

ESTUDIOS FILOGEOGRÁFICOS EN *Petunia* Juss. (SOLANACEAE)

Gustavo Adolfo Silva Arias

Estudiante M Sc. Ciencias Biológicas - línea sistemática

Universidad Nacional de Colombia

Becario

Beca de perfeccionamiento – Red Latinoamericana de Botánica

Informe final de actividades en el Laboratorio de Evolución Molecular (LEM) –
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil)

Directora: Loreta Brandão de Freitas Ph D.

Las actividades realizadas durante la beca de perfeccionamiento consistieron en revisión bibliográfica de artículos en genética de poblaciones y filogeografía, el desarrollo de actividades de laboratorio para la obtención de información genética para estudios poblacionales, procesamiento de esta información con ayuda de diferentes programas y el análisis dentro del marco de la filogeografía. Adicionalmente participé semanalmente en las reuniones de LEM en las cuales se realizan discusiones de artículos científicos en diferentes temas de genética y asistí a seminarios realizados en el programa de posgrado de genética y biología molecular.

Los resultados obtenidos muestran la utilidad y el campo de aplicación de los análisis filogeográficos. Además las actividades prácticas realizadas se constituyen en un aporte importante para el desarrollo del trabajo de investigación que estoy desarrollando como tesis de maestría. La revisión bibliográfica realizada durante el periodo de la beca y posteriores revisiones de estudios de filogeografía de organismos neotropicales se sintetizarán en una conferencia que realizará la profesora Loreta Freitas para la Cátedra de sede José Celestino Mutis: “Todo lo que Usted quiere saber de genética y nunca se atrevió a preguntar” que se realizará durante el segundo semestre de 2010 en la Universidad Nacional de Colombia. Las memorias de esta cátedra se realizan en un volumen suplementario de la revista Acta Biológica Colombiana, en la cual someteremos un artículo de revisión donde presentaremos de forma ampliada el tema desarrollado en la conferencia.

A continuación muestro en detalle las actividades y principales resultados de las actividades del proyecto de investigación realizado durante el periodo de la beca.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del área de la genética ha permitido la aplicación de sus principios y técnicas en muchas disciplinas enmarcadas dentro de las ciencias de la vida y del medio ambiente, dentro de estas, cada vez con mayor eficiencia, ha brindado información para reevaluar o soportar hipótesis de los principios y procesos involucrados en la evolución de las plantas. El uso de diversas herramientas de la biología molecular cada día tiene mayores aplicaciones y tiene mayor aceptación dentro de la comunidad científica, es por esto que

aprender sus bases conceptuales y aprovechar al máximo su campo de aplicación se ha vuelto una tarea fundamental en la formación de biólogos dedicados a diferentes áreas como la morfología comparada, el desarrollo, la ecología, la sistemática, la biogeografía, la paleontología, la fisiología o cualquier otra aproximación integradora que pretenda explicar aspectos estructurales o funcionales de los seres vivos. El estudio de la evolución de los seres vivos exige la síntesis y análisis de información derivada de las disciplinas mencionadas y actualmente varias de sus bases más importantes están sobre teoría desarrolladas en el marco de la genética.

Cada día se realizan más contribuciones que utilizan marcadores genéticos como información primaria para establecer hipótesis filogenéticas y los posibles factores históricos asociados, por esta razón la realización de un análisis crítico de la información obtenida con herramientas genéticas es cada vez más importante en el avance de las ciencias biológicas. La aplicación de técnicas y análisis moleculares aún está en construcción y por lo tanto siguen preguntas abiertas, desarrollo por realizar y aunque cada vez en menor grado, escepticismo o resistencia para su utilización. Dentro de esta tarea es muy importante el intercambio de saberes entre diferentes laboratorios y diferentes países, tanto para la formación de talento humano, como para el desarrollo de proyectos a escalas amplias que permitan entender los complejos fenómenos biológicos involucrados en los sistemas biológicos presentes en el Neotrópico.

El avance de los análisis en biología molecular y sistemática filogenética hace posible contrastar información proveniente de la inferencia de relaciones filogenéticas de entidades biológicas con estudios de la historia geológica de las regiones que ocupan para evaluar hipótesis de procesos históricos que expliquen las distribuciones actuales de estos organismos. Recientemente el surgimiento de la filogeografía ha dado lugar a numerosas aproximaciones que apoyan dichos análisis, aun más aquellas que incorporan los métodos estadísticos de síntesis provenientes de la genética de poblaciones tradicional en los métodos basados en árboles de genes (Hey & Machado, 2003). La disciplina de la filogeografía ha brindado nuevas vías de abordar la evolución de los organismos y a la vez la interacción de herramientas desarrolladas para diferentes fines en el entendimiento de procesos que se dan desde la escala poblacional hasta especies cercanamente relacionadas. Entre las herramientas involucradas se encuentran los análisis de diversidad genética derivados de la genética de poblaciones clásica, análisis filogenéticos, la teoría de la coalescencia y la biogeografía, con el fin de entender los procesos históricos que están implicados en la estructuración poblacional, la formación de nuevas especies y la reconstrucción del contexto geográfico de la diversificación. Los análisis filogeográficos han permitido abordar principalmente preguntas acerca de la localización y expansión de poblaciones, especies y biotas en el marco de biogeografía del Neógeno y del cuaternario, mediante la inferencia de los efectos de cambios en el clima o el paisaje en los procesos de migración y especiación (Riddle *et al.*, 2008), sobre la base de topología de linajes intraespecíficos, estimaciones acertadas de tiempos de divergencia entre estos y la deducción de las huellas de los procesos demográficos recientes sobre la diversidad genética de las poblaciones (Knowles, 2004).

La comparación de los patrones filogeográficos de taxa codistribuidos permite identificar arreglos de especies que presentan historias de vicarianza comunes, esto se ha convertido en una herramienta útil para la orientación de estrategias de conservación áreas específicas, mediante el propósito de mantener el potencial evolutivo de las especies. La medida de diversidad filogenética puede predecir los patrones generales de diversidad reflejando las relaciones históricas entre las áreas por medio del mantenimiento de poblaciones viables de especies en su ambiente natural o ecosistema (Moritz & Faith, 1998; Barker, 2002). Es posible la identificación de áreas potenciales, con especies clave, para ser nombradas como zonas de manejo genético o de reserva genética.

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo prácticas de obtención y análisis de información primaria y secundaria, por medio de diversas herramientas, utilizando para ello bases de datos, actividades de laboratorio y programas de cómputo diseñados para el análisis genético, con el fin de obtener el entrenamiento suficiente para la realización de proyectos de investigación en sistemática vegetal por medio de la utilización de técnicas modernas de biología molecular. Con el fin de lograr esto se realizó una unión dentro de las actividades de trabajo en los proyectos de evolución molecular con el género *Petunia* que se están realizando en el Laboratorio de Evolución Molecular de la Universidad Federal de Rio Grande del Sul (LEM, UFRGS), donde se lleva a cabo la aplicación de técnicas modernas en genética y tratamientos estadísticos para responder preguntas acerca de la evolución de las plantas, desde la escala poblacional a la filogenética.

El presente documento muestra las labores de aprendizaje de técnicas de laboratorio y análisis de datos de biología molecular alrededor del área de filogeografía realizadas durante tres meses en LEM como parte de realización de estudios en maestría en Ciencias Biológicas en la línea de Sistemática, con el fin de realizar la aplicación de las técnicas desarrolladas en este laboratorio en el desarrollo de la tesis en Colombia.

ACTIVIDADES REALIZADAS

El plan de trabajo que se llevó a cabo durante el periodo tres meses comprendió un componente constante de revisión bibliográfica enfocada en el aprendizaje de las técnicas utilizadas para la obtención de datos en genética de poblaciones y sistemática molecular, análisis de datos y teorías fundamentales en estas áreas. De manera alterna se revisaron otros artículos para las reuniones semanales de LEM, en las que se discuten temas de evolución molecular relacionados con las actividades de investigación del grupo y se asistió a algunas conferencias organizadas por el departamento de genética.

Entre las actividades de aprendizaje de las técnicas de laboratorio, durante el primer mes se realizó el acompañamiento a diferentes investigadores del laboratorio con el fin de saber las normas básicas del laboratorio, la forma de utilización del material disponible y la observación, paso a paso, de los procedimientos para la obtención de información de

marcadores moleculares. Luego de esto, con la asignación de unas muestras específicas, se realizaron los procedimientos de laboratorio iniciales que son utilizados en la obtención de información genética de plantas.

El aprendizaje del análisis de datos comenzó por medio de la lectura de las tesis y trabajos de los investigadores de LEM en el área de filogeografía, a partir de esto y con datos derivados de las investigaciones de los estudiantes del laboratorio se empezó a practicar el análisis de información. Estas prácticas abarcaron la interpretación y sistematización de patrones de bandas y lectura de cromatogramas obtenidos en las actividades de laboratorio, alineamiento de secuencias, genotipificación y creación de archivos de entrada para el análisis de información con los diferentes programas de cómputo, análisis básicos de diversidad genética, estructura poblacional, inferencia de relaciones filogenéticas e inferencia de procesos demográficos pasados. A continuación se muestra con más detalle los procedimientos y los resultados de las actividades realizadas.

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Extracción de ADN de hojas conservadas en sílica gel. Se tomaron 10 muestras de tejido foliar previamente maceradas en N₂ líquido y fueron procesadas con el procedimiento de Roy *et al.* (1992) optimizado para especies de *Petunia* en LEM. Una muestra de la solución obtenida fue analizada en electroforesis en gel de agarosa 1% para realizar una verificación cualitativa de la presencia y calidad del ADN obtenido (Figura 1a), adicionalmente se realizó un análisis cuantitativo de concentración y calidad del ADN presente en la solución

obtenida con el proceso de extracción. Este análisis se realizó por medio espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Tabla 1). Estos análisis muestran que mediante este procedimiento se logró obtener una concentración alta de ADN, sin embargo en varios casos se encontró que está muy degradado y en todos los casos mostró alto grado de contaminación con proteínas y fenol entre otras posibles sustancias, ya que el ratio de absorbancia 260/280 fue muy bajo (Tabla 1). Bajo estas condiciones las reacciones de PCR no tuvieron éxito en la amplificación de secuencias, por lo que se realizó de nuevo la extracción para algunas muestras con el Kit de extracción NucleoSpin Plant II (Figura 1b), el análisis de espectrofotometría mostró que se obtuvo una concentración apreciablemente menor de ADN pero con mucha pureza (Tabla 1).

Amplificación de marcadores específicos mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El producto obtenido de la extracción fue utilizado como ADN molde para realizar prácticas de amplificación de los espaciadores plásticos para taxa que aún no se tiene la estandarización del protocolo para este procedimiento (ver sección Prácticas adicionales). La práctica se enfocó en la optimización de condiciones para la amplificación de espaciadores plásticos, las cuales varían dependiendo del tamaño del marcador (pb) y la especificidad del iniciador disponible, esta es una fase crítica para la obtención de datos de calidad por lo cual necesita de numerosas repeticiones para la obtención de productos de calidad para su posterior interpretación y análisis (Matoli & Passos-Bueno, 2001). Las condiciones utilizadas en las reacciones de PCR fueron:

Reactivo	[] final	Programa
Tampón de extracción		94° - 5'
Tris-HCl pH 8,4	20 mM	
KCl	50 mM	
d NTP	0,2 mM	94° - 45''
Iniciador Directo	0,16 mM	48° - 1'
Iniciador Reverso	0,16 mM	72° - 1'
MgCl ₂	2 mM	
Taq Polimerasa	1U	72° - 5'

} 35x

Volumen final = 25µl

Dado que se utilizaron iniciadores que no fueron diseñados específicamente para las plantas utilizadas en este ensayo, inicialmente se utilizaron estas condiciones inespecíficas (*e.g.* temperatura de hibridación baja) para las PCR dado que en ensayos previos no se obtuvieron productos con condiciones más restrictivas.

La importancia del tamaño de la región que se pretende amplificar se muestra en el resultado del ensayo de amplificación del espaciador *trnG-trnS* (Figura 2a). La electroforesis de los productos obtenidos muestra que además de la ausencia de productos amplificados, tampoco aparecen las bandas tenues del control negativo (pozo 5) lo que

indica que se consumieron los reactivos (dNTP e iniciadores). Esto puede explicarse con el hecho que el espaciador es muy grande para poder amplificarse con solo dos iniciadores.

Teniendo en cuenta las medidas de concentración de ADN obtenidas en el análisis espectrofotométrico se realizaron varias diluciones a fin de evaluar la eficiencia de las PCR a concentraciones homogéneas conocidas para todas las muestras (Figura 2). Las concentraciones utilizadas fueron 100, 50, 20, 10, 5 y 3,5 ng/μl. Cuando se utilizó el ADN obtenido con el procedimiento de Roy *et al.* (1992) se comprobó que a menores concentraciones se obtuvieron más productos amplificados, como se puede notar en la Figura 2b, de izquierda a derecha se encuentran los resultados de los productos de la amplificación para todas las concentraciones con una muestra y se puede notar que solo con las muestras de los pozos 4, 5 y 6 (concentraciones 10, 5 y 3,5 ng/μl) se consiguió un amplificado. Las múltiples bandas encontradas muestran el efecto de la baja temperatura de hibridación, lo cual muestra que los iniciadores hibridaron en diferentes partes del ADN patrón, amplificando numerosos fragmentos. La comparación del producto de PCR obtenido con estas muestras con un control positivo (pozo 7) indica que en todas las muestras entre el conjunto de regiones amplificadas, está la región de interés.

Los resultados obtenidos muestran la importancia de tener una calidad y concentración óptima de ADN molde, al igual que las condiciones para las reacciones, para poder obtener los productos de PCR.

Con el fin de obtener una idea general de los procedimientos de purificación de productos PCR y obtención de marcadores por patrones de digestión de secuencias polimórficas amplificadas (CAPS, por sus siglas en inglés), se realizó el acompañamiento en los procedimientos que algunos estudiantes de LEM están realizando para sus respectivas investigaciones.

ANÁLISIS DE DATOS

Lectura cromatogramas. Con el procedimiento de secuenciación de los productos purificados de PCR se obtienen una serie de archivos .scf los cuales son cromatogramas obtenidos de la secuenciación automática de ADN que se lleva a cabo por medio de la separación de ADN basada en tamaño (electroforesis capilar), detección y registro de la coloración fluorescente de los nucleótidos marcados. Estos cromatogramas son analizados en el programa informático Chromas 2, con el cual se realiza la verificación y depuración de las secuencias por examen visual de los picos de absorción (Figura 3) que luego son exportadas a otro programa para su posterior alineamiento.

Se realizó la visualización de 500 cromatogramas correspondientes a 250 muestras enviadas a secuenciar, para cada muestra se obtuvieron dos secuencias correspondientes al iniciador directo y reverso. Las secuencias depuradas fueron exportadas al programa GeneDoc (Nicholas *et al.* 1997).

Alineamiento de secuencias. El análisis de las relaciones entre organismos está basado en hipótesis de homología las cuales infieren que los caracteres compartidos entre entidades biológicas se da por descendencia de un ancestro en común. Cuando se realizan análisis filogenéticos a partir de secuencias de ADN se realiza el alineamiento de las diferentes secuencias lo cual permite ver los cambios que han ocurrido en cada posición de la secuencia, entre los diferentes organismos que componen la muestra de estudio y representan las entidades biológicas en los análisis. El proceso de alineamiento puede realizarse de forma manual o mediante algoritmos de alineamiento múltiple o pareado desarrollados (p. ej. Clustal; Larkin *et al.* 2007). Para el caso de estudios con poblaciones o especies muy relacionadas, las secuencias analizadas presentan un grado de divergencia muy pequeño, por lo cual es posible hacer alineamientos manuales.

Las 250 muestras analizadas fueron exportadas al programa Genedoc y fueron alineadas de forma manual, de forma paralela fueron exportadas al programa Bioedit (Hall, 1999) y alineadas automáticamente por medio de la aplicación Clustal W, ambas metodologías arrojaron idéntico resultado a excepción de las regiones de mononucleotidos repetidos las cuales presenta un polimorfismo homoplásico o que puede ser un artefacto de las reacciones de PCR, por lo cual no se tuvo en cuenta para los análisis realizados (Figura 4). El resultado del alineamiento dio lugar a una matriz de 1240 pares de bases (pb) de las cuales 1203 fueron constantes, 37 mostraron algún polimorfismo (28 parsimonia informativos) y 1 indel de 5 pb.

Caracterización de diversidad genética. El alineamiento obtenido fue exportado al programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) en el cual se calcularon los parámetros diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (H_d) y número de sitios segregantes (S) (Tabla 2).

Análisis demográfico. Los eventos demográficos como cambios súbitos del tamaño poblacional son procesos comunes en el cuaternario como producto de las fluctuaciones climáticas, para estudiar la posibilidad de eventos demográficos en el pasado reciente en las poblaciones analizadas, se realizaron pruebas que detectan huellas de estos posibles eventos en la diversidad genética observada. Para esto se realizaron pruebas de neutralidad de Tajima (D ; Tajima, 1989) y Fu (F_s ; Fu, 1997) y un análisis de Pairwise Mismatch Distribution (Rogers & Harpending, 1992; Ramos-Onsins & Rozas, 2002; Ray *et al.* 2003) por medio del programa Arlequin (Tabla 2, Figura 5). Los eventos demográficos (expansión poblacional, cuello de botella, efecto fundador) dan lugar a cambios en la diversidad genética de las poblaciones. Un crecimiento poblacional súbito produce diagramas de Pairwise Mismatch Distribution unimodales con el pico de frecuencias en el lado de pocas diferencias, mientras que una población con tamaño estable o que está declinando produce diagramas multimodales.

Los resultados muestran señales de expansión poblacional para el Grupo 2, esto se detecta porque se encuentran con mayor frecuencia pares de individuos con diferencias de una o dos mutaciones y pocos o ningún par de individuos con más de cuatro diferencias. En

contraste los Grupos 1 y 3 muestran mayor cantidad de diferencias entre pares de individuos y por lo menos dos picos de frecuencias (diagrama multimodal), lo que muestra mayor estabilidad en el tamaño de las poblaciones lo que permite que se acumulen mutaciones a lo largo del tiempo. Valores negativos en la prueba D son indicativos de reducción poblacional, sin embargo es posible obtener valores de este tipo bajo eventos de expansión poblacional en poblaciones con tamaños grandes (Ray *et al.* 2003).

Estructura poblacional. Encontrar evidencia de estructuración poblacional es importante porque, junto al conocimiento de la distribución de las poblaciones muestreadas y la matriz geográfica donde se encuentran, ayuda a entender cómo las condiciones actuales y pasadas del entorno físico (clima y geología) explican procesos de diversificación. Además esta información presenta una importante aplicación en la generación de medidas de conservación.

La distancia geográfica es un factor que determina la diversidad genética en los organismos. Se considera que las diferencias genéticas están inversamente relacionadas con el flujo génico, bajo este escenario se tiene una estructura filogeográfica de la diversidad genética, es decir, los individuos o poblaciones espacialmente más próximos se están más emparentados entre sí, que aquellos que se encuentran más distantes entre sí. Variaciones a este patrón pueden explicarse por mecanismos de dispersión a larga distancia y por barreras históricas o ecológicas entre poblaciones próximas que actualmente pueden no ser evidentes.

Con el fin de identificar posibles patrones de estructura filogeográfica entre las poblaciones muestreadas se realizó un análisis de correlación entre las distancias genéticas y geográficas por medio de la prueba de Mantel (Mantel, 1967) implementado en el programa Alleles In Space (Miller, 2005). Este análisis muestra una correlación positiva lo que sugiere aislamiento por distancia y estructuración al interior de la especie. Para inferir posibles barreras genética que expliquen el aislamiento entre grupos de poblaciones se utilizó el programa SAMOVA (Dupanloup, 2002), este programa maximiza la varianza entre grupos y minimiza la varianza dentro de estos. El resultado aquí propuesto, suponiendo una estructura definida por tres grupos de poblaciones, da lugar a que cerca del 60% de la varianza de la diversidad genética de toda la muestra se explica por la diferencia entre los tres grupos de poblaciones propuestos (Tabla 3).

La estructura filogeográfica de los datos también se infiere a través del establecimiento de entre las relaciones entre los haplotipos que componen la muestra y su distribución geográfica. Para esto se realizó una red de haplotipos mediante el algoritmo Median Joining Network implementado en el programa Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999). El análisis incluyó 1240 posiciones y 250 secuencias. En este análisis se tomaron todos los caracteres con igual peso y $\epsilon=0$. En la red de obtenida se agruparon los haplotipos por colores, con respecto a los resultados obtenidos con SAMOVA y teniendo en cuenta variables geográficas. Además esta red muestra las diferencias entre los haplotipos como número de mutaciones y las frecuencias de cada haplotipo en toda la muestra.

Se recuperó una red de 37 haplotipos que se muestra alta congruencia con los grupos inferidos por SAMOVA y la distribución geográfica de las poblaciones muestreadas (Figura 7). Adicionalmente la red resultante es congruente con el resultado del análisis Pairwise Mismatch Distribution, mostrando por ejemplo para el grupo 2 (azul), evidencia de expansión poblacional reciente, relacionada con un patrón de relaciones entre los haplotipos “tipo estrella”, en la que hay un haplotipo central muy frecuente y muchos haplotipos poco frecuentes derivados de este y separados por pocos pasos mutacionales (para este caso una mutación en todas las conexiones).

Análisis de marcadores nucleares por genotipificación por patrones de bandas. En grupos de reciente divergencia como *Petunia* la información contenida en las secuencias de espaciadores del cloroplasto no es suficiente para el estudio de diferencias genéticas entre especies muy cercanas, esto porque no presentan el polimorfismo suficiente y además por el mecanismo uniparental de herencia del genoma plastídico. Con el fin de obtener una mejor resolución en el establecimiento de las relaciones genéticas y procesos evolutivos entre especies hermanas de *Petunia*, se realizó el análisis de diversidad genética por medio de CAPS, con el cual se obtiene un patrón alélico de varios loci dentro del genoma de cada individuo (genotipificación). Esta información fue sistematizada en una hoja de Excel y por medio del programa Convert fue transformado en los archivos de entrada para diferentes programas para el análisis de diversidad y estructura genética intra e interespecífica

tomando como objeto de estudio 5 loci de 40 individuos, correspondientes a 13 poblaciones de dos especies muy cercanas de *Petunia*.

Con el fin de caracterizar la diversidad genética del marcador genético para cada locus y cada especie se calcularon las frecuencias alélicas, el número de alelos, la riqueza alélica y la diversidad génica, por medio del programa Fstat (Tabla 3). El nivel de diferenciación genética entre las especies se midió mediante análisis de estructura, para esto se utilizó el índice de diferenciación F_{st} y un AMOVA con 1000 permutaciones y nivel de significancia del 0.05, implementados en el programa Arlequin (Tabla 4). Se utilizó una aproximación bayesiana implementada en el programa Structure 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) para establecer grupos genéticamente homogéneos compuestos por las poblaciones muestreadas de las dos especies. Este análisis se realizó con $K = 1-5$ (de uno a cinco grupos), 10 corridas para cada K , con 1.000.000 de repeticiones de MCMC, burning de 50.000, utilizando un modelo de mezcla, y la posibilidad que las frecuencias alélicas estén correlacionadas entre locus diferentes.

Los análisis muestran en general una diversidad genética mayor para *Petunia* sp1 que para *Petunia* sp2 (Tabla 3). Para 3 loci (Hf1, EPF1 y Myb75) se encontró que *Petunia* sp1 fijó un alelo que no se encuentra en *Petunia* sp2 (a excepción del alelo 01 del locus EPF1, el cual aparece en un individuo heterocigoto de *Petunia* sp2) lo cual indica que existe una diferenciación genética marcada entre las dos especies. Adicionalmente los análisis de estructura también muestran la presencia de una diferenciación genética entre las especies

(mayor porcentaje de variación genética entre las especies que dentro de ellas; Tabla 4). A nivel general estos resultados muestran que las poblaciones muestreadas presentan una identidad definida con respecto a la especie que correspondiente, sin embargo también se encontró un grado de similitud genética entre algunas poblaciones que corresponden a especies diferentes.

El análisis de los valores promedio, máximo y mínimo de LnP (D) (Pritchard *et al.*, 2000; Figura 8a) y de estadístico ΔK propuesto por Evanno *et al.* (2005; Figura 8b) permiten concluir que K=2 (dos grupos con homogeneidad genética) es la agrupación que mejor explica los datos teniendo en cuenta que presenta la mayor probabilidad posterior (Figura 8c). Este resultado es congruente con el resultado de diversidad genética entre las dos especies arriba descrito. La característica de los alelos compartidos entre las dos especies se puede explicar por una retención de un polimorfismo ancestral que aún permanece en ambas especies, dado que su proceso de divergencia es relativamente reciente. Sin embargo este patrón también puede explicarse por un proceso de introgresión, lo cual es congruente con los reportes de compatibilidad interespecífica en *Petunia* (Kulcheski *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El género *Petunia* y en general varios taxa presentes en el sureste de Brasil se constituyen en modelos biológicos muy interesantes para la aplicación de métodos de análisis filogeográfico y para evaluar hipótesis acerca de los efectos de las oscilaciones climáticas

del cuaternario y procesos de diversificación reciente en la diversidad genética dentro y entre especies relacionadas.

La filogeografía es un campo muy reciente que reúne numerosas herramientas de análisis genético y espacial, estas características hacen que se esté renovando constantemente a partir de su aplicación en diferentes modelos biológicos, del desarrollo de métodos analíticos, de revisiones teóricas y de la creciente capacidad de adquirir y procesar información genética de los organismos. Esta dinámica acelerada obliga a quienes se interesan en el área a revisar con mucha frecuencia los adelantos y aplicaciones que día a día se publican.

Dado que la filogeografía utiliza herramientas dentro del marco filogenético y espacial en la escala intraespecífica, la información que genera está muy relacionada con la biogeografía reciente (Neógeno, Cuaternario), por lo cual es posible generar y evaluar hipótesis en este campo. Por esta razón una de las prioridades en el campo de la filogeografía debe enfocarse en el estudio de taxa codistribuidos, obtener patrones generalizados y de esta manera poder realizar aportes biogeográficos robustos.

AGRADECIMIENTOS

A la Red Latinoamericana de Botánica por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo y especialmente a Dra. Paulina Chacón por toda su colaboración. A la RLB-Andrew W. Mellon Foundation Grant 2010-2011 (RLB2010-P05) por la financiación de esta beca.

A la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, al Laboratorio de Evolución Molecular y a la profesora Dra. Loreta B. Freitas por recibirme y brindarme todas las facilidades necesarias para el óptimo desarrollo de esta beca.

Este trabajo fue realizado con base en la información obtenida en los trabajos de tesis de Geraldo Mäder, Aline Mitcheli Ramos y Ana Lúcia Segatto a quienes agradezco su confianza y orientación. Agradezco a todo el equipo de investigadores y estudiantes de LEM por su colaboración en el desarrollo de este trabajo, especialmente agradezco toda la enseñanza recibida por parte de Dr. Jéferson N. Fregonezi, Dr. Nelson Fagundes, Geraldo Mäder, Aline Mitcheli Ramos, Ana Lúcia Segatto y Dra. Loreta B. Freitas. La sección de trabajo de laboratorio contó con constante colaboración de Geraldo Mäder, Jéferson N. Fregonezi, Verônica Thode y Priscilla M. Zamberlan.

Quiero reconocer el importante aporte de quienes se preocuparon por mi bienestar general durante el periodo de estadía en Porto Alegre, Lina María Caballero Villalobos, Dr. Rodrigo Singer, Dra. Rosana Farias Singer, Cristiano R. Buzatto, Paola Pulido, Santiago

Sánchez, Julián Aldana, Francisco Witt y Cristine Gobbo Menezes además de todos los colegas de LEM, quienes lograron hacerme sentir como en casa.

Finalmente en esta ocasión envió un enorme agradecimiento a Lina María Caballero Villalobos por todo su apoyo, soportar mi lejanía y sobre todo porque durante estos meses me dio la noticia más feliz e importante que me han dado en la vida, ¡te amo mucho!

BIBLIOGRAFÍA

BANDELT HJ, FORSTER P, RÖHL A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999; 16, 37–48.

BARKER GM. Phylogenetic diversity: a quantitative framework for measurement of priority and achievement in biodiversity conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2002; 76, 165–194.

DRUMMOND A, RAMBAUT A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 2007; 7: 214.

DUPANLOUP I, SCHNEIDER S, EXCOFFIER L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*. 2002; 11, 2571-2581.

EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005; 14, 2611–2620.

EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *EBO*. 2005; 1, 47-50.

FU, YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997; 147, 915–925.

HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41, 95–98.

HEY J, MACHADO CA. The study of structured populations – New hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*. 2003; 4, 535-543.

ICKERT-BOND SM, WEN J. Phylogeny and biogeography of Altingiaceae: evidence from combined analysis of five noncoding chloroplast regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006; 39: 512–528.

KNOWLES LL. The burgeoning field of statistical phylogeography. *J. Evol. Biol.* 2004; 17, 1–10.

KULCHESKI FR, MUSCHNER C, LORENZ-LEMKE P, STEHMANN JR, BONATTO SL, SALZANO FM, FREITAS LB. Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica*. 2006; 126, 3–14.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23, 2947-2948.

MAGALLÓN S, CASTILLO A. Angiosperm diversification through time. *Am. J. Bot.* 2009; 96, 349-365.

MANTEL N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 1967; 27, 209–220.

MATOLI SR, PASSO-BUENO MRS. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. Em: MATOLI SR (ed.). *Biologia molecular e evolução*. São Paulo, SP, Brasil. 2001.

MICHAELS SD, JOHN MC, AMASINO RA. Removal of Polysaccharides from Plant DNA by Ethanol Precipitation. *BioTechniques.* 1994; 17, 274-276.

MILLER MP. Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information. *Journal of Heredity.* 2005; 96, 722–724.

MORITZ C, FAITH DP. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology.* 1998; 7, 419–429.

MORRIS AB, ICKERT-BOND SM, BRUNSON DB, SOLTIS DE, SOLTIS PS. Phylogeographical structure and temporal complexity in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua*; Altingiaceae). *Molecular Ecology.* 2008; 17, 3889–3900.

NICHOLAS KB, NICHOLAS HB, DEERFIELD DW. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNET News.* 1997; 4, 1-4.

<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>

PIGG KB, ICKERT-BOND SM, WEN J. Anatomically preserved *Liquidambar* (Altingiaceae) from the middle miocene of Yakima Canyon, Washington state, USA, and its biogeographic implications. *American Journal of Botany*. 2004; 91, 499–509.

PRITCHARD JK, STEPHENS P, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155, 945–959.

RAMOS-ONSINS SE, ROZAS J. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Mol. Biol. Evol.* 2002; 19, 2092–2100.

RAY N, CURRAT M, EXCOFFIER L. Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Mol. Biol. Evol.* 2003; 20, 76–86.

RIDDLE BR, DAWSON MN, HADLY EA, HAFNER DJ, HICKERSON MJ, MANTOOTH SJ, YODER AD. The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography*. 2008; 32, 173–202.

ROGERS AR, HARPENDING H. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol. Biol. Evol.* 1992; 9, 552-569.

ROY A, FRASCARIA N, MACKAY J, BOUSQUET J. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor Appl Genet*. 1992; 85, 173–180.

TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989; 123, 585–595.

ZHOU ZK, CREPET WL, NIXON KC. The earliest fossil evidence of the Hamamelidaceae: late Cretaceous (Turonian) inflorescences and fruits of Altingioideae. American Journal of Botany. 2001; 88, 753–766.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Resultados análisis de calidad y concentración de ADN en la solución obtenida con los protocolos de extracción de Roy *et al.* (1992) y por medio del kit de extracción Nucleo Spin Plant II. La columna **260/280** representa el radio de absorbancia entre 260 – 280 nm. Un radio de ~1,8 se acepta para un ADN “puro”.

Muestra	Extracción Roy <i>et al.</i> 1992		Extracción Kit	
	Concentración (ng/μl)	260/280	Concentración (ng/μl)	260/280
FM1	128	1,16	9,5	1,62
FM2	368,3	1,12	-	-
FR1	309,6	1,16	-	-
FR 2	78,6	1,32	-	-
FR 3	325,8	1,19	-	-
FR 4	215,4	1,23	-	-
FR5	238,6	1,18	-	-
FR6	99,7	1,44	-	-
FR7	218	1,22	11,9	1,90
FR8	251	1,23	-	-
FS1	380,3	1,10	-	-
FS2	383,3	1,11	-	-

Tabla 2. Índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad para una secuencia de ADNcp de grupos de poblaciones de *Petunia* sp.

Grupos de poblaciones	N	H	Hd +/- SD	π +/- SD	S	Tajima D*	F_S^*
1	33	4	0,324 +/- 0,098	0,00027 +/- 0,00009	3	-1.23492 (p= 0.088)	-2.016 (p= 0.029)
2	74	11	0,493 +/- 0,068	0,00052 +/- 0,00009	11	-1.95882 (p=0.005)	-8.96316 (p=0)
3	143	22	0,848 +/- 0,018	0,00258 +/- 0,00017	24	-0.753 (p= 0.241)	-3.06517 (p= 0.207)

*1000 simulaciones.

Tabla 3. Resultados del AMOVA para una secuencia de ADNcp de grupos de poblaciones de *Petunia* sp.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de variación
Entre grupos entre poblaciones	2	326,394	193,9280 Va	59,63
Dentro de grupos	12	157,112	0,8963 Vb	27,56
Dentro de poblaciones	235	97,95	0,4168 Vc	12,82

Tabla 3. Índices de diversidad genética para el conjunto de datos de CAPS para dos especies de *Petunia*.

Especie	<i>Petunia</i> sp1				<i>Petunia</i> sp2			
	No. alelos	Frec. alélica	Riqueza alélica	Diversidad génica	No. alelos	Frec. alélica	Riqueza alélica	Diversidad génica
Hf1	1	1,000	1,000	0,000	1	1,000	1,000	0,000
EPF1	2	0,023 / 0,977	1,773	0,045	1	1,000	1,000	0,000
Myb75	3	0,286 / 0,619	2,999	0,552	1	1,000	1,000	0,000

		0,095						
Myb60	2	0,525 / 0,475	2,000	0,524	2	0,667 / 0,333	2,000	0,467
MybX	1	1,000	1,000	0,000	2	0,176 / 0,824	2,000	0,305

Tabla 4. Resultados del AMOVA para el conjunto de datos de CAPS para dos especies de *Petunia*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre las especies	9.890	0.25219	69.09871
Dentro de las especies	8.571	0.11278	30.90129
Fst	0.69099	p = 0.000	

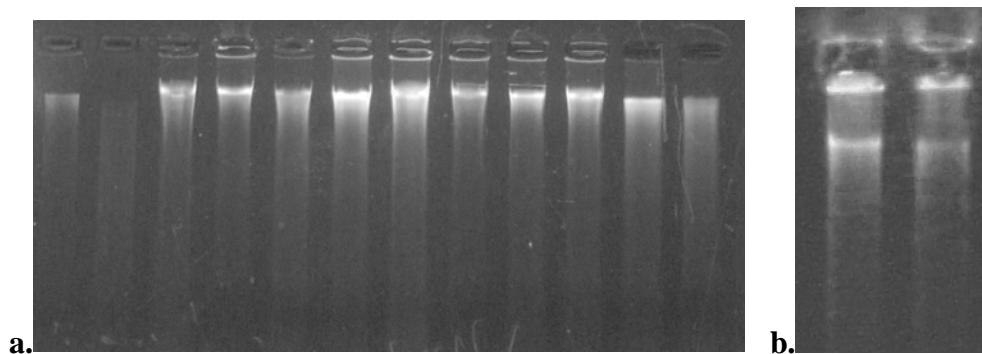


Figura 1. Bandas obtenidas en electroforesis en gel de Agarosa 1% para las muestras de ADN total extraído de tejido foliar de *Petunia* spp. **a.** Protocolo de Roy *et al.* (1992); **b.**

Extracción con el kit Nucleo Spin Plant II.

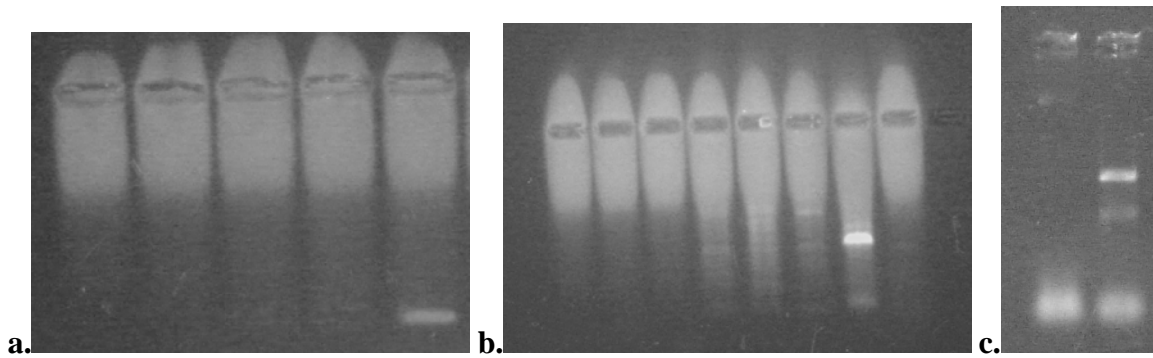


Figura 2. Resultados de electroforesis en gel de Agarosa 1% para productos de PCR de *Petunia* spp. **a.** Amplificaciones utilizando varias concentraciones de una muestra del ADN obtenido con el procedimiento de Roy *et al.* (1992) para el marcador *trnG-trnS*; **b.** Amplificaciones utilizando varias concentraciones de una muestra del ADN obtenido con el procedimiento de Roy *et al.* (1992) para el marcador *psbA-trnH* **c.** Amplificación del marcador *psbA-trnH* utilizando el ADN de una muestra obtenido con el kit de extracción.

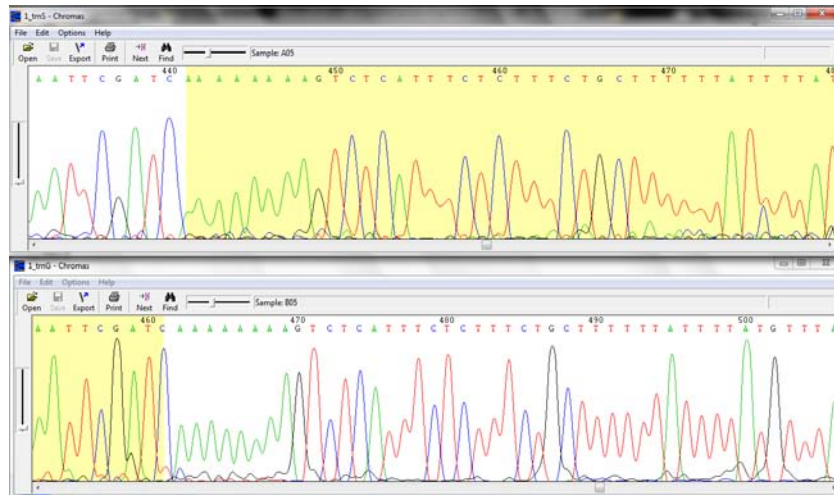


Figura 3. Cromatogramas de una secuencia del espaciador plástmico *trnG-trnS* de *Petunia* sp.

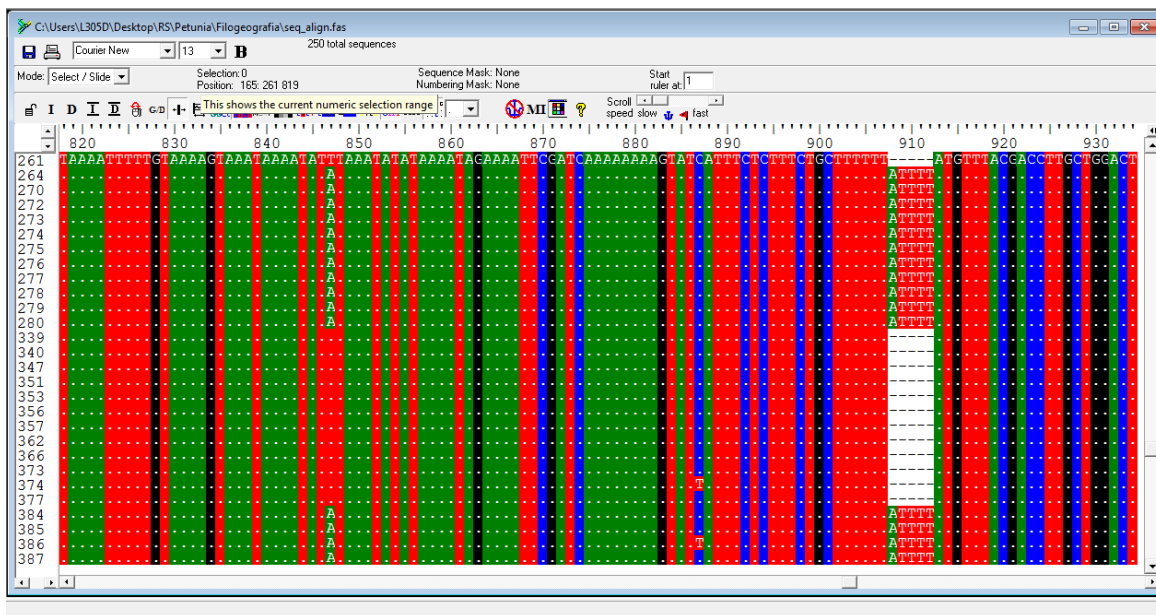


Figura 4. Alineamiento obtenido con el programa Bioedit para 250 secuencias del espaciador *trnG-trnS* de *Petunia* sp.

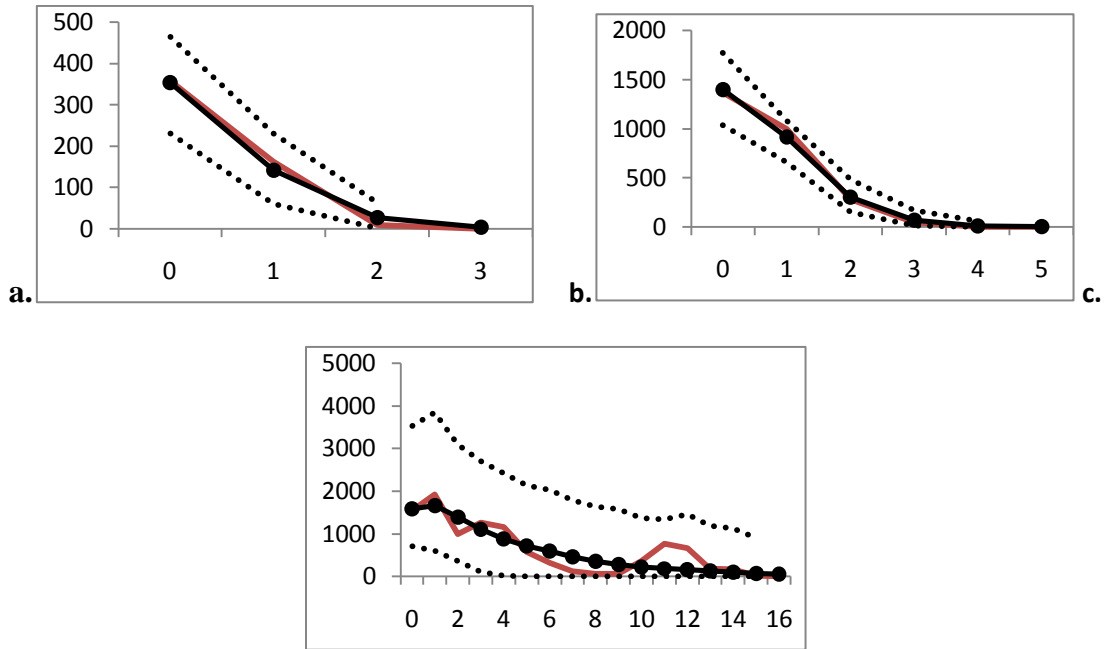


Figura 5. Diagrama de Pairwise Mismatch Distribution, Spatial expansion model, **a.** Grupo 1 SSD: 0.0717 (p=0.1), Harpending's index: 0.1655 (p=0.38); **b.** Grupo 2 SSD: 0.0008 (p=0.3), Harpending's index: 0.0967 (p=0.55); **c.** SSD= 0.0248 (p=0.5), Harpending's index: 0.0406 (0.84).

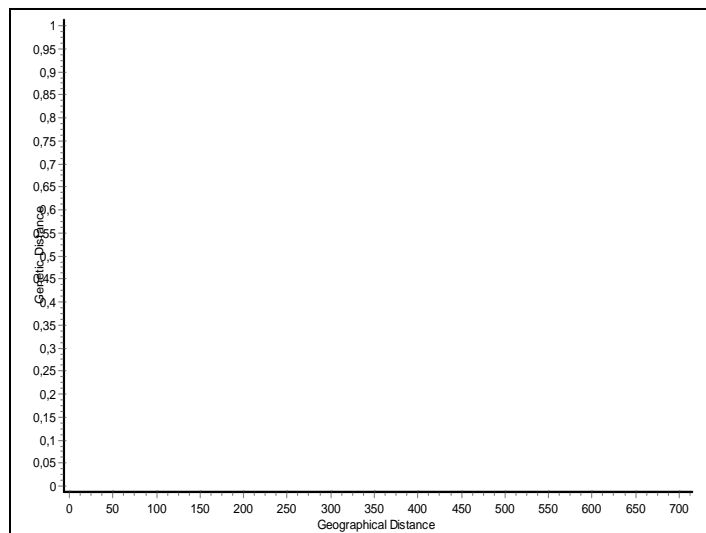


Figura 6. Correlograma obtenido mediante la comparación de la matriz de distancias geográficas y genéticas por medio de la prueba de Mantel para 250 individuos de *Petunia* sp. ($r=0,1466$; $p=0,0009$; 1000 réplicas).

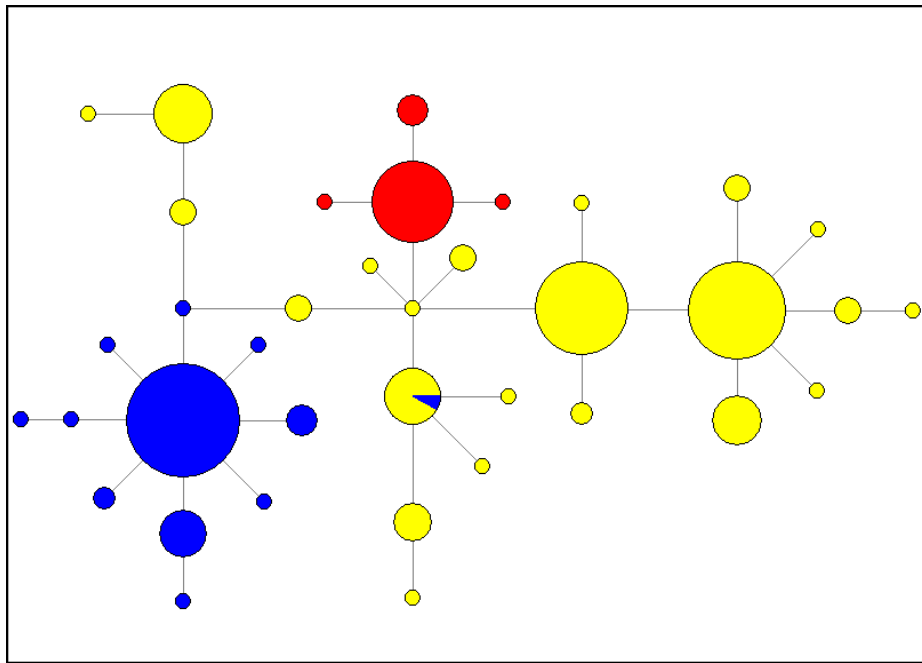
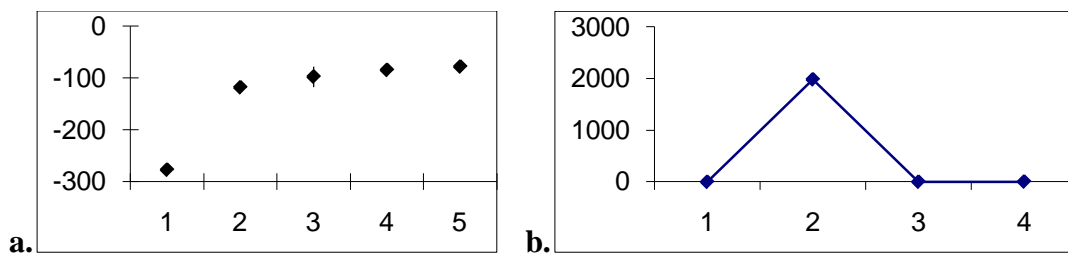


Figura 7. Red de haplotipos obtenida de la muestra de 15 poblaciones y 215 individuos.

Rojo (grupo 1); Azul (grupo 2); Amarillo (grupo 3).



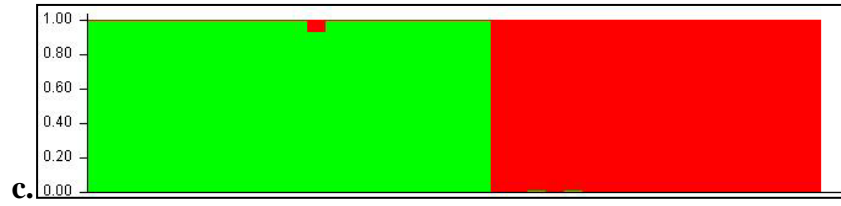


Figura 8. Gráficos resumen del análisis de estructura con Structure. **a.** Valores promedio, máximo y mínimo de $\ln P(D)$ para $K=1-5$; **b.** Valores de ΔK para $K=1-5$; **c.** Estructura genética con $K=2$.