

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares para
genes envolvidos na coloração de flores de *Petunia*

Viviane Noll Louzada Flores
Orientação: Loreta Brandão de Freitas
Coorientação: Sara Hartke

Porto Alegre
Dezembro/2017

Viviane Noll Louzada Flores

Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares para
genes envolvidos na coloração de flores de *Petunia*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como um dos
requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em
Biotecnologia da UFRGS, Ênfase
Biotecnologia Molecular.

Orientação: Profa. Dra. Loreta Brandão de Freitas (UFRGS)
Coorientação: Profa. Dra. Sara Hartke (IFRS-Campus Rolante)

Porto Alegre
Dezembro/2017

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pessoa que sempre me deu todo o suporte necessário para chegar até aqui, sem deixar faltar nada, sendo sempre presente e amável em todas as circunstâncias.

À professora Loreta Brandão de Freitas que me recebeu com o maior carinho em sua equipe, mesmo que eu não estivesse sempre presente, além de sua incrível orientação para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Sara Hartke, presença constante, mesmo de longe, durante todas as fases deste trabalho com colaboração e auxílio no meu aprendizado como pessoa e como profissional.

Ao Lucas, pessoa que caminhou ao meu lado durante toda a graduação, sendo muitas vezes meu ombro amigo, meu professor particular e pessoa fundamental para que esses anos tivessem sido tão prazerosos.

À Débora, melhor amiga desta vida, dupla de graduação e confidente para sempre.

Aos meus amigos e animais de estimação que fizeram com que todos esses anos de graduação fossem mais leves através do carinho, do suporte emocional e da presença amorosa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Gênero <i>Petunia</i> Juss. (Solanaceae)	2
1.2 Biologia da polinização.....	5
1.3 Genes envolvidos na determinação de características florais em <i>Petunia</i>.....	6
1.4 Marcadores Moleculares	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. JUSTIFICATIVA.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 Busca por sequências.....	12
4.2 Identificação de marcadores CAPS.....	13
4.3 Material vegetal e extração de DNA.....	14
4.4 Reações de PCR.....	15
4.5 Clivagem dos produtos de PCR.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1 Obtenção das sequências.....	17
5.2 Obtenção dos Marcadores CAPS.....	17
5.3 Genotipagem com o CAPS <i>MYB-FL-3'</i>.....	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

RESUMO

O gênero *Petunia* Juss., descrito inicialmente em 1803, apresenta uma ampla gama de espécies que se diferenciam não somente em nível morfológico, como genético. Apesar da diferenciação morfológica, muitas espécies são bem próximas geneticamente e a caracterização de suas populações é útil para entender como e por quê os processos de especiação e evolução ocorreram. Um dos fatores que permitiu a diferenciação das espécies ao longo do tempo foi a diversificação da forma de polinização. Esse processo favorece não somente a divergência das espécies, como também pode explicar como algumas espécies teriam surgido. No presente estudo, abordam-se espécies polinizadas por diferentes agentes polinizadores, que tem como atrativos a cor e a forma das flores, bem como a emissão de compostos voláteis. Dessa forma, o objetivo do estudo foi estudar genes envolvidos na diferenciação das flores destas espécies de *Petunia* através da identificação de marcadores moleculares em busca de polimorfismos que diferenciassem as espécies e passíveis de identificar eventuais híbridos interespecíficos. Foram identificados marcadores moleculares do tipo CAPS para os genes *MYB-FL* e *DFR*, mas não para o gene *FLS*. Os marcadores obtidos lograram sucesso na caracterização de cada espécie e indicaram a presença de indivíduos híbridos em regiões de co-ocorrência das espécies.

ABSTRACT

The genus *Petunia* Juss., first described in 1803, presents a wide range of species that differ not only in morphology, but also in genetic level. Despite the morphological differentiation, many species are very close genetically and the characterization of their populations is useful to understand how and why the processes of speciation and evolution occurred. One of the factors that allowed the differentiation of the species over time was the pollination syndrome diversification. This process favors not only the species divergence, but also can explain how some species would have arisen. In the present study, species pollinated by different agents were considered and these species present divergent color and shape of flowers, as well as volatile compounds emission. Thus, the objective of the study was to study genes involved in the differentiation of the flowers of these *Petunia* species through the identification of molecular markers able to differentiate the species and putative interspecific hybrids. CAPS-like molecular markers were identified for the *MYB-FL* and *DFR* genes, but not for the *FLS* gene. The obtained markers reached success in the characterization of each species and indicated the presence of hybrid individuals in co-occurrence regions of them.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae)

O gênero *Petunia* foi inicialmente descrito por Jussieu em 1803 e pertence à família Solanaceae. Composto por 14 espécies nativas (Stehmann *et al.*, 2009), é popularmente conhecido pelo híbrido amplamente cultivado petúnia-de-jardim ou *Petunia hybrida* (Segatto *et al.*, 2014a). *Petunia hybrida* é considerada a primeira planta de jardim cultivada e, cada vez mais, tem crescido o interesse acerca desse gênero para desenvolver novas cultivares.

Em 1950, geneticistas promoveram os primeiros testes bioquímicos e análises genéticas envolvendo a coloração e o desenvolvimento das flores e também a síntese de alguns compostos, como os flavonoides, envolvidos na determinação da coloração das pétalas e outros órgãos tomando *P. hybrida* como modelo experimental.

Em 1980, ainda eram poucos os núcleos de pesquisa que embasavam seus estudos no gênero *Petunia*. Dois grupos principais, localizados na Holanda e na França respectivamente, começaram a buscar maiores informações genéticas sobre gênero, o que levou à obtenção de mapas genéticos e coleções de indivíduos mutantes. Apesar disso, o mapa genético de *P. hybrida* continuou não esclarecido, provavelmente devido à natureza híbrida de seu genoma. Naturalmente o número de núcleos de pesquisa ao redor do mundo aumentou e, atualmente, já são mais de 20 (Gerats and Vandebussche, 2015).

Petunia é um gênero que ocorre somente no sul da América do Sul e a distribuição geográfica de suas espécies nativas se estende principalmente no sul do Brasil (estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), parte da Argentina e Uruguai, com apenas uma espécie ocorrendo de forma endêmica e restrita na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais (Stehmann *et al.*, 2009). No sul do Brasil, a região da Serra do Sudeste (Rio Grande do Sul) é um dos centros de diversidade desse gênero, onde ocorrem as espécies *P. axillaris*, *P. exserta*, *P. integrifolia* e *P. secreta* (Figura 1), que diferem entre si em morfologia e síndromes de polinização (Fregonezi *et al.*, 2013). Como as barreiras reprodutivas intrínsecas aparentam ser fracas entre as espécies do gênero (Watanabe *et al.*, 1996), a importância biológica de diferenças florais entre as espécies que ocorrem nessa região é evidente e os polinizadores podem ter sido centrais na história evolutiva de genes que mediaram as síndromes de polinização (Fregonezi *et al.*, 2013; Turchetto *et al.*, 2015a).



Figura 1. Espécies silvestres de *Petunia* que atraem diferentes animais polinizadores: (A) *P. axillaris*, polinizada por mariposas; (B) *P. exserta*, polinizada por beija-flores; (Fotos: Cris Kuhlemeier, University of Bern, Switzerland) (C) *P. integrifolia*, polinizada por abelhas; (D) *P. secreta*, polinizada por abelhas (Fotos: LEM-UFRGS).

Petunia axillaris é a única espécie do gênero que possui flores de coloração branca, com uma fragrância forte ao anoitecer e também uma grande quantidade de néctar rico em sacarose (Galliot *et al.*, 2006). Essa espécie conta com uma corola de dimensões que vão de três a sete centímetros de comprimento (Turchetto *et al.*, 2014) e polinização mediada por mariposas, ainda que outros insetos também realizem o processo (Tsukamoto *et al.*, 2003). De acordo com as diferenças morfológicas observadas em relação a medidas da flor, três subespécies alopátricas são reconhecidas: *P. a. axillaris*, *P. a. parodii* e *P. a. subandina* (Ando, 1996). Duas dessas subespécies são encontradas na região do Pampa (Rio Grande do Sul, Uruguai e parte da Argentina), em áreas planas, enquanto que *P. a. subandina* é encontrada somente em regiões montanhosas adjacentes à região sub-andina. A existência de possíveis híbridos entre *P. a. axillaris* e *P. a. parodii* é sugerida em razão da observação de indivíduos com morfologia intermediária entre estas duas subespécies em regiões ao longo do Rio Negro (Uruguai) e próximo à cidade de Bagé (Rio Grande do Sul) onde as duas subespécies podem ser encontradas muito próximas (Turchetto *et al.*, 2014). Devido à ampla distribuição de *P. axillaris*, esta espécie pode ser encontrada junto ou muito próxima de outras espécies do gênero que habitam a região pampeana (Watanabe *et al.*, 1996).

Petunia axillaris e *P. exserta* são espécies proximamente relacionadas (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006; Reck-Kortmann *et al.*, 2014) que compartilham características morfológicas como o tubo de corola longo, hábito ereto ou ascendente, pólen amarelo, folhas apicais de diferentes formas e tamanhos, pedúnculos com grandes cápsulas (> 9 mm de comprimento) e pequenas sementes (< 0,5 mm) (Stehmann *et al.*,

2009). A espécie *P. exserta*, entretanto, é a única espécie ornitófila do gênero e é caracterizada por apresentar flores vermelhas com anteras e estigma fortemente exsertos. Apesar de sua cor exuberante, *P. exserta* não é um dos parentais dos híbridos comerciais de flores vermelhas, tendo sido descoberta algumas décadas após a obtenção desses híbridos. Endêmica de uma área muito pequena na região da Serra do Sudeste, *P. exserta* foi encontrada, até agora, crescendo em regiões com muita sombra, como o interior de reentrâncias nas rochas das torres de arenito da região, o que parece ser um ambiente muito restrito e inóspito para as outras espécies desse gênero (Segatto *et al.*, 2014b).

Em alguns locais da Serra do Sudeste, populações de *P. axillaris* foram observadas perto de indivíduos de *P. exserta*. Nesses locais, também foram encontradas plantas com morfologia floral intermediária, indicando um possível processo de hibridização interespecífica (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Segatto *et al.*, 2014b) os quais tiveram confirmada sua condição de híbridos através da análise de marcadores moleculares do tipo microssatélites (Turchetto *et al.*, 2015b).

A espécie *P. integrifolia* tem flores pequenas, roxas, quase sem aroma, com uma alta quantidade de hexose no néctar (Dell’Olivo *et al.*, 2011) e são polinizadas por abelhas (Ando *et al.*, 2001). A grande variabilidade morfológica encontrada nesta espécie levou a diversas proposições taxonômicas ao longo do tempo, principalmente quando se trata da delimitação de espécies (Longo *et al.*, 2014), formando um verdadeiro complexo de táxons evolutivamente relacionados (Segatto *et al.*, 2017). Com ampla distribuição geográfica e caracteres morfológicos compartilhados com o potencial ancestral do gênero (Reck-Kortmann *et al.*, 2014), um dos membros deste grupo é, junto com *P. axillaris*, parte do cruzamento que deu origem à petúnia-de-jardim (Segatto *et al.*, 2014a).

Já a espécie comercial, *Petunia hybrida*, além de desempenhar importante papel no mercado mundial de plantas ornamentais (Gargul *et al.*, 2015), serve de modelo para estudos em diversas áreas da biologia vegetal (Meyer *et al.*, 1994; Vandenbussche *et al.*, 2004, 2016). Algumas características contribuem para o título de planta modelo, tais como crescimento rápido em condições artificiais de cultivo, ciclo de vida de aproximadamente curto, uma grande quantidade de genes bem caracterizados, disponibilidade de bancos de genes mutantes, além de apresentar flores grandes que facilitam estudos nesses órgãos.

1.2 Biologia da polinização

As relações que ocorrem entre as plantas e seus agentes polinizadores e dispersores estruturam comunidades devido à influência na distribuição espacial, na riqueza e na abundância das espécies de diferentes grupos, de tal forma que a supressão de um ou mais destes partícipes pode levar à extinção total de qualquer um dos outros (Yamamoto *et al.*, 2007). Geralmente, essas relações são associadas a síndromes de polinização, envolvendo traços florais como coloração, aroma, composição e quantidade de néctar (Hoballah *et al.*, 2007). Os traços florais que constituem uma síndrome de polinização particular podem ser separados em três categorias: (1) traços que atraem o polinizador, como a cor e o aroma; (2) traços que “recompensam” o polinizador, como volume e composição do néctar; e (3) eficiência dos traços, como o posicionamento dos órgãos reprodutivos que podem afetar a transferência efetiva do pólen (Sheehan *et al.*, 2012).

A reprodução das plantas envolve muitas etapas e a diversidade genética é fortemente influenciada pelos polinizadores e dispersores de sementes através da promoção do fluxo gênico. Vários estudos confirmaram que o ambiente exerce influência quase direta na distribuição das síndromes de polinização e dispersão (Yamamoto *et al.*, 2007). Assim, como a maioria das plantas depende de animais para polinização (Yuan *et al.*, 2013), o entendimento sobre o comportamento desses animais e a ecologia local são essenciais para a compreensão da evolução das plantas, em especial das angiospermas (Schiestl *et al.*, 2013). Um grande passo na evolução das angiospermas foi justamente o recrutamento de polinizadores animais como uma alternativa para aumentar a eficiência e a especificidade da transferência do pólen (Venail *et al.*, 2010). Dessa forma, as interações entre os agentes polinizadores e as flores são consideradas peças-chave para a diversificação do traço floral e também responsáveis, pelo menos em parte, pela especiação (Yuan *et al.*, 2013).

A evolução e a especiação acompanham as necessidades de cada espécie e seus traços florais otimizam características fundamentais para que as síndromes de polinização sejam estabelecidas (Venail *et al.*, 2010; Yuan *et al.* 2013). Por exemplo, flores de tubo longo, com coloração avermelhada, pouca produção de néctar e estruturas reprodutivas exsertas, como é o caso de *P. exserta*, tendem a ser preferidas por beija-flores (Yuan *et al.*, 2013). Já as espécies com flores brancas, tubo da corola longo, que emitem aroma adocicado especialmente ao anoitecer e tem grande produção de néctar, como *P. axillaris*, em geral são visitadas por insetos como as mariposas, que são

atraídos não só pelos longos tubos, como também pelo pico de emissão de aroma em determinadas horas da noite, quando estes insetos tem seu pico de atividade. As espécies de tubo curto e campanulado, com corola purpúrea, como *P. integrifolia* e *P. inflata*, são polinizadas geralmente por abelhas (Venail *et al.*, 2010). No caso destas duas últimas espécies, essa preferência pode ser explicada pelo fato de que as flores apresentem estames ventrais prolongados, facilitando, assim, a entrada de abelhas e a deposição de pólen nessas flores (Stuurman *et al.*, 2004).

As síndromes de polinização podem diferir em alguns ou em todos os traços florais mencionados e a diferença entre cada um desses traços geralmente é causada por polimorfismos em múltiplos genes. As transições entre síndromes de polinização são geneticamente complexas. Mesmo assim, essas mudanças ocorrem frequentemente. Na família Solanaceae, por exemplo, a síndrome de polinização mediada por pássaros evoluiu pelo menos 10 vezes durante a história evolutiva desta família de plantas (Knapp *et al.*, 2010). Diferentes atributos florais foram adaptados para polinizadores animais que exercem diferentes pressões seletivas nos traços florais, cuja importância está no fato de que esses intermediam a eficiência da transferência de pólen. O conjunto de traços pode servir de guia para um tipo particular de polinizador, e as síndromes de polinização podem ser surpreendentemente diferentes, mesmo em espécies próximas (Galliot *et al.*, 2006; Sapir and Ghara, 2017).

As espécies *P. axillaris* e *P. integrifolia* são frequentemente encontradas em simpatria ao longo de suas distribuições, porém híbridos interespecíficos nunca foram descritos entre elas como ocorrendo de forma natural. Acredita-se que a divergência na preferência por polinizadores seja, ao menos em parte, responsável pelo isolamento reprodutivo de ambas. O volume de néctar produzido e muitos componentes da morfologia floral característica de cada uma destas espécies podem contribuir para o isolamento reprodutivo dependente do polinizador (Galliot *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, as diferenças observadas nos traços florais são eficientes na manutenção do isolamento entre espécies simpátricas de *Petunia*, indicando que a visitação por insetos diferentes seja suficiente para manter o isolamento entre elas, como no caso de *P. axillaris* e *P. exserta* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006).

1.3 Genes envolvidos na determinação de características florais em *Petunia*

Considerando a importância de toda a estrutura floral para a polinização, alguns compostos são fundamentais para manter esses traços. A cor da flor é um dos mais

importantes fatores que atraem os polinizadores, além de ter importância no âmbito da horticultura e ornamentação (Luo *et al.*, 2016). As antocianinas e os flavonóis são apontados como os principais responsáveis pela pigmentação de flores (Huits *et al.*, 1994; Cress *et al.*, 2017). Esses dois compostos pertencem ao grupo dos flavonoides, que são uma grande família de metabólitos secundários em plantas. Os flavonóis são essenciais no crescimento do tubo polínico e na pigmentação de flores e outros órgãos vegetais, fornecendo uma grande gama de coloração em decorrência do tipo predominante e da concentração relativa entre eles. Esses compostos têm papel na fotoproteção, sendo geralmente considerados protetores contra raios UV e capturadores de radicais livres (Holton *et al.*, 1993). Enquanto isso, as antocianinas são os compostos mais comumente descritos como determinantes na coloração das flores (Luo *et al.*, 2016). Em *Petunia*, esses dois compostos são fundamentais para a determinação da cor da corola no gênero (Huits *et al.*, 1994) atuando em conjunto com os flavonóis.

Para a formação das antocianinas e dos flavonóis é necessária a ação de duas enzimas que controlam passos importantes, a *flavonol sintase* (FLS) e a *dihydroflavonol-4-reductase* (DFR) (Luo *et al.*, 2016). A primeira tem função de catalisar a transformação de dihidroflavonóis (dihidrokaempferol e dihidroquercetina, atuando como substrato) em flavonóis (kaempferol e quercetin). Essa enzima é codificada pelo gene *FLS*, cuja expressão é correlacionada positivamente com o acúmulo de flavonóis (Kumar and Yadav, 2013; Luo *et al.*, 2016). O gene *FLS* foi primeiramente identificado em *P. hybrida* e, subsequentemente, genes ortólogos foram clonados de várias espécies incluindo *Arabidopsis thaliana* (Preu *et al.*, 2009). Enquanto isso, a enzima DFR atua catalisando a reação de dihidroflavonóis em leucocianidinas, compostos precursores das antocianinas; essa enzima é codificada pelo gene *DFR*, cuja expressão além de aumentar a quantidade de antocianinas, atua inibindo a formação de flavonóis (Luo *et al.*, 2016).

Na rota ilustrada na Figura 2 é mostrado que dois compostos dihidroflavonoides principais podem ser catalisados de maneira a formar tanto antocianinas quanto flavonóis. Observa-se, inicialmente, a formação de uma chalcona pela enzima *chalcone synthase* (CHS) e sua subsequente isomerização pela enzima *chalcone flavanone isomerase* (CHI). As chalconas e as flavanonas são precursores centrais para produzir as diferentes classes de flavonoides. Assim, juntamente com CHS e CHI, as demais enzimas, como a *flavanone 3-hydroxylase* (F3H) e a *flavonoid 3'-hydroxylase* (F3'H),

precisam ser seletivamente ativadas, dependendo de qual tipo de flavonoide é necessitado pela planta (Huits *et al.*, 1994).

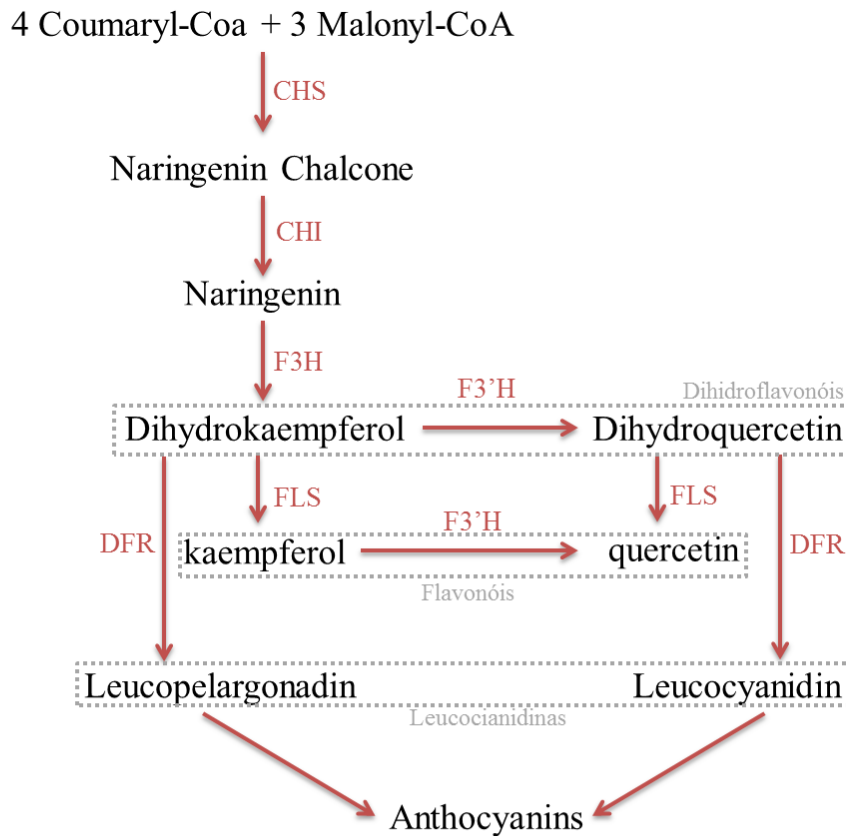


Figura 2: Rota de formação dos flavonóis e das antocianinas (adaptado de Berman *et al.*, 2016)

Diante do exposto, nota-se que os compostos flavonóis e as antocianinas competem pelo mesmo substrato, como visto no estudo de Luo *et al.* (2016) em *P. hybrida* e em outras espécies, sendo essa competição o que determina a formação de flores vermelhas ou brancas. Nesse estudo também ficou explícito que as plantas com um acúmulo de antocianinas em flores com coloração vermelha apresentaram expressão do gene *DFR* aumentada quando comparada a *FLS*. Da mesma forma, em flores brancas há uma maior taxa de expressão de *FLS* em relação a *DFR*. Assim, uma superexpressão de *FLS* ou *DFR* levaria a uma menor taxa de expressão de genes que estão envolvidos em passos iniciais da biossíntese de flavonoides. Isso pode ser explicado pelo mecanismo de *feedback* que ocorre na rota dos flavonoides como descrito por Luo *et al.* (2016).

Adicionalmente, Sheehan *et al.* (2016) demonstraram que o fator de transcrição MYB-FL regula a expressão do gene *FLS*. Logo, o gene *MYB-FL* que pertence à família dos fatores de transcrição R2R3-MYB é um dos principais determinantes dos níveis de compostos flavonóis em flores de *Petunia*. A luz UV não é percebida por humanos, mas sim por insetos e outros animais polinizadores. Eles podem ser capazes de associar diferenças na absorção de UV com as recompensas florais. As espécies *P. integrifolia* e *P. inflata*, por exemplo, são representantes do clado de tubo curto (Reck-Kortmann *et al.*, 2014) na filogenia do gênero, que é composto por espécies de flores pequenas e coloração púrpura ou magenta, pólen azul e que refletem UV. Enquanto isso, *P. axillaris* e *P. exserta* apresentam tubo longo, sendo que a primeira apresenta corolas que absorvem UV e a segunda flores que refletem UV (Sheehan *et al.*, 2016). Em *P. exserta* a expressão do gene *MYB-FL* é mantida. Entretanto, a capacidade de absorver UV foi perdida devido à deleção de um único par de bases na região codificadora do gene, alterando o quadro de leitura e formando um *stop codon* prematuro (Sheehan *et al.*, 2016). Portanto, as espécies de *Petunia* que apresentam o gene *MYB-FL* funcional tendem a apresentar flores que absorvem UV devido ao elevado acúmulo de flavonóis.

1.4 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são sequências de DNA que podem ser encontradas em localizações específicas no genoma, as quais são transmitidas seguindo padrões de herança genética. Um marcador molecular pode ser definido de várias formas: pode ser uma marca ou um alelo cromossômico que permita o rastreamento de uma região específica do DNA; pode ser uma parte específica de DNA com uma posição conhecida no genoma. Uma vez que os marcadores e seus genes alvo estão próximos no mesmo cromossomo, eles tendem a ser herdados juntos, possibilitando assim a criação de mapas de ligação. Os marcadores moleculares não devem ser considerados genes, pois geralmente não têm efeito biológico e não estão sob o efeito direto da seleção. Em vez disso, podem ser considerados “pontos de referência” constantes no genoma (Semagn *et al.*, 2006).

O progresso na genética molecular nas últimas décadas gerou conhecimento e ferramentas fundamentais para estudos sobre filogenia e genética de populações, possibilitando a identificação de espécies e a caracterização de ecossistemas, além de avaliar a variabilidade genética entre populações e dentro de uma mesma população. O uso de marcadores combinados com metodologias estatísticas tem sido eficiente na

discriminação genética de indivíduos (Rosa and Paiva, 2009). Apesar disso, devido à existência de várias técnicas moleculares e às diferenças em seus princípios e metodologias, a escolha do tipo de marcador molecular requer uma consideração cuidadosa já que depende dos objetivos de cada trabalho (Semagn *et al.*, 2006).

Alguns marcadores moleculares tais como os *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (CAPS) dependem da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e foram desenvolvidos de forma que contassem com análises mais rápidas e também necessitassem de uma menor quantidade de DNA quando comparados a técnicas baseadas integralmente em fragmentos de restrição por exemplo (Michaels and Amasino, 1998).

Os marcadores CAPS são uma combinação de PCR e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A técnica envolve a amplificação por PCR de uma região específica do DNA, seguida pela digestão enzimática com uma enzima de restrição que identifica sítios polimórficos nos fragmentos amplificados. Assim, os marcadores CAPS se baseiam na diferença de padrões de digestão por enzimas de restrição de fragmentos de PCR para regiões conhecidas do DNA. A variação é devida aos polimorfismos de nucleotídeos entre os indivíduos ou espécies. Passos críticos na abordagem por CAPS incluem a extração de DNA, as condições de PCR e o número ou distribuição dos sítios polimórficos (Michaels and Amasino, 1998).

Os CAPS apresentam diversas características positivas como marcadores moleculares na identificação de genes de interesse, quer em estudos de caracterização da diversidade genética, quer na identificação de espécies ou processos de especiação. Primeiro, como as análises de tamanho de fragmento de restrição são baseadas na amplificação por PCR, o processo é fácil e rápido, especialmente considerando espécies com genomas extensos (Matsumoto and Tsumura, 2004). Segundo, os *primers* CAPS desenvolvidos a partir de ESTs (*expressed sequence tags*) são muito mais úteis como marcadores genéticos para estudos de mapeamento comparativo do que aqueles derivados de sequências não funcionais, como marcadores microssatélites por exemplo. Terceiro, marcadores CAPS são codominantes podendo, desta forma, identificar indivíduos heterozigotos ou mesmo híbridos o que permite associar fenótipos intermediários e número de cópias alélicas. Apesar disso, a habilidade dos CAPS de detectar polimorfismos pode ser relativamente baixa quando comparada com outras técnicas, uma vez que necessita que as mutações estejam em nucleotídeos que afetam os sítios de restrição para a detecção dos polimorfismos. Logo, o desenvolvimento destes

marcadores só é possível quando as mutações alteram ou criam um sítio de reconhecimento de enzimas de restrição (Matsumoto and Tsumura, 2004). Polimorfismos em um único nucleotídeo, denominados *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) são as variações mais comuns que ocorrem no genoma. Como os SNPs são encontrados em grande quantidade, a busca por marcadores para esses polimorfismos tem potencial para responder questões nos mais diferentes campos de estudo da Biologia. A identificação de SNPs tem progredido bastante e muitos ensaios têm sido feitos. Ainda assim, a maioria desses experimentos exigem equipamentos e reagentes especializados para que a análise seja efetiva. Então, para uma genotipagem simples e rápida, buscam-se ensaios que não precisem de equipamentos sofisticados. Uma solução para esse problema se baseia na detecção de sítios de SNP por uma endonuclease de restrição específica, cuja sequência de reconhecimento tenha sido alterada ou introduzida por um SNP. Juntamente com o teste de PCR, os SNPs correspondente serão analisados como marcadores do tipo CAPS (Thiel *et al.*, 2004).

A fim de facilitar a conversão de SNPs em marcadores CAPS, um programa computacional foi desenvolvido, o SNP2CAPS. Esse programa funciona na proposta de que um simples algoritmo faz uma varredura nas sequências dos genes alvo de diferentes indivíduos ou espécies, as quais passaram por um alinhamento múltiplo, e procura por sítios de restrição que possibilitem a dedução de candidatos a CAPS pela identificação de padrões de restrição alternativos (Thiel *et al.*, 2004). No presente trabalho, o programa foi utilizado para facilitar o estudo de diferenciação entre as espécies *P. axillaris*, *P. exserta* e *P. integrifolia* em nível de caracterização gênica e também de relação fenótipo-genótipo considerando genes relacionados a características florais relevantes para o processo de especialização em relação à síndrome de polinização.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Contribuir para o conhecimento dos fatores genéticos e evolutivos determinantes dos processos de diversificação no gênero *Petunia* relacionados às síndromes de polinização.

2.2 Objetivos específicos

Identificar marcadores moleculares para genes envolvidos na coloração de flores de *Petunia* a partir da análise de genomas e transcriptomas;

Desenvolver metodologia para genotipar espécies e indivíduos de *Petunia* baseada em polimorfismos dos genes envolvidos na determinação da coloração das flores;

Identificar eventos de hibridação entre espécies de *Petunia* de diferentes síndromes de polinização;

Avaliar a relação de eventos de hibridação e os agentes polinizadores de flores de *Petunia*.

3. JUSTIFICATIVA

A partir da grande variabilidade populacional encontrada nas espécies de *Petunia* que apresentam diferentes síndromes de polinização, diferenças na expressão de determinados genes e em fenótipos relacionados aos atrativos florais podem ser encontradas em cada espécie. Além disso, algumas espécies apresentando diferentes síndromes de polinização são capazes de produzir híbridos naturais, cuja morfologia é intermediária entre as espécies parentais, o que sugere a possibilidade de perda ou mudança de agente polinizador. Como a identificação de todos os genes envolvidos na determinação dos diferentes atrativos florais de cada espécie é um processo trabalhoso que demanda grande investimento de tempo e financeiro, tornando praticamente inviável sua utilização em estudos populacionais ou de larga escala, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas metodológicas que permitam utilizar marcadores moleculares na avaliação de genes alvo em populações para compreender o processo de especiação e hibridação, além da identificação das forças diretrizes das variações que levam à perda ou aquisição de novos agentes polinizadores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Busca por sequências

As sequências completas dos genes *FLS* e *MYB-FL* foram obtidas do National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; acesso agosto de 2016) para as espécies *Petunia axillaris*, *P. exserta* e *P. integrifolia*, sendo selecionadas as “Coding Sequences” (CDS) para os referidos genes. A sequência de *FLS* para *P. hybrida* também foi obtida e incluída nas análises. Como o gene *DFR* não

apresenta sequência conhecida para as três espécies silvestres de *Petunia*, a CDS do gene *DFR* de *P. hybrida* foi alinhada pela plataforma *online blast* do NCBI contra o “Transcriptome Shotgun Assemble” (TSA) do gênero *Petunia* (Guo *et al.* 2015) obtido a partir do banco de dados NCBI. Os “contigs” (conjunto de segmentos de DNA sobrepostos) resultantes foram ordenados pelo *E-value* de forma decrescente e então selecionados a partir do transcriptoma dessas três espécies. O *E-value* foi mantido como *default*, sendo >10.0. Diante da disponibilidade do transcriptoma das espécies (Guo *et al.*, 2015) *P. axillaris*, *P. exserta* e *P. integrifolia* foi possível a busca por *contigs* diferentes das sequências já descritas para *FLS* e *MYB-FL*. Por essa razão, também foi conduzida uma busca *in silico* por ortólogos no transcriptoma das três espécies, sendo utilizada como isca (*query*) a sequência conhecida de cada CDS para cada espécie correspondente. Contudo, os *contigs* encontrados apresentaram sequências idênticas às sequências já conhecidas. Sendo assim, as análises para *MYB-FL* prosseguiram somente com as sequências de *P. axillaris*, *P. exserta* e *P. integrifolia*, e para o *FLS*, as análises seguiram com as sequências de *P. axillaris*, *P. exserta*, *P. integrifolia* e *P. hybrida*. Em seguida, foi gerado um alinhamento múltiplo para cada gene alvo individualmente, utilizando as sequências de nucleotídeos das três espécies silvestres e de *P. hybrida*, quando disponíveis (*DFR* e *FLS*), através do algoritmo ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>. Acesso em agosto de 2016). Os alinhamentos múltiplos resultantes foram empregados na etapa seguinte.

4.2 Identificação de Marcadores CAPS

Os marcadores CAPS, cada um constituído de um par de *primers* e uma enzima de restrição, foram identificados utilizando o programa SNP2CAPS (Thiel *et al.* 2004) a partir do alinhamento gerado pelo ClustalW de cada gene individualmente. O programa SNP2CAPS permite identificar regiões de polimorfismos (mutações de ponto ou SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*) entre as sequências alinhadas, sugerindo enzimas de restrição úteis em sua detecção. Além disso, essa análise fornece um indicativo das regiões mais apropriadas para o desenho de *primers* de cada marcador. A seleção dos marcadores sugeridos pelo SNP2CAPS seguiu os seguintes critérios: (1) possibilidade de alinhamento de *primers* dentro de um único éxon do gene alvo, permitindo a utilização dos CAPS em amostras de DNA; (2) disponibilidade comercial da enzima de restrição; (3) marcadores polimórficos entre as espécies *P. axillaris* e *P. exserta* em função de um dos objetivos específicos do presente trabalho; (4) possibilidade de

obtenção de fragmentos de clivagem que permitissem a diferenciação entre os alelos das espécies *P. axillaris* e *P. exserta*, diferindo em pelo menos 50 pb, facilitando a detecção dessa diferença por eletroforese em gel de agarose.

Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e submetidos aos testes de formação de estruturas diméricas (*selfdimer* ou *heterodimer*) formadas a partir da interação intermolecular dos *primers*, onde o *primer* é homólogo a ele mesmo ou ao segundo *primer*, respectivamente, sem que haja a amplificação da sequência de DNA por eles flanqueada durante a realização da reação de PCR, e estrutura em grampo (*hairpin*), quando existe a complementaridade entre os *primers*, utilizando a ferramenta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Os *primers* foram sintetizados por demanda à Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, California, USA).

4.3. Material vegetal e extração de DNA

Folhas jovens de um total de 51 indivíduos (28 indivíduos com morfologia floral típica de *P. axillaris*, oito indivíduos com fenótipo típico de *P. exserta* e 15 indivíduos com fenótipo intermediário entre ambas e considerados como prováveis híbridos interespecíficos) foram coletadas e armazenadas em sílica gel. As amostras foram coletadas durante a primavera de 2015, em dois diferentes pontos no Município de Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, onde estas espécies ocorrem. O DNA total foi extraído conforme protocolo de Roy *et al.* (1992) adaptado para amostras de *Petunia*. Para a extração do DNA genômico de cada indivíduo foi realizada a pulverização do tecido vegetal com auxílio de nitrogênio líquido em gral. Uma pequena quantidade de tecido pulverizado foi transferida para um microtubo e adicionados 600 µL de tampão de extração à base de CTAB (cetyl-trimethylammonium bromide; Sigma-Aldrich Chemicals Co., St. Louis, Missouri, USA); 60 µL de β-mercaptoetanol (Invitrogen); e 10 µL de proteinase K (Invitrogen; 10 mg/mL). Em seguida, a mistura foi incubada a 65° C por 40 min, sendo agitada levemente a cada 10 min. Após o período de incubação, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 min e acrescentados 600 µL de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1, v/v). A nova mistura foi agitada manualmente por 10 min e centrifugada a 14000 rpm durante 25 min. Imediatamente após o término da centrifugação, aproximadamente 600 µL da fase aquosa superior foram transferidos para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionado igual volume de isopropanol gelado e esta nova mistura foi armazenada em freezer por pelo menos 1

h e 30 min. A solução foi homogeneizada manualmente e centrifugada por 20 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 14000 rpm por 7 min (3X). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente por 30 min. O DNA obtido foi eluído pela adição de 30 μ L de água ultrapura e 0,5 μ L de RNase A (Invitrogen; 10 mg/mL), incubado por um período de 1 h e 30 min a 37° C seguido de 24 horas à temperatura ambiente. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium, Fremont, CA, EUA). Os DNAs foram quantificados em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.) e diluídos a uma concentração final de 20 ng/ μ L para serem utilizados como molde nas reações de amplificação para cada gene de acordo com os conjuntos de *primers* previamente desenhados e posterior clivagem.

4.4. Reações de PCR

Os protocolos de PCR adotados estão detalhados nos quadros 1 e 2. Como controle positivo para o estabelecimento dos protocolos de PCR e clivagem enzimática, os 51 indivíduos foram genotipados com o CAPS *MYB-FL-3'* como descrito por Sheehan *et al.* (2016) usando os *primers* detalhados no quadro 3 e a enzima MnlI (Invitrogen).

Quadro 1: Composição da reação de amplificação para o gene alvo *MYB-FL*.

	Concentração Final
Tampão (10X)	1X
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM
dNTP (2 mM)	200 μ M
Primer <i>MYB-FL-3'</i> F (10 μ M)	1 μ M
Primer <i>MYB-FL-3'</i> R (10 μ M)	1 μ M
Platinum <i>Taq</i> (10 U/ μ L)	1,5 U/reação
DNA	40 ng/reação
Volume Final	15 μ L

Quadro 2: Programa de PCR para o gene alvo *MYB-FL*.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94° C	3 minutos	1
94° C	30 segundos	30
55° C	30 segundos	
72° C	1 minuto	
72° C	7 minutos	1

Quadro 3: Sequência de *primers* para o gene *MYB-FL*

Gene alvo (CAPS)	Sequência dos Primers (5'-3')		Enzima	Referência
MYB-FL-3'	Forward	AATAGAGGTCTAACTCAGTATGCAT	MnII	Sheehan <i>et al.</i> , 2016
	Reverse	GGTTCGTGCCTTCTGTTTCC		

Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a uma concentração de 2,5% e voltagem constante de 115 V durante 1 h e 30 min, corado com GelRed. O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com marcador Low DNA Mass (Invitrogen). O mesmo procedimento foi usado no estabelecimento dos protocolos dos *primers* obtidos para cada gene, sendo a temperatura de anelamento adequada ajustada conforme necessário.

4.5. Clivagem dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos para o gene *MYB-FL* foram clivados com a enzima de restrição MnII. A composição da reação de clivagem está detalhada no Quadro 4. Após a clivagem, os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e, além do marcador Low DNA Mass, foi utilizado o 100 bp Ladder (Invitrogen). O protocolo usado foi adaptado de Sheehan *et al.* (2016).

Quadro 4: Composição da reação de clivagem com a enzima MnlI.

	Concentração Final
Tampão G	0,33 X
Produto PCR	10 µL
Enzima MnlI	5 U/reação
Volume Final	15 µL

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das sequências

De posse das CDS dos genes *FLS* e *MYB-FL* para *P. axillaris*, *P. exserta*, *P. integrifolia* e *P. hybrida* (essa última apenas no caso do gene *FLS*) foi realizado o alinhamento múltiplo para cada gene separadamente. Enquanto isso, para o gene *DFR*, após execução de *blast* usando como “isca” a CDS de *P. hybrida* contra o transcriptoma de *P. axillaris*, *P. exserta* e *P. integrifolia*, foram selecionados os *contigs* GBRU01068126.1, GBRT01048624.1, GBRV01043509.1, respectivamente, sendo então realizado o alinhamento múltiplo.

5.2 Obtenção dos Marcadores CAPS

A obtenção de marcadores CAPS objetivou principalmente a diferenciação de alelos das espécies *P. axillaris* e *P. exserta*, tendo em vista a observação de possíveis híbridos entre essas espécies na região da Pedra da Cruz. Assim, foram analisados no programa SNP2CAPS os alinhamentos múltiplos para os três genes (*FLS*, *DFR* e *MYB-FL*). Para o gene alvo *FLS*, não foi encontrada nenhuma enzima que permitisse a diferenciação entre as duas espécies. Ou seja, a sequência da CDS de *FLS* não apresenta um sítio polimórfico que permita essa distinção. Porém, essa análise poderá ser útil em outros estudos para diferenciar, por exemplo, *P. axillaris* e *P. exserta* de *P. integrifolia* e *P. hybrida*. Uma possível explicação se baseia na filogenia das espécies de *Petunia*, na qual *P. axillaris* e *P. exserta* se agrupam em um mesmo clado. Enquanto que *P. integrifolia* não se agrupa nesse clado, e sua distinção em relação às outras duas espécies quase sempre é notável (Reck-Kortmann *et al.*, 2014). Logo, era esperado que a frequência de sítios polimórficos fosse menor entre as espécies mais próximas. Com base em dados moleculares e geográficos, é visto que *P. exserta* derivou de *P. axillaris* e, portanto, pode representar um caso de especiação simpátrica (Hermann *et al.*, 2013). Estudos filogenéticos prévios (Ando *et al.*, 2005; Kulcheski *et al.*, 2006) mostram que,

apesar da variação fenotípica entre espécies de *Petunia*, a divergência genética entre as mesmas é muito pequena. Já para o gene *DFR*, o programa indicou enzimas que, além de permitir a diferenciação entre *P. axillaris* e *P. exserta*, também permitiu o alinhamento de *primers* em um mesmo éxon, possibilitando a utilização dos mesmos *primers* em futuras análises de expressão gênica. A enzima selecionada para o gene *DFR* foi Hpy8I (Tabela 1). Essa enzima consegue diferenciar as duas espécies de interesse devido a um polimorfismo causado pela troca de uma base adenina, presente em *P. axillaris*, por uma base guanina, presente em *P. exserta*. Esse tipo de mutação, chamada de mutação de ponto, pode afetar a função de uma proteína. Com base nas informações sugeridas pelo SNP2CAPS, na Tabela 2, constam os tamanhos dos fragmentos esperados após a PCR e após a clivagem com a enzima Hpy8I para cada espécie.

Enquanto isso, para o gene *MYB-FL*, a enzima selecionada foi Alw26I (Tabela 1), que também permitiu o alinhamento dos *primers* em um mesmo éxon. Essa enzima é indicada para a diferenciação entre os alelos de *P. axillaris* e *P. exserta*, pois *P. exserta* apresenta uma deleção de uma citosina. Essa deleção eliminou um sítio de restrição para a enzima MnlI - CAPS *MYB-FL-3'* (Sheehan *et al.*, 2016), e gerou um sítio de restrição para a enzima Alw26I - CAPS *MYB-FL* (desenhado no presente trabalho). Nesse caso, tem-se uma mutação *frameshift*, pois essa deleção alterou o quadro de leitura. Porém, não foi analisado o efeito dessa mutação na estrutura da proteína. Na Tabela 2, estão apresentados os tamanhos de fragmentos esperados após a PCR e após a clivagem com a enzima Alw26I.

Tabela 1: Marcadores CAPS para genes de coloração em *Petunia*.

Gene alvo (CAPS)		Sequência dos <i>Primers</i> (5'-3')	Enzima
<i>DFR</i>	Forward	TAAAGACCTGCCAGTGGTGTC	Hpy8I
	Reverse	AGACTTCAACATTGCTTAACATTTC	
<i>MYB-FL</i>	Forward	TAGGTGGTCTTTGATGGC	Alw26I
	Reverse	ATCAACAATTGAATCTCCTT	

Tabela 2: CAPS: tamanhos de fragmentos esperados após a PCR e após a clivagem.

Gene Alvo (CAPS)	Espécie	Tamanho do amplicon (pb)	Tamanho esperado dos fragmentos após a digestão (pb)
DFR	<i>P. axillaris</i>	260	153, 66 e 41
	<i>P. exserta</i>	260	105, 66, 48 e 41
	<i>P. integrifolia</i>	260	153, 66 e 41
	<i>P. hybrida</i>	260	153, 66 e 41
	<i>P. axillaris</i>	334	334
MYB-FL	<i>P. exserta</i>	333	279 e 54
	<i>P. integrifolia</i>	334	334

5.3 Genotipagem com o CAPS MYB-FL-3'

Tabela 3: Códigos dos indivíduos de *P. axillaris*, *P. exserta* e possíveis híbridos submetidos à extração de DNA e à genotipagem com o CAPS MYB-FL-3'.

Espécie	Códigos dos indivíduos
<i>P. axillaris</i>	A713, A714, A715, A716, A721, A722, A723, A724, A725, A729, A731, A736, A738, A746, A747, A748, A753, A755, A765, A768, A770, A775, A780, A781, A783, A787, A790, A794.
<i>P. exserta</i>	E700, E704, E711, E754, E759, E774, E777, E778, E779.
Possíveis híbridos	H706, H708, H709, H712, H740, H741, H742, H743, H744, H745, H756, H766, H767, H776, H792.

O DNA de indivíduos de *P. axillaris*, *P. exserta* e de possíveis híbridos foi utilizado nas PCRs e, em seguida, os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática. Esses resultados estão apresentados a seguir em géis de agarose. O primeiro teste realizado consistiu na PCR com o DNA dos indivíduos A715, A738, A746, E759, E777, E779, H741, H744, H792 (Figura 3). Os produtos de PCR para o CAPS MYB-FL-3' ficaram em torno de 800 pb para as três espécies.

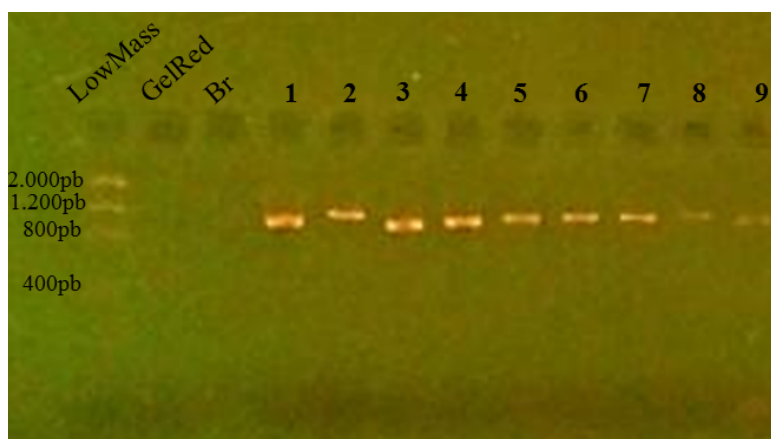


Figura 3: Gel de agarose para verificação dos produtos de PCR para o CAPS MYB-FL-3' dos indivíduos: 1) A715; 2) A738; 3) A746; 4) E754; 5) E777; 6) E779; 7) H741; 8) H744; 9) H792.

No estudo de Sheehan *et al.* (2016), os produtos de PCR obtidos para esse mesmo CAPS apresentaram um tamanho de banda entre em torno de 828 pb. Assim, pode-se inferir a correta amplificação da região do gene *MYB-FL* com o CAPS *MYB-FL-3'* para os indivíduos apresentados. Em seguida, os indivíduos A738, E759, E779, H741 e H792, amplificados previamente com os *primers* do CAPS *MYB-FL-3'*, foram selecionados para serem clivados com a enzima de restrição MnlI. Os produtos clivados foram aplicados em gel de agarose para a verificação das bandas (Figura 4). Foi possível depreender que o indivíduo A738 parece ter o alelo que contém o sítio de clivagem da enzima de restrição MnlI (alelo de *P. axillaris*). Entretanto, nesse caso foi visualizada uma banda apenas, enquanto espera-se que amostras de *P. axillaris*, ao serem digeridas com essa enzima de restrição, apresentem duas bandas, sendo uma de aproximadamente 340 pb e outra com aproximadamente 480 pb (Sheehan *et al.*, 2016). Enquanto isso, os indivíduos de *P. exserta* (Figura 3) apresentaram resultado esperado conforme Sheehan *et al* (2016), de forma que a banda visualizada após a clivagem tem o mesmo do produto de PCR, ou seja, não existe sítio de restrição. Já para os indivíduos H741 e H792 apresentaram o mesmo tamanho de banda do produto de PCR em comparação aos verificados para os indivíduos de *P. exserta*, o que indica que não houve a clivagem (Figura 4).

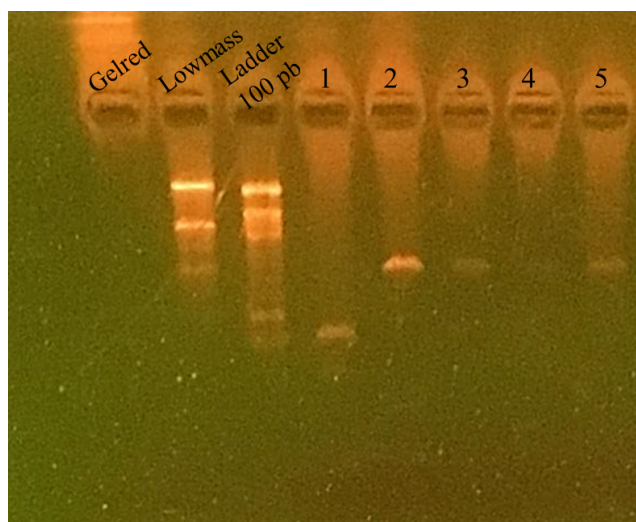


Figura 4: Gel de agarose para análise da clivagem com a enzima MnlI para amostras previamente amplificadas por PCR. 1) A738; 2) E759; 3) E779; 4) H741; 5) H792.

Esse resultado parece concordar com os registros fotográficos (Figura 5) do acervo do Laboratório de Evolução Molecular (UFRGS), através dos quais se nota maior semelhança entre as flores desses possíveis híbridos e as flores de *P. exserta*.

Nessa figura, observa-se uma diferença e também uma variabilidade de coloração entre os possíveis híbridos. Existem algumas razões prováveis para esse tipo de observação, dentre elas a própria hibridação em si, o efeito de um processo de especiação que está em andamento, ou até mesmo variabilidade de fenótipos (Segatto ALA – Tese Mestrado 2010).



Figura 5: Fotos de alguns dos prováveis híbridos. 1) H741; 2) H792; 3) H740; 4) H742; 5) H766 (Fonte: Acervo do Laboratório de Evolução Molecular – UFRGS).

No estudo de Sheehan *et al.* (2016), foram estudadas populações de regiões como a região da Pedra da Cruz – como neste trabalho, e região da Serra do Sudeste. A genotipagem dessas populações revelou que a grande maioria dos indivíduos de *P. exserta* dessas regiões apresentava homozigose para a deleção que ocorre no gene *MYB-FL*. Em relação à população de *P. axillaris* dessas regiões, a genotipagem sugeriu que, apesar da grande maioria apresentar homozigose para o alelo de *P. axillaris* (sem a deleção), alguns indivíduos eram heterozigotos (continham um alelo sem a deleção e outro com a deleção). Além disso, alguns desses indivíduos considerados possíveis híbridos estavam localizados na zona de simpatria entre as duas espécies, podendo justificar a heterozigose (Sheehan *et al.*, 2016). O alto grau de variação fenotípica que ocorre nesses locais pode ser consequência da hibridação interespecífica.

Na tentativa de reforçar a visualização de bandas no gel de clivagem, foi realizado um novo teste para as reações de amplificação com indivíduos já testados (Figura 6). Para isso, na PCR, além dos indivíduos A738, E759, E779, H741 e H792, foram adicionados o A790, e também os possíveis híbridos H740, H742 e H766, cujos fenótipos são mais próximos de *P. axillaris*, como visto na Figura 5.

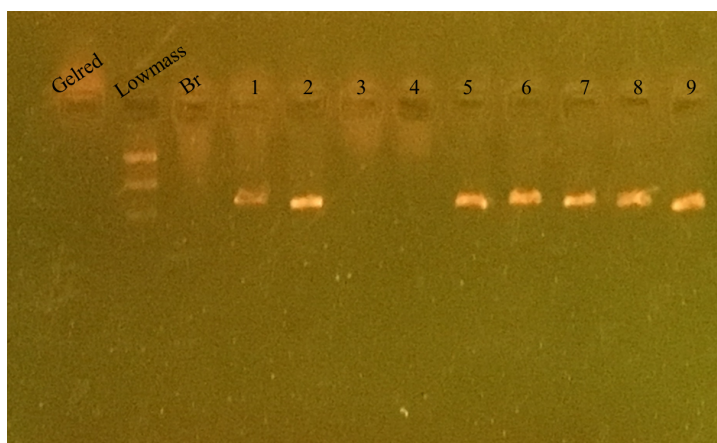


Figura 6: Gel de agarose para verificação da PCR dos indivíduos: 1) A738; 2) A790; 3) E759; 4) E779; 5) H740; 6) H741; 7) H742; 8) H766; 9) H792.

Entretanto, não houve amplificação dos indivíduos de *P. exserta*, sendo então repetida a PCR para todas as amostras dessa espécie. Na figura 7, estão dispostos todos os indivíduos de *P. exserta* submetidos à PCR. Os mesmos indivíduos que não apresentaram amplificação na PCR anterior não apresentaram, também, nesse novo teste. Entretanto, para dar continuidade ao próximo passo, dentre os indivíduos que apresentaram amplificação, foram selecionados dois (E700 e E704) para a clivagem com a enzima MnlI, juntamente com os demais indivíduos de *P. axillaris* e possíveis híbridos.

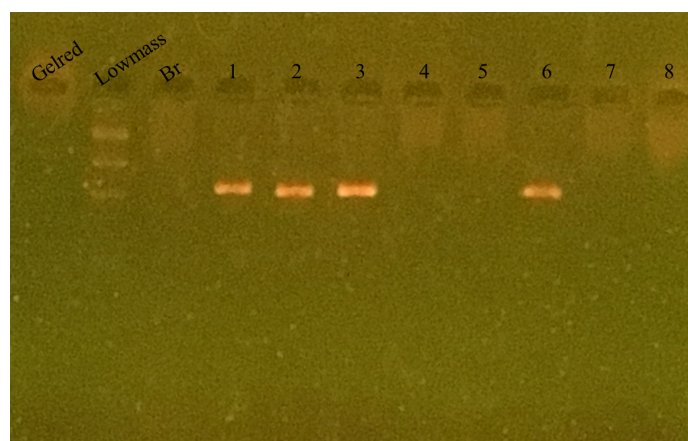


Figura 7: Gel de agarose para verificação da PCR de todas as amostras de indivíduos de *P. exserta* utilizadas no estudo. 1) E700; 2) E704; 3) E711; 4) E759; 5) E774; 6) E777; 7) E778; 8) E779.

Na Figura 8, nota-se que ainda não foi possível observar a presença de duas bandas após a clivagem para os indivíduos de *P. axillaris* e para os prováveis híbridos

com fenótipo mais próximo de *P. axillaris* (H742 e H766). Ainda assim, para os indivíduos A738, A790 e H742 é notável a redução dos tamanhos das bandas após a clivagem quando comparados aos tamanhos das bandas antes da clivagem (Figura 7).

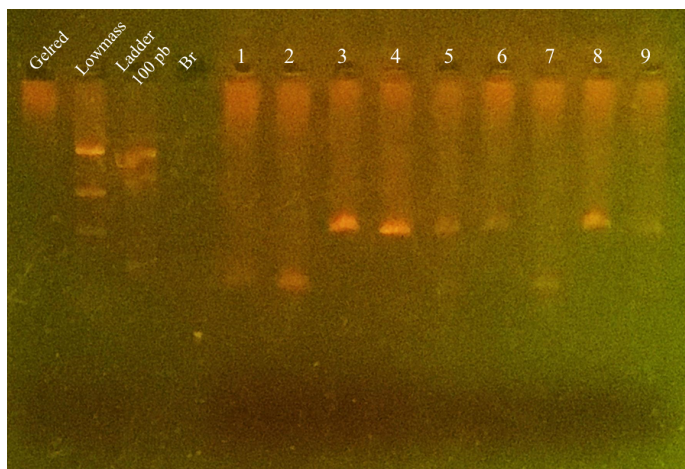


Figura 8: Gel de agarose para análise da clivagem com a enzima MnlI para amostras previamente amplificadas por PCR. 1) A738; 2) A790; 3) E700; 4) E704; 5) H740; 6) H741; 7) H742; 8) H766; 9) H792.

Isso possivelmente indica a presença de um sítio de clivagem nos indivíduos de *P. axillaris*, e também no possível híbrido H742, o qual apresenta fenótipo mais próximo de *P. axillaris*. Já o possível híbrido H740 aparentou um padrão de clivagem com duas bandas, sendo provavelmente um indivíduo heterozigoto – logo, um híbrido entre as espécies *P. axillaris* e *P. exserta*. A razão pela qual H740 seja um possível híbrido pode ser relacionada à localização dessa espécie em uma zona de simpatria entre *P. axillaris* e *P. exserta*, onde é mais provável a ocorrência da hibridação interespecífica (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudos de Grant and Temeles (1992) concluíram que beija-flores visitam diferentes espécies e aprendem quais são e quais não são fontes satisfatórias de néctar. Logo, é possível que essas aves sejam responsáveis pela transferência de pólen entre *P. axillaris* e *P. exserta*.

Concluindo, existe um grande potencial para a construção de marcadores do tipo CAPS para a identificação e caracterização de genes de interesse na diferenciação das síndromes florais no gênero *Petunia*. A obtenção destes marcadores também tem potencial para a identificação de prováveis híbridos entre as diferentes espécies e poderão ser utilizados em estudos envolvendo grandes tamanhos amostrais para fins de entender dinâmicas evolutivas ou caracterização dos próprios genes aos quais estão relacionados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 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). *Annals of Botany* 88: 403-413.

Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Marchesi E, Suarez E, Basualdo IL (2005) Phylogenetic Analysis of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) using Chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany* 96: 289-297.

Cress BF, Leitz QD, Kim DC, Amore TD, Suzuki JY, Linhardt RJ, Koffas MAG (2017) CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E. coli* for O-methylated anthocyanin production. *Microbial Cell Factories* 16: 1-14.

Dell'Olivo A, Hoballah ME, Gubitz T, Kuhlemeier C (2011) Isolation barriers between *Petunia axillaris* and *Petunia integrifolia* (Solanaceae). *Evolution* 65: 1979-1991.

Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL, de Freitas LB (2013) Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 171: 140-153.

Galliot C, Hoballah ME, Kuhlemeier C, Stuurman J (2006) Genetics of flower size and nectar volume in *Petunia* pollination syndromes. *Planta* 225: 203-212.

Gargul JM, Mibus H, Serek M (2015) Manipulation of MKS1 gene expression affects *Kalanchoë blossfeldiana* and *Petunia hybrida* phenotypes. *Plant Biotechnology Journal* 13: 51-61.

Genovart M (2009) Natural hybridization and conservation. *Biodiversity and Conservation* 18: 1435- 1439.

Gerats T, Vandenbussche M (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends in Plant Science* 10: 251-256.

Grant V (1992) Floral isolation between ornithophilous and sphingophilous species in *Ipomopsis* and *Aquilegia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 11828- 11831.

Grant V & Temeles EJ (1992) Foraging ability of rufous hummingbirds on hummingbirds flowers and hawkmoth flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 9400- 9404.

Guo Y, Weigert-Rininger KE, Vallejo VA, Barry CS, Warner RM (2015) Transcriptome-enabled marker discovery and mapping of plastochron-related genes in *Petunia* spp. *Bmc Genomics* 16: 1-19.

Harrison, RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. In: Futuyma D. and Antonovics J. (eds) *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Volume 7. Oxford University Press, New York, pp 69- 128.

Hoballah ME, Gübitz T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell'Olivo A, Arnold M, Kuhlemeier C (2007) Single Gene-Mediated Shift in Pollinator Attraction in *Petunia*. *The Plant Cell Online* 19: 779-790.

Holton TA, Brugliera F, Tanaka Y (1993) Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* 4: 1003-1010.

Huits HSM, Gerats AGM, Kreike MM, Mol JSM, Koes RE (1994) Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* 6: 295-310.

Knapp S (2010) On 'various contrivances': pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences* 365: 449-460.

Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM, de Freitas LB (2006) Molecular Phylogenetic Analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126: 3-14.

Kumar V, Yadav SK (2013) Overexpression of CsANR Increased Flavan-3-ols and Decreased Anthocyanins in Transgenic Tobacco. *Molecular Biotechnology* 54: 426-435.

Longo D, Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Bonatto SL, de Freitas LB (2014) Phylogeography of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. *Botanical Journal Of The Linnean Society* 174: 199-213.

Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM, de Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology* 15: 4487-4497.

Luo P, Ning G, Wang Z, Shen Y, Jin H, Li P, Huang S, Zhao J, Bao M (2016) Disequilibrium of Flavonol Synthase and Dihydroflavonol-4-Reductase Expression Associated Tightly to White vs. Red Color Flower Formation in Plants. *Frontiers In Plant Science* 6: 1-12.

Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 229- 237.

Matsumoto A, Tsumura Y (2004) Evaluation of cleaved amplified polymorphic sequence markers for *Chamaecyparis obtusa* based on expressed sequence tag information from *Cryptomeria japonica*. *Theoretical And Applied Genetics* 110: 80-91.

Meyer P, Niedenhof I, Louis MT (1994) Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *The EMBO Journal* 13: 2084-2088.

Michaels SD, Amasino RM (1998) A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant Journal* 14: 381-385.

Preu A, Stracke R, Weisshaar B, Hillebrecht A, Matern U, Martens S (2009) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase. *FEBS Letters* 583: 1981-1986.

Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL, de Freitas LB (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 81: 19-28.

Rosa AJM, Paiva SR (2009) Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. *Embrapa s/v*: 1-33.

Sapir Y, Ghara M (2017) The (relative) importance of pollinator-mediated selection for evolution of flowers. *American Journal of Botany* 104: 1-3.

Schiest FP, Johnson SD (2013) Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends In Ecology & Evolution* 28: 307-315.

Segatto, ALA. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Petunia exserta* Stehmann (Solanaceae). 2010. 98 f. Tese de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Segatto ALA, Ramos-Fregonezi AMC, Bonatto SL, de Freitas LB (2014a) Molecular insights into the purple-flowered ancestor of Garden Petunias. *American Journal of Botany* 101: 119–127.

Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL, de Freitas LB (2014b) Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 70: 504-512.

Segatto ALA, Reck-Kortmann M, Turchetto C, Freitas LB. (2017) Multiple markers, niche modelling, and bioregions analyses to evaluate the genetic diversity of a plant species complex. *BMC Evolutionary Biology* 17: 234.

Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 2540-2568.

Sheehan H, Hermann K, Kuhlemeier C (2012) Color and Scent: How Single Genes Influence Pollinator Attraction. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology* 77: 117-133.

Sheehan H, Moser M, Klahre U, Esfeld K, Dell'Olivo A, Mandel T, Metzger S, Vandenbussche M, de Freitas LB, Kuhlemeier C (2016) MYB-FL controls gain and loss of floral UV absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nature Genetics* 48: 159-166.

Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, de Freitas LB, Semir J (2009) The Genus *Petunia*. *Petunia* 1-28.

Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C, Kuhlemeier C (2004) Dissection of Floral Pollination Syndromes in *Petunia*. 168: 1585-1599.

Thiel T, Michalek W, Varshney R, Graner A (2004) Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical And Applied Genetics* 106: 411-422.

Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E, Kao T (2003) Breakdown of Self-Incompatibility in a Natural Population of *Petunia axillaris* Caused by Loss of Pollen Function. *Plant Physiology* 131: 1903-1912.

Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, Kuhlemeier C, Neffa VGS, Speranza PR, Bonatto SL, de Freitas LB (2014) Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology* 23: 374-389.

Turchetto C, Lima JS, Rodrigues DM, Bonatto SL, de Freitas LB (2015a) Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). *Annals Of Botany* 115: 939-948.

Turchetto C, Segatto AL, Beduschi J, Bonatto SL, de Freitas LB (2015b) Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *Aob Plants* 7: 1-12.

Vandenbussche M, Zethof J, Royaert S, Waterings K, Gerats T (2004) The Duplicated B-Class Heterodimer Model: Whorl-Specific Effects and Complex Genetic Interactions in *Petunia hybrida* Flower Development. *The Plant Cell Online* 16: 741-754.

Vandenbussche M, Chambrier P, Bento SR, Morel P (2016) *Petunia*, Your Next Supermodel? *Frontiers In Plant Science* 7: 11-11.

Venail J, Dell'Olivo A, Kuhlemeier C (2010) Speciation genes in the genus *Petunia*. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences* 365: 461-468.

Watanabe H, Ando T, Iida S, 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. *Japanese Society for Horticultural Science* 65: 625-634.

Yamamoto LF, Kinoshita LS, Martins FR (2007) Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 553-573.

Yuan Y, Byers KJRP, Bradshaw HD (2013) The genetic control of flower–pollinator specificity. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 422-428.