

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ANÁLISE DOS PROCESSOS DE ESPECIAÇÃO
EM ESPÉCIES RARAS DE ALTITUDE DE *PETUNIA* (SOLANACEAE)**

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

ANALU CRUZ SOUZA

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Caroline Turchetto

Porto Alegre, novembro de 2022.

“Vive de tal forma que deixes pegadas luminosas no caminho percorrido, como estrelas apontando o rumo da felicidade e não deixes ninguém afastar-se de ti sem que leve um traço de bondade, ou um sinal de paz da tua vida... Sem o passo inicial, ninguém vence as distâncias...”

(Joanna de Ângelis)

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 doutorado foi concedida pela CAPES.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um ato de bondade, é reconhecer que não realizou uma caminhada sozinha. Primeiramente, agradecer a Deus pelo dom da vida, pelas cadeias elétricas respiratórias que animam nossos corpos, uma das Ciências mais importantes para a Vida.

À **Loreta**, que pacientemente me concedeu a oportunidade de sua orientação me ensinando as ciências das petúnias. À **Carol**, sou grata por todos os momentos de aprendizagem que tive ao lado, gratidão! Espero ser digna do conhecimento aprendido a partir das orientações dessas duas cientistas de alto nível.

Aos amigos do LEM, Aléxia, Alice, Ariadne, Carolina, Clênio, Elise, Giovanna, Geraldo, Luana, Marcelo, Pedro e Sebastián, muito, muito obrigada por tudo. Todos os momentos que passei com vocês foram flores tão lindas como as petúnias que perfumaram minha caminhada. Obrigada também aos professores da pós-graduação da Genética e em especial ao Elmo por todo suporte e atenção.

Quero agradecer com muito carinho ao João pelos sábados com sessão de filmes, você sempre deixou que eu escolhesse os filmes. Ao José pela amizade e nossas longas conversas sobre a Ciência e o mundo. Aos amigos conquistados nesse percurso, gratidão.

Por fim, e não menos importante quero agradecer a minha família. Aos meus pais pelo suporte e apoio quando eu decidi ir para o Rio Grande do Sul em busca de um grande sonho, as minhas irmãs por perdoarem minhas ausências em momentos importantes de suas vidas.

SUMÁRIO

Resumo.....	2
Abstract.....	3
1. Introdução.....	4
2. Objetivos.....	12
3. Capítulo 1.....	13
4. Capítulo 2.....	32
5. Considerações Finais.....	86
6. Referências Bibliográficas.....	89

RESUMO

Espécies são consideradas raras quando ocorrem em distribuição restrita, com pequeno número de populações ou em poucos indivíduos por população, em oposição às espécies que têm ampla distribuição geográfica, mais comumente encontradas ou que possuem grandes populações. Por muito tempo, acreditou-se que espécies raras possuíam baixa diversidade genética em comparação a espécies de ampla distribuição a elas relacionadas. Entretanto, nem todas as espécies raras têm baixos níveis de variabilidade genética, uma vez que histórias de vida como sistema de cruzamento e mecanismos de dispersão de pólen e sementes, podem manter altos os níveis de diversidade, apesar do pequeno número de indivíduos. A presente tese teve como objetivo geral contribuir para o entendimento dos processos especiação do gênero *Petunia*. Os objetivos específicos contemplados nos capítulos que a compuseram foram: (a) avaliar a diversidade genética e estrutura populacional das espécies endêmicas dos campos de altitude no sul da América do Sul (*P. bonjardinensis*, *P. reitzii* e *P. saxicola*) através da análise de marcadores moleculares microssatélites; (b) identificar o estado de conservação e o risco de extinção dessas espécies; (c) contribuir para o entendimento dos sistemas reprodutivos destas espécies e seu papel na estruturação da diversidade genética; (d) avaliar a diversidade genética e estrutura populacional das espécies *P. scheideana* e *P. guarapuavensis* através da análise de marcadores genéticos nucleares; (e) testar barreiras ao fluxo gênico entre estas espécies; (g) testar modelos evolutivos e demográficos para a origem destas espécies; (h) contribuir para a taxonomia do gênero identificando os limites destas espécies. Para alcançar os objetivos, foram empregadas abordagens filogeográficas e de genética de populações a partir da amplificação e análise de loci de microssatélites nucleares, modelagem de nicho usando os registros de distribuição e estimativa do estado de conservação das espécies de acordo com os critérios da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza). Divididos em cada um dos dois capítulos, os resultados revelaram que a raridade das espécies *P. bonjardinensis*, *P. reitzii* e *P. saxicola* é provavelmente histórica, uma vez que não foram encontradas evidências genéticas de gargalos genéticos recentes. Mais uma vez, ficou evidente o papel da migração histórica, efeito fundador e ciclos climáticos do Pleistoceno explicando a diversidade genética em espécies de *Petunia*. A estrutura populacional destas três espécies também foi influenciada por sua biologia reprodutiva e pela perda recente de habitat decorrente das mudanças na paisagem. Em relação às espécies *P. scheideana* e *P. guarapuavensis*, foi encontrada variabilidade genética de moderada a baixa e diferenciação genética entre elas indicando que são entidades taxonômicas independentes. As análises do estado de conservação apontaram para uma ameaça de extinção para essas espécies devido à perda de habitat e fragmentação da paisagem, fato comum entre as espécies dos campos de altitude no sul do Brasil.

Palavras-Chave: Campos de altitude, diversidade genética, mudanças climáticas, *Petunia*

ABSTRACT

Species are considered rare when they are narrowly distributed, have a small number of populations, or just a few individuals per population, as opposed to species that have a wide geographic distribution, are more commonly found, or have large populations. For a long time, rare species were supposed to have low genetic diversity compared to widely distributed congeners. However, not all rare species have low genetic variability, as life histories such as mating systems and pollen and seed dispersal mechanisms can maintain high levels of diversity despite the small number of individuals. The present thesis aimed to contribute to understanding speciation processes in the genus *Petunia*. The specific objectives included in its chapters were: (a) to evaluate the genetic diversity and population structure of endemic species from highland grasslands in southern South America (*P. bonjardinensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola*) through the analysis of microsatellite molecular markers; (b) identify the conservation status and risk of extinction of these species; (c) contribute to the understanding of the reproductive systems of these species and their role in structuring genetic diversity; (d) to evaluate the genetic diversity and population structure of the species *P. scheideana* and *P. guarapuavensis* through the analysis of nuclear genetic markers; (e) test barriers to gene flow between these species; (g) test evolutionary and demographic models for the origin of these species; (h) contribute to the taxonomy of the genus by identifying the limits of these species. To achieve the objectives, phylogeographic and population genetic approaches were employed, based on the amplification and analysis of nuclear microsatellite loci, niche modeling using the distribution records, and estimation of the conservation status of the species according to the IUCN criteria (International Union for Conservation of Nature). Divided into each of the two chapters, the results revealed that the rarity of the species *P. bonjardinensis*, *P. reitzii* and *P. saxicola* is probably historical, as no genetic evidence of recent genetic bottlenecks was found. Once again, the role of historical migration, founder effect and Pleistocene climate cycles in explaining genetic diversity in *Petunia* species was evident. The population structure of these three species was also influenced by their reproductive biology and recent habitat loss due to changes in the landscape. Regarding the species, *P. scheideana* and *P. guarapuavensis*, moderate to low genetic variability was found, and genetic differentiation between them indicated that they are independent taxonomic entities. The conservation status analyzes pointed to a threat of extinction for these species due to habitat loss and landscape fragmentation, a common fact among species from highland grasslands in southern Brazil.

Keywords: Subtropical Highland grasslands, genetic diversity, climate change, *Petunia*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade genética em plantas raras e endêmicas e as consequências da fragmentação do habitat para a conservação das espécies

Espécies são consideradas raras quando ocorrem em distribuição restrita, apresentam pequeno número de populações ou em poucos indivíduos por população, em oposição àquelas que têm ampla distribuição geográfica, são mais comumente encontradas ou possuem grandes populações (Riva & Mammola 2021). As populações naturais podem ser pequenas por várias razões. As principais são locais disponíveis reduzidos e separados por distâncias que vão além da capacidade de dispersão da espécie; baixa capacidade de sustentação demográfica local; tempo curto de habitação dos locais devido ao deslocamento sucessional das espécies; colonização em estágios recentes, e incapacidade de exploração total do local. Estas razões, entretanto, se aplicam a populações que são pequenas naturalmente, onde não há indícios de interferência humana (Harper 1977).

A redução de habitat das populações das espécies raras provocadas principalmente pela fragmentação de suas áreas de ocorrências aumenta significadamente sua sensibilidade a mudanças climática e distúrbios ambientais. Os distúrbios induzidos principalmente por ações humanas levam primeiramente a redução populacional e podem ocasionar a extinção de espécies raras (Leitão et al. 2016). Em adição, a perda de espécies naturalmente raras impacta primeiramente a função de diversidade quando se compara com a perda inicial de espécies mais comuns (Basile, 2022).

Espécies naturalmente pequenas parecem resistir ao longo do tempo às variações demográficas populacionais compensando a raridade geográfica com abundância local, bem como, com abundância uniforme dentro de uma faixa restrita de ocorrência. A raridade geográfica dessas espécies naturais torna-as vulneráveis às flutuações ambientais estocásticas contribuindo para seu risco de extinção (Williams et al. 2009).

Espécies naturalmente raras são altamente especialistas e adaptadas a uma localidade. Essas adaptações locais, principalmente com especialização ambiental em áreas de refúgios surgem após contrações de habitat, como por exemplo, as provocadas após eventos de mudanças climáticas do Quaternário (Williams et al. 2009). O aumento do fluxo gênico em populações naturalmente pequenas, bem como uma larga faixa de distribuição geográfica e maior área de vizinhança podem evitar adaptações locais ao

dispor de longas distâncias para a dispersão, aumentando à capacidade de exploração local e na adaptação a mudança temporal (Polechová, 2022).

A distribuição e os níveis de diversidade genética dentro e entre populações de plantas raras têm grande dependência de processos históricos. As espécies raras, de modo geral, são mais suscetíveis à diminuição da variabilidade genética provocada pelos efeitos da deriva genética, pois esta atua de forma mais acentuada em populações com pequeno tamanho populacional efetivo (Cole 2003; Spielman et al. 2004; Aavik et al. 2017). As flutuações alélicas em consequência dos efeitos da deriva genética podem resultar no declínio da heterozigosidade esperada dentro das populações e, assim, afetar a diversidade genética como um todo. A baixa variação genética pode levar a consequências acentuadas para populações de tamanho populacional reduzido como, a redução da plasticidade adaptativa com prejuízo no desempenho de populações de plantas em ambientes heterogêneos (Fischer & Matthies 2008) ou mesmo a redução no seu potencial adaptativo (Stockwell et al. 2003), interferindo na adaptação local das populações (Engelhardt et al. 2014).

Por um longo tempo, as espécies raras foram consideradas como tendo níveis de diversidade mais baixos que aquelas de ampla distribuição, e se acreditava que sua diversidade genética seria mais afetada pela fragmentação do habitat (Young & Clarke 2000). Entretanto, nem todas as espécies raras tem baixos níveis de variabilidade genética, uma vez que histórias de vida, como sistema de cruzamento e mecanismos de dispersão de pólen e sementes, podem manter altos os níveis de diversidade, apesar da fragmentação do habitat (Loveless & Hamrick 1984; Hamrick & Godt 1996). Em uma ampla revisão da literatura (Gitzendanner & Soltis 2000), espécies com distribuição ampla foram comparadas com outras relacionadas evolutivamente, mas com distribuição restrita, quanto à diversidade genética. A comparação de espécies relacionadas é importante nestes casos porque evita a interferência de outros fatores que afetam a diversidade. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre as espécies de distribuição ampla e restrita, em relação à variabilidade genética intra- e interpopulacional.

A diversidade genética pode ser apresentada através de índices, comumente calculados em estudos de genética de populações, que servem como base para projetos de manejo e conservação de espécies. Sabendo que a perpetuação das espécies depende da manutenção de um número mínimo de indivíduos para que ocorra reprodução e a formação de descendentes (Frankham 2014), o conhecimento do pool gênico de cada

população é fundamental para inferir quais espécies ou populações devem prioritariamente ser manejadas. O conhecimento sobre a diversidade genética deve, então, ser aliado a outros na proposição de programas visando à conservação de espécies. Assim, para melhor compreender a dinâmica e os processos envolvidos na manutenção da biodiversidade, é necessário o conhecimento do padrão de distribuição da diversidade genética, fluxo gênico e filogeografia das espécies que compõem um ecossistema (Rahimmalek et al. 2009).

Diversos métodos de estimativa de biodiversidade têm sido propostos para a identificação de áreas prioritárias para a conservação. A distribuição geográfica no tempo evolutivo é um dos critérios que pode ser utilizado neste tipo de avaliação. Há indícios de que espécies que sempre foram raras não sofrem tanto com as consequências genéticas do isolamento e do pequeno tamanho populacional, quanto as espécies que se tornaram raras recentemente (Lutz et al. 2000). A identificação de linhagens evolutivas intraespecíficas através de análises filogenéticas moleculares também pode auxiliar a priorizar grupos que incluem a maior história evolutiva, identificando as linhagens que retêm o máximo de variabilidade genética (Vazquez & Gittleman 1998). O acesso à estrutura genética populacional de espécies ameaçadas ou cujo habitat está ameaçado permite identificar “hotspots” de biodiversidade e quais populações ou ambientes estariam sujeitos a maiores riscos (Ford et al. 1998; Matolweni et al. 2000; Collevatti et al. 2001). Atenção especial deve ser dada às regiões ricas em endemismos devido à grande vulnerabilidade destas espécies que, além de apresentar uma distribuição geográfica restrita, requerem nichos ecológicos especiais (Primack & Rodrigues 2001).

A fragmentação do habitat e as mudanças nas paisagens, tanto naturais como aquelas provocadas pela ação humana, tem reduzido o tamanho populacional e aumentado o isolamento espacial de muitas espécies (Lowe et al. 2005; Farwig et al. 2008). Por fragmentação de habitat se entende como a perda de habitat adequado para uma espécie e a separação de indivíduos dentro de manchas isoladas de habitats em ambientes não adequados (Leimu et al. 2010).

Um tamanho populacional pequeno e o isolamento espacial podem levar à erosão genética decorrente da deriva, do aumento nos níveis de endocruzamento, do reduzido nível de fluxo gênico, da ruptura dos processos de polinização e do aumento da probabilidade de extinções locais (Ellstrand & Elam 1993; Young et al. 1996; Ward et al. 2005).

Paisagens originais têm sido reduzidas a mosaicos de habitats remanescentes, cercados por áreas desfavoráveis, em geral pelo uso da terra (Overbeck et al. 2022). Neste processo, grandes populações são reduzidas ou subdivididas, possivelmente levando ao isolamento (Pillar et al. 2009). A fragmentação do habitat pode levar a uma redução da variabilidade genética através de eventos do tipo de gargalo de garrafa, enquanto o efeito do fundador, a deriva genética e o fluxo gênico restrito podem aumentar o isolamento genético das populações e sua divergência. Estes efeitos genéticos, além do possível aumento do endocruzamento, podem levar à fixação de alelos deletérios, colocando em risco a persistência destas espécies (Lutz et al. 2000). Outra consequência importante da fragmentação do habitat é a possibilidade de colocar em contato espécies espacialmente isoladas, permitindo a hibridação por contato secundário.

1.2 As espécies estudadas

Petunia Jussieu (Solanaceae) é um gênero composto por 14 espécies atualmente reconhecidas com o número cromossômico $2n = 14$ (Stehmann et al. 2009). O gênero *Petunia* é mundialmente conhecido em razão da *Petunia hybrida* (Hook) Vilm., popularmente conhecida como petúnia-de-jardim, a qual foi obtida a partir do cruzamento controlado entre *P. interior* (T.Ando & Hashim.) e *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb (Segatto et al. 2014). São plantas que, em seus ambientes naturais, apresentam reprodução anual (Stehmann et al. 2009).

As espécies do gênero são herbáceas, rasteiras, apresentando características morfológicas de hastes eretas, ascendentes, decumbentes, podendo atingir até 1 m de altura, com folhas sésseis ou pecioladas; suas flores estão associadas a duas brácteas opostas, cálice verde, corola com formato funil, tubos longos ou curtos e coloração roxa, vermelha, branca ou rosada, com anteras amarelas ou violáceas (Stehmann et al. 2009). Além das características morfológicas, as espécies de *Petunia* também podem ser classificadas pelos tipos de polinizadores associados as suas características de cor e tamanho da corola formando dois grupos bem distintos (Reck-Kortmann et al. 2014): um composto por espécies de tubo da corola curto, todas polinizadas por abelhas e com coloração púrpura, e outro com espécies de tubo longo, com flores de coloração vermelha polinizadas por beija-flores (Lorenz-Lemke et al. 2006), brancas e polinizadas por mariposas (Venail et al. 2010), ou rosa e polinizadas por abelhas (Rodrigues et al. 2018).

Duas regiões são consideradas como centro de diversidade para o gênero *Petunia*: os campos subtropicais no Planalto Sul brasileiro e a região da Serra do Sudeste no Pampa (Stehmann et al. 2009). Estudos moleculares sugeriram que a área ancestral do gênero tenha sido a região do Pampa, com posterior dispersão para regiões de mais alta elevação (Reck-Kortmann et al. 2014). A diversidade de espécies do gênero foi justificada pela ação de diferentes forças evolutivas que contribuíram para a diferenciação e diversificação das linhagens dentro do gênero, como eventos climáticos do Pleistoceno permitindo especiação alopátrica, adaptação local e interação com polinizadores (Lorenz-Lemke et al. 2010; Fregonezi et al. 2013).

O gênero é considerado jovem, com estimativas de divergência datando entre 1.3 (Lorenz-Lemke et al. 2010) e 2.8 milhões de anos (Särkinen et al. 2013), período no qual as espécies estiveram sob a influência das mudanças climáticas do Quaternário, que influenciaram significativamente os padrões de distribuição de *Petunia*.

Os planaltos do Sul e Sudeste do Brasil são regiões com elevações superiores a 800 m acima do nível do mar, compostas de mosaicos de campos abertos e florestas com *Araucaria* (Safford 1999) (Figura 1). Essas terras altiplanas são locais de ocorrência de espécies endêmicas de grandes elevações, as quais divergem entre si devido à expansão dos campos durante o Pleistoceno seguida de processos evolutivos de vicariância (Behling 2002). A influência climática durante o Plioceno-Quaternário, com períodos glaciais seguidos de intervalos interglaciais, favoreceu a dinâmica de expansão/contração das florestas e dos campos, formando relictos destes últimos em regiões mais elevadas, onde o clima mais frio e seco favoreceu processos de especiação alopátrica em diversos grupos de plantas, incluindo as espécies de *Petunia* (Barros et al. 2015).

No presente trabalho, selecionamos cinco espécies de *Petunia* (*P. bonjardinensis* T. Ando & Hashim., *P. guarapuavensis* T. Ando & Hashim, *P. reitzii* L.B.Sm. & Downs, *P. saxicola* L.B.Sm. & Downs e *P. scheideana* L.B.Sm. & Downs) como representantes do clado de tubo curto da corola. Essas espécies provavelmente compartilham os mesmos polinizadores, dos quais abelhas solitárias do gênero *Pseudagapostemon* já foram encontradas forrageando as espécies de *Petunia* (Stehmann et al. 2009). As espécies aqui estudadas são auto-incompatíveis (Tsukamoto et al. 1998) e possuem forma de dispersão de suas sementes por autocoria, no qual as sementes caem livremente perto da planta mãe na abertura do fruto maduro, elas ocorrem nos campos de altitude da região sul do Brasil (Figura 2) e foram coletadas nessa região de

forma a contribuir para o entendimento dos processos de diversificação deste grupo de plantas.

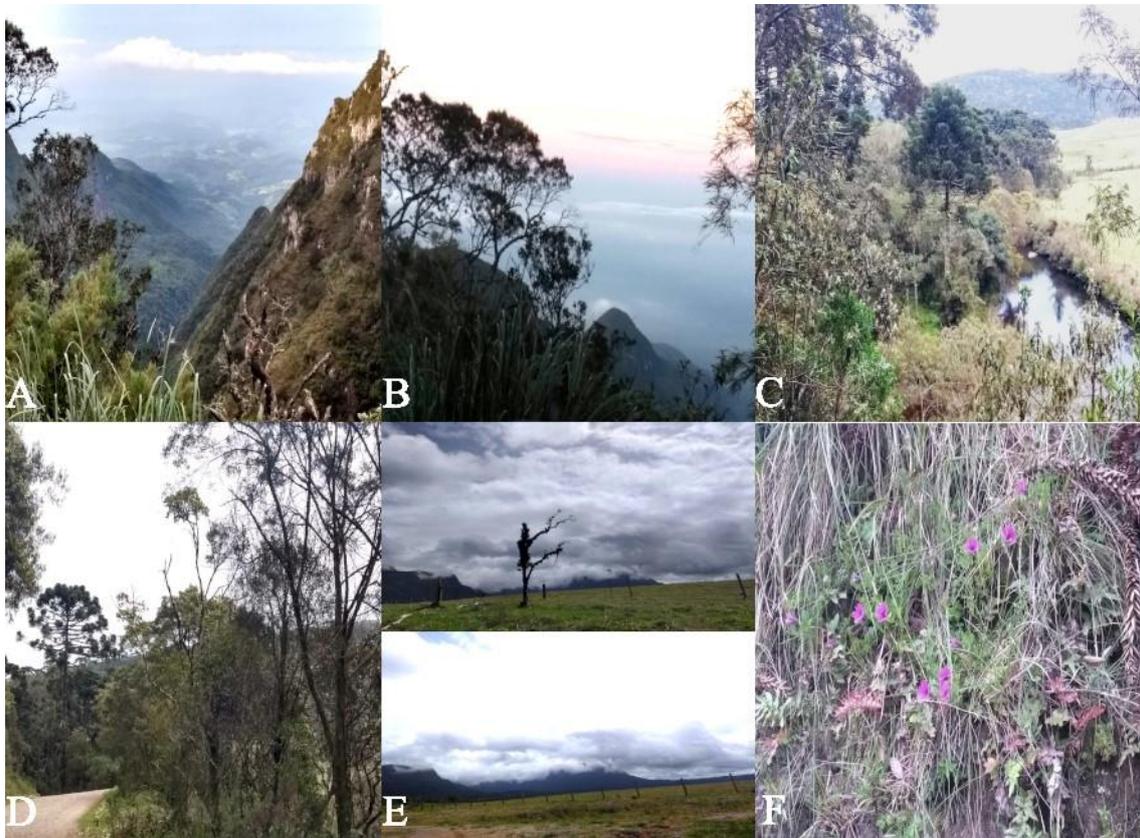


Figura 1. Regiões do Planalto Sul do Brasil. A e B: Campos de Altitude; C e D: Mosaico de campos abertos e floresta com *Araucaria*; E: Pradaria, local de ocorrência de espécies de *Petunia* e F: *Petunia* sp.

Petunia bonjardinensis ocorre em uma área restrita do planalto sul-brasileiro, município de Bom Jardim da Serra, estado de Santa Catarina. Possui corola campanulada de coloração púrpura. O estigma encontra-se posicionado acima das anteras do par mais longo de estames, característica que facilmente diferencia a espécie das demais de ocorrência na mesma área (Stehmann et al. 2009).

Petunia guarapuavensis tem distribuição geográfica nas terras de campo, em elevações de aproximadamente 800 m, nos estados brasileiros de Santa Catarina e Paraná. Possui o tubo da corola curto, com o interior esbranquiçado e coberto por um retículo roxo profundo, estigma esbranquiçado, estames longos apresentando anteras separadas (Ando et al. 2005).

Petunia reitzii ocorre em altitudes de cerca de 1000 m de elevação e está associada à floresta com *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. Esta espécie cresce nas paredes de pequenas falésias ao lado de rios (Ando et al. 1999) e nas encostas e

beiras de estrada da região dos Campos de Cima da Serra, estado de Santa Catarina; possui flores com corola em forma de funil, de coloração vermelha brilhante (Stehmann et al. 2009).

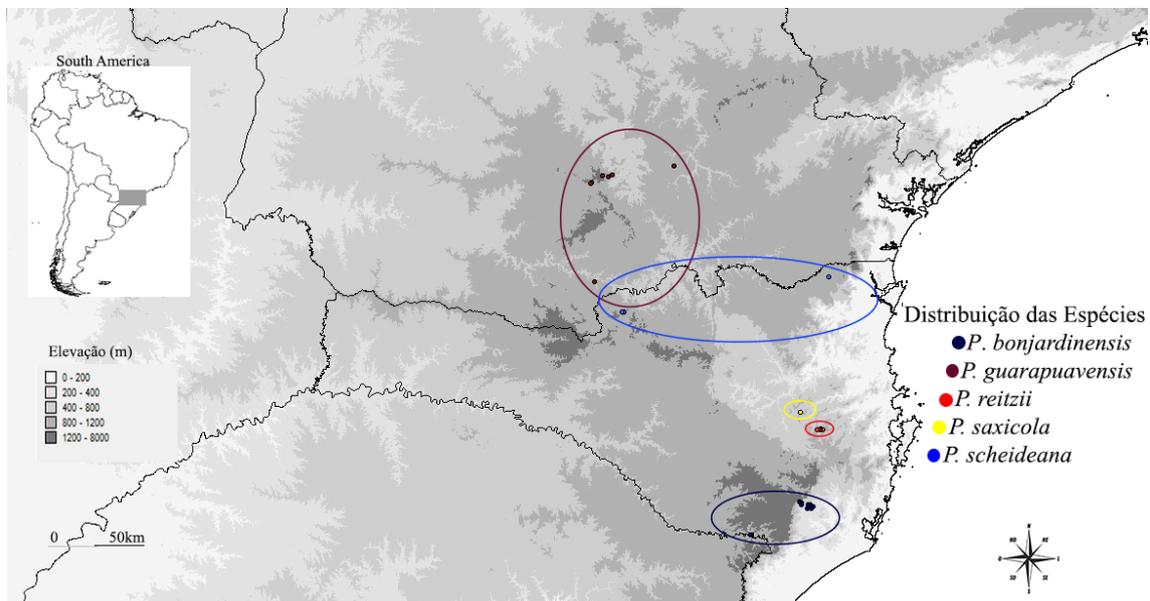


Figura 2. Distribuição geográfica das espécies de *Petunia* de altitude estudadas na presente tese.

Os indivíduos de *P. saxicola* podem ser encontrados crescendo em escarpas úmidas e afloramentos rochosos numa pequena área na fronteira do planalto sul-brasileiro, município de Otacílio Costa, Santa Catarina. Suas flores possuem corola de cor vermelho vibrante, com estigma exsudado acima das anteras do par mais longo de estames (Stehmann et al. 2009).

Petunia scheideana possui estigma maior que 1,5 cm de comprimento, localizado no mesmo nível das anteras do par mais longo de estames, corola funelforme com coloração púrpura pálida a esbranquiçada com reticulações purpúreas contrastantes; o pólen é azulado e as folhas são glabras. Com distribuição geográfica em altas altitudes (800 - 1200 m de elevação), ocorre nos estados brasileiros de Santa Catarina e Paraná, em associação às florestas com *Araucaria*. Sua ocorrência é em zonas entre pradarias e florestas ou em áreas de campo aberto e beiras de estradas. É considerada como sinônimo de *P. guarapuavensis* por alguns autores por compartilharem os mesmos atributos florais e vegetativos (Stehmann et al. 2009).

Estas espécies já foram analisadas do ponto de vista filogenético (Reck-Kortmann et al. 2014) e baseado na diversidade genética de marcadores plastidiais de seus indivíduos (Lorenz-Lemke et al. 2010). Uma vez que ainda não foram abordados

aspectos evolutivos e populacionais a partir de marcadores genéticos nucleares, o presente trabalho foi proposto.

A presente tese foi composta de dois capítulos, contemplando os objetivos descritos a seguir, e dividindo as espécies de acordo com o problema central abordado e a distribuição geográfica. As espécies aqui abordadas são endêmicas, raras e com distribuição restrita aos Campos de Cima da Serra e no primeiro capítulo, foram incluídas as espécies *P. bonjardinensis*, *P. reitzii* e *P. saxicola* para as quais as informações sobre a estrutura populacional, a diversidade genética e o modo de reprodução podem contribuir para a sugestão de programas de conservação das espécies. No segundo capítulo, estudamos as espécies *P. scheideana* e *P. guarapuavensis* para as quais uma abordagem genética da diversidade individual pode contribuir também para elucidar dúvidas taxonômicas. Essas espécies são consideradas sinônimas, e apesar de apresentarem sobreposição das distribuições geográficas, elas apresentam diferenças graduais de elevação e por essa razão ocupam diferentes nichos ecológicos. Além de ocuparem regiões disjuntas das espécies estudadas no primeiro capítulo, localizadas mais ao norte na distribuição geográfica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral da presente tese foi contribuir para o entendimento dos processos especiação no gênero *Petunia*. Para isso, a tese foi dividida em dois capítulos com objetivos específicos próprios e amostragens adequadas a cada diferente abordagem.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a diversidade genética e estrutura populacional das espécies endêmicas dos campos de altitude no sul da América do Sul: *P. bonjardinensis*, *P. reitzii*, *P. saxicola*, *P. scheideana* e *P. guarapuavensis* através da análise de marcadores moleculares do tipo microssatélites;
- b) Identificar o status de conservação e risco de extinção dessas espécies;
- c) Contribuir para o entendimento dos sistemas reprodutivos destas espécies e seu papel na estruturação da diversidade genética;
- d) Testar barreiras ao fluxo gênico entre estas espécies;
- e) Testar modelos evolutivos e demográficos para a origem destas espécies;
- f) Contribuir para a taxonomia do gênero identificando os limites entre as espécies *P. guarapuavensis* e *P. scheideana*.

3. Capítulo 1.

Artigo publicado no periódico *Botanical Journal of the Linnean Society* como artigo original

Genetic diversity in micro-endemic plants from highland grasslands in southern Brazil

ANALU SOUZA, GIOVANNA C. GIUDICELLI, MARCELO C. TEIXEIRA,
CAROLINE TURCHETTO, SANDRO L. BONATTO, LORETA B. FREITAS

Resumo

A estrutura genética populacional resulta da interação entre eventos históricos, condições ecológicas atuais e traços de vida. A estrutura genética e o fluxo gênico entre populações são importantes para a dinâmica das espécies, principalmente para espécies raras e ameaçadas de extinção, que são mais vulneráveis às mudanças e fragmentação da paisagem. Aqui nós avaliamos a diversidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico em *Petunia bonjardinensis*, *P. reitzii* e *P. saxicola*, três espécies raras que são endêmicas de pastagens subtropicais no sul da América do Sul. Analisamos a diversidade e estrutura genética considerando eventos históricos, como efeito fundador e mudanças climáticas, e características biológicas de cada espécie. Também estimamos o estado de conservação dessas três espécies. Coletamos amostras de todos os indivíduos adultos e locais de ocorrência que puderam ser encontrados em mesma estação de floração, genotipando-os com 13 marcadores microssatélites nucleares. Nossos resultados sugerem que a raridade é provavelmente histórica para essas três espécies, uma vez que não encontramos evidências genéticas de gargalos recentes. *Petunia bonjardinensis*, que possui a maior área de ocorrência e tamanhos populacionais, apresentou os maiores índices de diversidade. As outras duas espécies apresentaram menor diversidade genética, sendo geograficamente mais restritas. O fluxo gênico entre essas espécies foi baixo, embora elas compartilhem algum polimorfismo genético ancestral. Migração histórica, efeito fundador e ciclos climáticos do Pleistoceno explicam a diversidade genética que também foi influenciada pela biologia reprodutiva e perda recente de habitat, enquanto a paisagem influenciou a

estrutura populacional. Com base nos critérios da IUCN, as três espécies estão ameaçadas de extinção e provavelmente o principal risco para sua sobrevivência é a atividade antrópica na área de ocorrência. Recomendamos um programa urgente de preservação dessas espécies *in situ* e *ex situ*.

Palavras-chave: *Petunia*; Solanaceae; diversidade; endemismo; raridade; conservação.

4. Capítulo 2.

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico *Botanical Journal of the Linnean Society* como artigo original

Genetic and species diversification in Solanaceae from South American subtropical highland grasslands

ANALU C. SOUZA, CAROLINE TURCHETTO, LORETA B. FREITAS

Resumo

A complexa estrutura e distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de plantas dependem da interação de forças evolutivas como seleção, mutação, deriva genética, além da história de vida, características, sistema de acasalamento, formas de dispersão do pólen e sementes da espécie. Neste estudo, avaliamos a distribuição da variabilidade genética de *Petunia guarapuavensis* e *P. scheideana*, duas espécies endêmicas, raras, com distribuição geográfica restrita aos campos subtropicais de altitude no sul da América do Sul. Baseamos nossas análises em microssatélites nucleares com o objetivo de desvendar ambiguidades taxonômicas que consideram essas entidades como sinônimos apesar de ocuparem diferentes clados na árvore filogenética do gênero. Encontramos variabilidade genética moderada a baixa para cada espécie. Nossos achados suportam que há diferenciação genética entre essas espécies, o que sugere que elas são entidades taxonômicas independentes. As análises do estado de conservação apontaram para uma ameaça de extinção para essas espécies devido à perda de habitat e fragmentação da paisagem.

Palavras-chave: *Petunia*; diversidade genética; estrutura populacional; conservação; especiação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, espécies endêmicas ou de distribuição geográfica restrita são associadas a baixos níveis de diversidade genética e, considerando a fragmentação do habitat, com baixo fluxo gênico. Frequentemente compostas de poucas populações e/ou poucos indivíduos por população, essas espécies são consideradas raras (López-Pujol et al. 2013). Embora não observado muito frequentemente, espécies raras podem apresentar alta diversidade genética, algumas vezes associada a adaptações ecológicas a diferentes ambientes (p/ ex., Turchetto et al. 2016).

Nesta tese, foram estudadas cinco espécies do gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) que podem ser classificadas como raras, quer por serem altamente restritas, quer pelo pequeno número de populações ou indivíduos em cada uma delas. O objetivo geral, aqui, foi contribuir para o entendimento dos processos de especiação no gênero, analisando estas espécies que se distribuem nos campos de altitude no sul do Brasil.

O entendimento dos processos de especiação envolve entender também a estrutura genética das espécies e a distribuição da diversidade dentro e entre populações, e com isso fornecer informações importantes para a conservação, uma vez que a variabilidade genética direciona o potencial de enfrentar os desafios em decorrência das mudanças climáticas e ambientais, especialmente considerando espécies raras e ameaçadas (Nag et al. 2014).

As espécies estudadas nos capítulos 1 e 2 confirmaram o padrão esperado de baixa diversidade genética associada à distribuição geográfica restrita, enquanto que aquelas com mais ampla distribuição apresentaram níveis de diversidade mais elevados. O pequeno número de populações ou indivíduos encontrados para as espécies de *P. reitzii* e *P. saxicola*, no capítulo 1, e *P. scheideana*, no capítulo 2, pode explicar, pelo menos em parte, a variabilidade nuclear observada e a estruturação populacional destas espécies. Ambos, combinados com a fragmentação no ambiente onde estas espécies ocorrem.

O tamanho efetivo populacional baixo tende a favorecer a ação de eventos genéticos estocásticos como a deriva genética, o que pode aumentar a depressão por endogamia nessas populações. Embora as espécies de *Petunia* aqui estudadas sejam consideradas autoincompatíveis (Robertson et al. 2011), a fragmentação dos seus habitats pode levar ao cruzamento entre indivíduos aparentados dentro das populações.

Além disso, mecanismos de reversão da autoincompatibilidade e ocorrência de endocruzamento biparental já foi observado em outras espécies do gênero e relacionado tanto à preservação dos limites de espécies quando estas ocorrem em simpatria (p/ ex., Turchetto et al. 2015) como à adaptação local e formação de banco de sementes intergeracional (p/ex., Rodrigues et al. 2019). O aumento dos níveis de endocruzamento pode ter tanto efeitos positivos como negativos na adaptação e permanência dessas espécies. Se por um lado pode intensificar a adaptação local, por outro pode dificultar a colonização de novos ambientes frente a mudanças climáticas ou degradação ambiental por ação humana (Külkamp et al. 2018).

As espécies com distribuição mais ampla como *P. bonjardinensis*, estudada no capítulo 1, e *P. guarapuavensis*, estudada no capítulo 2, apresentaram índices de diversidade genética maiores que os observados nas demais. Para estas não foram encontrados indicativos de redução do tamanho efetivo populacional. A variabilidade genética encontrada nessas espécies pode, assim, ser explicada, além de outros fatores, por elevado polimorfismo ancestral.

Todas as espécies aqui estudadas apresentam as características de uma síndrome floral ancestral no gênero, a melitofilia (Reck-Kortmann et al. 2014). Embora seus polinizadores específicos não tenham sido formalmente estudados, abelhas pequenas e solitárias, principalmente da subfamília Colletidae e Halictidae, são frequentemente vistas visitando e coletando néctar e pólen das espécies de *Petunia* que ocorrem nos Campos de Cima da Serra (Stehmann et al. 2009; Mouga & Krug, 2010). Muitas dessas abelhas apresentam capacidade limitada de forrageamento, visitando e coletando pólen de flores em populações próximas, o que pode contribuir para a manutenção da diversidade genética dentro das populações e a diferenciação e estruturação populacional nestas espécies (Barbosa et al. 2013; Rivadeneira et al. 2020).

O relacionamento evolutivo das espécies estudadas no capítulo 2 reforça achados prévios que preconizavam que *P. guarapuavensis* e *P. scheideana* são entidades taxonômicas independentes (Lorenz-Lemke et al. 2010; Reck-Kortmann et al. 2014), apesar de sua grande semelhança morfológica e da proximidade de suas distribuições. As baixas taxas de migração entre as duas espécies indicam a existência de barreiras reprodutivas capazes de proteger o limite de espécies entre elas. Além disso, estas espécies ocorrem em diferentes altitudes, o que pode indicar um processo de adaptação a diferentes condições ambientais, que por sua vez dificulta o fluxo gênico entre espécies (Servedio & Noor 2003).

As cinco espécies aqui estudadas tiveram origem recente (Lorenz-Lemke et al. 2010) e evoluíram sob o efeito das mudanças climáticas do Quaternário que, em períodos de clima frio e seco, permitiram a migração do gênero *Petunia* para as terras altas do sul do Brasil (Reck-Kortmann et al. 2014; Barros et al. 2015). Como demonstrado especialmente no capítulo 1, estas espécies de *Petunia* sofreram grande perda de habitat nas últimas décadas em decorrência do uso da terra na região e, como outras espécies dos Campos Sulinos, encontram-se sob a ameaça de extinção, enfrentando os fortes desafios frente ao contexto de mudanças climáticas e a transformação da paisagem (Andrade et al. 2016).

De acordo com os critérios da IUCN, as espécies aqui estão sob o risco de extinção, principalmente pela fragmentação de suas áreas de ocorrências. Medidas de manejo visando à conservação de espécies são de fundamental importância para evitar a perda de variabilidade de espécies com distribuição fragmentada (Ralls et al. 2018). As análises de adequabilidade de nicho para as espécies de *Petunia*, principalmente as realizadas no capítulo 2, mostraram a diminuição de áreas adequadas no futuro para estas espécies em decorrência dos cenários de mudanças climáticas.

Desta forma, em ambos os capítulos, sugerimos que estas espécies sejam preservadas em ações *in situ* e *ex situ* para que estes importantes representantes da diversidade dos Campos Sulinos não sejam perdidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aavik T, Talve T, Thetlof M, Uuemaa E and Oja T (2017) Genetic consequences of landscape change for rare endemic plants – A case study of *Rhinanthus osiliensis*. *Biol Conserv* 210:125-135.
- Ando T, Saito N, Tatsuzawa F, Kakefuda T, Yamakage K, Ohtani E, Koshi-ishi M, Matsusake Y, Kokubun H, Watanabe H, Tsukamoto T, Ueda Y, Hashimoto G, Marchesi E, Asakura K, Hara R and Seki H (1999) Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia*. *Biochem Syst Ecol* 27:623–650.
- Ando T, Soto S and Suárez E (2005) New records of *Petunia* (Solanaceae) for the Argentinean flora. *Darwiniana* 43:64-68.
- Andrade BO, Bonilha CL, Ferreira PMA, Boldrini II and Overbeck GE (2016) Highland grasslands at the southern tip of the Atlantic Forest biome: Management options and conservation challenges. *Oecol Aust* 20:175-199.
- Barbosa AR, Silva-Pereira V and Borba EL (2013) High genetic variability in self-incompatible myophilous *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Braz J Bot* 36:179-187.
- 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.
- Basile M (2022) Rare species disproportionately contribute to functional diversity in managed forests. *Sci Rep* 5897:1-9.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177:19-27.
- Cole CT (2003) Genetic variation in rare and common plants. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:213-237.
- Collevatti RG, Grattapaglia D and Hay JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol Ecol* 10:349-356.
- Ellstrand NC and Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Ann Rev Ecol Syst* 24:217-242.
- Engelhardt KAM, Lloyd MW and Neel MC (2014) Effects of genetic diversity on conservation and restoration potential at individual, population, and regional scales. *Biol Conserv* 179:6-16.
- Farwig N, Braun C and Bohning-Gaese K (2008) Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). *Conserv Genet* 9:317-326.
- Fischer M and Matthies D (1997) Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *Am J Bot* 84:1685-1692.
- Ford BA, McQueen DAR, Starr JR and Naczi RFC (1998) The impact of species-specific traits and phylogenetic relatedness on allozyme diversity in *Carex* sect. *Phyllostachys* (Cyperaceae). *Plant Syst Evol* 212:13-29.
- Frankham R, Bradshaw CJA and Brook BW (2014). Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol Conserv* 170:53-63.
- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto S and Freitas LB (2012) Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* in the Neotropical Pampas grassland. *Bot J Linn Soc* 171:140-153.
- Gitzendanner MA and Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot* 87:783-792.

- Hamrick JL and Godt MJW (1996) Effects of the history traits on genetic diversity in plants. *Phil Trans R Soc London B* 351:1291-1298.
- Harper JL (1977) *Population biology of plants*. London: Academic Press, 892pp.
- Külkamp J, Heiden G and Iganci JRV (2018) Endemic plants from the southern Brazilian highland grasslands. *Rodriguésia* 69:429-440.
- Leimu R, Vergeer P, Angeloni F and Ouborg J (2010) Habitat fragmentation, climate change, and inbreeding in plants. *Ann NY Acad Sci* 1195:84-98.
- Leitão RP, Zuanon J, Villéger S, Williams SE, Baraloto C, Fortunel C, Mendonça FP and Mouillot D (2016) Rare species contribute disproportionately to the functional structure of species assemblages. *Proc R Soc B* 283:1-9.
- López-Pujol J, Martinell MC, Massó S, Blanché C and Sáez L (2013) The ‘paradigm of extremes’: Extremely low genetic diversity in an extremely narrow endemic species, *Coristospermum huteri* (Umbelliferae). *Plant Syst Evol* 299:439-446.
- 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.
- Loveless MD and Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann Rev Ecol Syst* 15:65-95.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE and Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95:255-273.
- Lutz E, Schneller J and Holderegger R (2000) Understanding population history for conservation purposes: Population genetics of *Saxifraga aizoides* (Saxifragaceae) in the lowlands and lower mountains north of the Alps. *Am J Bot* 87:583-590.
- Matolweni LO, Balkwill K and MacLellan T (2000) Genetic diversity and gene flow in the morphologically variable, rare endemics *Begonia dregei* and *Begonia homonyma* (Begoniaceae). *Am J Bot* 87:431-439.
- Mouga DMDS and Krug C (2010) Comunidade de abelhas nativas (Apidae) em Floresta Ombrófila Densa Montana em Santa Catarina. *Zoology* 27:71-79.
- Nag A, Ahuja PS and Sharma RK (2014) Genetic diversity of high-elevation populations of an endangered medicinal plant. *AOB Plants* 7:1-15.
- Overbeck GE, Vélez-Martin 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, Rosenfield MF, Sampaio AB, Silva FHB, Silveira FAO, Sosinski EE, Staude IR, Temperton VM, Turchetto C, Veldman JW, Viana PL, Zappi DC and Müller SC (2022) Placing Brazil's grasslands and savannas on the map of science and conservation. *Persp Plant Ecol Evol Syst* 56:125687.
- Pillar VP, Muller SC, Castilhos ZMS and Jacques AVA (2009) *Campos Sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 403 pp.
- Polechová J (2022) The costs and benefits of dispersal in small populations. *Phil Trans R Soc B* 377:1-5.
- Primack RB and Rodrigues E (2001) *Biologia da Conservação*. Editora Vida, Londrina. 328 pp.
- Rahimmalek M, Tabatabaei BES, Arzani A and Etemadi N (2009) Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochem Syst Ecol* 37:354-361.

- Ralls K, Ballou JD, Dudash MR, Eldridge MDB, Fenster CB, Lacy RC, Sunnucks P and Frankham R (2018) Call for a paradigm shift in the genetic management of fragmented populations. *Conserv Lett* 11:1-6.
- 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.
- Riva F and Mammola S (2021) Rarity facets of biodiversity: Integrating zeta diversity and dark diversity to understand the nature of commonness and rarity. *Ecol Evol* 11:13912-13919.
- Rivadeneira G, Ramsay PM and Montúfar R (2020) Fire regimes and pollinator behaviour explain the genetic structure of *Puya hamata* (Bromeliaceae) rosette plants. *Alp Bot* 130:13-23.
- Robertson K, Goldberg EE and Igić B (2011) Comparative evidence for the correlated evolution of polyploidy and self-compatibility in Solanaceae. *Evolution* 65:139-155.
- Rodrigues DM, Caballero-Villalobos L, Turchetto C, 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 D, Turchetto C, Lima JS, Freitas LB (2019) Diverse yet endangered: pollen dispersal and mating system revealed inbreeding in a narrow endemic plant. *Plant Ecol Divers* 12:169-180.
- Safford HD (1999) Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *J Biogeogr* 26:693-712.
- 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.
- Servedio MR and Noor MAF (2003) The role of reinforcement in speciation: Theory and data. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:339-364.
- 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.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc Natl Acad Sci* 101:1561-1564.
- Stehmann JR, Lorenz Lemke AP, Freitas LB and Semir J (2009) The Genus *Petunia*. Springer New York, New York, NY, pp 1 28
- Stockwell CA, Hendry AP and Kinnison MT (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *TRENDS Ecol Evol* 18:94-101.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, Hashimoto G, Marchesi E and Kao T (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *A Phytotaxonomica et Geobotanica* 49: 115-133.
- Turchetto C, Lima JS, Rodrigues DM, Bonatto SL and Freitas LB (2015) Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). *Ann Bot* 115:939-948.
- 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.
- Vazquez DP and Gittleman JL (1998) Biodiversity conservation: Does phylogeny matter? *Curr Biol* 8:R379-R381.

- Venail J, Dell'Olivo A and Kuhlemeier C (2010) Speciation genes in the genus *Petunia*. *Phil Trans R Soc B: Biol Sci* 365:461-468.
- 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.
- Williams SE, Williams YM, VanDerWal J, Isaac JL, Shoo LP and Johnson CN (2009) Ecological specialization and population size in a biodiversity hotspot: How rare species avoid extinction. *PNAS* 106:19737-19741.
- Young AG and Clarke GM (2000) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Young AG, Boyle T and Brown AHD (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 10:413-418.