P. exserta* (Solanaceae). *Bot J Linn Soc* 192:550-567.
- Tomazelli LJ, Dillenburg SR and Villwock JÁ (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain, southern Brazil. *Rev Bras Geocienc* 30:474-476.
- Tsukamoto T, Ando T, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G, Sakazaki U, Suárez E, Marchesi E, Oyama K and Kao T (2002) Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). *J Plant Res* 115:185-193.
- Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, Kuhlemeier C, Solís Neffa VG, Speranza PR, Bonatto SL and Freitas LB (2014a) Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Mol Ecol* 23:374-389.
- Turchetto, Segatto ALA, Telles MPC, Diniz-Filho JAF, Freitas LB (2014b) Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: a comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 16:75-82.
- Turchetto C, Segatto AL, Beduschi J, Bonatto SL and Freitas LB (2015) Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants*. 7:plv084.
- 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.
- Turchetto C, Segatto ALA, Silva-Arias GA, Beduschi J, Kuhlemeier C, Bonatto SL and Freitas LB (2019a) Contact zones and their consequences: hybridization between two ecologically isolated wild *Petunia* species. *Bot J Linn Soc* 190:421-435.
- Turchetto C, Schnitzler CK and Freitas LB (2019b) Species boundary and extensive hybridization and introgression in *Petunia*. *Acta Bot Bras*. 33:724-733
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F and Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol Ecol* 22:1193-1213.
- Vandenbussche M, Chambrier P, Rodrigues Bento S and Morel P (2016) *Petunia*, your next supermodel? *Front Plant Sci* 7:72.
- Venail J, Dell’Olivo A and Kuhlemeier C (2010) Speciation genes in the genus *Petunia*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:461-468.
- Warren DL, Glor RE and Turelli M (2008) Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* 62:2868-2883.

- Watanabe H, Ando T, Iida S ichi, Suzuki A, Buto K ichi, Tsukamoto T, Hashimoto G and Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *Engei Gakkai* 65:625-634.
- Weschenfelder J, Corrêa ICS, Aliotta S and Baitelli R (2010a) Paleochannels related to late quaternary sea-level changes in Southern Brazil. *Braz J Oceanogr* 58:35-44.
- Weschenfelder J, Corrêa ICS, Aliotta S and Baitelli R (2010b) Paleochannels related to late quaternary sea-level changes in Southern Brazil. *Braz J Oceanogr* 58:35-44.
- Weschenfelder J, Baitelli R, Corrêa ICS, Bortolin EC and dos Santos CB (2014) Quaternary incised valleys in southern Brazil coastal zone. *J S Am Earth Sci* 55:83-93.
- Whitlock R, Hipperson H, Thompson DBA, Butlin RK and Burke T (2016) Consequences of *in-situ* strategies for the conservation of plant genetic diversity. *Biol Conserv* 203:134-142.
- Wiens JJ. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58:193.
- Wiens JJ and Graham K (2005) Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:519-539.
- Wiens JJ, Ackerly DD, Allen AP, Anacker BL, Buckley LB, Cornell HV, Damschen E I, Davies TJ, Grytnes J-A, Harrison SP, Hawkins BA, Holt RD, McCain CM and Stephens PR (2010) Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecol Lett* 13:1310-1324.
- Wijsman HJW (1990) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae). *Acta Bot Neerl* 39:101-102.
- Wijsman HJW and De Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia* iv. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot Neerl* 34: 337-349.
- Wilcox KR, Shi Z, Gherardi LA, Lemoine NP, Koerner SE, Hoover DL, Bork E, Byrne KM, Cahill J, Collins SL, *et al* (2017) Asymmetric responses of primary productivity to precipitation extremes: a synthesis of grassland precipitation manipulation experiments. *Global Change Biol* 23:4376-4385.
- Wolf JBW and Ellegren H (2017) Making sense of genomic islands of differentiation in light of speciation. *Nat Rev Genet* 18:87-100.
- Wuyun T, Amo H, Xu J, Ma T, Uematsu C and Katayama H (2015) Population structure of and conservation strategies for wild *Pyrus ussuriensis* Maxim in China. *PloS One* 10:e0133686.
- Zhang X, Shen S, Wu F and Wang Y (2017) Inferring genetic variation and demographic history of *Michelia yunnanensis* Franch. (Magnoliaceae) from chloroplast DNA sequences and microsatellite markers. *Front Plant Sci* 8:583.