

Identificação de polimorfismos em genes relacionados à cor da corola em espécies de *Petunia* Juss. (Solanaceae).

SILVÉRIO AC, FREITAS LB

Laboratório de Evolução Molecular, Instituto de Biotecnologia, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS – Brasil.

INTRODUÇÃO

Petunia Juss. (Solanaceae) é um gênero nativo do sul da América do Sul (**Figura 1**) composto por 14 espécies, as quais apresentam diferenças morfológicas relacionadas à síndrome de polinização. A característica analisada neste trabalho foi a produção de pigmentos florais em duas espécies do gênero, *Petunia exserta* Stehmann (**Figura 2**), com flores vermelhas e polinizadas por beija-flores, e *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. subsp. *axillaris* que apresenta flores brancas e tem mariposas como seu principal agente polinizador; e de seus híbridos naturais, que ainda não têm seus polinizadores identificados. Neste trabalho foi verificada a existência de polimorfismos entre as espécies supracitadas e seus híbridos naturais através da análise de marcadores do tipo CAPS para o fator de transcrição MYB-FL, relacionado à produção de pigmentos florais e perda ou ganho de absorvância de luz UV nas flores das espécies do gênero.

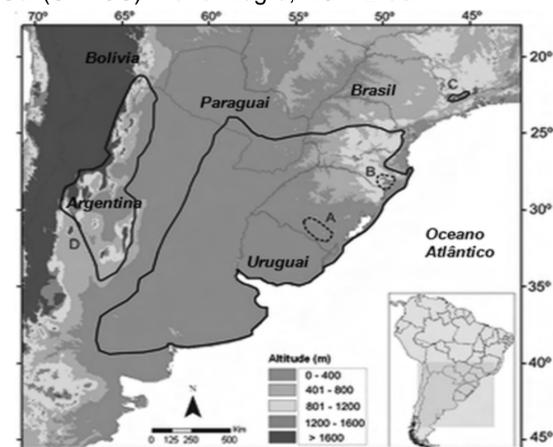


Figura 1. Distribuição geográfica do gênero *Petunia*. (Stehmann et al., 2009)



Figura 2. *Petunia exserta*, híbridos de A a E, e, *Petunia axillaris*, da esquerda para a direita.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção do marcador CAPS:

- Obtenção da sequência completa do MYB-FL das duas espécies e seleção das sequências codificadoras (NCBI);
- Busca por homólogos no transcriptoma de *P. axillaris* e *P. exserta* (BLAST);
- Alinhamento sequencial múltiplo por CLUSTALW (GenomeNet);
- Obtenção do marcador CAPS MYB-FL, constituído de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e uma enzima de restrição (SNP2CAPS);
- Os *primers* foram desenhados com o programa Primer BLAST e submetidos aos testes de formação de estruturas diméricas com a ferramenta (OligoAnalyzer).

2. Genotipagem:

- Extração de DNA;
- Amplificação por PCR;
- Clivagem com enzima de restrição, MnlI (CAPS MYB-FL-3');
- Análise de polimorfismos entre as espécies e os indivíduos.

RESULTADOS

A enzima selecionada para o gene MYB-FL, pelo software SNP2CAPS, foi a Alw26I, cujo protocolo de clivagem não pode ser otimizado. Alternativamente, usou-se a enzima MnlI. A reação de PCR resultou em um fragmento com 828 pb. A clivagem dos fragmentos amplificados de *P. axillaris* produziu um padrão com 2 bandas, uma de 340 pb e outra de 480 pb (**Figura 3**); foram observados polimorfismos nesta espécie, com indivíduos apresentando duas e outros com três bandas. Já *P. exserta* não apresentou clivagem sendo observado o fragmento de PCR inteiro, uma vez que esta espécie não tem o sítio de restrição para a enzima MnlI. Os indivíduos com coloração intermediária (híbridos) apresentaram um padrão de três ou duas bandas.

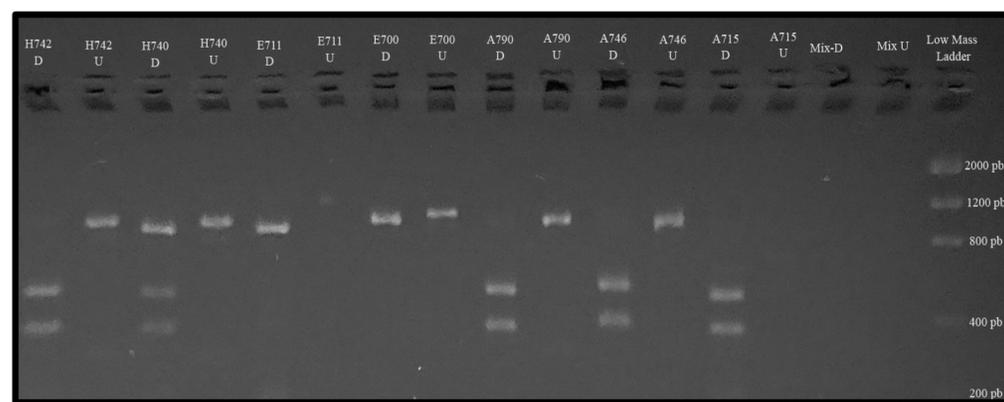


Figura 3. Teste 1: MYB-FL-3', clivagem com enzima MnlI em amostras de híbridos (H), *P. exserta* (E), *P. axillaris* (A), amplificação de PCR digerida pela enzima (D), amplificação de PCR não digerida pela enzima (U).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos foram diferentes dos esperados, uma vez que houve segregação independente entre o genótipo do CAPS e a cor da corola. Esperava-se que todos os indivíduos de corola branca (fenótipo de *P. axillaris*) apresentassem apenas o padrão de duas bandas, enquanto que os indivíduos considerados híbridos (corola rosada) apresentassem sempre três bandas. Os resultados assim indicam que pode haver introgressão gênica nestas espécies devido a retrocruzamentos entre as espécies parentais e seus híbridos e que cruzamentos entre híbridos devem estar também ocorrendo. Assim, nesta zona de contato secundário, um processo de diversificação está acontecendo.

FINANCIAMENTO: