

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

Avaliação da variabilidade genética de espécies nativas do grupo *Petunia integrifolia* e sua aplicabilidade no estudo de *Petunia hybrida* (Solanaceae)

ALINE MITCHELI CARVALHO RAMOS FREGONEZI

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Loreta Brandão de Freitas

Co-orientação: Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Porto Alegre, fevereiro de 2011.

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal no Rio Grande do Sul. As reações de genotipagem e sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Fontes Financiadoras:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ - UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Com este trabalho encerro meus dois sofridos anos de mestrado. Ao longo desta jornada muitos conhecimentos foram adquiridos e com certeza muitas pessoas contribuíram para que eu chegasse até a etapa final. Faço então, um agradecimento especial a todos que colaboraram de alguma forma. O meu muitíssimo obrigado:

À minha orientadora, Dra. Loreta Brandão de Freitas, por todos os ensinamentos, pelos momentos fundamentais de incentivo e principalmente por acreditar na minha capacidade de concretizar este trabalho oportunizando a realização deste mestrado. Tu foste uma mãe abraçando esta causa! Obrigada!

Ao CNPq, especialmente pela oportunidade oferecida através do Edital MCT/CNPq 70/2008, que visa ampliar a formação de recursos humanos de alto nível. Esta iniciativa também foi fundamental para o meu ingresso no mestrado, juntamente com o projeto elaborado pela minha orientadora.

Aos meus pais, pela extrema compreensão de minha ausência e por servirem de conselheiros e ouvintes nos momentos estressantes. Vocês dois foram a base de tudo! Ter chegado até aqui foi fruto do trabalho amoroso e incentivador que vocês dois fizeram ao longo da minha formação, amo muito vocês.

Aos companheiros de LEM (Ana Lúcia, Ana Luíza, Rak, Verônica, Pri, Geraldo e Maikel), que tantas vezes me fizeram rir e que foram muito importantes nestes dois anos. Sem a companhia de vocês este mestrado não teria tido a menor graça. Não quero escrever com ar de despedida, mas quero que vocês saibam que construí muitas amizades durante este tempo e que vocês são os melhores parceiros de trabalho (e festinhas) que alguém pode querer.

Aos demais colegas do Laboratório de Evolução Molecular que passaram por aqui durante este tempo e que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

Ao Manuel, pelo suporte técnico on-line via Messenger e pela paciência enorme em explicar as minhas 8566 dúvidas sobre microssatélites.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao PPGBM pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Elmo Cardoso, por resolver com muita tranquilidade todas as questões burocráticas que surgiram ao longo do mestrado.

Às instituições e fontes financiadoras.

E por último, à pessoa mais importante ao longo destes dois anos: meu marido! Obrigada por todo amor, atenção, carinho, paciência e companheirismo. Obrigada por não me deixar desistir nos momentos de desespero e por me incentivar incondicionalmente! Esta dissertação também é tua porque sozinha eu não teria conseguido! Tu foste o apoio das minhas duas pernas e não tem “obrigado” que retribua isso! Tu és o amor da minha vida, te amo muito!!! Não sei como te agradecer por me fazer tão feliz!

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	07
CAPÍTULO 1: Introdução	08
1.1. O gênero <i>Petunia</i> Juss.	09
1.2. O híbrido comercial de <i>Petunia</i> : origem e desenvolvimento das variedades	11
1.3. O parental de flores púrpuras: Complexo <i>integrifolia</i>	15
1.4. Estudos moleculares em plantas	20
1.4.1. Marcadores Microssatélites	22
CAPÍTULO 2: Objetivos	25
CAPÍTULO 3: <i>Petunia integrifolia</i> complex and <i>Petunia hybrida</i> cultivars: molecular insights on purple-flowered ancestors of commercial hybrids	27
CAPÍTULO 4: Transferability of microsatellite markers from <i>Petunia integrifolia</i> subsp. <i>depauperata</i> to <i>P. integrifolia</i> Complex (Solanaceae)	61
CAPÍTULO 5: Considerações finais	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

O gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) é conhecido mundialmente através do híbrido artificial *Petunia hybrida* e as duas espécies parentais, *P. integrifolia* e *P. axillaris*, são nativas do Sul da América do Sul. Porém, *P. integrifolia* é formada por um complexo de espécies semelhantes na estrutura floral, mas diferentes no habitat e distribuição. O objetivo deste trabalho é contribuir para um melhor detalhamento da origem da espécie comercial *P. hybrida* e determinar a variabilidade genética nas espécies e subespécies do grupo *integrifolia*. Neste trabalho foram utilizadas 13 populações naturais distribuídas entre os cinco *taxa* que compõem o complexo: *Petunia bajeensis*, *Petunia inflata*, *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*, *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* e *Petunia interior*. Além disso, foram incluídas 22 variedades de *P. hybrida* abrangendo as duas principais classificações comerciais: Grandiflora e Multiflora. Dez marcadores de microssatélites desenvolvidos para *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* foram transferidos para as outras espécies do grupo *integrifolia*. Padrões de diversidade genética e estruturação populacional foram estudados utilizando sete destes *loci* de microssatélites. Dados de sequência de marcadores plastidiais foram adicionados para permitir uma comparação entre as espécies do gênero *Petunia* e as variedades comerciais através de uma rede de haplótipos. A probabilidade de ancestralidade foi inferida entre as populações estudadas e as variedades de *P. hybrida*. A análise da AMOVA mostrou que 66% da variação genética estão entre os indivíduos amostrados. A espécie *P. bajeensis* apresentou baixa variabilidade comparada com as outras do complexo *integrifolia* e se mostrou geneticamente muito distinta do restante do grupo. Foi detectado um relacionamento genético muito próximo entre as espécies *P. inflata* e *P. interior*, bem como para as subespécies de *P. integrifolia*. Dados de cpDNA revelaram um compartilhamento de haplótipos entre variedades comerciais e as espécies *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, *P. axillaris* e *P. altiplana*. Os resultados obtidos permitiram excluir as espécies *P. bajeensis* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata* como possíveis parentais de flor roxa da petúnia-de-jardim e apontar para populações de *P. inflata* e *P. interior* localizadas na região noroeste do Rio Grande do Sul e arredores. Este foi o primeiro estudo realizado com a utilização de marcadores microssatélites em populações naturais de *Petunia* e forneceu novas ferramentas moleculares para estudos futuros.

ABSTRACT

The genus *Petunia* Juss (Solanaceae) is worldwide known through the artificial hybrid *Petunia hybrida* and the two parental species, *P. integrifolia* and *P. axillaris*, are native from Southern South America. However, *P. integrifolia* is formed by a complex of species that are similar in morphological traits, but different in habitat and geographical distribution. The aim of this work is contribute for a better understanding of *P. hybrida* origin and access the genetic variability in integrifolia group species and subspecies. Were utilized 13 natural populations distributed between five *taxa* that compose the integrifolia complex: *Petunia bajeensis*, *Petunia inflata*, *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*, *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* and *Petunia interior*. Besides, 22 varieties of *P. hybrida* were included, covering the two main classifications: Grandiflora and Multiflora. Ten microsatellites markers developed for *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* were transferred for other integrifolia group species. Measures of genetic diversity and population structure were obtained using seven microsatellites *loci*. Plastidial sequence data were added to allow comparisons between species of the genus *Petunia* and commercial varieties through a network of haplotypes. The probability of ancestry was inferred between the studied populations and *P. hybrida* cultivars. AMOVA analyses showed that 66% of genetic variation is between the individuals sampled. *Petunia bajeensis* revealed low genetic variability compared with other species of integrifolia complex and was genetically very different from the rest of group. A very close genetic relationship was detected among *P. inflata* e *P. interior*, as well as among the integrifolia subspecies. cpDNA data revealed sharing haplotypes between commercial varieties and the species *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, *P. axillaris* and *P. altiplana*. The results allowed to exclude *P. bajeensis* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata* as possible purple-flowered parents of garden petunias, pointing *P. inflata* e *P. interior* populations, located in northwestern Rio Grande do Sul and surrounding regions, as possible parents. This was the first study that used microsatellite markers in natural *Petunia* populations, and provided new molecular tools for future investigations.

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1. O Gênero *Petunia* Juss.

A família Solanaceae Juss. é representada por aproximadamente 2500 espécies distribuídas em 102 gêneros, essencialmente compostos por ervas, arbustos, árvores ou lianas. Esta família é amplamente distribuída, porém é muito mais diversa nas Américas, ocorrendo frequentemente em lugares alterados. Solanaceae inclui muitos gêneros de importância econômica mundial. Entre os gêneros de utilização agrícola podemos citar: *Solanum* L. (batata, tomate, berinjela), *Capsicum* L. (pimenta) e *Nicotiana* L. (tabaco). A família também inclui diversas espécies de interesse ornamental como *Brunfelsia* L. (manacá-de-cheiro), *Cestrum* L. (dama da noite), *Datura* L. (trombeteira) e *Petunia* Juss. (petúnias) (Judd *et al.*, 2009).

O gênero *Petunia* foi originalmente estabelecido por Jussieu no início do século XVII com a descrição de duas espécies: *Petunia nyctaginiflora* (= *P. axillaris*) e *Petunia parviflora* (= *Calibrachoa parviflora*). Porém, até a metade do século XIX, diversas espécies de *Petunia* foram descritas sob outros gêneros (Stehmann, 1999). Fries (1911) publicou uma monografia do gênero reconhecendo 27 espécies divididas em dois subgêneros: *Pseudonicotiana* e *Eupetunia*. Ao primeiro subgênero foram atribuídas as espécies *P. axillaris* e *P. pygmaea* (= *Calibrachoa pygmaea*) (espécies de flores brancas) e ao segundo gênero o restante das 25 espécies (de flores violáceas).

Wijsman (1982) e Wijsman & Jong (1985) publicaram estudos morfológicos e cromossômicos demonstrando que todo o gênero *Petunia* era composto por dois grupos distintos de espécies: um grupo com $2n = 14$ e outro com $2n = 18$. A designação *Petunia* foi mantida para as espécies com $2n = 14$ e as espécies $2n = 18$ receberam o nome de *Calibrachoa* La Llave & Lex. (Wijsman, 1990).

Não existe na literatura uma concordância com relação ao número de espécies no gênero *Petunia*. Em 1998 Ando & Hashimoto, através de dados morfológicos, reconheceram 14 espécies. Porém, Stehmann (1999) reconheceu apenas 11 espécies em uma revisão taxonômica do grupo com base em características ecológicas, cromossômicas, anatômicas e morfológicas. A classificação mais recente, que adiciona dados moleculares, reconhece novamente 14 espécies distribuídas nas áreas subtropicais e temperadas da América do Sul (Stehmann *et al.*, 2009). Embora taxonomistas estejam trabalhando intensivamente para desenvolver um sistema de classificação botânica objetivo, muitas

espécies ainda apresentam nomenclatura divergente devido a discordâncias taxonômicas, sinônimos na nomenclatura ou identificação equivocada.

De modo geral, as espécies de *Petunia* são ervas eretas, decumbentes ou procumbentes, com raízes axiais. O caule é cilíndrico e herbáceo e quando jovem é esverdeado. As folhas são sésseis ou subsésseis, podendo variar de um a 19 centímetros. As flores são vistosas, com cálice fendido até próximo à base; a corola possui prefloração imbricada, podendo ser actinomorfa ou zigomorfa, de coloração predominantemente púrpura ou, mais raramente, vermelha ou branca. Apresentam cinco estames, com anteras amarelas ou azul-violáceas. O fruto é uma cápsula septígrafa com sementes pequenas e numerosas. Não há um sistema de dispersão a longas distâncias, de forma que, geralmente, as sementes ficam próximas à planta mãe. Normalmente são plantas hermafroditas, anuais e de vida curta (Stehmann *et al.*, 2009).

As petúnias são predominantemente heliófilas (necessitam de alta intensidade luminosa) e podem ser encontradas nos mais variados tipos de solo. Podem habitar campos, afloramentos rochosos e capoeiras da zona ecotonal entre o campo e a mata (Stehmann, 1999).

Dentro do gênero existem diferentes síndromes florais (conjuntos de características que tornam a flor propícia à polinização por determinado vetor), sendo a melitofilia (polinização por abelhas) a mais comum, presente em cerca de oito espécies do gênero. A maioria das espécies melitófilas de *Petunia* são auto-incompatíveis e, assim, dependentes da polinização realizada por abelhas especializadas para a sua reprodução, em um provável processo de co-evolução (Wittmann *et al.*, 1989; Silva, 1994).

Fertilizações interespecíficas em laboratório produzem híbridos com variado grau de fertilidade, comprovando que não há barreiras genéticas a este tipo de cruzamento (Watanabe *et al.*, 1996). As espécies de *Petunia* se reproduzem sexuadamente e florescem geralmente num mesmo período, não havendo isolamento sazonal entre elas. Os mecanismos de isolamento dentro deste gênero são predominantemente geográficos (diferentes habitats) e estruturais (radiação adaptativa de síndromes florais). Estes últimos parecem ser particularmente importantes para a manutenção da integridade genética destas espécies (Stehmann, 1999).

1.2. O híbrido comercial de *Petunia*: origem e desenvolvimento das variedades

As petúnias são mundialmente conhecidas devido à espécie *Petunia hybrida* (petúnia-de-jardim). A história das petúnias-de-jardim (Figuras 1 e 2) começou no século XIX quando as espécies *Salpiglossis integrifolia* (= *Petunia integrifolia*) e *Petunia violacea* (= *Petunia integrifolia*) descritas por Hooker e por Lindley, respectivamente, foram transportadas da América do Sul e introduzidas nos jardins dos países europeus entre os anos de 1820 e 1830 (Sink, 1975). Indivíduos de *Petunia nyctaginiflora* (= *P. axillaris*) já eram amplamente cultivados nesta época e híbridos entre estas duas espécies foram rapidamente obtidos, resultando em uma grande variedade de cores intermediárias aos parentais com valores excepcionais para os horticultores (Ferguson & Ottley, 1932).

O sucesso dos híbridos se deu pela perda da auto-incompatibilidade em algumas linhagens obtidas (característica encontrada em populações naturais de *P. integrifolia*), permitindo a reprodução em casa de vegetação. Os híbridos passaram a ser cultivados a partir de sementes e também através de propagação clonal. Desde o início dos anos 1830, as petúnias-de-jardim têm sido objeto de melhoramento genético com intuito de obter diferentes cores, formas e tamanho de flores, incluindo poliplóides e flores dobradas (Stout, 1952).

Muitos autores têm tentado elucidar a história da introdução das petúnias na Europa e a origem dos verdadeiros parentais de *Petunia hybrida* e alguns deles consideram a possibilidade de *P. inflata* (descrita por Fries em 1911) também ser um dos parentais (Ferguson & Ottley, 1932; Stout, 1952; Sink, 1975). Wijsman (1982) realizou uma série de cruzamentos na tentativa de identificar os parentais de *P. hybrida* e concluiu que o híbrido era resultado do cruzamento de duas espécies biológicas (*P. axillaris* e *P. integrifolia*) cada uma com subespécies geográficas. O cruzamento natural entre *P. axillaris* e *P. integrifolia* não foi detectado em populações simpátricas, embora seja eficientemente realizado em condições artificiais (Ando *et al.*, 2001).

Além do uso ornamental, *Petunia hybrida* apresenta qualidades que favorecem sua utilização como sistema modelo para estudos científicos, especialmente na área da genética: facilidade de crescimento, ciclo de vida relativamente curto (cerca de quatro meses da germinação à produção de sementes), facilidade de propagação assexuada, flores

e folhas grandes que permitem estudos de citogenética e bioquímica, produção de frutos e sementes abundantes, alta eficiência de transformação genética e disponibilidade de mutantes por inserção de elementos transponíveis endógenos (Gerats & Vandebussche, 2005).



Figura 1: Exemplos de *Petunia hybrida* variedade Grandiflora utilizados neste trabalho. Diâmetro das flores para estes indivíduos variam entre 07 e 10 cm.



Figura 2: Exemplos de *Petunia hybrida* variedade Multiflora utilizados neste trabalho. Diâmetro das flores para estes indivíduos variam entre 03 e 05 cm.

No Brasil são comercializados dois principais tipos de petúnia: Grandiflora e Multiflora. O primeiro tipo se refere a plantas mais compactas com um número limitado de flores bem abertas e folhas grandes cujo diâmetro da corola pode variar aproximadamente entre 07 e 10 cm (Figura 1). Já o segundo tipo diz respeito a plantas mais ramificadas, com um grande número de folhas e flores pequenas, cujo diâmetro da corola pode variar entre 03 e 6,5 cm (Figura 2) (Dole & Wilkins, 2004). O tipo Grandiflora surgiu pela primeira vez em 1881 como uma mutação no tipo multiflora. Posteriormente, foi descoberto que o genótipo Grandiflora é devido a um gene dominante (G-) que, na condição homozigota, é quase letal (Sink, 1973).

Outro acontecimento importante na história de *P. hybrida* foi o desenvolvimento de híbridos F1 obtidos através do cruzamento entre os tipos Grandiflora e Multiflora. Este híbrido F1 Grandiflora foi produzido durante a década de 1940 por Charles de Weddle da “PanAmerican Seed Company” (W. Chicago, Illinois, EUA) a partir de sementes e foi denominado “Ballerina”. Cultivares Multiflora de flores vermelhas surgiram posteriormente e foram introduzidas pela primeira vez por S. Sinclair da companhia “Bodger Seeds” (Lompoc, California, EUA) em 1950. Claude Hope, um co-fundador da “PanAmerican Seed Company”, utilizou uma variedade intitulada ‘Fire Chief’ para criar o primeiro cultivar do tipo Grandiflora chamada “Comanche”. Durante a década de 1990 muitos programas de melhoramento foram desenvolvidos para atender às preferências dos consumidores e muitas variedades surgiram: Wave™ (Pan-Americana), Cascadias® (Danziger), Surfinia® (Suntory), Trailblazer® (Novartis) Ramblin®, (Goldsmith), Petitunia® (Danziger) Tunias™, Tiny (Bodger), entre outras. Novas variedades foram criadas, como as “petúnias pendentes”: plantas com caules longos que podem atingir 1,5 metros (ideais para jardineiras) e com flores pequenas distribuídas por toda extensão do indivíduo (Griesbach, 2007).

Atualmente, todas as grandes companhias produtoras de sementes têm sua própria série de petúnias. Infelizmente, não existe um sistema unificado de identificação e organização das variedades comerciais, desde as linhagens mais antigas até os últimos cultivares desenvolvidos. Cada país ou instituição responsável possui um sistema diferente. Por exemplo: a empresa “PanAmerican Seed” produz a variedade Wave e criou a Easy Wave, Shock Wave, Tidal Wave, etc; já a empresa “Goldsmith Seeds” (Gilroy, California, USA) produz as petúnias Ramblin, Sakata, Explorer, Avalanche, além de muitas outras. A quantidade de variedades registrada nestes bancos é muito grande, com os mais variados fenótipos, mas em muitos deles os registros não recebem classificações baseadas em algum critério morfológico ou de parentesco, e são atribuídos normalmente nomes de fantasia que não fazem menção a características do cultivar, de forma que um mesmo fenótipo pode apresentar diversas nomenclaturas. Como exemplo podemos citar a variedade “Mirage Lavander” e a variedade “Purple Vein Ray” desenvolvidas e comercializadas pelas empresas “PanAmerican Seed” e “Danziger” respectivamente (Figura 3), cujas características morfológicas são muito semelhantes.



Figura 3: Exemplo de fenótipos similares de *Petunia hybrida* com nomenclaturas diferentes. **A)** *P. hybrida* “Mirage Lavander” desenvolvida pela empresa “PanAmerican Seed”. Disponível no sítio (http://www.panamseed.com/series_info.aspx?phid=048600940002843). **B)** *P. hybrida* “Purple Vein Ray” desenvolvida pela empresa “Danziger”. Disponível no sítio (http://www.danziger.co.il/index.php?page_id=1912) Ambos acessos realizados em 5 de janeiro de 2011 as 14hs.

As petúnias-de-jardim estão entre as plantas ornamentais mais importantes no contexto mundial, gerando mais de milhões de dólares por ano nos Estados Unidos (Griesbach, 2007). Os maiores produtores mundiais de sementes são os Estados Unidos, o Japão e a Alemanha, embora as espécies parentais sejam nativas do sul da América do Sul. As sementes comercializadas no Brasil são importadas, principalmente, dos Estados Unidos e do Japão, e não existem aqui programas de melhoramento para o híbrido e tão pouco programas de conservação para espécies nativas (Freitas *et al.*, 2008).

1.3. O parental de flores púrpuras: Complexo *integrifolia*

A espécie *Petunia integrifolia* apresenta uma das maiores distribuições do gênero, habitando territórios na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (Figura 4). Algumas características morfológicas das populações diferem entre as regiões geográficas, o que parece ser suficiente para que alguns autores sugiram níveis taxonômicos mais elevados. Representantes de *P. integrifolia* podem ser encontrados nos mais variados tipos de ambientes abertos, como latossolos, campos arenosos e afloramentos rochosos. Na primavera se observa muitas populações crescendo com vigor em locais modificados, como terrenos baldios, acostamentos e barrancos em estradas. Espécies do complexo *integrifolia* (Figura 5) podem ser reconhecidas pelas seguintes características morfológicas: corola infundibuliforme, magenta ou púrpura, filetes adnatos 2 a 5 mm à base da corola, estigma localizado entre as anteras dos pares de estames maior e mediano e pólen violáceo (Stehmann, 1999).

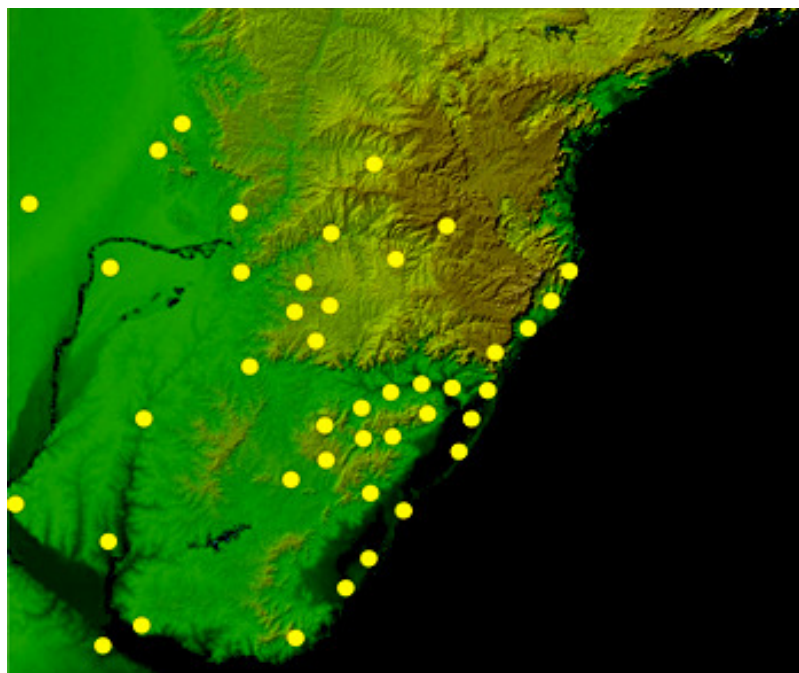


Figura 4: Mapa de registro de ocorrência para as espécies do Complexo *integrifolia*. Levantamentos de registro de herbário publicados por Stehmann 1999.

A delimitação da espécie *P. integrifolia* sofreu diversas alterações ao longo do tempo. Plantas com flores púrpuras e pequenas, muito diferentes de *P. axillaris* (uma espécie já bem

conhecida na Inglaterra) foram descritas e ilustradas por Hooker em 1831 sob o nome de *Salpiglossis integrifolia*. No mesmo ano, Lindley publicou a descrição de uma planta com características semelhantes sob o nome de *Petunia violacea* (Stout, 1952). Fries (1911), além de separar as espécies com flores púrpuras no subgênero *Eupetunia*, reconheceu duas novas espécies e uma nova subespécie: *P. inflata*, *P. occidentalis* e *P. violacea depauperata*.

Em 1915 Schinz e Thellung notaram que a nomenclatura correta para *P. violacea* (de acordo com as Regras Internacionais de Nomenclatura) deveria ser *Petunia integrifolia* (Stout, 1952). Posteriormente, Smith & Downs (1966) reconheceram como uma espécie distinta as populações que habitam a ilha de Florianópolis (Santa Catarina) sendo estas chamadas de *Petunia littoralis*. Além disso, sinonimizaram *P. inflata* (descrita por Fries em 1911) para *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thellung var. *integrifolia* e *P. violacea depauperata* (também descrita por Fries em 1911) para *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thellung var. *depauperata*.

Wijsman (1982) reconheceu *P. integrifolia* como sendo uma espécie única, formada por três subespécies: *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, associada à região do Pampa, *P. integrifolia* subsp. *occidentalis*, isolada na região norte da Argentina e sul da Bolívia, e *P. integrifolia* subsp. *inflata* no Paraguai, nordeste da Argentina e oeste da região sul do Brasil, estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Nos anos seguintes, outros três *taxa* relacionados à *P. integrifolia* foram elevados à categoria de espécie: Ando & Hashimoto (1996) denominaram as populações que apresentavam anteras com tecas diferenciadas e ramificações tricotômicas de *Petunia interior*; e, em 1998, estes mesmos autores, baseados nas diferenças de tamanho da flor, dos estames e formato do tubo da corola descreveram *Petunia riograndensis* e *Petunia bajeensis*, ambas ocorrendo no planalto sul-riograndense.

Stehmann (1999), em uma revisão taxonômica do gênero, argumentou que a espécie *P. integrifolia* encontra-se naturalmente estruturada em populações parcialmente isoladas. Este isolamento seria o responsável pelas diferenças florais e vegetativas nas populações marginais, ocasionando um gradiente morfológico e induzindo a proposição de *taxa* pontuais. Para este autor, todas as espécies e subespécies do complexo descritas anteriormente deveriam ser sinonimizadas em *Petunia integrifolia*, podendo, eventualmente, serem aceitos alguns *taxa*

infra-específicos. Para ele, apenas *P. occidentalis*, que apresenta uma distribuição disjunta das demais e caracteres morfológicos consistentes, seria uma espécie independente.

Longo (2005) analisou cinco morfologias de *P. integrifolia* através de dados moleculares: *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* (de acordo com a classificação de Wijsman, 1982); *P. integrifolia* subsp. *depauperata* (de acordo com a classificação de Fries, 1911); *P. riograndensis* (descrita por Ando & Hashimoto, 1998); *P. interior* (descrita por Ando & Hashimoto, 1996) e *P. littoralis* (Smith & Downs, 1966), e verificou a existência de três linhagens evolutivas. A primeira linhagem correspondendo à espécie *P. interior*; a segunda à *P. riograndensis* e indivíduos com morfologia correspondente à *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*, coletados a oeste do Lago Guaíba e da Lagoa dos Patos; e a terceira linhagem reunindo os grupos morfológicos correspondentes à *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*, *P. littoralis* e indivíduos com morfologia correspondente a *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*, coletados a leste do Lago Guaíba e da Lagoa dos Patos. Após estes resultados, um novo tratamento taxonômico foi proposto para esse grupo de forma que as morfologias ocorrentes na região Noroeste do Rio Grande do Sul (RS) sejam agrupadas sob uma mesma nomenclatura, e que sejam reconhecidas duas subespécies para *P. integrifolia*: *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata*.

Em 2007, Stehmann & Bohs reconheceram *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. subsp. *depauperata* (R.E.Fr.) Stehmann. Esta subespécie está associada a ambientes de alta salinidade, dunas fósseis ou à segunda linha de dunas do litoral dos estados de Santa Catarina e RS.

Dados moleculares mais recentes, utilizando os espaçadores plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG*, indicam que as diferentes morfologias do Complexo *integrifolia* (Figura 5) compreendem cinco linhagens genéticas distintas. (Lorenz-Lemke *et al.*, em preparação): A primeira linhagem corresponde às morfologias *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* e *P. riograndensis*; a segunda corresponde as morfologias *P. integrifolia* subsp. *depauperata* e *P. littoralis*; a terceira corresponde à *P. bajeensis*; a quarta compreende indivíduos que possuem morfologias de *P. inflata* e *P. interior*, mas que ocorrem abaixo de 500 m de altitude, e a quinta linhagem compreende indivíduos que possuem morfologia de *P. interior*, mas que ocorrem acima de 500 m de altitude. Esta última linhagem é geneticamente próxima às espécies de altitude, sugerindo eventos de hibridação no passado (Figura 6).



Figura 5. Representantes do Complexo integrifolia, com detalhe das flores. Com base nas informações taxonômicas e moleculares, são considerados neste trabalho cinco *taxa*: *Petunia bajeensis* (A), *Petunia inflata* (B), *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia* (C), *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* (D) e *Petunia interior* (E). Pode se observar que todas as espécies/linhagens são muito semelhantes morfologicamente, sendo separadas por diferenças no tamanho e forma das flores e posição dos órgãos reprodutivos.

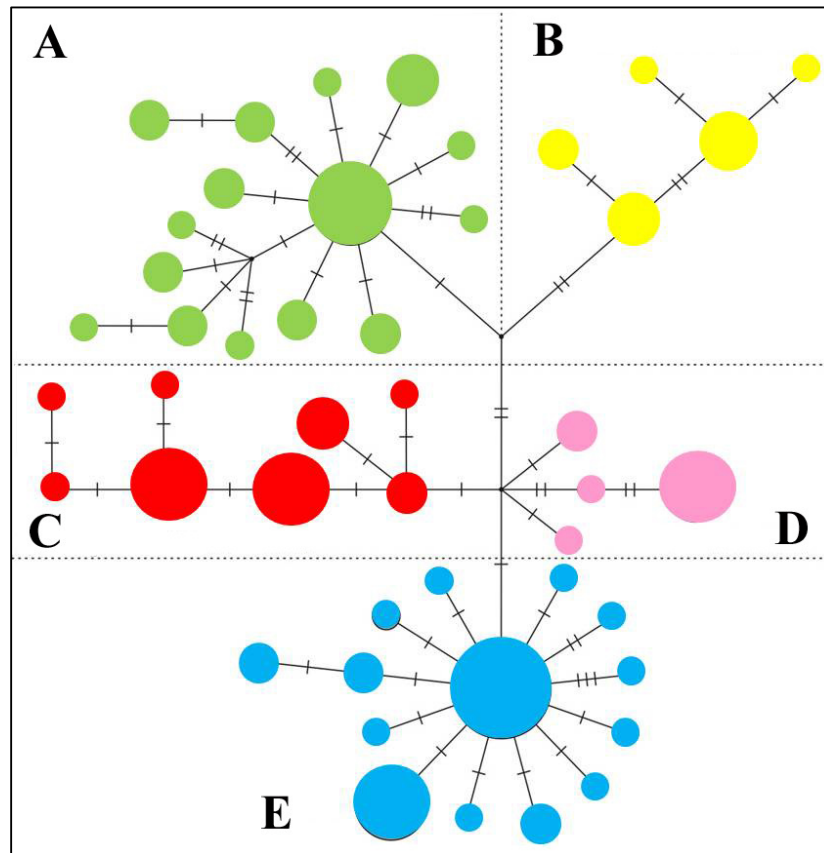


Figura 6. Network de relacionamento de haplótipos gerado pelo método de *median-joining* a partir de seqüências de DNA dos espaçadores plastídias *trnH-psbA* e *trnS-trnG* do Complexo integrifolia. (Lorenz-Lemke *et al.*, em preparação). Os grupos de haplótipos assinalados pelas diferentes cores são as linhagens correspondentes às seguintes morfologias: *P. inflata* e *P. interior* que ocorrem abaixo de 500 m de altitude (A, verde); *P. interior* que ocorrem acima de 500 m (B, amarelo); *P. integrifolia* subsp. *depauperata* e *P. litorallis* (C, vermelho); *P. bajeensis* (D, rosa); *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* e *P. riograndensis* (E, azul).

Neste trabalho foram adotadas as classificações mais recentes, além de se levar em conta os dados moleculares, assumindo-se assim cinco entidades taxonômicas: *Petunia bajeensis*, *Petunia inflata*, *Petunia integrifolia* subsp. *integrifolia*, *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* e *Petunia interior*.

1.4. Estudos moleculares em plantas

Inúmeros avanços nos estudos evolutivos têm sido feitos nos últimos anos com o aprimoramento das técnicas de sequenciamento do genoma. Marcadores moleculares tornaram-se uma ferramenta poderosa nos estudos que envolvem questões taxonômicas e populacionais, pois permitem acessar a história evolutiva dos organismos em muitas escalas geográficas (Avice, 2000). Neste contexto, o DNA organelar tem tido um papel importante (Calcagnotto, 2001) e vêm sendo amplamente utilizado em diversos trabalhos (Okaura & Harada, 2002; Hwang *et al.*, 2003; Jakob & Blattner, 2006), pois possui características peculiares como a herança uniparental, a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas em regiões não codificadoras, se comparadas a um genoma nuclear (Wolfe *et al.*, 1987; Olmstead & Palmer, 1994).

Em plantas, um número cada vez maior de trabalhos na área de sistemática taxonômica vem utilizando regiões codificadoras do DNA plastidial (cpDNA) para esclarecer problemas de classificação baseadas em dados morfológicos (Olmstead & Palmer, 1991; Olmstead *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2005). Para estudos filogenéticos em níveis taxonômicos abaixo da categoria de gênero, as regiões não codificadoras do cpDNA (íntrons e espaçadores intergênicos) são as mais utilizadas, pois sofrem pouca ou nenhuma pressão seletiva. Assim, essas regiões estão mais livres para variar, fornecendo informações filogenéticas suficientes para reconstruir eventos evolutivos relativamente recentes (Small *et al.*, 1998). O cpDNA é herdado maternalmente na maioria das angiospermas (Palmer *et al.*, 1988) e isto confere uma vantagem em análises que avaliam o fluxo de sementes (Palmé *et al.*, 2003). Além disso, o cpDNA é relativamente pequeno (aproximadamente 150.000 pb) e bastante conservado com relação à sequência e ordem dos genes. A taxa de substituições sinônimas nos genes deste genoma é cerca de 3-4 vezes mais lenta que a do DNA nuclear (Wolfe *et al.*, 1987).

Dentre os numerosos marcadores plastidiais utilizados e descritos na literatura (Shaw *et al.*, 2005), destaca-se o espaçador *trnS-trnG* que apresenta variação intra-específica suficiente para permitir estudos de estrutura populacional e fluxo gênico em diversas espécies de angiospermas (Hamilton, 1999), exibindo também variabilidade em diferentes níveis taxonômicos dependendo do grupo de estudo. Xu *et al.* (2000) mostraram que este marcador é mais informativo em comparação a outras nove regiões não codificadoras do cpDNA para espécies intimamente relacionadas de *Glycine* (Fabaceae). Em um trabalho com *Moringa*

(Moringaceae), este espaçador também apresentou alta variabilidade intra-específica (Olson, 2002). Hamilton (1999) também desenvolveu *primers* para o espaçador intergênico entre os genes *psbB* e *psbH* (*psbB-psbH*) para estudar a dinâmica populacional dentro de espécies de *Corythophora* (Lecythidaceae), mas Xu *et al.* (2000) mostraram que esta região é menos informativa que *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e *trnT-trnL* para espécies de *Glycine* (Fabaceae).

Também existem disponíveis outros *primers* para regiões intergênicas altamente variáveis, flanqueadas por exons para garantir a conservação dos sítios de anelamento, sendo muito úteis para estudos populacionais (Hamilton, 1999; Shaw *et al.*, 2005). A região espaçadora entre os genes *trnH* e *psbA* foi caracterizada por Aldrich *et al.* (1988), em um dos primeiros estudos sobre esta região, como sendo rica em eventos de inserção/deleção (*indels*) e em sequências repetidas de AT (adenina/timina) variáveis em comprimento. Alguns trabalhos têm demonstrado a utilidade deste espaçador para estudos filogenéticos. Sang *et al.* (1997) perceberam alta variabilidade desta região quando comparada com o gene *matK* e o espaçador *trnL-trnF*, atribuindo valor filogenético para este marcador. Chase *et al.* (2007) propuseram sua utilização na criação de um “código de barras genético” para as plantas terrestres. Porém, Shaw *et al.* (2005) apontaram para problemas no seu uso em estudos filogenéticos, pois apesar da alta variação, o marcador é relativamente pequeno e pode não trazer informações suficientes. Estudos intra-específicos com o espaçador *trnH-psbA*, muitas vezes em conjunto com outros espaçadores plastidiais, têm comprovado sua utilidade na resposta a diferentes questões filogeográficas (Hamilton *et al.*, 2003; Ohi *et al.*, 2003; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006, 2010; Bettin *et al.*, 2007).

O sequenciamento das regiões *psbA-trnH* e *trnS-trnG* do cpDNA, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou uma boa variação inter e intra-específica nos gêneros *Petunia* e *Calibrachoa* e tem respondido diversas questões populacionais para algumas espécies destes grupos (Longo, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006, 2010; Mäder, 2008; Ramos, 2008; Fregonezi, 2009).

1.4.1. Marcadores Microsatélites

Microsatélites são definidos como repetições seriadas simples de DNA compostas por pequenos motivos que podem variar de 1-6 nucleotídeos repetidos de quatro a cerca de 60 vezes. Também variam em abundância em diferentes genomas de eucariotos e procariotos, incluindo organelas (Chambers & MacAvoy, 2000).

Estas sequências foram observadas primeiramente por Birnboim & Straus (1975) e foram denominadas *polypirimidine stretches*. Posteriormente outras nomenclaturas foram atribuídas a este tipo de sequência: *Simple Sequence Repeat* (SSR) e *Short Tandem Repeat* (STR). A utilização destas regiões como marcadores nucleares foi proposta inicialmente por Weber & May (1989) para estudos em humanos, devido ao seu alto grau de polimorfismo.

A grande variação dos alelos de microsatélites tem sido atribuída tradicionalmente ao tipo de mecanismo mutacional que predomina nestas regiões, chamado replicação *slippage* do DNA. Durante a replicação da fita molde de DNA, uma das fitas contendo o microsatélite forma uma alça, originando um mau pareamento e desta forma há perda ou ganho de uma ou mais unidades de repetição (Schlötterer, 2000). Os microsatélites são geralmente encontrados em regiões não codificadoras do genoma sendo considerados marcadores neutros. São de herança codominante (herdados de acordo com a herança mendeliana) e apresentam altas taxas de mutação (entre 10^{-2} e 10^{-6} nucleotídeos por locus por geração) (Sia *et al.*, 2000).

Alguns modelos de evolução molecular foram desenvolvidos para serem empregados em regiões com evolução semelhante ao que ocorre em microsatélites. Dentre os modelos mais utilizados estão o *Stepwise Mutation Model* (SMM) de Ota & Kimura (1973), o *Infinite alleles Model* (IA) de Wright (1931) e o *Two Phase* (TP) proposto por Di Rienzo *et al.* (1994). No modelo SMM cada mutação é uma unidade de repetição. Dois alelos que se diferenciam por apenas um motivo são mais intimamente relacionados (compartilham um ancestral comum) do que alelos que se diferenciam por vários motivos. Já no modelo IA, cada mutação cria um novo alelo e, neste caso, a proximidade do número de repetições não indica relação filogenética entre os alelos. O modelo mais recente, TP, nada mais é do que uma complementação do modelo SMM. Este pressupõe que mudanças no tamanho alélico são predominantemente *single-phase* (uma unidade de repetição), mas existe a rara ocorrência de mutações com mais de uma unidade de repetição.

As características dos marcadores do tipo microssatélites (marcadores neutros, altamente variáveis e de herança mendeliana) fornecem a base para sua aplicação bem sucedida em diversos estudos nas áreas da medicina, genética forense, epidemiologia molecular, parasitologia, genética da conservação e mapas de ligação (Chistiakov *et al.*, 2006). Em estudos populacionais estes marcadores podem revelar relações filogenéticas em curtos intervalos de tempo, como aqueles observados em radiações recentes (Takezaki & Nei, 1996).

Marcadores SSR são obtidos a partir do uso de *primers* que flanqueiam regiões contendo os microssatélites. Os *primers* são desenhados a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas, nos quais os microssatélites foram previamente localizados. O progresso no uso de microssatélites tem encontrado dificuldades devido ao alto custo no desenvolvimento de *primers* específicos (Oliveira *et al.*, 2006), procedimentos laboriosos e do isolamento problemático em alguns *taxa* (Selkoe & Toonen, 2006). Muitos estudos evolutivos necessitam de *primers* universais que possam ser facilmente transferidos entre espécies e permitam a comparação entre *taxa* intimamente relacionados para abordar mecanismos envolvidos na divergência populacional e processos de especiação (Noor & Feder, 2006).

Alguns trabalhos têm mostrado que pares de *primers* desenhados para uma espécie podem ser utilizados para outras espécies do mesmo gênero (Isagi & Suhandono, 1997; Cipriani *et al.*, 1999), ou até mesmo, para diferentes gêneros da mesma família (White & Powell, 1997; Roa *et al.*, 2000; Zucchi *et al.*, 2002). Este processo, chamado de transferabilidade, é descrito como a capacidade que os *primers* desenvolvidos para uma espécie têm em amplificar segmentos de DNA em outras espécies. A transferabilidade entre *taxa* muito distantes filogeneticamente pode ser problemática, resultando em uma grande proporção de falhas de amplificação ou amplificações não específicas (Barbará *et al.*, 2007). Em plantas, *loci* conservados de SSR têm sido observados através de cultivares, subespécies e espécies relacionadas (Métais *et al.*, 2002)

Marcadores SSR são altamente polimórficos em diversos grupos vegetais quando comparados a outras classes, pois respondem questões relacionadas a fluxo gênico, análise de paternidade (Wright & Bentzen, 1994) e genética de populações naturais (Collevatti *et al.*, 2001). Com relação aos cultivares, diversos estudos com SSR têm sido feitos para investigar

suas origens e seus respectivos parentais. Benchimol *et al.* (2007) conseguiram inferir que a origem do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) se deu através de dois principais centros de domesticação (Mesoamericano e Andino). Em outro estudo realizado com avelã (*Corylus avellana* L.), Boccacci & Botta (2009) conseguiram identificar três áreas independentes de origem de domesticação, até então desconhecidas. Testolin *et al.* (2000), utilizando 26 *loci* de SSR, foram capazes de determinar a paternidade de mais de 10 cultivares de pêssegos e nectarinas. Uma análise de parentesco em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) demonstrou claramente que plantas com regiões cromossômicas indesejáveis foram selecionadas no passado, e que retrocruzamentos atuais podem ajudar a eliminar estas regiões do genoma (Akagi *et al.*, 1997).

CAPÍTULO 2

Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar a diversidade genética do grupo *Petunia integrifolia* através de marcadores microssatélite, tendo como objetivos específicos:

- Avaliar a variabilidade genética destes marcadores nas espécies e subespécies do grupo;
- Caracterizar a variabilidade genética entre diferentes variedades de *Petunia hybrida* através de sequências de DNA plastidial e marcadores microssatélites, e assim contribuir para o entendimento da origem da espécie comercial;
- Avaliar a transferabilidade de marcadores do tipo microssatélites desenvolvidos para *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* para a outra subespécie e para as demais espécies do grupo *P. integrifolia*.

CAPÍTULO 3

***Petunia integrifolia* complex and *Petunia hybrida* cultivars: molecular insights on purple-flowered ancestors of commercial hybrids**

Manuscrito a ser submetido para a revista *Annals of Botany*

***Petunia integrifolia* complex and *Petunia hybrida* cultivars: molecular insights on purple-flowered ancestors of commercial hybrids**

Ramos-Fregonezi, AMC¹; Fregonezi, JN¹; Segatto, ALA¹; Bonatto, SL²; Freitas, LB¹.

¹Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves 9500, PoBox 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil,.

²Genomic and Molecular Biology Laboratory, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001, Porto Alegre, RS, Brazil,

Running title: *Petunia hybrida* parents

Correspondence author: Loreta B. Freitas, Fax: 55 51 3308-9823; e-mail: loreta.freitas@ufrgs.br

1 **Background and Aims:** *Petunia hybrida* was reported to be an interspecific hybrid between
2 *P. axillaris* and *P. integrifolia*. However the designation *P. integrifolia* involves a complex of
3 closely related species leading uncertainly about the purple-flowered true parent.
4 Contributions to understanding the origin of commercial hybrids are necessary as well as the
5 relationships between species that form the integrifolia complex

6 **Methods:** Nuclear microsatellites were used to evaluate genetic variability and explore
7 genetic relationships in 13 natural populations of five closed related integrifolia complex
8 species: *P. bajeensis*, *P. inflata*, *P. integrifolia* subsp. *depauperata*, *P. integrifolia* subsp.
9 *integrifolia* and *P. interior*. Chloroplast markers also were used to identify possible purple-
10 flowered parental populations of *P. hybrida*.

11 **Key Results:** Most of the genetic variation (66%) occurred within populations. Considerable
12 variation was found within integrifolia complex species in terms of number of alleles,
13 expected heterozigosity (H_E) and allelic richness. Strong genetic similarity was found
14 between *P. inflata* and *P. interior*, as well as between *P. integrifolia* subspecies. *Petunia*
15 *bajeensis* proved to be genetically very different from the other species of integrifolia
16 complex and showed a low genetic diversity. *P. inflata* and *P. interior* populations showed
17 highest ancestry probability with *P. hybrida* cultivars.

18 **Conclusions:** The variation found in the microsatellites markers used in this study was
19 satisfactory to answer our goals. This study provides new molecular tools for future
20 population studies involving integrifolia complex species, especially those with higher
21 variation. Of the natural species studied, *P. inflata* and *P. interior* are the most probably
22 purple-flowered ancestors of *P. hybrida*.

23 **Key Words:** integrifolia complex, *Petunia hybrida*, microsatellites, parentage, population
24 genetics

25

1 **Introduction**

2
3 The genus *Petunia* Juss. belongs to the Solanaceae family and comprises about 14
4 natural species, many of them with a great economic interest. The name “Petunia” is known
5 worldwide through commercial species *Petunia hybrida* that moves millions of dollars in
6 floriculture trade. The history of the garden petunias began in the nineteenth century, when
7 the species *Salpiglossis integrifolia* Hook. and *Petunia violacea* Lindley (currently *P.*
8 *integrifolia* (Hook.) Schinz & Tell.) were transported from South America and introduced into
9 gardens of European countries between 1820s and 1830s (Sink, 1975). Individuals of *Petunia*
10 *nyctaginiflora* Juss. (= *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb.) were already
11 widely cultivated in this period and hybrids between these two species were rapidly obtained,
12 resulting in a wide variety of intermediate colors with exceptional value for gardeners
13 (Ferguson and Ottley, 1932). Since the early 1830s, the garden petunia has been subject of
14 genetic improvement in order to obtain different colors, shapes and size of flowers, including
15 polyploidy and double flowers (Stout, 1952). Besides the ornamental use, *P. hybrida* has
16 qualities which favor its use as a model system for scientific studies, especially in genetics:
17 facility of growth, relatively short life cycle, ease asexual propagation, large flowers and
18 leaves that allow studies of cytogenetic and biochemistry, producing abundant fruits and
19 seeds, high efficiency of genetic transformation and availability of mutants by insertion of
20 endogenous transposable elements (Gerats and Vandenbussche, 2005).

21 The garden petunias are among the most important ornamental plants in the global
22 context. The main producers of seeds in the world are the United States, Japan, and Germany,
23 although the parental species are native of southern South America. The seeds sold in Brazil
24 are imported and there are no breeding programs for hybrid or conservation programs for
25 native species (Freitas *et al.*, 2008). Currently all major seed-producing companies have their
26 own series of petunias. Unfortunately, there is no a worldwide unified system of identification

1 and organization of commercial varieties, from the oldest lineages to the latest cultivars
2 developed and each country or institution in charge has a different system.

3 Many authors have attempted to elucidate the petunia's introduction history into
4 Europe and the origin of true parents of *Petunia hybrida*, and some of them consider the
5 possibility of *Petunia inflata* R.E.Fr. (described by Fries in 1911) also be one of the parental
6 (Ferguson and Ottley, 1932; Stout, 1952; Sink, 1975; Sink, 1984). However, the identification
7 of purple-flowered parental is complicated because the natural populations of *P. integrifolia*
8 species form a broad complex group with similar general floral characters, in spite of exhibit
9 differences in habitat, geographic distribution and minor details in floral and vegetative
10 structures, leading to many changes in taxonomy in species delimitation over time (Fries,
11 1911; Smith and Downs, 1966; Wijsman, 1982; Ando and Hashimoto, 1998).

12 *Petunia* populations with purple flowers were described for the first time as
13 *Salpiglossis integrifolia* by Hooker (1831). In 1833 Lindley published a description of a plant
14 with similar characteristics under the name *Petunia violacea* (Stout, 1952). Fries (1911)
15 described *P. inflata* as independent species and recognized a new variety, *P. violacea*
16 *depauperata*, which has more prostrate grow habit and shorter pedicel than the type species.
17 Schinz and Thellung (1915) noted that the correct nomenclature (according to the
18 International Rules of Nomenclature) should be *Petunia integrifolia* (Hook) Schinz & Thell.
19 Smith and Downs (1966), regarded *P. inflata* as a synonym of *P. integrifolia* and recognized
20 populations growing in the sandy soils of beaches in Santa Catarina Island, in Santa Catarina
21 Brazilian State, with elongated stems bearing narrow and glabrous leaves, as a different
22 species, named *P. littoralis* Smith & Downs. Wijsman (1982) recognized *P. integrifolia* as a
23 single species and provided subspecies names as: *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, associated
24 with the Pampean region (southern Rio Grande do Sul and Uruguay), and *P. integrifolia*
25 subsp. *inflata* occurring in Paraguay, northeastern Argentina and western Brazil. In the

1 subsequent years, three other related *taxa* to *P. integrifolia* were elevated to species status:
2 Ando and Hashimoto (1996) termed *P. interior* those populations that had anthers with
3 differentiated thecae and trichotomic ramifications, and in 1998 these same authors described
4 *P. riograndensis* and *P. bajeensis* based on differences in size of the flower, stamens, shape of
5 the corolla tube and additional vegetative characters.

6 Recent molecular data, based on cpDNA sequence, suggests that the different
7 morphologies of the integrifolia complex comprise five distinct genetic lineages (our group,
8 unpublished data). In this work we adopted the most recent classification, based also on
9 molecular data (Stehmann *et al.*, 2009) with five taxonomic entities in the integrifolia
10 complex, as follows: *Petunia bajeensis* T. Ando & Hashim. is characterized by leaves with
11 prominent venation, purple corolla mouth, reniform in frontal view and urceolate in lateral
12 view. This species can be found only in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil, in
13 the cities of Bajé and Lavras do Sul growing along roadside slopes (Ando and Hashimoto,
14 1998). *Petunia inflata* R.E.Fr. can be recognized by its ascendant habit, inflexed pedicel in the
15 fruiting state, the slightly constricted tube in the purple corolla and geographic distribution,
16 that includes Paraguay, northeast Argentina and extreme west of southern Brazil (Ando *et al.*,
17 2005a). The species *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. is recognized mainly by the
18 following suite of morphological characters: decumbent stems, elliptic or obovate, funnel
19 form purple corolla, anthers completely opened (flat) after dehiscence and deflexed pedicels
20 in the fruiting state. This taxon can be divided in two subspecies: *P. integrifolia* (Hook.)
21 Schinz & Thell. subsp. *depauperata* (R.E.Fr.) Stehmann, occupying the quaternary deposits
22 along the coast, from Uruguay to Florianópolis, in Santa Catarina state (Brazil) and *P.*
23 *integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. subsp. *integrifolia* (R.E.Fr.) Stehmann, which is
24 widespread in the Pampean region of Argentina and Uruguay, as well as in the southern
25 continental part of Rio Grande do Sul. According to Stehmann *et al.* (2009) *P. riograndensis*

1 is here considered a synonym of *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*. Finally *P. interior* T. Ando
2 & G. Hashim. can be found in the northwestern Rio Grande do Sul and western Santa
3 Catarina in Brazil and in Misiones Province, Argentina. This species is extremely similar to
4 *P. integrifolia*, from which it can be distinguished only by minor characters such as the stem
5 often divided into three branches around the node bearing the first flower and the channeled
6 lobes of the dehisced anthers (Ando *et al.*, 2005a). The geographic distribution of the
7 *integrifolia* complex is shown in the Figure 1.

8 Molecular studies in *Petunia* indicate rapid divergence and speciation, and apparently
9 the molecular markers used do not seem to be powerful enough to resolve close relationships
10 (Ando *et al.*, 2005b; Kulcheski *et al.*, 2006). Specially, the nuclear markers used so far show
11 little resolution among species (Kulcheski *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).
12 In this context microsatellites markers appears as good candidates due the rapid evolution that
13 can allows comparisons among closely related taxa and attempt to elucidate the mechanisms
14 involved in population divergence and speciation processes (Noor and Feder, 2006). Several
15 studies have shown the possibility of using primer pairs designed for other species belonging
16 to the same genus (Isagi and Suhandono, 1997; Cipriani *et al.*, 1999), or even among different
17 genera (White and Powell, 1997; Roa *et al.*, 2000; Zucchi *et al.*, 2002).

18 The aim of this study is to access the overall genetic variability of the taxa currently
19 accepted in the *integrifolia* complex through microsatellite markers. Besides some *P. hybrida*
20 specimens were included in the study, with the purpose to identify possible purple-flowered
21 parental populations of *P. hybrida*, using also sequence of plastid markers, well employed and
22 characterized in natural *Petunia*. This is the first study that uses microsatellite markers in
23 natural *Petunia* populations.

24

25 **Materials and Methods**

1 **Population sampling and DNA extraction**

2
3 This study was conducted in natural populations of *Petunia integrifolia* complex.
4 Were sampled three populations of *P. inflata* (IN1, IN2, and IN3), *P. interior* (TE1, TE2 and
5 TE3), *P. integrifolia* subsp. *depauperata* (LI1, LI2 and LI3), *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*
6 (GR1, GR2 and GR3) and one of *P. bajeensis* (BA) (Fig.1). Twenty-two specimens of *P.*
7 *hybrida* (HYBR) were acquired in local market covering the two main classifications:
8 Grandiflora and Multiflora. The first type refers to more compact plants with a limited
9 number of flowers, very large leaves and corolla diameter varying between approximately 7
10 and 10 cm. The second type includes more branched plants, with large number of small leaves
11 and flowers. The corolla diameter varies between 3 and 6.5 cm. The varieties of *P. hybrida*
12 were treated as a unique group (or population). This group, obviously, does not reflect a
13 natural population since it is formed by different cultivars and therefore basic population
14 statistics were not performed. The complete dataset, including all groups, was used only for
15 comparative analyses. Dried leaves were frozen with liquid nitrogen and ground to a fine
16 powder, and DNA was extracted from the powdered leaves with cetyltrimethyl ammonium
17 bromide (CTAB) as described by Roy *et al.* (1992).

18 19 **Plastid DNA sequence**

20 Polymerase chain reaction (PCR) was employed to amplify the non-coding plastid
21 *trnH-psbA* and *trnS-trnG* intergenic spacers using primers that were described by Sang *et al.*
22 (1997) and Hamilton (1999), respectively. Amplifications were performed in 25- μ L reactions
23 consisting of 1 U *Taq* polymerase (Invitrogen), 1 x PCR buffer (Invitrogen), 0.2 mM each
24 dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each primer and approximately 20 ng of template genomic
25 DNA. The amplification conditions for *trnH-psbA* were as follows: 3 min at 94 °C, 30 cycles
26 with 1 min at 94 °C, 1 min at 58 °C, and 1 min at 72 °C, with a final 10-min extension step at

1 72 °C. For *tmS-tmG* the conditions were the same, except for the annealing temperature,
2 which is 50 °C. The PCR products were checked by horizontal electrophoresis in 1% agarose
3 gel, stained with GelRed (Biotium), and purified with PEG 20% (Dunn and Blattner, 1987).
4 Sequencing was performed with a MegaBACE 1000 automatic sequencer (GE-Healthcare), in
5 accordance with the manufacturer's specifications. All sequences were submitted to GenBank
6 database (for more information about Genbank numbers see Table S1 in Supplementary
7 Material).

8

9 **Microsatellites**

10 The seven microsatellites markers used in this study were isolated from *P. integrifolia*
11 subsp. *integrifolia* (Kriedt *et al.* in press). Each locus was amplified by PCR and fluorescently
12 labeled by the addition of M13 tail. The PCRs were conducted with a standardized protocol
13 for all loci in a final volume of 15 µL containing manufactured 0.5 U of Platinum *Taq* DNA
14 polymerase (Invitrogen), 1× PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 2.0 mM of MgCl₂, 0.013
15 µM of forward M13 labeled primers and 0.2 µM of reverse and M13 fluorescent-labeled
16 primers (FAM, NED or HEX) and approximately 10 ng of genomic DNA was used as
17 template. The Table 1 lists the sequences and annealing temperature of each primer pair.
18 Products were run on a MEGABACE 1000 (GE-Healthcare) automated sequencer, with an
19 ET-ROX 550 internal size ladder (GE-Healthcare). Fragment length was determined using
20 GENETIC PROFILER 2.0 (GE-Healthcare).

21

22 **Data analysis**

23 **Analysis of cpDNA sequence.** With the goal to verify the relationships among the varieties
24 of *P. hybrida* and natural populations of *Petunia* species, we generate sequences of the
25 spacers described above for the varieties and added to the data generate in other studies

1 performed by our working group (unpublished data). The plastid regions were combined into
2 a single concatenated set and aligned manually with the assistance of Genedoc (Nicholas et
3 *al.*, 1997). All the contiguous insertion/deletion events (indels) were treated as one mutational
4 step (Simmons *et al.*, 2001). Evolutionary relationships between haplotypes were estimated
5 with the Network 4.1.0.9 program (available at www.fluxus-engineering.com) using the
6 Median-Joining method ($\epsilon = 0$, Bandelt *et al.*, 1999).

7

8 **Analysis of nuclear microsatellite data.** With the purpose of characterize the microsatellite
9 loci in integrifolia complex species, the number of alleles (A), expected heterozygosity (H_E),
10 observed heterozygosity (H_O) and inbreeding coefficient (F_{IS}) were calculated for each locus
11 using Arlequin package version 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) and FSTAT (Goudet, 1995).
12 Each natural population was also characterized by the observed allelic richness, observed
13 heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E) and the inbreeding coefficient (F_{IS}). The
14 inbreeding coefficient (F_{IS}) was calculated per locus and populations to determine deviations
15 from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). Frequencies of null-alleles were estimated in
16 CERVUS 3.0.3 (Marshall *et al.*, 1998). In order to explore the power of our marker loci we
17 calculated the probability of identity, P_{ID} (Waits *et al.*, 2001), also using CERVUS 3.0.3. The
18 P_{ID} is defined as the probability of two individuals randomly sampled has the same genotypes
19 at all loci, given the sample size and observed levels of diversity. It is estimated for each
20 locus, but can be easily combined for a set of loci. The lower the P_{ID} value combined result,
21 the greater is the power of the marker set to perform analyses, especially the parentage ones.
22 Genetic differentiation between populations and species was assessed using an analysis of
23 molecular variance (AMOVA) with Arlequin 3.11. Population subdivision was calculated by
24 means of F -statistic analogues (Φ -statistics). Significance of these statistics was assessed
25 using 2×10^4 permutations. Pairwise population genetic differentiation was estimated with both

1 F_{ST} and R_{ST} according to two different microsatellite mutation models: the infinite alleles
2 model (IAM) and the stepwise mutation model (SMM), respectively. We used both models
3 because there is no consensus on whether the F_{ST} and R_{ST} - based approach is better at
4 handling microsatellite data (Otero-Arnaiz *et al.*, 2005).

5 With the aim of depict relationships between natural populations and varieties of *P.*
6 *hybrida* in a graphical way, a matrix based on shared alleles among populations was
7 calculated, bootstrapping the original data 1000 times, in MICROSAT program (Minch *et al.*,
8 1998). After this, a tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) (Saitou and Nei,
9 1987) method with MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007).

10 The Bayesian analysis software STRUCTURE ver. 2.3.3 was used to assess
11 population structure and ancestry (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003). As gene flow is
12 expected among the natural populations and is also expected that some populations share
13 alleles with varieties for *P. hybrida*, the admixture model using correlated allele frequencies
14 was implemented. The analyses including all sampled individuals of each population as a
15 prior incorporated into the STRUCTURE algorithm and varieties of *P. hybrida* were put in a
16 distinct group. The optimum number of groups (K) was determined by varying the value of K
17 from 1 to 14 and running the analysis ten times per K value, in order to determine the
18 maximum value of posterior likelihood [$\ln P(D)$]. Each run was performed using 2.5×10^5 burn-
19 in periods and 10^6 MCMC repetitions after burn-in. We determined the most probable K
20 value using the maximum value of ΔK according to Evanno *et al.* (2005).

21

22 **Results**

23 **Genetic diversity indices**

24 We analyzed seven microsatellites loci and five were polymorphic in integrifolia
25 complex species, with up to 4 alleles per locus in *P. bajeensis*, 7 in *P. integrifolia* subsp.

1 *integrifolia*, 8 in *P. inflata* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata* and up to ten alleles per locus
2 in *P. interior* (Table 1). The average alleles found for each species was 2.28 for *P. bajeensis*,
3 3.14 for *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, 3.28 for *P. integrifolia* subsp. *depauperata*, 4.28
4 for *P. inflata* and 4.57 for *P. interior*. The locus PID1G6 was fixed for a single allele in *P.*
5 *bajeensis*, as well as PID3G5 for *P. inflata* and *P. interior*, and PID4C6 for *P. integrifolia*
6 subsp. *integrifolia* and *P. interior*. Genetic diversity evaluated over all loci was generally
7 higher in populations of *P. inflata* e *P. interior* than in other species when estimated via allelic
8 size range, number of alleles and allelic richness (Tables 1 and 2). Null alleles were detected
9 in five loci, with higher frequencies in PID3H7 (0.6881) and PID1G6 (0.6520). The other
10 values ranged from 0.02 to 0.1. The combined probability of identity (P_{ID}) for seven
11 microsatellites loci was 5×10^{-5} for the *integrifolia* complex species, thus indicating a low
12 probability that two unrelated individuals drawn from each of these two species' gene pools
13 will share the same multi-locus genotype. Tests for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)
14 indicated heterozygote deficits (positive F_{IS} values significantly different from zero) for all
15 populations of *P. interior* and in two populations of *P. inflata* (IN1, IN2) and *P. integrifolia*
16 subsp. *integrifolia* (GR1, GR2) whereas for *P. bajeensis* the F_{IS} values indicates excess of
17 heterozygotes (negative F_{IS} value significantly different from zero) (Table 2).

18

19 **Genetic differentiation among populations**

20 The AMOVA indicated that only 12% of the genetic variation was due to differences
21 between species and subspecies, 22% was due to differences among populations within
22 groups, and almost 66 % was due to within-population variation (Table 3). Pairwise
23 population differentiation under the IAM and SMM mutation models revealed similar patterns
24 with the strongest differentiation within-population ($\Phi_{ST} = 0.342$, $R_{ST} = 0.432$; $P < 0.05$).
25 However, population differentiation under the SMM mutation models revealed higher
26 differentiation among groups (23%) than among populations within groups (20%). Based on

1 these values it was considered appropriated to use the microsatellites genotype data even for
2 to investigate relationships between integrifolia complex species.

3

4 **Genetic divergence and relationships among integrifolia complex populations and *P.*** 5 ***hybrida* varieties**

6 A neighbor-joining tree of populations based on shared alleles (Fig. 2) clustered the 13
7 natural populations and the varieties of *P. hybrida* in two major groups. The first group
8 comprises more closed populations (GR2, GR3, LI2, LI3, LI1, IN3, GR1, IN1, TE1, IN2 and
9 TE2) and in a broad sense indicates the genetic proximity of integrifolia complex taxa.
10 Almost all populations of *P. integrifolia* subsp. *depauperata* and *P. integrifolia* subsp.
11 *integrifolia* were clustered, likewise the populations of *P. inflata* and *P. interior*. One
12 exception was observed in IN3 which was closed related to GR1. The second group includes
13 the three most divergent populations (BA, TE3 and HYBR) and surprisingly TE3 was very
14 divergent from the remaining natural populations of *P. interior*, grouping with *P. hybrida*.

15 The ΔK statistic (Fig. 3) revealed $K=2$ to be the optimum value and $K=6$ as the second
16 most probable number of genetic clusters in the data. The second result provided a
17 substructure within the integrifolia complex mentioned earlier and reflects the possible
18 genetic groups corresponding to species and subspecies of the complex, including the genetic
19 group of varieties of *P. hybrida*. The figure 4 shows the proportion of ancestry of each
20 population and individual for $K=2$ (A) and $K=6$ (B). These analyses showed that *P. bajeensis*,
21 varieties of *P. hybrida* well as TE3 are the most divergence in terms of genetic ancestry. This
22 becomes very clear in the structure result with $K=2$ (Fig. 4A) which grouped these divergent
23 populations, placing in another group the other populations that are more closed related. The
24 admixture proportions for $K=6$ (Fig. 4B) show that populations of *P. integrifolia* subsp.
25 *depauperata* and *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* are similar among themselves and different

1 from the other species. In the same way, populations of *P. inflata* and *P. interior* (except TE3)
2 show more proportions of ancestry shared into their populations than others. Among all
3 populations of the integrifolia complex sampled in this study, TE3 appears to be the most
4 similar to *P. hybrida* group.

5 The combined plastid sequences generated of 22 *P. hybrida* cultivars resulted in three
6 haplotypes (V1, V2 and V3) distributed along different *Petunia* species according to genetic
7 relationships presented in network (Fig. 5). Eleven cultivars presented the haplotype V1
8 which also was found in natural populations of *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* and *P.*
9 *axillaris*. This haplotype was connected to median vector and seems to be more ancestral
10 haplotype according to its localization on the network. The second haplotype (V2) was
11 presented in only one cultivar of *P. hybrida* and in some individuals of *P. altiplana*, species
12 that occurs in the highlands of southern Brazil (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010). Although this
13 species also have purple flowers, it is not belong to integrifolia complex since that its
14 geographic distribution and morphological characters are different. However, the haplotype
15 V2 was related to haplotypes presented in *P. interior* whose populations can be found in
16 highlands. The haplotype V3 was detected in ten cultivars and showed genetic affinities with
17 Pampa biome species, being shared with *P. exserta* and *P. axillaris*. Haplotypes related with
18 V3 were also found in *P. axillaris*, species of widespread geographical distribution in the
19 Pampa, considered the white-flowered parental of the garden petunias.

20

21 **Discussion**

22

23 **Genetic diversity in the integrifolia complex**

24 The seven combined microsatellites markers proved to have a sufficient variation
25 amount to answer our questions and can be confirmed to by the P_{ID} value (5×10^{-5}). Although
26 two loci (1G6 and 3H7) showed a high value of null alleles, the other five showed satisfactory

1 variation and three of them are highly variable and may be used in future population studies
2 of species within the integrifolia complex. The average of allele numbers and heterozygosity
3 found for the species were equal or greater when compared to other works with related genera
4 (Ashkenazi *et al.*, 2001; Nunome *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2010). A comparison of these
5 values is difficult to make, given that microsatellites population studies are scarce in *Petunia*-
6 related natural groups.

7 The lower genetic diversity values was found in *P. bajeensis* and the highest diversity
8 was found in *P. inflata* and *P. interior*, in terms of allele numbers per locus and allele
9 richness. This variation is not expected, since that the source species may have high genetic
10 variation than others (Barbará *et al.*, 2007). Although levels of genetic diversity are high for
11 the most taxa of integrifolia complex, a deficiency of heterozygotes was identified in some
12 populations (Table 2). The significant positive values of F_{IS} indicate levels of inbreeding and
13 it cannot be result of mating system, because the integrifolia complex species are self-
14 incompatible (Sims and Robbins, 2009). The deviations from HWE could be result of small
15 number of individuals sampled in these populations leading to a biased result. Nonetheless,
16 the natural landscape has undergone extensive and severe changes, due to increase in planting
17 areas, especially monoculture, and urban areas. As a consequence, populations have been
18 fragmented and disturbed and may deviate from HWE. Furthermore, these values can be
19 explained due to null alleles influencing deviations in F_{IS} (Jarne and Lagoda, 1996).

20 An exception to the standards mentioned above was *P. bajeensis* which presented
21 significant negative values of F_{IS} indicating excess of heterozygotes. Almost all individuals
22 were heterozygotes for two loci (1G6 and 3C4). This species seems to be rare with few know
23 populations so far in two municipality areas with a small number of individuals per
24 population (Ando and Hashimoto, 1998, and personal observations). The population sampled
25 in this work is naturally small (almost all extant plants were sampled), and thus it is subject to

1 stochastic factors as changing in allele frequencies and fixation of alleles that could resulting
2 in deviations from HWE (Kimura and Crow, 1964; Ellstrand and Elam, 1993).

3

4 **Population genetic structure**

5 Our study detected great genetic divergence within populations and this result is
6 compatible with the evolution of microsatellites markers. These markers exhibit high
7 mutation rates ($4N_e\mu > 1$) and usually display high levels of heterozygosity (Hedrick, 1999).
8 The values for Φ_{ST} and R_{ST} were slightly different. Therefore, statistics based in IAM, such
9 Φ_{ST} , may underestimate differentiation if mutation is largely stepwise (Slatkin, 1995),
10 whereas R_{ST} may overestimate differentiation if microsatellites mutate by large insertions or
11 deletions (Di Rienzo *et al.*, 1994). So, we can expect higher values of R_{ST} compared to Φ_{ST} .
12 The shift of differentiation levels among species and populations showed by R_{ST} when
13 compared with Φ_{ST} can be explained by the wide variation between allele size range in
14 different taxa of integrifolia complex and under the SMM model the indice is estimated by
15 variance of the length of the alleles.

16

17 **Relationships among integrifolia complex populations**

18 The taxonomy of the genus *Petunia* was nearly concordant in literature for the most
19 taxa. However, the morphological circumscription of species related to *P. integrifolia* is not
20 easy as already explained above. The genetic relationships among populations visualized in
21 the NJ tree and Bayesian analysis were completely consistent with this showing a very close
22 relationship between populations. Our results confirmed the pronounced divergence of *P.*
23 *bajeensis* from the others taxa of the integrifolia complex. As discussed earlier, this species
24 has a restricted geographical distribution, but apparently there are no physical barriers causing
25 reproductive isolation. Even so, our markers demonstrate a very different gene pool when

1 compared to populations of other species (Fig. 4) demonstrating that gene flow with other
2 taxa is very low. Additional studies such reproductive biology and detection of effective
3 pollinators are necessary for elucidate the causes of this isolation.

4 All results indicate a high genetic similarity between *P. integrifolia* subsp.
5 *depauperata* and *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* and this is in agreement with the taxonomy
6 classification in subspecies level. The morphological distinction between these two
7 subspecies is extremely difficult. A molecular study with plastid spacers shows that these
8 subspecies are genetically closed lineages separated by few mutational steps, probably in a
9 very recent speciation process (our group, unpublished data). This also can be verified in our
10 network of haplotypes and in the Bayesian analyses that shown a shared ancestry (Figs 4 and
11 5). Besides, *P. integrifolia* subsp. *depauperata* occupies an area of geological dating at most
12 400 thousand years (Menegat *et al.*, 1998) demonstrating to be a young genetic lineage. Very
13 few populations occur in sympatry with *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* in older geological
14 areas, corroborating with recent speciation process.

15 In the same way, our results displayed strong genetic similarity between *P. inflata* and
16 *P. interior* populations (except TE3). Nevertheless, unlike *P. integrifolia* subspecies, these
17 two entities are classified as two different species. In this case the morphological traits seem
18 to be sufficient to separate these two taxa, but the microsatellite markers do not exhibit a clear
19 genetic separation. Ando *et al.* (2005a) reported the existence of a hybrid zone in
20 northwestern Rio Grande do Sul for these two species showing, over again, the genetic
21 proximity of these taxa.

22 Among *P. interior* populations studied, one of them (TE3) showed a very different
23 genetic composition, according to the tree and Bayesian analyses. Genetically disrupted
24 populations already was reported by cpDNA data (our group, unpublished data), and this
25 disruption could be a consequence of hybridization events in the past among some *P. interior*

1 populations with highland *Petunia* species. Some of these populations can be seen on the
2 network (Fig. 5) and, perhaps, TE3 may belong to this group of divergent populations.

3 All molecular markers used so far showed the same difficult to clarify close
4 relationships in the genus *Petunia* (Ando *et al.*, 2005b; Kulcheski *et al.*, 2006; Chen *et al.*,
5 2007; Zhang *et al.*, 2008). Our markers also indicated that *Petunia* is a recent genus
6 presenting incipient species, especially those related to integrifolia complex.

7

8 **Genetics relationships among integrifolia complex populations and cultivars of *P.*** 9 ***hybrida***

10 The investigation of true parents of *P. hybrida* has been done over the past 80 years, at
11 least (Ferguson and Ottley, 1932; Stout, 1952; Sink, 1975; Sink, 1984) and this identification
12 is very hard, since information in literature is scarce and often vague. The petunias growing in
13 European gardens in the 1830s were transported from South America, but the localities source
14 is unknown making it difficult to identify the parental species. The most accurate information
15 about the first species of *Petunia* to be collected mentioned the mouth of the Plata River
16 (Argentina) as a source of *Petunia nyctaginiflora* (*P. axillaris*) and only “Argentina” as a
17 source of *Salpiglossis integrifolia* (*P. integrifolia*) (Ferguson and Ottley, 1932; Griesbach,
18 2007). Our attempt was to make a preliminary investigation with molecular markers,
19 including all purple-flowered species reported in the literature as probable parents and also
20 related species that comprise the integrifolia complex.

21 The sample of varieties was found to be genetically divergent from natural populations
22 included in this work. We did not expect a high similarity with native populations as it is
23 know that throughout the development of *P. hybrida*, many crosses, backcrosses and other
24 reproductive experiments could lead a loss of identity with the native ancestors. In addition,
25 the *P. hybrida* sampled, composed of individuals chosen at random, exhibit lower levels of

1 diversity in the microsatellite loci studied (data not shown) than native populations. Studies of
2 genetic diversity of S-alleles found in the cultivate forms fewer than ten alleles (Robbins *et*
3 *al.*, 2000) compared to that of the natural populations, which may have 40 or more distinct S-
4 alleles (Tsukamoto *et al.* 2003). This reflects the bottleneck of plant breeding in which
5 relatively few individuals were used in the initial interspecific hybridizations. Moreover, the
6 low allelic diversity suggests that subsequent hybridizations and introgressions from wild
7 relatives have been relatively infrequent during the 150 years or so of *P. hybrida* cultivation
8 (Sims and Robbins, 2009).

9 A fraction of similarity was observed between some cultivars and individuals of TE3,
10 a population of *P. interior* localized in north of Rio Grande do Sul. These data support the
11 hypothesis that *P. inflata* populations could have been one of the ancestors of the some
12 varieties, since the populations of this region have long time been described as *P. inflata*. The
13 other possible purple-flowered parental of *P. hybrida* described in the literature is *P.*
14 *integrifolia*, but the sampled populations of this species didn't show probability of ancestry
15 with these cultivars. Even so, we cannot completely dismiss the possibility of *P. integrifolia*
16 subsp. *integrifolia* be a parent, being necessary to include other populations from different
17 geographic regions to confirm this assumption.

18 Data of chloroplast, which included a larger sample of *Petunia* genus, showed genetic
19 distinct haplotypes from different species shared by cultivars. In *Petunia*, chloroplast is
20 inherited through seeds and the different haplotypes must indicate that initial crossing were
21 carried out in both directions. However, in the three haplotypes found in varieties the higher
22 frequency of sharing occurs with *P. axillaris* (V1 and V3) and this can be explain by the
23 unilateral incompatibility reported in interspecific crosses. Mather (1943) described
24 successful in this kind of crosses only with *P. axillaris* as the female parent. Stout (1952)
25 through hybridization experiments with *P. axillaris* and *P. integrifolia* concluded that female

1 individuals of *P. axillaris* are fertile with other species, but *P. integrifolia* is sterile with
2 pollen from *P. axillaris*. Although we found a higher frequency of haplotypes of *P. axillaris*
3 in varieties, we must also consider the existence of shared *P. integrifolia* haplotypes in V1.
4 Thus, we cannot reject the possibility of *P. integrifolia* be the donor seed in some cases, since
5 the breakdown of incompatibility in *Petunia* can be obtained (Richards, 1997).

6 The sharing of V2 with *P. altiplana* was an unexpected and interesting result, because
7 this species is not related to integrifolia complex neither is distributed in regions described for
8 the source species of *P. hybrida* parents. So, there is a possibility (even small) that this
9 species have been used as female parental in crosses for obtain some hybrids. Nevertheless,
10 the V2 haplotype is related to others found in *P. interior* individuals, indicating that this
11 specific cultivar may be derived from *P. interior*. Perhaps the V2 haplotype is naturally
12 present in populations of both species, since is known that hybridizations occurred between
13 these species, as previously explained. In this sense, we not detected the V2 haplotype in *P.*
14 *interior* individuals probably due to insufficient populations sampling.

15 Our attempt to use molecular markers in the investigation of purple-flowered parental
16 of *P. hybrida* not appointed to a single species, therefore we had intended to perform a
17 preliminary investigation in a broad sample. Though, our data allow us, with confidence,
18 discard some taxa and point some populations and geographic regions. The *P. bajeensis* and
19 *P. integrifolia* subsp. *depauperata* populations and the sampled populations of *P. integrifolia*
20 subsp. *integrifolia* have been *P. hybrida* ancestors is very unlikely, according to genetic data
21 present here, as well as historical descriptions of sampling sites. We concluded that *P. inflata*
22 and *P. interior* populations would be subjects for future studies, and may be also different and
23 more distant *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* populations, located easternmost from our
24 samples, in the argentine regions surrounding Uruguay and Paraná Rivers.

25

1 **Conclusions**

2 The variation found in the microsatellites markers used in this study was satisfactory
3 to answer our goals. Our study also provides new molecular tools for future population
4 studies involving *P. inflata* and *P. interior* and new insights about *P. hybrida* ancestors
5 identification. Given the advantages of using microsatellites, we believe that this marker type
6 will help in understanding the importance of evolutionary factors shaping populations genetic
7 variation and structure in integrifolia complex species and, perhaps, other *Petunia* species.

8

9 **Literature cited**

- 10 **Albrecht E, Escobar M, Chetelat RT. 2010.** Genetic diversity and population structure in
11 the tomato-like nightshades *Solanum lycopersicoides* and *S. sitiens*. *Annals of Botany*
12 **105:** 535-554.
- 13 **Ando T, Hashimoto G. 1996.** A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from interior
14 Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* **48:** 217-223.
- 15 **Ando T, Hashimoto G. 1998.** Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Rio
16 Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* **50:** 483-492.
- 17 **Ando T, Ishikawa N, Watanabe H, Kokubun H, Yanagisawa Y, Hashimoto G, Marchesi**
18 **E, Suárez E. 2005a.** A morphological study of the *Petunia integrifolia* complex
19 (Solanaceae). *Annals of Botany* **96:** 887–900.
- 20 **Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E,**
21 **Suárez E, Basualdo IL. 2005b.** Phylogenetic analysis of *Petunia sensu* Jussieu
22 (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany* **96:** 289-297.
- 23 **Ashkenazi V, Chani E, Lavi U, Levy D, Hillel J, Veilleux RE. 2001.** Development of
24 microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting
25 analyses. *Genome* **44:** 50–62.
- 26 **Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific
27 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16:** 37-48.

- 1 **Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C. 2007.** Cross-species
2 transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*
3 **16:** 3759-3767.
- 4 **Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G,**
5 **Marchesi E, Bullrich L, Ando T. 2007.** Phylogenetic analysis of the genus *Petunia*
6 (Solanaceae) based on the sequence of the *Hfl* gene. *Journal of Plant Research* **120:**
7 385–397.
- 8 **Cipriani G, Lot G, Huang WG, Matarazzo MT, Peterlunger E, Testolin R. 1999.** AC/GT
9 and AG/CT microsatellites repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation,
10 characterization and cross species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied*
11 *Genetics* **99:** 65-72.
- 12 **Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. 1994.**
13 Mutational processes at simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings*
14 *of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91:** 3166–3170.
- 15 **Dunn IS, Blattner FR. 1987.** Sharons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination
16 deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*
17 **15:** 2677-2698.
- 18 **Ellstrand NC, Elam DR. 1993.** Population genetic consequences of small population size:
19 implications for plant conservation. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and*
20 *Systematics* **24:** 217-242.
- 21 **Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals
22 using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14:** 2611–
23 2620.
- 24 **Excoffier LGL, Laval G, Schneider SS. 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software
25 package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1:**
26 47-50.
- 27 **Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003.** Inference of population structure using
28 multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164:**
29 1567–1587.
- 30 **Ferguson MC, Ottley AM. 1932.** Studies on *Petunia* III. A redescription and additional
31 discussion of certain species of *Petunia*. *American Journal of Botany* **19:** 385-405.

- 1 **Freitas LB, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR. 2008.** Petúnias-de-jardim. In: Barbieri RL,
2 Stumpf ERT. eds. *Origem e Evolução de plantas cultivadas*. Brasília: Embrapa, 707-
3 926. (English version *in press*).
- 4 **Fries RE. 1911.** Die Arten der Gattung *Petunia*. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens*
5 *Handlingar* **46**: 1-72.
- 6 **Gerats T, Vandebussche M. 2005.** A model system for comparative research: *Petunia*.
7 *Trends in Plant Science* **10**: 251-256.
- 8 **Goudet J. 1995.** FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *The*
9 *Journal of Heredity* **86**: 485-486.
- 10 **Griesbach RJ. 2007.** *Petunia Petunia x hybrida*. In: Anderson NO. ed. *Flower Breeding and*
11 *Genetics - Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*. New York:
12 Springer, 301-336.
- 13 **Hamilton MB. 1999.** Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic
14 regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* **8**: 513-525.
- 15 **Hedrick PW. 1999.** Highly variable loci and their interpretation in evolution and
16 conservation. *Evolution* **53**: 313-318.
- 17 **Hooker WJ. 1831.** *Salpiglossis integrifolia*. Entire-leaved *Salpiglossis*. *Curtis's Botanical*
18 *Magazine* **58**: t. 3113.
- 19 **Isagi Y, Suhandono S. 1997.** PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus*
20 *myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* **6**:
21 897-899.
- 22 **Jarne P, Lagoda P. 1996.** Microsatellites: from molecules to populations and back. *Trends in*
23 *Ecology and Evolution* **11**: 424-429.
- 24 **Kimura M, Crow JF. 1964.** The number of alleles that can be maintained in a finite
25 population. *Genetics* **49**: 725-738.
- 26 **Kriedt RA, Ramos-Fregonezi AMC, Beheregaray LB, Bonatto SL & Freitas LB (in**
27 **press).** Isolation of microsatellite markers for *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*
28 (Solanaceae), a Brazilian Coastal Plain species. *Molecular Ecology Resources*.

- 1 **Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano**
2 **FM, Freitas LB. 2006.** Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae).
3 *Genetica* **126**: 3-14.
- 4 **Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stheman JR, Salzano FM, Bonatto**
5 **SL & Freitas LB 2010** Diversification of plant species in a subtropical region of
6 eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia*
7 (Solanaceae). *Molecular Ecology*, in press. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04871.x
- 8 **Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. 1998.** Statistical confidence for
9 likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**: 639-
10 655.
- 11 **Mather K. 1943.** Specific differences in *Petunia*. *International Journal of Genetics* **45**: 215-
12 235.
- 13 **Menegat R, Porto ML, Carraro CC, Fernandes LAD. 1998.** *Environmental Atlas of Porto*
14 *Alegre*. Porto Alegre: University Press UFRGS, 140pp.
- 15 **Minch E, Ruiz-Linares A, Goldstein DB, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. 1998.**
16 *MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite*
17 *allele data*. Palo Alto, CA: Department of Genetics, Stanford University.
- 18 **Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW. 1997.** GeneDoc: Analysis and visualization of
19 genetic variation. *European Molecular Biology Network Journal* **4**: 1-4.
- 20 **Noor MAF, Feder JL. 2006.** Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews*
21 *Genetics* **7**: 851-61.
- 22 **Nunome T, Suwabe K, Iketani H, Hirai M. 2003.** Identification and characterization of
23 microsatellites in eggplant. *Plant Breeding* **122**: 256-262.
- 24 **Otero-Arnaiz A, Casas A, Hamrick JL, Cruse-Sanders J. 2005.** Genetic variation and
25 evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley,
26 central Mexico. *Molecular Ecology* **14**: 1603-1611.
- 27 **Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using
28 multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- 29 **Richards AJ. 1997.** *Plant Breeding Systems*. London: Chapman & Hall. 529p.

- 1 **Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C,**
2 **Tohme J. 2000.** Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*)
3 (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship.
4 *American Journal of Botany* **87**:1647-1655.
- 5 **Robbins TP, Harbord RM, Sonneveld T, Clarke K. 2000.** The molecular genetics of self-
6 incompatibility in *Petunia hybrida*. *Annals of Botany* **85**: 105–112.
- 7 **Roy A, Frascaria N, MacKay J, Bousquet J. 1992.** Segregating random amplified
8 polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied*
9 *Genetics* **85**: 173-180.
- 10 **Saitou N, Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
11 phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 945-967.
- 12 **Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. 1997.** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution,
13 and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* **84**: 1120-
14 1136.
- 15 **Schinz NY, Thellung A. 1915.** *Petunia integrifolia*. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden*
16 *Gesellschaft in Zürich* **60**: 361.
- 17 **Slatkin M. 1995.** A measure of population subdivision based in microsatellite allele
18 frequencies. *Genetics* **139**: 157–162.
- 19 **Simmons MP, Ochoterena H, Carr TG. 2001.** Incorporation, relative homoplasy, and effect
20 of gap characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **50**: 454-
21 462.
- 22 **Sims TL, Robbins TP. 2009.** Gametophytic self-incompatibility in *Petunia*. In: Gerats T,
23 Strommer J. eds. *Petunia Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*. New
24 York: Springer, 85-106.
- 25 **Sink KC. 1975.** Inheritance of three genes for morphological characters in *Petunia hybrida* in
26 crosses with four *Petunia* species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **17**: 67-
27 74.
- 28 **Sink KC. 1984.** Taxonomy. In: Sink KC. ed. *Petunia*. New York: Springer, 3–9.
- 29 **Smith LB, Downs RJ. 1966.** *Petunia*. In: Reitz PR, ed. *Flora Illustrada Catarinense*.
30 *Solanaceae*. Itajai: Herbario `Barbosa Rodrigues', 261-291.

- 1 **Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB, Semir J. 2009.** The genus *Petunia*. In:
2 Gerats T, Strommer J. eds. *Petunia Evolutionary, Developmental and Physiological*
3 *Genetics*. New York: Springer, 1-28.
- 4 **Stout AB. 1952.** Reproduction on *Petunia*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* **20**:1-202.
- 5 **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics**
6 **Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-
7 1599.
- 8 **Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E,**
9 **Kao TH. 2003.** Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia*
10 *axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiology* **131**: 1903–1912.
- 11 **Waits LP, Luikart G, Taberlet P. 2001.** Estimating the probability of identity among
12 genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* **10**: 249–
13 256.
- 14 **Wijsman HJW. 1982.** On the inter-relationships of certain species of *Petunia* I. Taxonomic
15 notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Botanica Neerlandica* **31**: 447-
16 490.
- 17 **White G, Powell W. 1997.** Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia*
18 *humilis* (Meliaceae): An endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology* **6**:
19 851-860.
- 20 **Zhang X, Takahashi H, Nakamura I, Mii M. 2008.** Molecular discrimination among taxa
21 of *Petunia axillaris* complex and *P. integrifolia* complex based on PolA1 sequence
22 analysis. *Breeding Science* **58**:71-75.
- 23 **Zucchi MI, Brondani RV, Pinheiro JB, Brondani C, Vencovsky R. 2002.** Transferability
24 of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae
25 family). *Molecular Ecology Notes* **2**:512-514.

TABLE 1. Characterization of microsatellites markers in integrifolia complex populations, including marker source, repeat type, annealing temperature (T), molecular size range in base pairs, and diversity parameters: number of alleles (A), expected (H_E), observed (H_O) heterozygosity and inbreeding coefficient F_{IS} .

Locus	Repeat motif	T (°C)	<i>P. bajeensis</i> n=13					<i>P. inflata</i> n=31					<i>P. integrifolia</i> subsp. <i>depauperata</i> n=23					<i>P. integrifolia</i> subsp. <i>integrifolia</i> n=18					<i>P. interior</i> n=35				
			SR	A	H_E	H_O	F_{IS}	SR	A	H_E	H_O	F_{IS}	SR	A	H_E	H_O	F_{IS}	SR	A	H_E	H_O	F_{IS}	SR	A	H_E	H_O	F_{IS}
PID1D6	tri-	63	263 272	2	0.506	0.636*	-0.272	257 278	7	0.843	0.588	+0.309	266 275	4	0.615	0.333	+0.466	260 278	7	0.821	0.384	+0.542	257 278	7	0.723	0.592*	+0.184
PID1F1	di-	62	161 175	3	0.624	0.769*	-0.244	171 181	5	0.591	0.111	+0.815	171 175	3	0.521	0.391	+0.254	169 175	3	0.506	0.235	+0.543	169 189	10	0.757	0.281	+0.632
PID1G6	di-	63	216	1	-	-	-	212 218	4	0.450	0.080	+0.825	214 216	2	0.047	0.047*	0.00	216 218	2	0.225	0.125*	+0.455	216 218	3	0.503	0.181	+0.644
PID3C4	di-	63	247 263	4	0.608	0.666*	-0.100	247 267	8	0.692	0.322	+0.538	243 259	8	0.751	0.652	+0.135	251 263	5	0.684	0.588	+0.144	249 265	7	0.720	0.406	+0.440
PID3G5	tri-	63	170 173	2	0.489	0.750*	-0.571	170	1	-	-	-	170 173	2	0.224	0.250*	-0.118	170 176	2	0.147	0.153*	-0.043	170	1	-	-	-
PID3H7	tri-	60	129 132	2	0.289	0	+1.00	129 135	3	0.339	0.00	+1.00	132 135	2	0.384	0.300*	+0.224	132 135	2	0.175	0.187*	-0.071	126 132	3	0.561	0.038	+0.933
PID4C6	tri-	62	173 176	2	0.516	0.923	-0.846	176 179	2	0.032	0.032*	0.00	170 176	2	0.043	0.043*	0.00	176	1	-	-	-	176	1	-	-	-

*Indicates heterozygosity in Hardy-Weinberg equilibrium $P < 0.05$

TABLE 2. Characterization of integrifolia complex populations with seven nuclear microsatellites, including sample size, and diversity parameters allelic richness, expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity and within-population inbreeding coefficient F_{IS}

Species	Population	N	Allelic richness	H_E	H_O	F_{IS}
<i>P. bajeensis</i>	BA	13	1.830	0.505	0.624	-0.246*
<i>P. inflata</i>	IN1	9	1.868	0.492	0.234	0.543*
	IN2	10	1.928	0.599	0.265	0.573*
	IN3	12	1.391	0.614	0.416	0.327
	Overall	31	2.789	0.491	0.189	-
<i>P. integrifolia</i> subsp. <i>depauperata</i>	LI1	12	1.641	0.416	0.450	0.084
	LI2	6	1.652	0.445	0.366	0.191
	LI3	5	1.529	0.447	0.375	0.178
	Overall	23	2.392	0.369	0.288	-
<i>P. integrifolia</i> subsp. <i>integrifolia</i>	GR1	8	1.600	0.608	0.404	0.354*
	GR2	4	1.747	0.525	0.316	0.441*
	GR3	6	1.814	0.540	0.450	0.192
	Overall	18	2.465	0.426	0.279	-
<i>P. interior</i>	TE1	13	1.798	0.649	0.291	0.571*
	TE2	8	1.945	0.620	0.285	0.566*
	TE3	14	1.805	0.496	0.347	0.309*
	Overall	35	2.964	0.653	0.300	-

*Indicates significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium $P < 0.05$

TABLE 3. Results of analysis of molecular variance (AMOVA) calculated for species and subspecies (major groups) and their respective populations.

Source of variation	Sum of squares	Components of variance	Percentage of variation	Statistics	P value
Among groups	67.967	0.22312	12.109	$\Phi_{CT} = 0.12109$	<0.0001
Among populations within groups	56.031	0.40877	22.185	$\Phi_{SC} = 0.25243$	<0.0001
Within populations	232.683	1.21060	65.704	$\Phi_{ST} = 0.34295$	<0.0001
Total	356.681	1.84249			

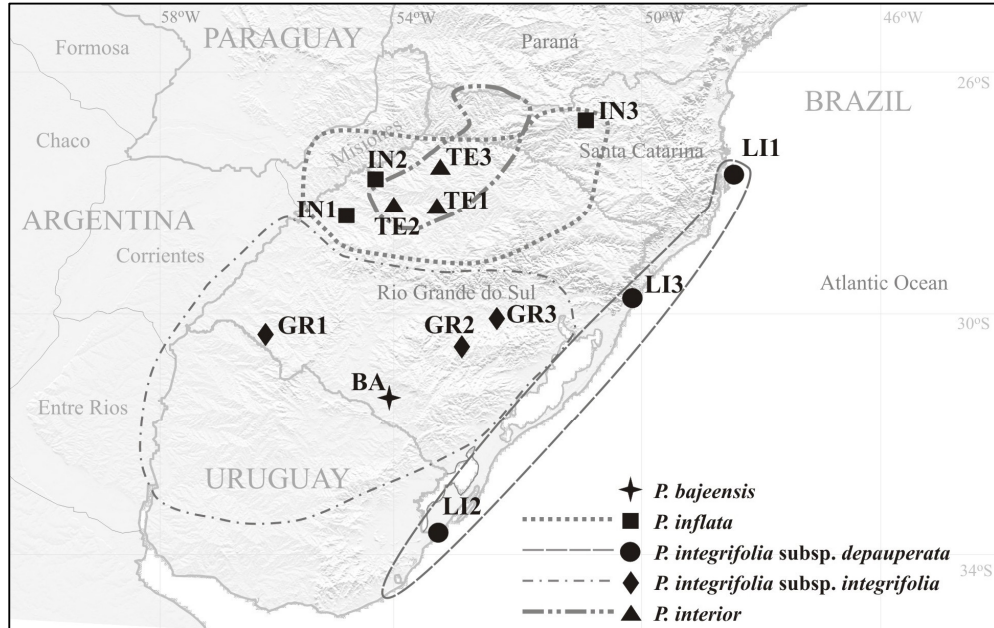


FIG. 1. Sampled populations and geographical distribution of integrifolia complex taxa. Symbols of each sampled populations are indicated and the assumed geographical distribution were based on Ando and Hashimoto (1998) and Ando *et al.* (2005a).

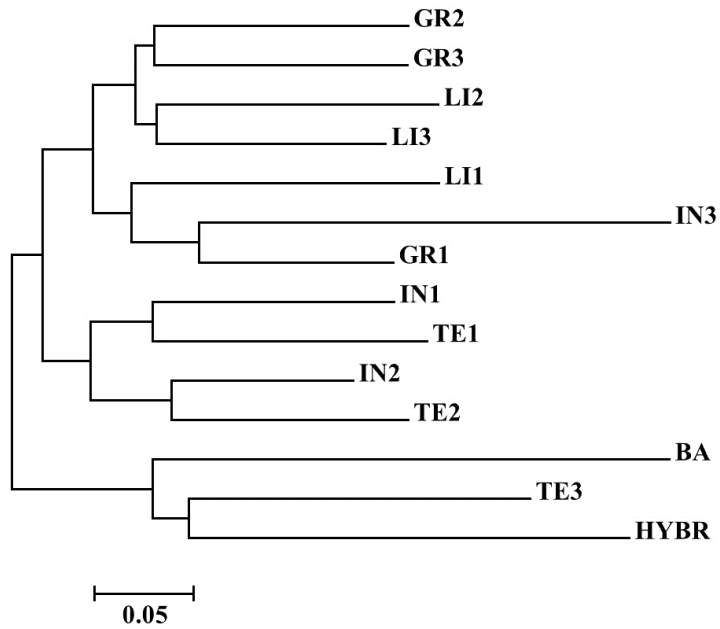


FIG. 2. Neighbor-joining tree of integrifolia complex populations based on a matrix distance of proportional shared alleles. Populations abbreviations are described in the text.

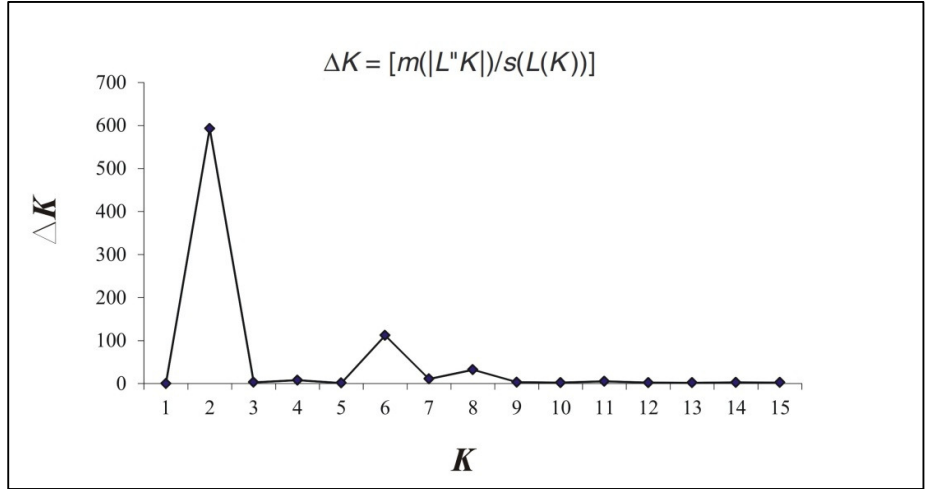


FIG. 3. Estimated number of populations (K) derived from the structure clustering analyses. The magnitude of ΔK was calculated using the method described by Evanno *et al.* (2005).

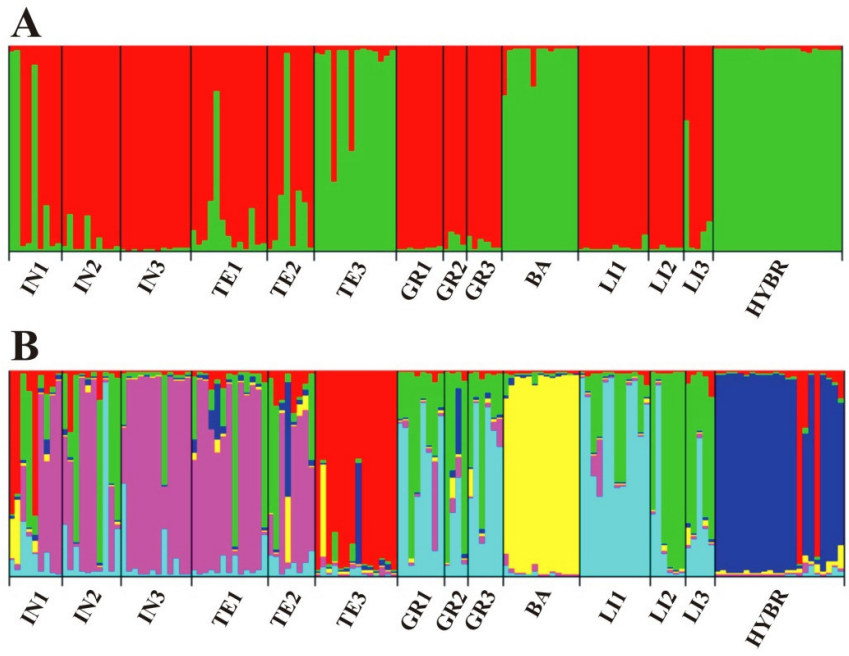


FIG. 4. Bayesian admixture proportions (Q) of integrifolia complex individuals for K=2 and K=6 population models. Each population is represented by one vertical line with K segments colored proportionally according to their belonging to a genetic cluster.

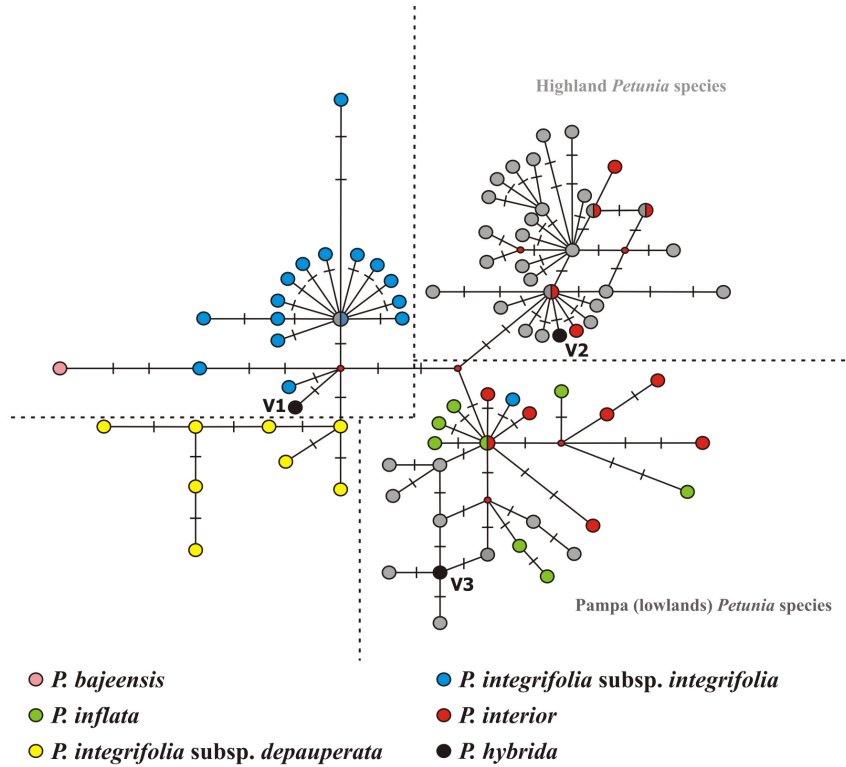


FIG. 5. Median-joining network based on the combined data of chloroplast regions (more details in text) showing the relationships between twelve *Petunia* species and *P. hybrida* varieties studied. Gray circles correspond to other *Petunia* species that not included in the integrifolia complex. The haplotype groups in network indicate the mains species groups in *Petunia* genus. Crossed lines represent inferred differences between haplotypes and small red circles indicate median vectors.

CAPÍTULO 4

Transferability of microsatellite markers from *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* to *P. integrifolia* Complex (Solanaceae)

Manuscrito a ser submetido para a revista *Molecular Ecology Resources*

1 **Transferability of microsatellite markers from *Petunia integrifolia* subsp.**
2 ***depauperata* to *P. integrifolia* Complex (Solanaceae)**

3

4 Ramos-Fregonezi, AMC¹; Kriedt, RA¹; Bonatto, SL²; Freitas, LB¹.

5

6 ¹Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves 9500,
7 PoBox 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil,.

8 ²Genomic and Molecular Biology Laboratory, Pontifícia Universidade Católica do Rio
9 Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001, Porto Alegre, RS, Brazil,

10

11 Key words: cross-species amplification; genetic diversity; microsatellite markers; *Petunia*
12 *integrifolia* Complex.

13

14 Correspondence author: Loreta B. Freitas, Fax: 55 51 3308-9823; e-mail:
15 loreta.freitas@ufrgs.br

16

17 Running title: Microsatellite loci transferability across *P. integrifolia* Complex species.

18 **Abstract:** We analyzed the cross-species transferability of 10 SSR loci from *P. integrifolia*
19 subsp. *depauperata* in the four *taxa* of integrifolia complex, formed by species with uncertain
20 delimitation. Seven of ten loci tested amplify within species. *Petunia inflata* and *P. interior*
21 show the better transferability of the tested markers. The frequency amplification shows a
22 gradient of distance between species, with *P. inflata* more close to *P. integrifolia* subsp.
23 *depauperata*, and *P. bajeensis* distantly related. We presented suitable SSR markers that
24 could be used especially in *P. inflata*, *P. interior* and *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, that
25 exhibit good variation in the tested samples.

26

27 The genus *Petunia* Juss. (Solanaceae) is native of Southern South America and is
28 internationally known due the garden petunia (*Petunia hybrida*) displaying several different
29 phenotypes within their cultivars. The first garden petunia was reported to be an interspecific
30 hybrid of *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. and *P. integrifolia* (Hook.) Schinz &
31 Thell. (Stout 1952). However, *P. integrifolia* is formed by a complex of similar species in
32 general floral characters, but exhibit differences in habitat, geographical distribution and
33 minor details in floral and vegetative structures, leading to many changes in taxonomy and
34 species delimitation over time (Fries 1911; Smith & Downs 1966; Wijsman 1982; Ando &
35 Hashimoto 1996, 1998; Stehmann & Bohs 2007; Stehmann *et al.* 2009). In this work we
36 adopted the most recent classification, based also on molecular data (Stehmann & Bohs,
37 2007; Stehmann *et al.* 2009). Therefore the integrifolia complex comprises five taxonomic
38 entities: *P. bajeensis* T. Ando & Hashim., *P. inflata* R.E.Fr., *P. integrifolia* (Hook.) Schinz &
39 Thell. subsp. *depauperata* (R.E.Fr.) Stehmann, *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. subsp.
40 *integrifolia* (R.E.Fr.) Stehmann and *P. interior* T. Ando & G. Hashim.

41 Molecular studies in *Petunia* show rapid divergence and speciation, and apparently the
42 molecular markers used do not seem to be powerful enough to resolve close relationships
43 (Ando *et al.* 2005; Kulcheski *et al.* 2006). Specially, the nuclear markers used so far show
44 little resolution among species (Kulcheski *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008). In
45 this context, microsatellites markers appears as a good candidate due the rapid evolution, that
46 can allows comparisons among closely related *taxa* and try to elucidate the mechanisms
47 involved in population divergence and speciation processes (Noor & Feder 2006). Several
48 studies have shown the possibility of using primer pairs designed for other species belonging
49 to the same genus (Isagi & Suhandono 1997; Cipriani *et al.* 1999), or even among different
50 genera (White & Powell 1997; Roa *et al.* 2000; Zucchi *et al.* 2002).

51 In the present study we analyzed the cross-species transferability, testing 10 primer
52 pairs obtained from *P. integrifolia* subsp. *depauperata* in four other *taxa* of *integrifolia*
53 complex. DNA was extracted from leaves using the protocol of Roy *et al.* (1992). Each locus
54 was amplified by PCR and fluorescently labeled by the addition of M13 tail. The PCRs were
55 conducted with a standardized protocol for all loci in a final volume of 15 μ L containing:
56 manufactured 1X PCR buffer, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 unit of Platinum
57 *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.2 μ M of reverse and M13 fluorescent-labeled primers
58 (FAM, NED or HEX), 0.013 μ M of forward M13 labeled primer (Kriedt *et al.* in press) and
59 10 ng template DNA. The PCRs were performed in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler
60 (Applied Biosystems) and Table 1 lists the sequences and annealing temperature of each
61 primer pair. Fragment analysis was performed on a MEGABACE 1000 (GE-Healthcare)
62 automated sequencer, with 190 ET-ROX 550 internal size ladder (GE-Healthcare). Fragment
63 length and microsatellite genotyping was determined using GENETIC PROFILER 2.0 (GE-
64 Healthcare). Genetic diversity indices and population analysis were performed using Arlequin

65 package version 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). Due to the frequency of null alleles, data were
66 analyzed based on the success of amplification of a PCR product of expected size. Genetic
67 distances between individuals were assessed using a Euclidean distance matrix, generated
68 from the presence of amplified fragments in all species. The distance matrix was used in a
69 principal coordinate analysis (PCO), through MVSP package, version 3.13 (Kovach 2005).

70 Amplification and variability were testing in 42 individuals for *P. inflata* e *P. interior*,
71 30 individuals for *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* and 18 individuals for *P. bajeensis*. Of the
72 10 pairs of primers tested, 7 successfully amplify PCR products within a range of *integrifolia*
73 complex species. In *P. inflata*, all 10 loci were amplified in at least ten individuals, while for
74 the other species the transferability success was lower (Table 1). Of these 10 loci, 9 exhibited
75 equal or higher levels of polymorphism in the transfer species than in the source species
76 (except for *P. bajeensis*). These findings do not fit the general pattern observed in a series of
77 studies that compare the behavior for homologous SSR for a range of species (Jarne &
78 Lagoda 1996) and may be explained by the biogeography of these species. *P. integrifolia*
79 subsp. *depauperata* is a younger lineage than the transfer species, inhabiting exclusively a
80 geological area that has emerged 400.000 years ago. Three markers showed no amplification
81 for the species *P. bajeensis*, two showed no amplification for *P. integrifolia* and one marker
82 did not amplify for *P. interior*; these markers may have a stronger possibility of displaying
83 null alleles. The failed amplification for some loci in some taxa provides an opportunity to
84 compare the genetic relationships among these species, and could be evidence that we are
85 working with different genetics groups (Figure 1). The second principal coordinate, PCO 2
86 (20.26%), displays ranges of values where each species can be found

87 generating a gradient of distance between species. Studies using sequence data of cpDNA
88 showed that the different morphologies of the integrifolia complex correspond of five genetic
89 lineages (Lorenz-Lemke *et al.*, unpublished data). The measure of genetic distance used in
90 this study takes account only null alleles, and produces a conservative estimate of the
91 relationship between more distantly related taxa. However, the analysis of SSR variation in an
92 evolutionary context is hindered by problems of null expression and homoplasy and thus
93 limits the type of analysis applied.

94 Considering only those loci that amplified within each species, we observe that 67%
95 were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for *P. bajeensis*, 28.5% for *P. interior* and *P.*
96 *inflata*, and 43% for *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*. We did not expect that these loci were
97 in HWE, since the sampled individuals are from different populations. Only the sample of *P.*
98 *bajeensis* is comprised of one population, presenting the higher number of loci in HWE. For
99 the same reason described above, we choose not to show and discuss the results of linkage
100 disequilibrium.

101 Our results showed better transferability of the tested markers to *P. inflata* and *P.*
102 *interior* than other species, which could be suggests a closer phylogenetic relationship with *P.*
103 *integrifolia* subsp. *depauperata*. However, this is an unexpected result. Morphological data
104 and geographical distribution place *P. integrifolia* subsp. *integrifolia* closed with *P.*
105 *integrifolia* subsp. *depauperata*, as well as other molecular data (Chen *et al*, 2007).

106 Our study presented for the first time suitable SSR markers that could be used in the
107 integrifolia complex, which will be particularly useful for analyzing diversity and population
108 structure of these species. We believe that at least five of the *loci* tested may answer questions
109 of speciation and migration, especially within the species *P. inflata*, *P. interior* and *P.*
110 *integrifolia* subsp. *integrifolia* that exhibit good variation in the tested samples.

111 **References**

- 112 Ando T & Hashimoto G (1996) A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from
113 interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* **48**:217-223.
- 114 Ando T & Hashimoto G (1998) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Rio
115 Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* **50**:483-492.
- 116 Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez
117 E & Basualdo IL (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using
118 chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany* **96**: 289-297.
- 119 Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G,
120 Marchesi E, Bullrich L & Ando T (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia*
121 (Solanaceae) based on the sequence of the *Hf1* gene. *Journal of Plant Research* **120**: 385-
122 397.
- 123 Cipriani G, Lot G, Huang WG, Matarazzo MT, Peterlunger E & Testolin R (1999) AC/GT
124 and AG/CT microsatellites repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation,
125 characterization and cross species amplification in *Prunus*. *Theoretical Applied Genetics*
126 **99**:65-72.
- 127 Excoffier LGL, Laval G & Schneider SS (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software
128 package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47-50.
- 129 Fries RE (1911) Die Arten der Gattung *Petunia*. Kongl. Svenska Vetenskapsakad.
130 Handlingar. **46**:1-72.
- 131 Isagi Y & Suhandono S (1997) PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus*
132 *myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* **6**:897-
133 899.
- 134 Jarne P & Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back.
135 *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 424- 429.
- 136 Kovach WL (2005) *MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows, ver. 3.1.*
137 Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.

- 138 Kriedt RA, Ramos-Fregonezi AMC, Beheregaray LB, Bonatto SL & Freitas LB (*in press*).
139 Isolation of microsatellite markers for *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* (Solanaceae), a
140 Brazilian Coastal Plain species. *Molecular Ecology Resources*.
- 141 Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM &
142 Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica*
143 **126**:3-14.
- 144 Noor MAF & Feder JL (2006) Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews*.
145 *Genetics* **7**:851-61.
- 146 Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C &
147 Tohme J (2000) Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae)
148 microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany*
149 **87**:1647-1655.
- 150 Roy A, Frascaria N, Mackay J & Bousquet J (1992) Segregating random amplified
151 polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical Applied Genetics* **85**:173-
152 180.
- 153 Smith LB, Downs RJ (1966) *Petunia*. In: Reitz PR (ed) *Flora Illustrada Catarinense*.
154 *Solanaceae*. Itajai: Herbario 'Barbosa Rodrigues', 261-291.
- 155 Stehmann JR e Bohs L (2007) Nuevas combinaciones en Solanaceae. In: Zuloaga FO,
156 Morrone O e Belgrano MJ (eds.) Novedades taxonómicas y nomenclaturales para la flora
157 vascular del cono sur de sudamérica. *Darwiniana* **45**: 236-241.
- 158 Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB & Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats
159 T & Strommer J (eds) *Petunia Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*, 2ed,
160 Springer, New York, pp 1-28.
- 161 Stout, AB (1952) Reproduction on *Petunia*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* **20**:1-202
- 162 White G & Powell W (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia*
163 *humilis* (Meliaceae): An endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology* **6**:851-
164 860.
- 165 Wijsman HJW (1982) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* I. Taxonomic
166 notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Botanica Neerlandica* **31**: 447-490.

- 167 Zhang X, Takahashi H, Nakamura I & Mii M (2008) Molecular discrimination among taxa of
168 *Petunia axillaris* complex and *P. integrifolia* complex based on Po1A1 sequence analysis.
169 *Breeding Science* **58**:71-75.
- 170 Zucchi MI, Brondani RV, Pinheiro JB, Brondani C & Vencovsky R (2002) Transferability of
171 microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family).
172 *Molecular Ecology Notes* **2**:512-514.

Table 1 List of SSR loci indicating GenBank reference, repeat motif, primer sequence, annealing temperature (Ta), allele size range, number of alleles per locus (A), expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O) of *Petunia* species

Primer	GenBank accession no*	Repeat motif	Primer sequence (5' - 3')	Ta (°C)	<i>P. bajeensis</i> n=18			<i>P. inflata</i> n=42			<i>P. integrifolia</i> subsp. <i>integrifolia</i> n=30			<i>P. interior</i> n=42						
					Allele size range	A	H_E	H_O	Allele size range	A	H_E	H_O	Allele size range	A	H_E	H_O	Allele size range	A	H_E	H_O
PID-1D6		(TGG)6	F:TGGCTATAGAGGAACATACCAATAG R:CTGCTAAACATTTGACATGG	63	263-272	2	0.5181	0.5833	257-278	7	0.8428	0.5555	260-278	7	0.8215	0.3846	257-278	7	0.7232	0.5925
PID-1F1		(CT)7	F:ACCATTCCTTAACATCCCAATCC R:GAGTGGAGATCAGAGTGATTTTCC	62	161-175	3	0.5257	0.7222	171-181	5	0.6157	0.0857	169-175	3	0.4432	0.1666	169-189	11	0.7637	0.2702
PID-1G6		(TG)7	F:TTGGTAAGGCTGCTACTCACTC R:AAAAGGAGATCTGCCAGGAG	63	216	1	--	--	212-218	4	0.4065	0.0689	216-218	2	0.2258	0.1250	212-218	3	0.4908	0.1739
PID-3C4		(CT)13	F:CTGAAGGTTGTTGCCTGTTG R:CATCCCTGTGTATGGAAATG	63	247-263	4	0.6137	0.6666	247-267	8	0.6560	0.3513	251-263	5	0.6486	0.5263	249-265	7	0.6976	0.3846
PID-3G3		(TAGA)7	F:TTTTGGACTCAAGATCATTTTATG R:TCATATGGTTTACTAGTTTGGATGC	58	NA	NA	--	--	198	1	--	--	NA	NA	--	--	234-238	2	1.00	1.00
PID-3G5		(TTC)8	F:GGTCATGCCAGGTGAACATC R:CATATCCCGGCTCCTAACTG	63	170-173	2	0.4891	0.7500	170	1	--	--	170-176	2	0.1287	0.1333	170	1	--	--
PID-3G7		(CA)10	F:TGTGCCACTGATAATGTGTCC R:AAAACCTTTCCCTACTGTATTTC	59	NA	NA	--	--	172	1	--	--	NA	NA	--	--	NA	NA	--	--
PID-3H7		(GAA)6	F:GGGCAGTTTCCATGAAATTAAC R:AAGAGACACTCCATTTCTTTG	60	129-132	2	0.2258	0.00	129-135	3	0.2834	0.00	129-135	3	0.2555	0.1666	126-132	3	0.5513	0.0370
PID-4C6		(GAA)13	F:GGCTTGAAAATGTTGAAGAAC R:GCTGATCCATCCCCAGAAG	62	173-176	2	0.5120	0.9473	176-179	2	0.0238	0.0238	176	1	--	--	176	1	--	--
PID-4G8		(CA)8	F:TCAGTCAGGCTGAATAAGTTCC R:CCTTAAACTCGTATCTTTGCACAT	58	NA	NA	--	--	228-232	2	0.6666	0.00	228-230	2	0.6000	0.3333	230-268	3	0.7142	0.00

NA: Failed to amplify

* Waiting for this information

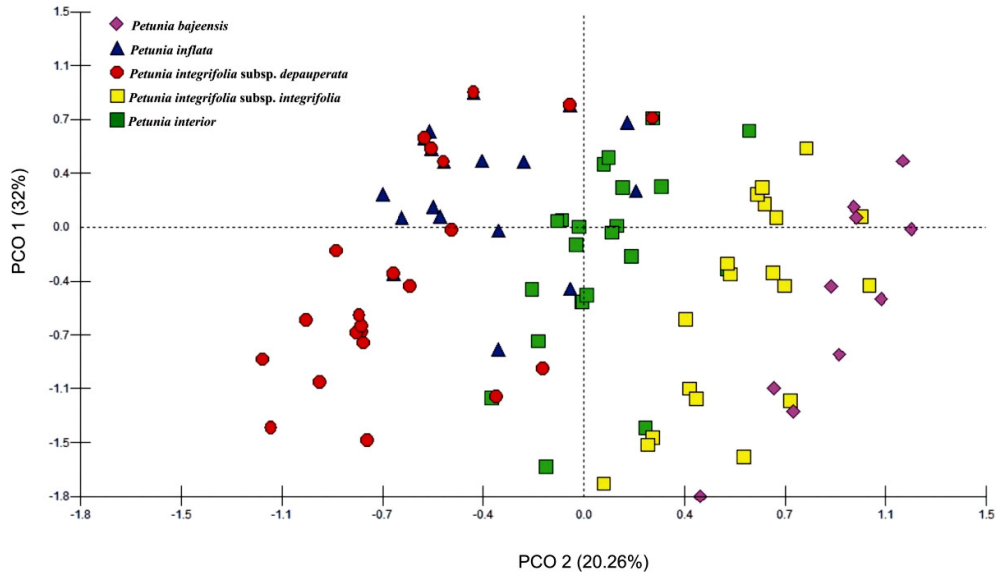


Figure 1: Distances between species based on presence of amplified product, through principal coordinate analysis, with the two principal axes plotted.

Capítulo 5

Considerações finais

As petúnias têm sido por um longo tempo objeto de interesse, tanto para cientistas como para floriculturistas, pelo interesse na obtenção de cultivares ornamentais e por ser um modelo para estudos genéticos. Neste sentido, muitos estudos são realizados devido à facilidade de cultivo, manutenção em pequenos espaços e transformação genética. Individualmente, as plantas fornecem grande quantidade de material, bioquímico ou celular. Porém, estudos com populações naturais que visam entender processos evolutivos e o relacionamento entre espécies ainda são raros e praticamente restritos aos estudos conduzidos por nosso grupo de trabalho.

A delimitação taxonômica das espécies também é outro ponto fraco no estudo do gênero, especialmente devido à rápida especiação e radiação adaptativa que ele apresenta. Muitos debates e falta de consenso no estabelecimento de uma nomenclatura específica e infra-específica são comuns na história taxonômica do grupo.

Embora alguns estudos já tenham esclarecido os processos evolutivos que ocorreram em determinadas populações (Longo, 2005; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006, 2010; Ramos, 2008; Segatto, 2010; Turchetto, 2010) e contribuído para o aperfeiçoamento da taxonomia de algumas espécies do gênero (Kulchesk *et al.*, 2006; Stehmann *et al.*, 2009), estamos longe de compreender claramente a história evolutiva destas plantas, que atualmente se encontram vulneráveis e ameaçadas de extinção, especialmente pela descaracterização de seu ambiente.

Em relação à origem da petúnia-de-jardim, a determinação das espécies envolvidas nos cruzamentos iniciais é de fundamental importância para futuras aplicações em programas de melhoramento. A comparação da espécie cultivada com seus parentais, e destes com outras espécies do gênero, traz a perspectiva de encontrar processos e padrões variantes em características genéticas e fisiológicas do desenvolvimento. Um dos parentais da espécie cultivada é conhecido, uma vez que no gênero apenas uma espécie de flores brancas é encontrada. Já o parental de flores purpúreas permanece como uma incógnita, tanto em função da alta similaridade genética e morfológica entre as espécies do chamado complexo *integrifolia*, quanto em função da imprecisão dos registros de coleta dos exemplares utilizados nos primeiros cruzamentos.

No presente trabalho tivemos como objetivo contribuir para entendimento da origem da petúnia-de-jardim, com ênfase no relacionamento e na variabilidade genética das espécies que compõem o complexo *integrifolia*. A utilização de marcadores nucleares

microsatélites forneceu uma melhor compreensão dos padrões de diversidade genética encontrados em populações naturais, e a adição de dados dos espaçadores plastidiais foi realizada para aumentar a resolução na determinação do parental de flor púrpura de *P. hybrida*.

A principal contribuição para o estudo evolutivo do gênero *Petunia* que este trabalho traz é a utilização de marcadores do tipo microsatélites para o entendimento das relações evolutivas de suas espécies. A determinação da variabilidade genética das populações associada às similaridades encontradas entre as espécies (Capítulo 4), que reforça as conclusões obtidas a partir de marcadores de herança uniparental, abre a perspectiva da utilização de marcadores microsatélites no gênero como um todo, a exemplo do sugerido por autores como Wang (2010), e em complementação aos estudos já desenvolvidos (Longo, 2005; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006, 2010; Ramos, 2008; Segatto, 2010; Turchetto, 2010). Os resultados apresentados no Capítulo 4 demonstram a necessidade de ampliar o número de trabalhos como este, descrevendo microsatélites específicos para cada espécie do gênero, mas principalmente realizando com eles estudos comparativos, tanto de filogeografia como de genética de paisagens.

O conjunto geral de resultados encontrados neste trabalho demonstra que as cinco entidades taxonômicas estudadas são muito próximas geneticamente e algumas delas estão em processo de especiação recente, como é o caso das subespécies de *Petunia integrifolia*. Aqui, os marcadores nucleares não conseguiram separar estas duas subespécies, contrariando os dados de sequências plastidiais (Lorenz-Lemke *et al.*, em preparação) que demonstram uma separação clara entre estes dois conjuntos de linhagens, o que permitiu, inclusive, calcular taxas evolutivas para o gênero, definindo a datação dos eventos de diversificação (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010). A classificação taxonômica em duas subespécies, neste caso, poderia ser considerada adequada.

Entretanto, *P. inflata* e *P. interior* também se mostraram muito similares geneticamente, não podendo ser separadas por nenhum dos marcadores utilizados. Este resultado também foi obtido com os marcadores plastidiais, o que contraria a taxonomia baseada em diferenças morfológicas, que separa estas populações em duas espécies. Neste caso, o que pode estar sendo visualizado são eventos de hibridação, históricos e recentes, uma vez que entre as espécies do gênero as barreiras reprodutivas são tênues (Watanabe *et al.*, 1997; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto, 2010). A classificação taxonômica destas

duas espécies parece ser suficiente para sua validação, embora considerem diferenças mínimas nos caracteres florais e vegetativos.

O estudo da variabilidade dos *loci* e a avaliação da diversidade mostraram que *P. bajeensis* é uma espécie muito divergente do restante e diferenças morfológicas corroboram com este resultado (Ando & Hashimoto, 1998), questionando a inclusão desta no complexo de espécies que envolvem a nomenclatura “integrifolia”.

Processos de diferenciação ecológica e especiação podem ser enfatizados em diferentes estágios. Wiens (2004) sugere que a tendência das populações em manter seu nicho ecológico ancestral (conjunto de condições bióticas e abióticas nas quais a espécie está apta a sobreviver, reproduzir e manter tamanhos populacionais viáveis) é a primeira fase na formação de espécies incipientes. Segundo este modelo, a separação de linhagens começa quando mudanças ambientais criam condições dentro da distribuição geográfica da espécie que estão fora do seu nicho ecológico ancestral. Como os indivíduos são incapazes de persistir ou dispersar nas novas condições ecológicas, a distribuição geográfica da espécie se torna fragmentada. A falha na adaptação a novos ambientes e a novas condições ecológicas é o que frequentemente isola populações e dá início ao processo de especiação. Os modelos mais tradicionais focam a divergência subsequente e necessária para a ocupação de novos habitats. Para uma espécie expandir sua distribuição e ocupar novos ambientes, as populações têm que sofrer seleção natural divergente em caracteres morfológicos, fisiológicos e comportamentais. Nestes casos, a adaptação às novas condições ambientais e ecológicas é o que direciona as divergências evolutivas (Schluter, 2001).

Áreas transicionais são de grande importância em processos de especiação, pois grande parte da variação adaptativa está concentrada nestas regiões (Smith *et al.*, 2001). No século passado, o padre naturalista B. Rambo realizou extensivos levantamentos florísticos na região sul, abordando de maneira histórica a distribuição geográfica das formações vegetais. Suas análises são tão detalhadas que ainda se mantêm atuais e são amplamente utilizadas em estudos botânicos. Seus trabalhos indicaram que a Região Sul pode ser considerada uma área transicional, pois é limítrofe para a distribuição de diversas espécies de plantas: limite norte para elementos austral-antárticos (Rambo 1951a) e limite sul para elementos tipicamente tropicais (Rambo 1951b). É neste contexto que o processo de diversificação dos *taxa* aqui estudados pode estar inserido.

O conjunto de variedades de *P. hybrida* utilizado neste trabalho representa os principais tipos cultivados no Brasil, mas é uma parcela muito pequena da história de melhoramento pela qual esta espécie vem passando em mais de dois séculos.

A caracterização genética destas variedades demonstrou alto grau de divergência em relação às populações nativas estudadas. A maior probabilidade de ancestralidade foi observada para uma população de *P. interior*. Como já foi discutido anteriormente, *P. interior* e *P. inflata* são geneticamente muito próximas. Assim, os resultados apresentados neste trabalho não permitem indicar qual foi a espécie parental de flores purpúreas na origem de *P. hybrida*, mas permitem apontar uma direção para investigações futuras.

Populações de *P. inflata* e *P. interior* situadas na região noroeste do Rio Grande do Sul e arredores (territórios da Argentina e Paraguai) devem estar envolvidas nos cruzamentos iniciais para a obtenção do híbrido comercial. Porém, estudos que incluam uma amostragem populacional maior, aumentando tanto a distribuição das populações quanto o número de indivíduos, são necessários. Por outro lado, os nossos dados, aliados a outras informações, permitem praticamente rejeitar *P. bajeensis* e *P. integrifolia* subsp. *depauperata* como parentais das petúnias-de-jardim.

Este trabalho é o primeiro a utilizar marcadores microssatélites para acessar a variabilidade em populações naturais de *Petunia* e também no uso de ferramentas moleculares para investigar os ancestrais de *P. hybrida*. Até agora, apenas um estudo ainda não publicado desenvolveu este tipo de marcadores para espécies do gênero, e seu objetivo foi descrever marcadores espécie-específicos para a caracterização de cruzamentos entre linhas comerciais de *P. axillaris* e *P. exserta* (E. Bossolini, comunicação pessoal).

Foi alcançado um alto percentual de transferabilidade para os *loci* de microssatélites. Esta situação era esperada devido ao alto grau de similaridade genética observado entre as espécies do gênero (Kulcheski *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2007). O grau de polimorfismo observado também foi alto, especialmente quando comparado com dados plastidiais, que indicam baixos índices de variabilidade e compartilhamento de haplótipos devido à retenção de polimorfismos ancestrais. A transferabilidade destes marcadores para as espécies do complexo *integrifolia* forneceu uma nova ferramenta molecular para estudos populacionais futuros, e também para acessar a variabilidade genética dos híbridos comerciais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Caps. 1 e 5)

- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A & Fujimura T (1997) Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor Appl Genet* 94:61-67.
- Aldrich J, Cherney BW, Merlin E & Christopherson L (1988) The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Curr Genet* 14:137-146.
- Ando T & Hashimoto G (1996) A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* 48:217-223.
- Ando T & Hashimoto G (1998) Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* 50:483-492.
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watanabe H, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E & Kitching IJ (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88:403-413.
- Ando T, Ishikawa N, Watanabe H, Kokubun H, Yanagisawa Y, Hashimoto G, Marchesi E & Suárez E. (2005) A morphological study of the *Petunia integrifolia* complex (Solanaceae). *Ann Bot* 96: 887-900.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Editora Harvard University, Londres, 447 pp.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF & Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16:3759-3767.
- Benchimol LL, Campos T, Carbonell SAM, Colombo CA, Chioratto AF, Formighieri EF, Gouve LRL & Souza AP (2007) Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genet Resour Crop Ev* 54:1747-1762.
- Bettin O, Cornejo C, Edwards PJ & Holderegger R (2007) Phylogeography of the high alpine plant *Senecio halleri* (Asteraceae) in the European Alps: *in situ* glacial

- survival with postglacial stepwise dispersal into peripheral areas. *Mol Ecol* 16:2517-2524.
- Birnboim HC & Straus NA (1975) DNA from eukaryotic cells contains unusually long pyrimidine sequences. *Can J Biochem* 53: 640-643.
- Boccacci P & Botta R (2009) Investigating the origin of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using chloroplast microsatellites. *Genet Resour Crop Ev* 56:851-859.
- Calcagnotto D (2001) Taxas de evolução e o relógio molecular. In: Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, pp 52-63.
- Chambers GK & MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126:455-476.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, Van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jorgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L & Wilkinson M (2007) A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56:295-299
- Chen S, Matsubara K, Omori T, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L & Ando T (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (Solanaceae) based on the sequence of the *Hfl* gene. *J Plant Res* 120: 385–397.
- Chistiakov DA; Hellemans B & Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255:1-29.
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Matarazzo MT, Peterlunger E & Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellites repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterisation and cross species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* 99:65-72.
- Collevatti RG, Grattapaglia D & Hay JD (2001) High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86 (1):60-67.

- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M & Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91:3166-3170.
- Dole JM & Wilkins HF (2004) Floriculture: Principles and species. 2ª edição. Editora Prentice Hall, New Jersey, 1040 pp.
- Ferguson MC & Ottley AM (1932) Studies on *Petunia* III. A redescription and additional discussion of certain species of *Petunia*. Am J Bot 19:385-405.
- Freitas LB, Lorenz-Lemke AP & Stehmann JR (2008) Petúnias-de-jardim. In: Barbieri RL & Stumpf ERT (eds.) Origem e Evolução de plantas cultivadas. Embrapa, Brasília, pp 707-926.
- Fregonezi JN (2009) História Evolutiva do gênero *Calibrachoa* La Llave & Lex. (Solanaceae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.
- Fries RE (1911) Die Arten der Gattung *Petunia*. Kongl. Svenska Vetenskapsakad. Handl. 46:1-72.
- Gerats T & Vandenbussche M (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. Trends Plant Sci 10:251-256
- Griesbach RJ (2007) *Petunia Petunia x hybrida*. In: Anderson NO (ed) Flower Breeding and Genetics - Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century. Springer, New York, pp 301-336.
- Hamilton MB (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraespecific variation. Mol Ecol 8:513-525.
- Hamilton MB, Braverman JM & Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. Mol Biol Evol 20:1710-1721.
- Hwang SH, Lin TP, Ma CS, Lin CL, Chung JD & Yang JC (2003) Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. Mol Ecol 12:2689-2695.

- Isagi Y & Suhandono S (1997) PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Mol Ecol* 6:897-899.
- Jakob SS & Blattner FR (2006) A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): Long-Term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction, and the consequences for phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* 23:1602-1612.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF & Donoghue MJ (2009) *Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético*. 6ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 632 pp.
- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126:3-14.
- Longo D (2005) Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15:4487-4497.
- Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL & 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* (no prelo): doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04871.x
- Mäder G (2008) Filogeografia e variabilidade genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Métais I, Hamon B, Jalouzot R & Peltier D (2002) Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theor Appl Genet* 104:1346-1352.
- Noor MAF & Feder JL (2006) Speciation genetics: evolving approaches. *Nat Rev. Genet* 7:851-61.

- Ohi T, Kajita T & Murata AJ (2003) Distinct geographic structure as evidence by chloroplast DNA haplotypes and ploidy level in Japanese *Aucuba* (Aucubaceae). *Am J Bot* 90:1645-1652.
- Oliveira EJ , Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R & Vieira MLC (2006) Origin , evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29:294-307.
- Olmstead R & Palmer JD (1991) Chloroplast DNA and Systematics of the Solanaceae. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M. and Estrada N (eds) *Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution*. The Royal Botanic Garden and The Linnean Society of London, Kew, pp 161-168.
- Olmstead RG & Palmer JD (1994) Chloroplast DNA Systematics: A review of methods and data analysis. *Am J Bot* 81:1205-1224.
- Olmstead RG, Sweere J.A, Spangler RE & Palmer JD (1999). Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: Nee M, Lester RN, Hawkes JG (Eds.) *Solanaceae IV*. Royal Botanical Garden, Kew, pp.111-137.
- Olson ME (2002) Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int J Plant Sci* 163:51–65.
- Okaura T & Harada K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88:322-329.
- Ota T & Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res* 22:201-204.
- Palmé AE, Su Q, Rautenberg A, Manni F & Lascoux M (2003) Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. *Mol Ecol* 12:201-212.
- Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, Chase MW & Manhart JR (1988) Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75:1180–1206.
- Rambo B (1951a) O elemento andino no pinhal riograndense. *Sellowia* 3: 7-39.
- Rambo B (1951b) A imigração da selva higrófila no Rio Grande do Sul. *Sellowia* 3: 55-91.

- Ramos AMC (2008) História Evolutiva de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C & Tohme J (2000) Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. *Am J Bot* 87:1647-1655.
- Sang T, Crawford DJ & Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84:1120-1136.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends Ecol Evol* 16: 372-380.
- Segatto ALA (2010) Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Petunia exserta* Stehmann (Solanaceae) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Selkoe KA & Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists : a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol lett* 9:615-629.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE & Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92:142-166.
- Sia EA, Butler AC, Dominska M, Greenwell P, Fox TD & Petes TD (2000) Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:250-255.
- Silva OS (1994) Importância de *Callonychium petuniae* CURE & WITTMANN, 1990 (Insecta, Hymenoptera, Andrenidae) e outras abelhas no sucesso reprodutivo de *Petunia integrifolia* (HOOKER) SCHINZ *et. THELLUNG* (Solanaceae). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.

- Sink KC (1973) The inheritance of apetalous flower type in *Petunia hybrid* Vilm. and linkage tests with the genes for flower doubleness and Grandiflora characters and its use in hybrid seed production. *Euphytica* 22:520-526.
- Sink KC (1975) Inheritance of three genes for morphological characters in *Petunia hybrid* in crosses with four *Petunia* species. *Can. J. Genet. Cytol.* 17:67-74
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T & Wendel JF (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *Am J Bot* 85:1301-1315.
- Smith LB & Downs RJ (1966) *Petunia*. In: Reitz PR (ed.) *Flora Ilustrada Catarinense. Solanaceae*. Itajai: Herbario 'Barbosa Rodrigues', 261-291.
- Smith TB, Kark S, Schneider CJ & Wayne RK (2001) Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends Ecol Evol* 16: 431.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Tese de Doutorado.
- Stehmann JR & Bohs L (2007) Nuevas combinaciones em Solanaceae. In: Zuloaga FO, Morrone O & Belgrano MJ (eds.) *Novedades taxonómicas y nomenclaturales para la flora vascular del cono sur de sudamérica*. *Darwiniana* 45: 236-241.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB & Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats T & Strommer J (eds) *Petunia Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*, 2ed, Springer, New York, pp 1-28.
- Stout AB (1952) Reproduction on *Petunia*. *Mem. Torrey Bot. Club* 20:1-202
- Takezaki N. & Nei M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389–399.
- Testolin R, Marrazzo T, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori MT, Pancaldi M & Sansavini S (2000) Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43:512-20.

- Turchetto C (2010) Análise da diversidade genética e morfológica de *Petunia axillaris* (Lam) Britton, Sterns & Poggenb (Solanaceae) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Wang J (2010) Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Mol Ecol* 19: 2605–2608.
- Watanabe H, Ando T, Iida SI, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Hashimoto G & Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *J Japan Soc Horticult Sci* 65:625-634.
- Watanabe H, Ando T, Iida SI, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Kokubun H, Hashimoto G, & Marchesi E (1997) Cross compatibility of *Petunia pubescens* and *Petunia pygmaea* with native taxa of *Petunia*. *J Japan Soc Horticult Sci* 66: 607-612.
- Weber JL & May PE (1989) Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-396.
- White G & Powell W (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): An endangered tropical hardwood species. *Mol Ecol* 6:851-860.
- Wiens JJ (2004) Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58: 193-197.
- Wijsman HJW (1982) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Bot Neerl* 31: 447-490.
- Wijsman HJW & Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot Neerl* 34:337-349.
- Wijsman HJW (1990) On the inter-relationships of certain species of *Petunia* VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae). *Acta Bot Neerl* 39:101-102.

- Wittmann D, Radtke R, Cure JR & Schfino-Wittmann MT (1989) Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* and three purple flowered *Petunia* species in Southern Brazil. *Z. zool. Syst. Evolut.* 28:157-165.
- Wolfe KH, Li WH & Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84:9054-5058.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.
- Wright JM & Bentzen P (1994) Microsatellites: Genetic markers of the future. *Rev Fish Biol Fisher* 4:384-388.
- Xu DH, Sakai AJ, Kanazawa M, Shimamoto A & Shimamoto Y (2000) Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. *Theor Appl Genet* 101:724–732.
- Zucchi MI, Brondani RV, Pinheiro JB, Brondani C & Vencovsky R (2002) Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. To *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Mol Ecol Notes* 2:512-514.