

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

**Ameaçada, rara e diversa: avaliação genômica revela linhagem críptica em espécie
dos campos sulinos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**.

CAROLINA KAISER SCHNITZLER

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

Porto Alegre, setembro de 2022.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, Loreta, pela calma e paciência, pelos ensinamentos e pela orientação que tornou esse trabalho possível.

À professora Caroline, pelas ajudas, dentro e fora do meio acadêmico, pela amizade e incentivos.

Aos colegas de laboratório, Alako, Analu, Geraldo, Giovanna, Luana e Sebastian, pela convivência e amizade que criamos; especialmente à minha segunda família nesse ambiente, amigos de coração e rede de apoio que formamos, Aléxia, Alice e Pedro, pelas noites (mal) dormidas, compartilhamentos e confissões.

A todos os professores, tanto do PPGBM quanto dos outros departamentos, que proporcionaram a construção do conhecimento que carrego desde a graduação até o presente momento.

A todos os amigos a quem recorri, virtual e fisicamente, pelos momentos de trocas de conhecimento, entretenimento e devaneio.

Por último, mas de grande importância, à minha família, meu irmão Felipe por estar fisicamente presente durante os tempos mais difíceis, meus pais, Loiva e Edgar, pelo suporte emocional e por terem sempre acreditado na minha força, me dando confiança para seguir sempre.

SUMÁRIO

Resumo.....	5
Abstract.....	6
1. Introdução.....	7
2. Objetivos.....	12
3. Capítulo 1.....	13
4. Considerações Finais.....	47
5. Referencias Bibliográficas.....	50

RESUMO

A Serra do Sudeste é considerada um centro de diversidade do gênero *Petunia*, com a distribuição de duas espécies endêmicas e outras duas de ampla distribuição. *Petunia secreta* é uma espécie com distribuição restrita apenas à localidade denominada Pedra do Segredo. A espécie é classificada como rara, endêmica e em perigo de extinção. Em 2014, uma população numerosa, composta por indivíduos com morfologia similar à *P. secreta*, foi encontrada em um ambiente antropizado, na beira da rodovia BR-290. A caracterização genética desta população mostrou acentuada diferenciação em relação às populações da área original de descrição da espécie. Aqui realizamos uma investigação sobre a origem dessa população por meio de variações encontradas em nível genômico, comparando-a com populações naturais de outras espécies do gênero de ocorrência próxima à população de interesse. Os resultados sugerem inexistência de fluxo gênico com as espécies *P. integrifolia* e *P. exserta*; presença de um componente genético exclusivo à BR-290; compartilhamento parcial de polimorfismos com *P. axillaris* e *P. secreta* canônica. A análise da demografia histórica demonstrou que a linhagem BR-290 teria surgido a partir de um ancestral comum com *P. secreta*, com tempo de divergência estimado em 25 Kya, coincidindo com as mudanças climáticas do Pleistoceno. Desta forma, sugere-se que esta linhagem seja considerada uma forma independente e críptica a *P. secreta*, devendo ser tida como uma nova espécie no gênero e protegida como tal.

ABSTRACT

Serra do Sudeste is considered a center of diversity of the genus *Petunia*, with the distribution of two endemic and two widely distributed species. *Petunia secreta* is narrowly distributed, restricted to the locality called Pedra do Segredo. The species is classified as rare, endemic, and endangered. In 2014, a large population, composed of individuals with a morphology similar to *P. secreta*, was found in an anthropized environment, on the side of the BR-290 highway. The genetic characterization of this population showed marked differentiation in relation to the populations of the original area of *P. secreta* description. Here, we carry out an investigation into the origin of this population based on variations at the genomic level, comparing natural populations of other *Petunia* species occurring close to the BR-290 population. The results suggested that there is no gene flow with *P. integrifolia* and *P. exserta*; BR-290 shows an exclusive genetic component; there is partial polymorphism sharing between BR-290 and *P. axillaris* and canonical *P. secreta*. The analysis of historical demography showed that the BR-290 lineage would have emerged from a common ancestor with *P. secreta*, with an estimated divergence time of 25 Kya, coinciding with the Pleistocene climate changes. Thus, it is suggested that this lineage should be considered as an independent and cryptic form of *P. secreta*, and should be considered as a new species in the genus and protected as such.

1. INTRODUÇÃO

Novas linhagens evolutivas podem surgir devido a diversos processos responsáveis por mudanças em uma população ancestral, como alterações em sua ecologia, distribuição geográfica e morfologia (causadas naturalmente ou por intervenção antrópica). Apesar da extensa e constante identificação das forças evolutivas que atuam sobre as espécies e em sua formação, é difícil uma conceituação unificada da delimitação de espécies, devido às distintas áreas da biologia que utilizam essa unidade de identificação, de acordo com o foco específico de cada uma delas (Knowles and Carstens, 2007; De Queiroz, 2007). A diversificação de padrões genéticos distintos resultante desses processos influencia as dinâmicas populacionais, com a capacidade de separar as populações em unidades evolutivas independentes, com diminuição e/ou interrupção de fluxo gênico entre as mesmas, acentuando os efeitos da seleção natural e deriva genética (Hedrick, 2011). Mudanças nessas dinâmicas podem ocasionar um efeito gargalo de garrafa nas espécies, devido à redução de tamanho efetivo e do isolamento espacial das populações (Lowe *et al.*, 2005; Farwig *et al.*, 2008). A persistência de espécies pode ser posta em risco através de variações climáticas e de fragmentação de habitats, pela ação da deriva genética que pode ocasionar uma erosão genética, com redução de fluxo gênico, aumento nos níveis de endocruzamento, dificuldades na ação dos polinizadores em plantas, causando um aumento em extinções locais (Ellstrand and Elam, 1993; Young *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2005).

Mudanças na paisagem em função da ação antrópica, além da fragmentação do habitat, podem levar à hibridação interespecífica por contato secundário de espécies espacialmente isoladas, formando zonas híbridas, processo que é ambíguo nos seus efeitos sobre a dinâmica da biodiversidade, e é observado em mais de 40% das famílias de plantas vasculares (Avice, 2000; Seehausen, 2008; Whitney *et al.*, 2010; Abbott, 2017). Em uma via, a hibridação é capaz de aumentar a diversidade genotípica e de mover adaptações genéticas, melhorando as chances de adaptação local e permitindo a ocupação de novos habitats pela espécie, assim, gerando linhagens recombinantes estáveis (Rieseberg, 1997; Avice, 2004; Brawand, 2014; Pierce *et al.*, 2017). Por outro lado, o número de espécies e sua diversidade genética podem diminuir, colapsando as linhagens existentes pelo desequilíbrio de ligação entre os loci, reduzindo a capacidade de especiação (Levin *et al.*, 1996; Harrison and Bogdanowicz, 1997). Mecanismos de isolamento reprodutivo em plantas, tanto em fase pré-zigótica como pós-zigótica, existem para impedir a viabilidade

de um organismo híbrido na natureza, o primeiro através de barreiras geográficas e tempos distinto de floração, que dificultam a transferência de pólen, sistemas genéticos de incompatibilidade, modificações florais, sejam estas estruturais ou de compostos secundários, resultando em alterações no comportamento dos polinizadores; e o último por levar à inviabilidade de maturação reprodutiva, menor proporção de sementes férteis e germináveis (Judd *et al.*, 1999; Lowry *et al.*, 2008; Cahenzli *et al.*, 2018). Espécies raras ou endêmicas são mais suscetíveis à perda de complexos gênicos após a introdução de novos genes, em um fenômeno conhecido como “genetic swamping” (Levin *et al.*, 1996).

O campo da filogeografia utiliza a ferramenta de constatação de variação molecular em indivíduos, tanto para estudos intraespecíficos como interespecíficos, possibilitando compreender os processos que atuam sobre linhagens genéticas relacionando-os com a sua distribuição geográfica (Avise, 2000). Abordagens seguindo essa filosofia dão oportunidade de trazer à tona os contextos evolutivos, ecológicos e geográficos das espécies, facilitando a identificação de refúgios da biodiversidade, assim como a determinação de decorrências históricas e espaciais nas riquezas de espécies (e.g. Maier *et al.*, 2019; Giudicelli *et al.*, 2021; Ortego *et al.*, 2021). A modificação de paisagens originais em decorrência de ações antrópicas têm aumentado a fragmentação de habitats de maneira mais acentuada que mudanças provenientes das oscilações climáticas, subdividindo e reduzindo grandes populações, sendo propulsores de redução de variabilidade genética (Tiscornia *et al.*, 2019). A potencialidade de permitir a compreensão e identificação da história de áreas isoladas evolutivamente, possibilita categorizar estratégias de manejo e prioridades para a conservação destas (Ali, 2020).

A variação genética encontrada por polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*) fornecem uma representação de todo o genoma do organismo, possibilitando a identificação de processos microevolutivos e macroevolutivos que agem sobre o mesmo. Abordagens com esses marcadores têm sido amplamente utilizadas em estudos de história demográfica de populações e para estimar o tempo de divergência entre linhagens e espécies (Maier *et al.*, 2019; Garcia-Erill *et al.*, 2020).

O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) possui 17 espécies silvestres descritas, com a ocorrência exclusiva nas regiões temperadas e subtropicais da América do Sul (Greppi *et al.*, 2019). A distribuição natural da maioria das espécies abrange o Sul e Sudeste do Brasil, com ocorrência também no Uruguai e em algumas províncias da Argentina

(Stehmann *et al.*, 2009). As espécies desse gênero são diploides, com o mesmo número cromossômico ($2n = 14$), e são mundialmente conhecidas pela comercialização da espécie *Petunia hybrida* (Hook.) Vilm., popularmente denominada petúnia-de-jardim, que movimenta um dos maiores orçamentos para plantas comerciais no mundo e é considerada um modelo para estudos de genética e evolução de plantas (Vandenbussche *et al.*, 2016). Essa planta ornamental é resultado de cruzamentos artificiais interespecíficos entre uma espécie com flores brancas e tubo da corola longo (*P. axillaris* (Lam) Britton *et al.*) e uma espécie de flores roxas e tubo da corola curto, *P. interior* Ando & G. Hashim. (Segatto *et al.*, 2014) ou *P. inflata* R.E.Fr. (Bombarely *et al.*, 2016). Sob condições experimentais, todas as espécies de *Petunia* podem hibridizar e produzir descendentes férteis (Gerats and Vandenbussche, 2005) devido à ausência de barreiras intrínsecas entre estas (Watanabe *et al.*, 1996).

A identificação dos processos evolutivos no gênero *Petunia* são de complexa resolução, especialmente devido ao recente tempo de divergência (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Särkinen *et al.*, 2013) e da baixa diferenciação genética entre as espécies (Segatto *et al.*, 2017). A filogenia mais abrangente em número de taxa e de maior número de marcadores genéticos, tanto plastidiais como sequências nucleares (Reck-Kortmann *et al.*, 2014) revelou a distribuição das espécies em dois clados com suporte no comprimento do tubo da corola. O primeiro clado é composto pelas espécies de tubo longo e *P. occidentalis* R.E.Fr., enquanto o segundo abrange as espécies de tubo curto, sendo este subdividido em dois clados internos de acordo com a altitude em que as espécies são encontradas.

O Bioma Pampa ocupa dois terços do estado do Rio Grande do Sul, em sua porção sul, a Província do Pampa na Argentina e todo o território do Uruguai, incluído nos Campos do Rio de La Plata (Tiscornia *et al.*, 2019). Esse bioma possui predominantemente uma vegetação herbácea e arbustiva, com um mosaico de matas ciliares nas bordas dos corpos d'água (Overbeck *et al.*, 2007). A utilização de campos naturais para a pastagem de gado sem o manejo adequado pode levar à redução da diversidade biológica, diminuição de nutrientes retidos e à erosão do solo (Tiscornia *et al.*, 2019). A região da Serra do Sudeste, no Rio Grande do Sul, corresponde à porção central do Estado e integra o Bioma Pampa. A Serra do Sudeste constitui uma fitofisionomia heterogênea, onde um dos principais fatores que determina a distribuição da vegetação arbórea/arbustiva e campestre é a intensidade do manejo (Overbeck *et al.*, 2007; 2015). Formada por um relevo muito acidentado, com

solos rasos e presença de afloramentos rochosos areníticos. Essa região é considerada um centro de diversidade para o gênero *Petunia*, onde se distribuem duas espécies endêmicas, *P. exserta* Stehmann., com síndrome floral ornitófila, e *P. secreta* Stehmann & Semir, com síndrome floral melitófila, e outras duas espécies de ampla distribuição, *P. axillaris*, de síndrome floral esfingófila, e *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell., única representante do clado de tubo curto da corola, também melitófila.

Petunia secreta é uma espécie endêmica, com poucas populações e poucos indivíduos por populações. As plantas são encontradas expostas ao sol, no topo de afloramentos rochosos, em uma área restrita da Serra do Sudeste, conhecida como Pedra do Segredo, no município de Caçapava do Sul, RS (Stehmann and Semir, 2005; Turchetto *et al.*, 2016). A espécie compartilha diversas características morfológicas com as demais espécies do clado de tubo longo, como o hábito de crescimento cespitoso, o tubo da corola longo e hipocrateriforme, o pólen amarelo, pedúnculos frutíferos eretos com cápsulas grandes que abrigam dezenas de sementes pequenas, assim como o tempo de geração anual (Stehmann and Semir, 2005; Stehmann *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2018). Diferenciadas pela coloração púrpura das flores e polinização preferencial por abelhas do gênero *Pseudagapostemon* (Rodrigues *et al.*, 2018). Apesar do baixo número de indivíduos e pequena distribuição geográfica, essa espécie demonstra diversidade genética similar à *P. axillaris*, que possui um grande número de indivíduos e é de ampla distribuição (Turchetto *et al.*, 2016).

Em 2014, foi encontrada uma população morfológicamente classificada como *P. secreta*, mas ocorrendo em um ambiente atípico para a espécie à beira da rodovia BR-290. Diferentemente do que é observado na Pedra do Segredo, às margens da BR-290 constituem um ambiente ruderal, distante cerca de 30 km da distribuição do tipo da espécie, e a população é formada por indivíduos mais altos e em maior número que os descritos para as populações canônicas. Não foram encontrados caracteres florais diagnósticos que diferenciasses esta população daquelas de ocorrência na Pedra do Segredo, fazendo com que o taxonomista especializado no gênero *Petunia* classificasse os indivíduos da BR-290 como *P. secreta* (J. R. Stehmann, UFMG, comunicação pessoal). Estudos realizados com marcadores plastidiais e microssatélites nucleares demonstraram uma forte diferenciação genética da população da BR-290 em relação às demais (Turchetto *et al.*, 2016), propondo a existência de duas linhagens evolutivas distintas. As análises com

estes marcadores não foram capazes de determinar a origem evolutiva da população da BR-290, trazendo como hipóteses igualmente prováveis um processo de hibridação entre espécies que coocorrem na área, isolamento por distância entre a população da BR-290 e as da Pedra do Segredo ou mesmo uma nova espécie morfológicamente indistinta de *P. secreta*. Assim, acredita-se que a proposição de uma análise com ampla cobertura genômica possa contribuir para a discussão sobre a origem desta população às margens da BR-290 e auxiliar no entendimento de processos de especiação e diversificação do gênero *Petunia*.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o entendimento dos processos evolutivos que originaram a diversidade no gênero *Petunia*.

Objetivos específicos

- a) Caracterizar a diversidade genética da espécie *Petunia secreta* a fim de identificar a origem evolutiva de populações disjuntas usando uma ampla cobertura do genoma;
- b) Avaliar a variabilidade genética, estruturação populacional e história demográfica da espécie através de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs);
- c) Testar a hipótese de origem da população disjunta por hibridação;
- d) Contribuir para o entendimento de processos evolutivos envolvidos na especiação de *Petunia* e conseqüentemente, de plantas dos campos sulinos de baixa altitude.

3. CAPÍTULO 1

"Endangered, diverse, and cryptic: genomic evaluation reveals an undescribed lineage from the lowland grasslands in southern South America"

CAROLINA KAISER SCHNITZLER, PEDRO HENRIQUE PEZZI, GIOVANNA CÂMARA GIUDICELLI, CAROLINE TURCHETTO, AURELIANO BOMBARELY, LORETA BRANDÃO DE FREITAS

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

Abstract

Environments in constant changes mainly due to land use are often threatened. The South American grasslands constitute ecosystems sensitive to climate changes and human actions that promote landscape fragmentation and habitat loss for several species. These open fields home many endemic and narrowly distributed species for which environmental shifts could be even worse due to the usual small effective population size and low genetic diversity. Here we describe the genetic diversity, population structure, and evolutionary history for a cryptic herbaceous lineage that inhabits a severely impacted environment. We based our work in a wide genomic coverage, analyzed under population genomic approach to test different hypotheses for this lineage origin, comparing with related species from the same area. The lineage is not yet recognized as an independent taxon but constitutes a divergent genetic component that allowed the colonization of a new micro-environment during a period of high diversification to the genus. We found limited genetic diversity and high level of inbreeding in this lineage. Strongly threatened because its habitat management, this cryptic lineage can serve as a model to propose conservation strategy based on genomic studies for South American grasslands.

Key words: population genomics, Solanaceae, cryptic speciation, conservation

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão de processos de diferenciação entre linhagens e a sua manutenção leva ao melhor entendimento dos processos de diversificação e às forças que atuam sobre eles. Neste sentido, o presente projeto teve como principal meta elucidar as relações entre populações morfológicamente semelhantes, porém ocorrendo em ambientes ecologicamente distintos. Os resultados obtidos permitiram desvendar os processos evolutivos e a distinção de linhagens encontradas na espécie *Petunia secreta* (Solanaceae), testando hipóteses anteriormente levantadas (Turchetto *et al.*, 2016) para explicar a diversidade genética encontrada na espécie. Aqui, com a utilização de dados genômicos e análises de estruturação populacional e demografia histórica dos indivíduos, foi possível identificar a diversidade genética e o tamanho populacional efetivo refletindo os efeitos das pressões antrópicas em espécies de campo.

As mudanças climáticas do Pleistoceno, que estão diretamente relacionadas com a dinâmica campo-floresta e a disponibilização e/ou fragmentação de habitat para os organismos envolvidos neste fenômeno, têm sido associadas ao processo de diversificação que ocorre em espécies de campo, particularmente considerando espécies do gênero *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Backes *et al.*, 2019) e seu gênero irmão, *Calibrachoa* (Mäder *et al.*, 2019). Da mesma forma, estes efeitos também já foram relacionados a mudanças demográficas em táxons específicos (p/ ex., Giudicelli *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2022). Em decorrência destas variações climáticas, espécies de campo tenderam a expandir sua distribuição durante os períodos mais frios e secos, migrando de sul para o norte; com o aquecimento e aumento da umidade nos períodos interglaciais, as espécies florestais tiveram condições de expandir sobre os campos, a partir das áreas de menor elevação e beiras de rios (Ledru *et al.*, 2005), fragmentando a distribuição das espécies campestres que ficaram restritas a elevações mais altas (Behling, 2002). O gênero *Petunia* seguiu este padrão com fortes reflexos em sua estrutura genética (Barros *et al.*, 2015; 2020)

A diferenciação genética intraespecífica encontrada em espécies de recente diversificação pode, também, ser explicada por eventos como a migração seguida de diferenciação das linhagens que, em épocas de mudanças climáticas, pode ser favorecida pela abertura novos territórios, ecologicamente adequados ao estabelecimento dos indivíduos. A colonização de novos ambientes envolve a combinação de dois fatores genéticos importantes: um novo arranjo de variantes genéticas ancestrais, que podem

resultar em isolamento reprodutivo rápido, e o acúmulo gradual de novas mutações (Marques *et al.*, 2019), as quais também podem promover o isolamento reprodutivo. Em *Petunia* essa combinação de fatores, associados ou não a mudanças morfológicas, já foi associada à diversidade encontrada em nível populacional (Rodrigues *et al.*, 2019; Giudicelli *et al.*, 2021; Turchetto *et al.*, 2022) e entre diferentes espécies do gênero (Caballero-Villalobos *et al.*, 2021; Guzmán *et al.*, 2022, Pezzi *et al.*, 2022) amplamente favorecida pela disponibilidade de novos habitats.

Com os resultados obtidos no presente trabalho, através da análise de polimorfismos genômicos neutros, foi possível identificar uma linhagem independente e inferir sua origem evolutiva. Esta linhagem (BR-290) é críptica à *P. secreta* baseado nos caracteres morfológicos florais, derivou de um ancestral comum de *P. secreta* e apresenta seu próprio componente genético. A linhagem BR-290 tem um tamanho populacional efetivo menor que o observado tanto em *P. secreta* proveniente da distribuição canônica da espécie como aquele estimado para a espécie irmã, *P. axillaris*. As três linhagens, *P. secreta* canônica, BR-290 e *P. axillaris*, são proximamente relacionadas, embora *P. secreta* e *P. axillaris* apresentem menor diferenciação genética entre si que àquela em relação à BR-290. O ambiente em que a linhagem BR-290 se encontra é fortemente antropizado, às margens de uma rodovia de grande tráfego na região central do Rio Grande do Sul. O Pampa, como um todo, tem altas taxas de conversão de campos naturais para o uso agrícola e pecuário (Baeza and Paruelo, 2020). Além disso, este ecossistema possui a menor taxa de áreas protegidas entre os biomas brasileiros (Overbeck *et al.*, 2022). Em sua distribuição canônica, *P. secreta* ocorre em pequenas populações de poucos indivíduos, todas restritas à formação conhecida por Pedra do Segredo, municipalidade de Caçapava do Sul. O solo onde as plantas crescem é derivado de rochas, bastante seco e raso e os indivíduos são cercados por vegetação xerofítica, majoritariamente composta por espécies de cactos, suculentas e bromeliáceas (Turchetto *et al.*, 2016). A linhagem BR290 ocorre em solo rico, úmido e cercada principalmente de espécies de gramíneas (Rodrigues *et al.*, 2019). O solo e a vegetação às margens da rodovia são manejados principalmente por fogo e roça mecânica (observação pessoal), mas apenas diferenças na morfologia vegetativa, como altura das plantas, foram reconhecidas pelo taxonomista do gênero (J.R. Stehmann, comunicação pessoal). A população da BR290 é composta por várias dezenas de indivíduos (Turchetto *et al.*, 2016).

Conforme estudos anteriores (Turchetto *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019), *P. secreta* apresenta alta diversidade genética, apesar do baixo número de indivíduos e populações. Em comparação com os índices sumários de diversidade obtidos para a linhagem BR290, é possível identificar esta apresenta uma menor taxa de endocruzamento e maiores valores de heterozigosidade observada que a espécie *P. secreta* canônica. Porém, ao analisarmos o tamanho populacional efetivo consideravelmente menor na linhagem BR-290, pode-se sugerir que esta enfrenta maior pressão de forças evolutivas, devido à perda de habitat progressivamente gerada por ações antrópicas no controle da vegetação às margens da rodovia.

Através da percepção da biodiversidade, não apenas devido aos valores estipulados pela noção humana, mas como peso intrínseco de cada organismo, em nível intra e interespecífico, podem ser estabelecidas estratégias de manejo e conservação mais adequadas. O Bioma Pampa vem sofrendo constantes supressões para a conversão dos campos naturais para utilização agrícola e pecuária, muitas vezes de forma irregular, resultando em um remanescente de áreas naturais de apenas 48% no estado do RS (FEPAM, 2021). No presente trabalho, além da identificação de uma linhagem críptica, irmã de *P. secreta*, que pode ser considerada em perigo de extinção devido à perda do hábitat e pela área de ocorrência restrita, vem à luz o quão urgente é a tomada de medidas de proteção nessa região.

É importante a exploração dos dados obtidos no presente estudo através de mais análises, usando outros cenários de hibridação entre espécies de co-ocorrência na área, utilizando a detecção de invariantes filogenéticas; testar a ocorrência de isolamento por distância ou isolamento por ecologia entre a linhagem BR-290 e *P. secreta*, bem como outros modelos demográficos e evolutivos envolvendo as demais espécies da Serra do Sudeste. Além disso, a identificação dos loci sob seleção deve ser empregada para compreender processos de eventual adaptação local, com o auxílio de diferentes variáveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali T (2020) A conceptual framework for designing phylogeography and landscape genetic studies. *CRC Crit Rev Plant Sci* 39:457-478.
- 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.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. 1st Edition. Harvard university press, Cambridge, MA, 464 pp.
- 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.
- Baeza S and Paruelo JM (2020) Land use/land cover change (2000–2014) in the *Rio de la Plata* grasslands: an analysis based on MODIS NDVI time series. *Remote Sens* 12:381.
- 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: a comparative analysis of *Adesmia*, *Calibrachoa*, and *Petunia*. *Perspec Plant Ecol Evol Syst* 17:360–368.
- Barros MJF, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Reck- Kortmann M, Fregonezi JN, Diniz-Filho JAF, and Freitas LB (2020) Phylogenetic niche conservatism and plant diversification in South American subtropical grasslands along multiple climatic dimensions. *Genet Mol Biol* 43:e20180291.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeog Palaeoclim Palaeoecol* 177:19-27.
- Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao M, Bapaume L, Barry CS, Bliet M, Boersma MR, Borghi L, Bruggmann R *et al.* (2016) Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nat Plants* 2:16074.
- Caballero-Villalobos L, Silva-Arias GA, Turchetto C, Giudicelli GC, Petzold E, Bombarely A and Freitas LB (2021) Neutral and adaptive genomic variation in hybrid zones of two ecologically diverged *Petunia* species (Solanaceae). *Bot J Linn Soc* 196:100-122.
- De Queiroz K (2007) Species Concepts and Species Delimitation. *Syst Biol* 56:879-886.
- Ellstrand NC and Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24:217-242.
- Farwig N, Braun C and Böhning-Gaese K (2008) Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). *Conserv Genet* 9:317.
- FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler (2021) Relatório técnico de indicadores de biodiversidade do estado do Rio Grande do Sul: remanescentes de áreas naturais. Rio Grande do Sul.
- Garcia-Erill G, Kjær MM, Albrechtsen A, Siegismund HR and Heller R (2021) Vicariance followed by secondary gene flow in a young gazelle species complex. *Mol Ecol* 30:528-544.
- Gerats T and Vandenbussche M (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends Plant Sci* 10:251–256.
- 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. *Perspec Plant Ecol Evol Syst* 41:125496.

- Giudicelli GC, Turchetto C, Guzmán-Rodríguez S, Teixeira MC, Petzold E, Bombarely A, and Freitas LB (2022) Population genomics indicates micro-refuges and riverine barriers for a southern South American grassland nightshade. *J Biogeogr* 49:51-65.
- Greppi JA, Hagiwara JC and Stehmann JR (2019) A new species of *Petunia* (Solanaceae) from Corrientes, Argentina. *Phytotaxa* 414:289-295.
- Guzmán S, Giudicelli GC, Turchetto C, Bombarely A and Freitas LB (2022) Neutral and outlier single nucleotide polymorphisms disentangle the evolutionary history of a coastal Solanaceae species. *Mol Ecol* 31:2847-2864.
- Hedrick PW (2009) *Genetics of populations*. 4th Edition. Jones & Bartlett Publishers, Burlington, MA, 675 pp.
- Knowles LL and Carstens BC (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Syst Biol* 56:887-895.
- 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.
- Ledru MP, Rousseau DD, Cruz FW Jr, Riccomini C, Karmann I, and Martin L (2005) Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic Rainforest region and interhemispheric comparison. *Quatern Res* 64:444-450.
- 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.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE and Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95:255-273.
- 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.
- Maier PA, Vandergast AG, Ostojka SM, Aguilar A and Bohonak AJ (2019) Pleistocene glacial cycles drove lineage diversification and fusion in the Yosemite toad (*Anaxyrus canorus*). *Evolution* 73:2476-2496.
- Marques DA, Meier JI and Seehausen O (2019) A combinatorial view on speciation and adaptive radiation. *Trends Ecol Evol* 34(6):531-544.
- Ortego J, Céspedes V, Millán A and Green AJ (2021) Genomic data support multiple introductions and explosive demographic expansions in a highly invasive aquatic insect. *Mol Ecol* 30:4189-4203.
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, Boldrini II, Both R and Forneck ED (2007) Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 9:101-116.
- Overbeck GE, Vélez-Martín E, Scarano FR, Lewinsohn TM, Fonseca CR, Meyer ST, Ceotto P, Dadalt L, Durigan G, Ganade G *et al.* (2015) Conservation in Brazil needs to include non-forest ecosystems. *Divers Distrib* 21:1455-1460.
- Overbeck GE, Vélez-Martín E, Menezes LS, Anand M, Baeza S, Carlucci MB, Dechoum MS, Durigan G, Fidelis A, Guido A, Moro MF, Munhoz CBR, Reginato M, Rodrigues RS, Rosenfeld MF, Sampaio AB, Silva FHB, Silveira FAO, Sosinski EE, Satude IR, Temperton VM, Turchetto C, Veldman JW, Viana PL, Zappi DC, Müller SC (2022) Placing Brazil's grassland and savannas on the map of science and conservation. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 56:125687.

- Pezzi PH, Guzmán-Rodríguez S, Giudicelli GC, Turchetto C, Bombarely A and Freitas LB (2022) A convoluted tale of hybridization between two *Petunia* species from a transitional zone in South America. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 56:125688.
- 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.
- Rodrigues DM, Caballero-Villalobos L, Turchetto C, Jacques RA, Kuhlemeier C and Freitas LB (2018) Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? *AoB Plants* 10:ply057.
- Rodrigues DM, Turchetto C, Lima JS and Freitas LB (2019) Diverse yet endangered: pollen dispersal and mating system reveal inbreeding in a narrow endemic plant. *Plant Ecol Diver* 12:169-180.
- 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.
- Segatto ALA, Ramos-Fregonezi AMC, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *Am J Bot* 101:119-127.
- 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.
- Souza A, Giudicelli GC, Texeira MC, Turchetto C, Bonatto SL, and Freitas LB. 2022. Genetic diversity in micro-endemic plants from highland grasslands in southern Brazil. *Bot J Lin Soc* 199:235-251.
- Stehmann JR and Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. *Syst Bot Monogr* 104:341.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB and Semir J (2009) The genus *Petunia*. Springer New York, New York, NY, pp 1–28.
- Tiscornia G, Jaurena M and Baethgen W (2019) Drivers, process, and consequences of native grassland degradation: Insights from a literature review and a survey in Río de la Plata grasslands. *Agronomy* 9:239.
- 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, Lima JS, Hartke S, Reck-Kortmann M, Bonatto SL and Freitas LB (2022) So close, so far: spatial genetic structure and mating system in *Petunia exserta*, an endemic from a peculiar landscape in the Brazilian Pampa grasslands. *Bot J Linn Soc* 199:412-427.
- Vandenbussche M, Chambrier P, Rodrigues Bento S and Morel P (2016) *Petunia*, Your Next Supermodel? *Front. Plant Sci.* 7:72.
- Ward M, Dick CW, Gribel R and Lowe AJ (2005) To self, or not to self. A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. *Heredity* 95:246-254.
- Watanabe H, Ando T, Lida S, Suzuki A, Buto K, 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. *J Jpn Soc Hort Sci* 65:625-634.
- Young AG, Boyle T, Brown AHD (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 10:413-418.