

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Desvendando os processos bioquímicos e moleculares envolvidos com as diferentes síndromes de polinização nas espécies *Calibrachoa parviflora* e *Calibrachoa pygmaea***

Ana Luiza Ramos Cazé

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Dra. Loreta B. Freitas

Co-orientador: Dr. Cris Kuhlemeier

**Porto Alegre, Dezembro de 2016**

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética – UFRGS
- Institute of Plant Sciences, University of Bern
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Swiss National Science Foundation.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Loreta Brandão de Freitas, por todo apoio durante essa caminhada, por todos os ensinamentos, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com as belas calibrachosas. Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao meu também orientador Cris Kuhlemeier por ter me recebido de braços abertos no seu laboratório, por ter me mostrado um outro lado da ciência que até então me era desconhecido, por todos os ensinamentos, pela inspiração profissional e pessoal, quem sabe um dia eu viro maratonista. Muito obrigada, Vielen Dank, Dank u!

Agradeço aos colegas do LEM, pela ajuda nas coletas e pelo bom convívio de sempre em especial ao Geraldo, Giovanna, Ana Lúcia, Carol, vocês são excelentes pessoas e profissionais!

Aos colegas do IPS por todo o apoio durante esse período, por todo o suporte tanto no laboratório quanto fora dele, pela amizade, pelas trilhas, aventuras e cervejas compartilhadas, you guys are awesome! Um especial agradecimento para Hester, Avichai, Michel e Korinna pelas super proveitosas discussões científicas e Therese por toda a ajuda no laboratório e com as calibrachosas.

Agradeço aos professores e funcionários do PPGGM, à UFRGS e IPS-UNIBE pelo ensino de qualidade. Em especial ao Elmo que sempre, sempre foi prestativo para resolver todas as questões burocráticas. Muito obrigada!

Aos amigos de sempre e para sempre, que não importa a distância ou o tempo estão sempre presentes: Pam, Fabys, Rayssa, Rak, Ari, Nati, Camila, Gui, Renato.

Aos amigos Sarah, Hester, Avichai, Moritz, Pierre, Tural, Holly, Naama, Renata, Lorenz, Kristine, não tenho palavras para descrever como vocês são importantes para mim.

Agradeço à minha família por todo suporte, pelo incentivo, amor e dedicação, obrigada por não me deixarem desistir jamais dos meus sonhos e objetivos, e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês todos!

Agradeço também à família Schüpbach por serem pessoas tão queridas e especiais, vocês têm meu coração, especialmente mami Karin, Diego e grossmami Ruth. E ao Rico, por todo amor, suporte e dedicação. Merci vielmal!!

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMO</b> .....  | 6  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | 8  |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....  | 10 |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 11 |
| 1. Evolução floral e polinizadores .....   | 11 |
| 2. Os gêneros <i>Petunia</i> e <i>Calibrachoa</i> .....  | 15 |
| 2.1 <i>Petunia</i> .....   | 16 |
| 2.2 <i>Calibrachoa</i> .....   | 17 |
| 3. Pigmentos florais e polinizadores .....   | 20 |
| 3.1 Os flavonoides e antocianinas .....  | 22 |
| 3.2 Os pigmentos carotenoides.....   | 30 |
| 3.3 A cor das flores e pigmentação em <i>Calibrachoa</i> .....   | 35 |
| 3.4 Genes envolvidos na produção de cor em diferentes espécies de plantas.....   | 37 |
| 4. Fatores de transcrição do tipo MYB e gene <i>AN2</i> .....  | 38 |
| 5. A emissão de aroma floral como estratégia na atração do polinizador .....   | 41 |
| 5.1 Classes dos compostos orgânicos voláteis .....   | 43 |
| 5.2 Síntese dos compostos orgânicos voláteis da classe dos fenilpropanoides/benzenoides .....  | 45 |
| 5.3 Genes envolvidos na produção e emissão de compostos orgânicos voláteis .....   | 48 |
| 5.4 Regulação da síntese e da emissão floral dos compostos orgânicos voláteis.....   | 49 |
| 5.5 Exemplos de compostos voláteis de cheiro, polinizadores e alguns dos genes envolvidos .....  | 50 |
| 6. A doce recompensa .....   | 51 |
| 7. Ferramentas moleculares, bioquímicas e sequenciamento de transcriptoma como metodologia para desvendar processos biológicos em plantas..... | 53 |
| 7.1 Reação de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) na determinação de expressão gênica de genes de interesse .....                         | 54 |
| 7.2 Espectrometria de Massa na identificação e quantificação de moléculas e compostos .....  | 56 |

|  |    |
|--|----|
| 7.3 RNAseq – Uso de transcriptoma para identificação e quantificação de expressão gênica .....   | 59 |
| 8. Transição de cor – evolução e seleção.....  | 63 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 68 |
| Objetivo Geral.....  | 68 |
| Objetivos específicos.....   | 68 |
| <b>CAPÍTULO IV</b> .....   | 69 |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | 69 |
| <b>APÊNDICE</b> .....  | 80 |
| Apêndice 1. Os níveis de expressão dos genes biossintéticos envolvidos nos passos iniciais da síntese de carotenoides em <i>Calibrachoa parviflora</i> e <i>C. pygmaea</i> . ..... | 80 |
| Apêndice 2: Fenótipo das flores de <i>Calibrachoa</i> cor visível e cor UV. ....   | 82 |
| Apêndice 3. Os níveis de expressão dos genes envolvidos na produção de essência floral em <i>Calibrachoa parviflora</i> e <i>C. pygmaea</i> .....                                  | 83 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> (Capítulo I e IV) .....   | 85 |

---

## RESUMO

Mesmo espécies proximamente relacionadas podem apresentar enormes diferenças em caracteres florais, como cor da flor, emissão de essência floral e produção de néctar. Essas diferenças são frequentemente relacionadas a polinização por grupos específicos, conhecidos como síndrome de polinização. Adaptação para um específico tipo de polinizador, pode levar a mudanças em síndrome de polinização, através de complexos processos, que envolvem alterações em diferentes características. Portanto uma maneira de entender como esses processos ocorrem se dá através de análises moleculares de caracteres individuais dentro das síndromes de polinização.

Por consequência, características florais presentes em duas espécies proximamente relacionadas no gênero *Calibrachoa*, *C. parviflora* e *C. pygmaea*, as quais apresentam diferentes síndromes de polinização foram analisadas no intuito de entender os mecanismos e bases moleculares responsáveis pelas diferenças em síndrome de polinização nessas duas espécies e que podem ser relacionadas a processos de diversificação do gênero dirigida por interações planta- polinizador. *C. parviflora* apresenta flores na cor rosa, e possui características adaptadas a polinização por abelhas, enquanto que *C. pygmaea* possui flores brancas, emitem aroma floral e é adaptada para polinização via mariposas.

O gênero *Calibrachoa* é relacionado com o gênero *Petunia*, e espécies de ambos os gêneros compartilham as mesmas síndromes de polinização, em *Petunia* muitos dos genes relacionados a cor das flores e emissão de compostos essência já foram identificados e caracterizados. Por exemplo o gene *AN2* responsável pela diferença de cor das flores entre as espécies *Petunia integrifolia* e *P. axillaris*. Porém, análises desse gene em espécies de *Calibrachoa* demonstraram que nas espécies de *C. parviflora* e *C. pygmaea* esse gene não é o responsável pela diferença na cor das flores como se observa entre as espécies de *Petunia*.

Alem disso, os pigmentos que compõem a cor das flores dessas duas espécies foram identificados como pertencentes as duas classes de pigmentos as antocianinas e os carotenoides, sendo a composição majoritária de antocianinas, da classe das delphinidinas. A composição dos pigmentos das duas classes, mostrou ser bastante espécie-especifica em que *C. pygmaea* produz maiores quantidades de carotenos do tipo  $\beta$ -caroteno e antocianidinas do tipo petunidina. Enquanto que, *C. parviflora* sintetiza maiores quantidade de carotenos do tipo luteína e antocianidinas do tipo petunidina e malvidina. As duas espécies são capazes de sintetizar antocianinas, embora apresentem diferenças na quantidade de produto originado, *C. parviflora* produz maiores quantidades de antocianinas do que *C. pygmaea*, portanto apresenta flores com

maior pigmentação, já *C. pygmaea* produz baixa quantidade de antocianinas e então apresenta flores com baixa pigmentação.

Através de obtenção de dados de transcriptoma para as duas espécies e via análises dos níveis de expressão gênica dos genes da via de biossíntese das antocianinas e flavonoides, observou-se que os genes responsáveis pela formação das antocianinas, e conseqüentemente pela cor das flores são expressos em maiores níveis em *C. parviflora* comparados com *C. pygmaea*. Portanto a diferença na cor das flores entre essas duas espécies pode ser atribuída a diferença de expressão dos genes responsáveis pela síntese de antocianinas. Com destaque a expressão do gene responsável pelo transporte das antocianinas para o vacúolo (*AN9*) e dos genes responsáveis pela acidificação do lúmen vacuolar (genes do *PH*) em *C. pygmaea*. Além disso, fatores regulatórios do tipo *trans* parecem estar atuando na regulação destes genes em *C. pygmaea*.

Ademais, observações das flores de *C. pygmaea* mostraram que essa espécie possui um interessante fenômeno de mudança de cor das flores durante o dia, o qual mostrou ser influenciado pela presença de luz, induzindo pigmentação e mudando a cor das flores de brancas para amarelo claras no lado adaxial da corola e púrpura/ amarronzada no lado abaxial da corola, retornando a cor das flores para brancas ao crepúsculo e permanecendo brancas durante toda a noite. Esse fenômeno se relaciona com a síndrome de polinização da espécie.

Uma outra característica floral importante na relação planta x polinizador é a emissão de aroma floral. Sabe-se que espécies adaptadas para serem polinizadas por mariposas frequentemente liberam essência floral. Então, os compostos orgânicos voláteis de aroma emitidos pelas flores de *C. pygmaea* foram identificados e caracterizados neste trabalho. As análises revelaram que a maioria dos compostos de essência emitidos por *C. pygmaea* fazem parte dos benzenoides/ fenilpropanoides e mostram um ritmo controlado de emissão noturna, também associados a síndrome de polinização.

Portanto, as características florais que estão conectadas com a síndrome de polinização foram analisadas pela primeira vez em espécies silvestres do gênero *Calibrachoa pygmaea* e *C. parviflora*. Os resultados aqui obtidos contribuem para um melhor entendimento de como se dá os processos de transição entre síndromes florais no gênero *Calibrachoa*, e que podem ser associados aos processos de diversificação no gênero. Através da identificação dos tipos de pigmentos produzidos pelas flores, bem como a identificação dos primeiros genes candidatos envolvidos na diferença de cor das flores entre estas duas espécies, e os tipos de compostos de essência floral emitidos por *C. pygmaea*.

## ABSTRACT

Closely related plant species can display very different floral traits, as flower colour, scent floral emission and production of nectar as a reward, known as pollination syndromes, which are often correlated with specific groups of pollinators. Adaption to a specific type of pollinator can result in change in the pollination syndrome through a complex process involving alteration in different traits. Therefore, one way to understand how these processes evolve is through molecular analysis and characterization of single traits within pollination syndromes.

Thus, the floral traits in two close species of *Calibrachoa* genus, *Calibrachoa parviflora* and *C. pygmaea*, which display different polination syndromes, the former species has pink flowers and are adapted to bee-pollinated, while *C. pygmaea* has white flowers, emit scent and are adapted to moth-pollination were analysed in order to understand the mechanisms and molecular bases responsible for the differences in pollination syndrome that can leads to species diversification driven by plant-pollinator interactions.

The *Calibrachoa* genus is related with *Petunia* genus, in which species from both genera sharing the same pollination syndromes. In petunia species many of the genes involves with the differences in flower colour and floral scent release were identified. For instance, the *AN2* gene, that is responsible for the flower colour differences between *Petunia integrifolia* and *P. axillaris*. Therefore, analysis of this gene in *Calibrachoa* species showed that for *C. pygmaea* and *C. parviflora* this gene does not play the same role as in *Petunia* species.

The pigments that composes the flower colour in *C. parviflora* and *C. pygmaea* were identified as belonging to the two class of pigments the anthocyanins and carotenoids, yet constituted mainly of anthocyanins from the class of the delphinidins. The composition of the pigments from both class showed to be specie-specific in which *C. pygmaea* produces more  $\beta$ -carotene from the carotenoids and petunidin as anthocyanidins, whereas *C. parviflora* synthesize more lutein carotenoid type and petunidin and malvidin as anthocyanidins in the corolla limb. These two species are able to synthesize anthocyanins, despite the differences in the amount of production, *C. parviflora* makes more anthocyanins thus shows strong flower pigmentation and *C. pygmaea* produces low amonts of anthocyanins, therefore has flowers with low pigmentation.

By construction a transcriptomic data between these two species, and then, the analysis of expression levels of the genes from the flavonoid/anthocyanins biosynthetic pathway it was observed that the genes which are responsible for the flower colour are higher expressed in *C.*

*parviflora* than in *C. pygmaea*. Thus, the differences in flower colour between these two species can be attributed to the differences in the expression levels of all the genes involved in anthocyanin synthesis. Highlighting, the very low expression of the gene responsible for transport the anthocyanins to the vacuole (*AN9*) and the genes involved in the acidification of the vacuole (*PH* genes) in *C. pygmaea*. Moreover, a *trans* regulatory factor is likely to be responsible for the regulation of these genes in *C. pygmaea*.

Furthermore, observations of *Calibrachoa pygmaea* flowers showed that this species displays an interesting phenomenon of flower colour change during the day. That showed to be under the influence of light, inducing pigmentation and change the flower colour from white to pale yellow in the adaxial side of corolla and purplish/ brownish at the abaxial side, and then turning back the flower colour to white at dusk, and remain the white colour of the flowers overnight. This phenomenon showed to be associated with the pollination syndrome in this species.

Floral scent emission is another important trait in the relationship plant  $\times$  pollinator, and is known that species adapted to be pollinated by moths often releases floral aroma. Thus, the floral volatiles compounds were identified and characterized in *C. pygmaea*. The analysis revealed that the majority of the scent compounds are part of the benzenoid/ phenylpropanoid class and shows a controlled nocturnal rhythm of emission, which is also related with the pollinator syndrome.

Thus, the floral traits that are connected with pollination syndrome were analysed for the first time in *Calibrachoa pygmaea* and *C. parviflora* species, these findings contribute to a better understanding of the process of pollination syndrome transition in *Calibrachoa* genus. Through the identification of the class of pigments synthesized by the flowers in both species and the identification of the first candidate genes involved in the flower colour difference between these two species, as well as the identification of the scent compounds emitted by *C. pygmaea* flowers.

## Nomenclatura

Na maioria dos casos, os genes que codificam enzimas são referidos pelo nome da enzima com letras maiúsculas, e quando em itálico para indicar que se referem aos genes (ex: *ANS* codifica a enzima ANS). Quando mais de um gene codifica a mesma enzima, os nomes estabelecidos para os genes são usados (ex: *HF1* e *HF2* para F3'5'H). Letras minúsculas e em itálico são usadas para indicar *loci*. Para genótipos de certos loci, letras em maiúsculo indicam *loci* funcional (ex: *AN2*) e letras em minúsculo e itálico indicam *loci* não-funcional/mutante (ex: *an2*).

---

## CAPÍTULO I

# INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Evolução floral e polinizadores

Embora não possam se locomover, as plantas utilizam mecanismos surpreendentes para atrair o tão importante polinizador (Whitney & Glover, 2013) como, por exemplo, a emissão de compostos voláteis pelas plantas que atua como linguagem de sinal para atrair os polinizadores (Dudareva *et al.*, 2000). Plantas emitem fragrância através das flores, frutos e folhas. O tipo de buquê de essência floral, bem como o ritmo circadiano de emissão de cheiro estão fortemente relacionados com os hábitos e preferências do polinizador (Dudareva *et al.*, 2006). Assim como a emissão de fragrância, algumas espécies de plantas usam como estratégia o oferecimento do néctar como recompensa para o polinizador. O néctar é composto basicamente de açúcares e aminoácidos e é uma rica fonte de energia para os insetos e animais polinizadores. Ele é produzido em estruturas denominadas nectários e é localizado, geralmente, na estrutura floral, acessível ao polinizador eficiente (Brandenburg *et al.*, 2009; Heil, 2011). Além dessas características, a cor da flor é um caráter de bastante importância na relação flor x polinizador (Klahre *et al.*, 2011) e será discutida em mais detalhes durante esta seção.

Desde que Darwin propôs as flores como estruturas adaptativas, os polinizadores têm sido considerados como os principais agentes seletivos para a evolução das plantas com flores (Darwin, 1862; Fenster *et al.*, 2004; van der Niet & Johnson, 2012), sugerindo que plantas aumentam seu *fitness* reprodutivo via adaptação ao mais eficiente e abundante polinizador, o qual é capaz de, satisfatoriamente, transferir o pólen para flores coespecíficas (Waser *et al.*, 1996; 2006). A maioria das plantas tem suas flores polinizadas por animais, sendo que algumas podem ser polinizadas por diferentes espécies de animais (generalistas) enquanto que outras espécies de plantas são polinizadas por um grupo específico de polinizadores (especialistas).

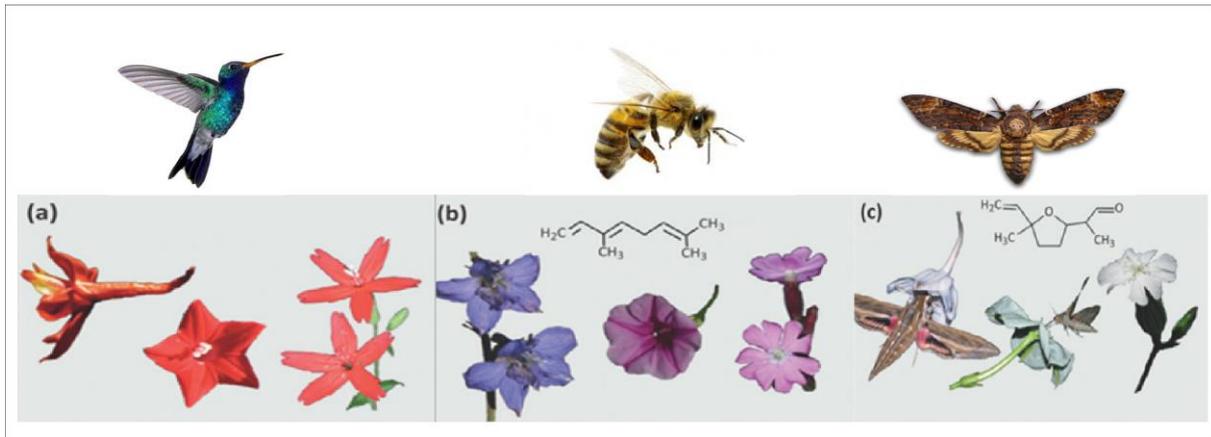
---

Estes são os chamados polinizadores funcionais como, por exemplo, mariposas noturnas e abelhas.

Tem sido proposto que polinizadores específicos, exercem uma forte pressão de seleção positiva, o que leva a um cenário de evolução convergente de características florais, no qual espécies de diferentes grupos taxonômicos apresentam combinações similares de características florais (Fenster *et al.*, 2004; Chittka & Raine, 2006; Whitney & Glover, 2013; Schiestl & Johnson, 2013).

Desta forma, as relações complexas entre as flores e seus polinizadores seriam o fator chave na evolução e na radiação das angiospermas. Em parte, isto se deve ao fato de que o isolamento reprodutivo e a especiação estão ligados (Proctor *et al.*, 1996). A complexidade destas relações deu origem a um sistema de classificação das flores através de suas síndromes florais criado inicialmente por van der Pijl (1960) e ampliado posteriormente por diversos autores. As síndromes florais são um conjunto de características florais adaptadas para atrair tipos específicos de animais polinizadores (Fenster *et al.*, 2004).

Determinadas cores de flores são associadas a tipos específicos de polinizadores, devido ao fato de que polinizadores, muitas vezes, apresentam preferência inata por determinadas cores de flores (Faegri & Van der Pijl, 1979). Essa preferência está fortemente relacionada com a capacidade de percepção de cor pelo animal (Chittka & Raine, 2006). Por exemplo, dentro do espectro visível ao olho humano, abelhas apresentam síndrome floral associada a flores nas cores azul e magenta; mariposas têm preferência pelas flores de cor branca, enquanto que beija-flores, pelas flores de cor vermelha. Essa preferência do polinizador por determinadas cores leva à existência de convergência evolutiva de sinais florais em que diferentes espécies de plantas com determinadas características florais atraem o mesmo grupo de polinizadores (Fig. 1) (Gumbert, 2000; Goyret *et al.*, 2008; Schiestl & Johnson, 2013). Os polinizadores também utilizam aprendizado associativo na determinação da escolha das flores a serem visitadas, associando determinada cor à recompensa como, por exemplo, oferta de néctar em volume e qualidade (Goyret *et al.*, 2008; Schiestl & Johnson, 2013).



**Figura 1:** Exemplos de síndromes de polinização em que flores de diferentes espécies mostram convergência evolutiva de sinais florais para atrair polinizadores: **a)** o beija-flor é o frequente polinizador de flores vermelhas de diferentes espécies, da esquerda para a direita imagem de flores das espécies de *Delphinium nudicaule*, *Ipomea quamoclit* e *Silene virginica*, cuja as flores geralmente não emitem fragrância; **b)** as abelhas são polinizadores de flores das cores azul e magenta, de diferentes espécies (imagem de flores das espécies de *D. dasycaulon* e *I. pes-caprae*, respectivamente), as quais emitem fragrância como estratégia para atrair o polinizador como o composto volátil de cheiro  $\beta$ -ocimeno (estrutura molecular demonstrada na cadeia de carbono acima da flor); **c)** mariposas são polinizadores de flores de cor branca de diferentes espécies (da esquerda para a direita imagem de flores de *D. leroyi*, *Petunia axillaris* e *Silene latifolia*). As flores polinizadas por mariposas também emitem forte aroma (estrutura molecular representando um composto de essência aldeído lilás, esquematizada na imagem acima da flor) e, frequentemente, fornecem néctar como recompensa ao polinizador. Figura adaptada de Schiestl & Johnson (2013).

Embora seja frequentemente observado que determinadas características florais atraem polinizadores específicos, existe uma certa controvérsia em relação à síndrome de polinização, devido ao fato de que espécies de plantas associadas a um único tipo de polinizador são bastante raras. Diversas espécies de flores, apesar de possuírem seu polinizador específico via síndrome floral, também podem ser visitadas por outros polinizadores conhecidos como visitantes florais. Em alguns casos, o polinizador não específico pode ser de grande importância para manter a reprodução da espécie. Isso ocorre em determinados ambientes em que o polinizador específico esteja ausente ou seja raro (Herrera, 1996). Outro ponto debatido baseia-se no fato de que a adaptação a um tipo específico de polinizador pode acarretar o risco de extinção, devido ao fato de que, se determinado polinizador se tornar escasso ou mesmo ausente, a espécie corre risco de declínio (Fenster *et al.*, 2004). Apesar do contínuo debate sobre o tema, o conceito de síndrome de polinizador é bastante utilizado e útil para gerar hipóteses sobre polinizadores e valores adaptativos das características florais (Gübitz *et al.*, 2009).

A existência de síndromes de polinização distintas pode ser vista como um fator importante no isolamento reprodutivo entre espécies evolutivamente relacionadas e, mais tardiamente, ser relacionada a processos de especiação, o que explicaria a enorme diversidade de novas espécies de plantas (Schemske & Bradshaw, 1999; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006). Os fatores responsáveis pelos processos de especiação são complexos e dependem tanto da constituição genética e molecular dos organismos, quanto dos fatores ecológicos bem como da atuação de forças evolutivas (Coyne & Orr, 2004). Uma maneira de penetrar nessa complexidade se dá através da identificação de genes responsáveis pelo isolamento reprodutivo em espécies proximamente relacionadas, seja através de um mecanismo de isolamento inicial (barreira reprodutiva) ou através de especiação em contínuo (Orr, 2005). Por esta razão, existe um grande interesse científico em relação à rápida divergência dos caracteres florais presentes nas angiospermas.

Mudanças em caracteres florais podem significar a perda do sucesso reprodutivo, visto que podem acarretar uma diminuição da visitação pelo polinizador específico, por outro lado, podem levar à adaptação a um novo tipo de polinizador (Hoballah *et al.*, 2007; Dell’Olivo & Kuhlemeier, 2013). Neste último caso, contudo, para garantir o sucesso reprodutivo, é necessário que mudanças coordenadas em características múltiplas sejam implementadas.

Dentre todas as estratégias desenvolvidas pelas plantas, considerando as estruturas florais, a fim de atrair o polinizador, o caráter cor tem sido extensamente abordado e grandes avanços no entendimento dos mecanismos relacionados à determinação da cor têm sido elucidados (Quattrocchio *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2014; Sheehan *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm demonstrado a importância da cor das flores na preferência do polinizador como, por exemplo, em espécies de *Antirrhinum* (Comba *et al.*, 2000), *Mimulus* (Bradshaw & Schemske, 2003) e *Petunia* (Hoballah *et al.*, 2007). Em espécies de *Petunia*, Hoballah *et al.* (2007) demonstraram que o caráter cor altera significativamente a preferência inata do polinizador. Nesse estudo, com insetos sob condições controladas em casa de vegetação, verificou-se que abelhas possuem preferência inata por flores púrpuras e mariposas por flores brancas. Em um segundo experimento, usando plantas geneticamente modificadas, nas quais a cor das flores foi alterada e as demais características foram mantidas, a diferença da cor das pétalas foi suficiente para alterar a preferência do polinizador.

A variação da cor das flores está relacionada à expressão e à regulação de enzimas biossintéticas (Whittall *et al.*, 2006). A transição evolutiva entre as síndromes florais dentro dos

diversos gêneros envolve um sistema genético-regulatório bastante complexo. Na família Solanaceae, por exemplo, são descritos pelo menos dez eventos independentes de aquisição da polinização por pássaros (Knapp, 2010) a partir da condição melitófila (polinização por abelhas) mais frequente.

A família Solanaceae é formada por 99 gêneros e cerca de 3000 espécies, sendo a maior diversidade encontrada no Neotrópico, onde mais de dois terços dos gêneros são endêmicos (The Angiosperm Phylogeny Group, 2016). Membros desta família habitam os mais diversos biomas Sul-Americanos e eventos de radiação adaptativa têm sido descritos e amplamente exemplificados envolvendo síndromes florais e especiação (Cocucci, 1999; Stehmann *et al.*, 2009), colonização de novos ambientes (Linder, 2008) e novidades evolutivas na exploração de um mesmo ambiente (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Gavrilets & Losos, 2009; Stehmann *et al.*, 2009). Este é um dos três grupos de plantas mais importantes comercialmente e tem evoluído amplamente na ausência de poliploidização, sendo que grupos bastante diversos da família apresentam os mesmos números cromossômicos básicos e compartilham a mesma arquitetura cariotípica (Wu & Tanksley, 2010). Nesta família encontram-se os gêneros *Solanum*, *Capsicum*, *Lycopersicon*, *Ipomea*, e, entre muitos outros, os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*.

## 2. Os gêneros *Petunia* e *Calibrachoa*

Em 1803, Jussieu estabeleceu o gênero *Petunia* como pertencente à família Solanaceae, onde foram descritas, inicialmente, duas espécies: *Petunia nyctaginiflora* e *Petunia parviflora*. Posteriormente, diversas espécies foram descritas sob outros gêneros até que, em 1911, Fries reuniu sob o nome *Petunia* 27 espécies (Stehmann, 1999). Estudos realizados por Wijsman (1982) e Wijsman & Jong (1985) mostraram que estas espécies constituíam dois grupos distintos que diferiam em relação ao número cromossômico, capacidade de intercruzamento, bem como em diversos caracteres morfológicos, propondo assim, a separação em dois gêneros. As espécies com número cromossômico  $2n = 14$  foram mantidas como *Petunia* e as espécies com número cromossômico  $2n = 18$  passaram a ser consideradas como pertencentes ao gênero *Calibrachoa* La Llave & Lex. (Wijsman, 1990). As principais características morfológicas que distinguem os dois grupos são: 1) o tipo de prefloração, enquanto a maioria das espécies de *Petunia* possuem prefloração coclear imbricada, as espécies de *Calibrachoa* apresentam prefloração conduplicada (Wijsman & Jong, 1985); 2) diferenças na parede anticlinal das sementes, em que as sementes de *Petunia* apresentam células com paredes onduladas e finas, enquanto que as de *Calibrachoa* possuem paredes retas e espessadas (Watanabe *et al.*, 1999);

3) diferenças na anatomia foliar, onde as espécies de *Calibrachoa* apresentam células foliares bem diferenciadas no tecido da endoderme de contorno na nervura nas folhas, enquanto que nas de *Petunia* o mesmo tecido não possui diferenciação. Diferenças entre os gêneros também são encontrados no tipo de hábito, pois espécies de *Calibrachoa* são subarborescentes enquanto que as espécies de *Petunia* possuem hábito herbáceo (Stehmann, 1999). A realização de cruzamentos artificiais entre espécies dos dois gêneros não foi bem sucedida, o que sugere a presença de uma forte barreira genética (Watanabe *et al.*, 1996, 1997, 2001; Ando *et al.*, 2001). Além das diferenças cromossômicas e morfológicas, dados moleculares suportam fortemente a divisão dos gêneros (Ando *et al.*, 2005). Por outro lado, as espécies dos dois gêneros compartilham diversas características como síndromes florais, padrões biogeográficos, processos evolutivos e proximidade filogenética (Fregonezi *et al.*, 2013) (Fig. 2 e 3).

## 2.1 *Petunia*

O gênero *Petunia* compreende 14 espécies (Stehmann *et al.*, 2009), é endêmico da América do Sul, sendo a maioria das espécies encontradas no sul e no sudeste do Brasil e em parte da Argentina, Uruguai e Bolívia. As espécies se reproduzem de forma sexuada e, geralmente, florescem no mesmo período (Stehmann, 1999). Os mecanismos de isolamento reprodutivo dentro do gênero são em relação à distribuição geográfica e, para as espécies simpátricas, as diferentes síndromes florais parecem ser responsáveis pelo isolamento e manutenção da integridade genética das espécies (Stehmann, 1999; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Hoballah *et al.*, 2007; Segatto *et al.*, 2014). A síndrome de polinização predominante é a melitofilia, ocorrendo também a esfingofilia (polinização por mariposas) e a ornitofilia (polinização por pássaros) (Ando, 2001). O gênero apresenta flores nas cores branca, magenta e vermelha, as quais atraem diferentes tipos de polinizadores, sendo, portanto, um modelo interessante para estudos relacionados às síndromes florais (Stuurman *et al.*, 2004). Dentre as espécies, duas delas apresentam características florais contrastantes e diferentes tipos de polinizadores: *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb e *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. (Fig. 3a e b).

*Petunia axillaris* (Fig. 3a) possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Bolívia (Ando, 1996; Turchetto *et al.*, 2014). As flores são brancas e apresentam corola com tubo longo, emitem forte fragrância noturna e produzem grande quantidade de néctar (Ando *et al.*, 1995; Hoballah *et al.*, 2005, 2007). O principal polinizador da espécie são as mariposas noturnas (Ando *et al.*, 2001), predominantemente das espécies

*Manduca sexta* e *Eumorpha vitise*, menos frequentemente tem sido observada também a presença de himenópteros e abelhas como visitantes florais (Hoballah *et al.*, 2007).

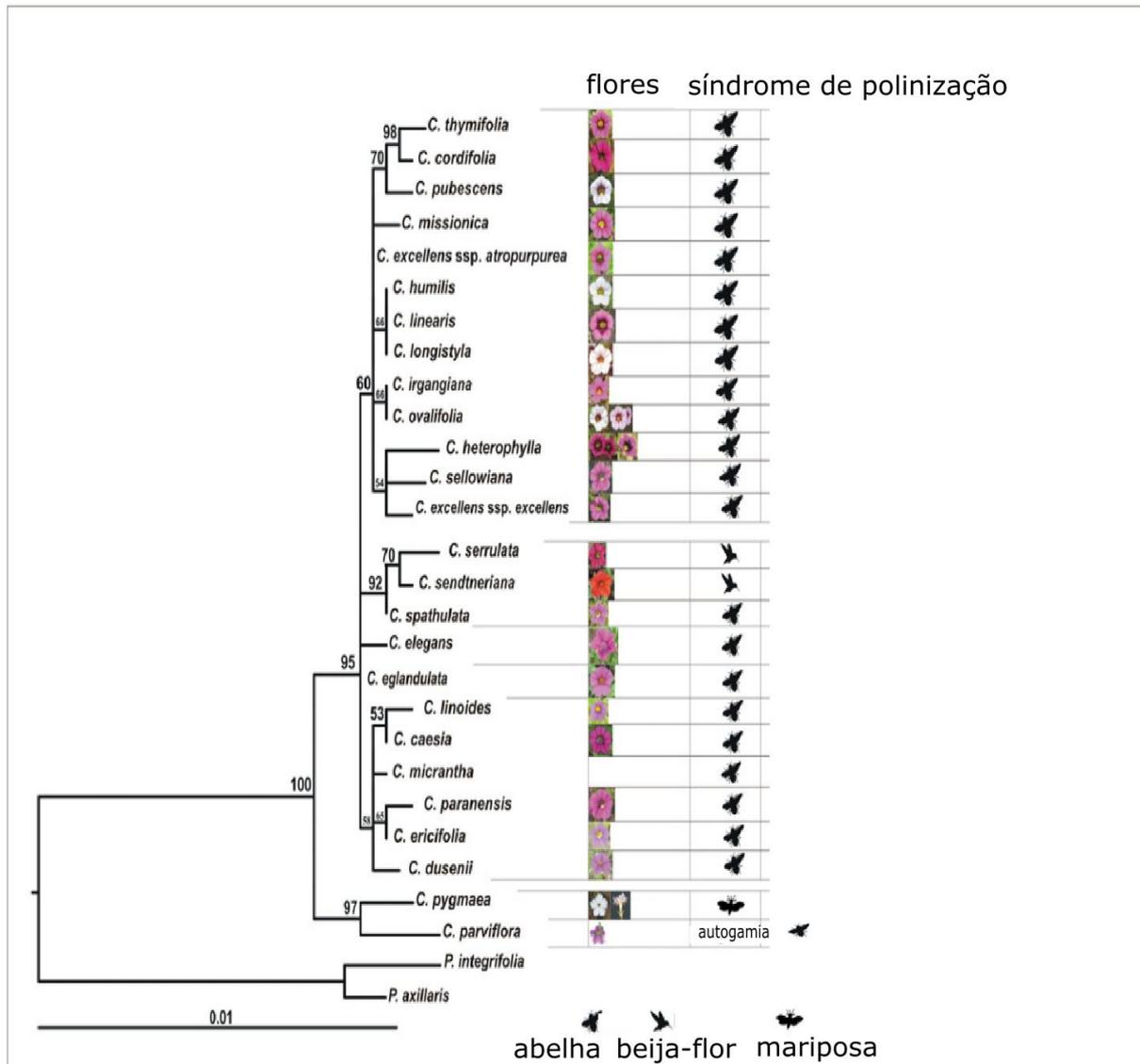
Enquanto que, *Petunia integrifolia* (Fig. 3b) tem sua distribuição geográfica no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. Apresenta flores na cor púrpura e com tubo curto, pouca produção de néctar e sem perfume (Ando *et al.*, 1995; Hoballah *et al.*, 2005), sendo polinizadas por abelhas (Ando *et al.*, 2001).

Espécies silvestres de *Petunia*, embora apresentem diferenças morfológicas e ecológicas possuem baixa diversidade genética, sendo observado bastante compartilhamento de alelos ancestrais, e pequena distância genética observada entre taxa, o que indica uma recente diversificação do gênero (Ando *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010, Segatto *et al.*, 2013). Espécies de *P. integrifolia* e *P. axillaris*, embora algumas vezes observadas em simpatria, não foram encontrados híbridos naturais, o que sugere que os diferentes tipos de polinizadores podem ser uma barreira efetiva de isolamento reprodutivo (Ando *et al.*, 2001; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006).

## **2.2 Calibrachoa**

O gênero *Calibrachoa* pertence à família Solanaceae e compreende 27 espécies que se distribuem principalmente no sul da América do Sul (Fregonezi *et al.*, 2012). As espécies deste gênero são, geralmente, auto-incompatíveis e polinizadas principalmente por abelhas, embora algumas espécies apresentem síndromes florais adaptadas à polinização por pássaros e mariposas. No gênero, são encontradas espécies com flores nas cores branca, magenta, alaranjada e vermelha (Fig. 2).

Dentre as espécies do gênero, duas se distinguem bastante das demais em relação à biologia reprodutiva, aos hábitos (Stehmann *et al.*, 1999) e às relações filogenéticas (Fig. 2) (Fregonezi *et al.*, 2012): *Calibrachoa pygmaea* (R. E. Fr.) Wijsmann e *C. parviflora* (Juss.) Wijsman (Fig. 3c e d, respectivamente).



**Figura 2:** Árvore filogenética de *Calibrachoa*, apresentando as síndromes de polinização, bem como a identificação da cor das flores em cada espécie, além de mostrar a próxima relação do gênero *Calibrachoa* com espécies do gênero *Petunia* (grupo externo *P. integrifolia* e *P. axillaris*). A árvore filogenética também mostra *C. pygmaea* e *C. parviflora* como pertencentes a um grupo distinto das demais espécies (Fregonezi *et al.*, 2012). Figura adaptada de Fregonezi *et al.* (2013).

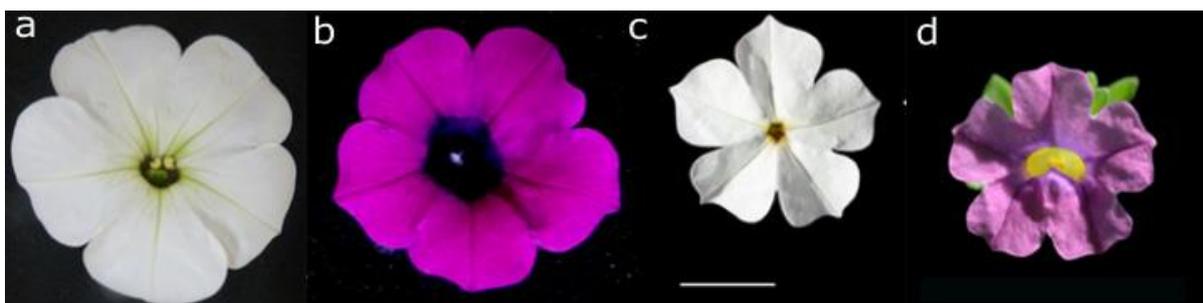
*Calibrachoa pygmaea* e *C. parviflora* são tipicamente espécies herbáceas, com ciclo de vida anual, enquanto que as demais espécies do gênero são arbustivas e perenes (Fregonezi *et al.*, 2012). Ambas as espécies apresentam reduzido conteúdo de DNA nuclear, aproximadamente 50% da média do conteúdo de DNA nuclear se comparadas com as demais espécies do gênero e com espécies do gênero proximoamente relacionado *Petunia* (Mishiba *et al.*, 2000). Baseado nas relações evolutivas e no conjunto de evidências morfológicas, *C.*

*pygmaea* e *C. parviflora* agrupam-se no subgênero *Calibrachoa*, enquanto as demais espécies foram incluídas no subgênero *Stimomphis* (Fregonezi *et al.*, 2012).

*Calibrachoa pygmaea* (Fig. 3c) apresenta flores brancas, com corola hipocrateriforme, semelhante a *P. axillaris*. Emite forte fragrância ao entardecer, característica típica de flores polinizadas por mariposas. A espécie apresenta distribuição geográfica bastante restrita (pequena área no sul da América do Sul) comparada com *C. parviflora*, sendo encontrada em pequenas áreas temporariamente alagadiças. (Fregonezi *et al.*, 2012).

*Calibrachoa parviflora* (Fig. 3d) apresenta uma das menores flores do gênero, com diâmetro floral em torno de 1 cm. Possui flores na cor magenta e é a única espécie autocompatível do gênero, embora apresente características adaptadas relacionadas à síndrome de melitofilia, especialmente no que se refere ao formato das flores, à cor e à antese diurna. *Calibrachoa parviflora* é a espécie do gênero com maior distribuição geográfica, sendo encontrada no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e na América do Norte. É uma espécie bastante generalista, presente em áreas urbanas, regiões portuárias e beiras de estradas (Fregonezi *et al.*, 2012). A ocorrência desta espécie em uma distribuição anfiamericana é atribuída à migração ocasional recente, especialmente por atividades humanas que teriam levado acidentalmente sementes de *C. parviflora* que, por suas características reprodutivas, acabaram por se estabelecer (Stehmann, 1999).

Os pares de espécies *P. axillaris* e *P. integrifolia* e *C. pygmaea* e *C. parviflora* compartilham importantes características na relação flor x polinizador. Ambos os pares de espécies contrastam entre si em relação à síndrome floral, enquanto as espécies com flores brancas de ambos os gêneros são polinizadas por mariposas, as flores de cor magenta, tanto em *Petunia* como em *Calibrachoa*, possuem características relacionadas à melitofilia. Além da cor da flor, outros atrativos aos polinizadores são comuns entre as espécies dos dois gêneros de acordo com a síndrome floral que apresentam (Fig. 2 e 3).



**Figura 3:** Detalhe das flores do gênero *Petunia* e *Calibrachoa*: **a.** *Petunia axillaris*; **b.** *P. integrifolia*; **c.** *Calibrachoa pygmaea*; **d.** *C. parviflora*. (Barra de escala 1 cm).

### 3. Pigmentos florais e polinizadores

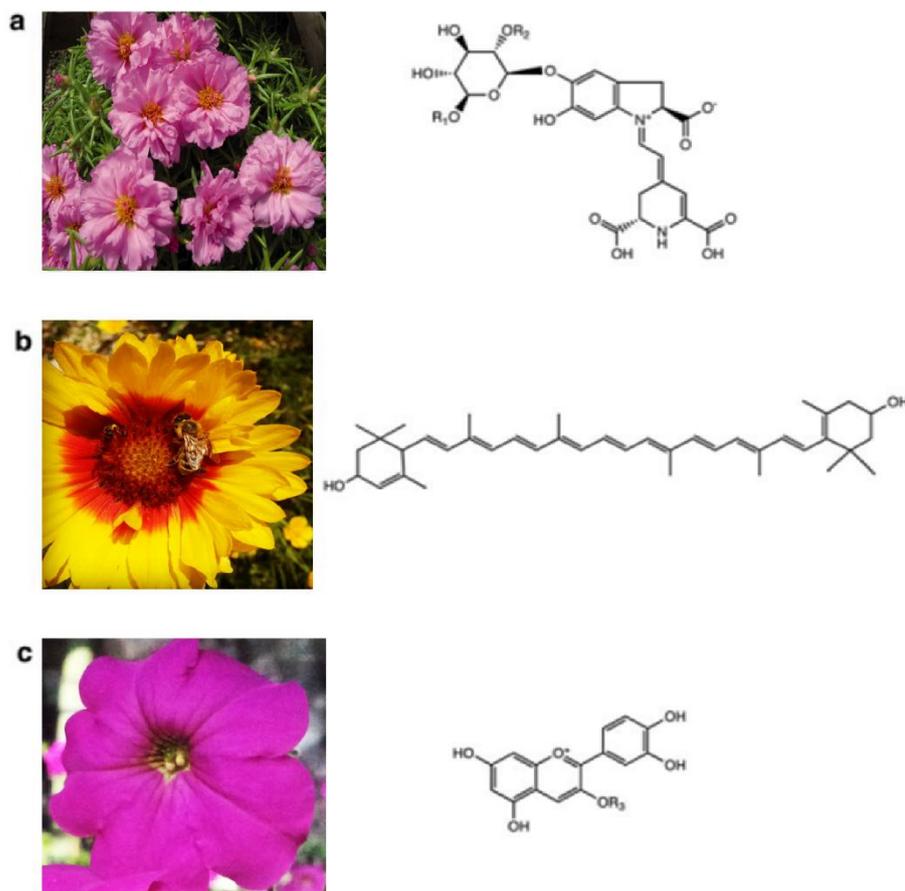
Como já mencionado anteriormente, a exuberante diversidade de flores tem sido considerada como um dos aspectos mais importantes, responsáveis pela evolução e radiação das angiospermas (Glover, 2007). Um dos fatores responsáveis por essa enorme diversidade floral se relaciona à co-evolução das relações planta-polinizador (Whitney & Glover, 2013). Flores exibem características distintas em relação à forma, textura, simetria e tamanho, sendo a cor das pétalas a característica mais importante, especialmente no papel de atrair os animais polinizadores, além de contribuir para o isolamento reprodutivo (Grant, 1949; Faegri & van der Pijl, 1979; Hoballah *et al.*, 2007).

O que determina a cor das flores são os chamados pigmentos florais, os quais funcionam como um sinal de atração visual para os polinizadores, aumentando as chances de que o polinizador as visite e, de modo eficiente, transfira o pólen para outras flores, o que contribui para o sucesso reprodutivo da espécie. Além disso, os pigmentos constituem um dos principais fatores determinantes do valor ornamental das flores, devido ao atrativo visual e estético que encanta os olhos humanos. Portanto, os estudos de pigmentação são um dos tópicos favoritos para a área de melhoramento genético, visto que, além de ter grande importância do ponto de vista ornamental, o mercado de consumo de flores ornamentais tem gerado bilhões de dólares a cada ano (Chandler, 2003; Tanaka *et al.*, 2008).

Existem três classes principais de pigmentos florais na natureza: flavonoides, betalainas, e carotenoides (Fig. 4) (Grotewold, 2006; Tanaka *et al.*, 2008). No ramo dos flavonoides, está a classe das coloridas antocianinas, que são os pigmentos responsáveis por conferir as cores vermelha, magenta, violeta e azul do espectro visível das flores (Koes *et al.*, 2005). Os flavonoides estão relacionados à absorção de luz ultravioleta (UV) e também atuam como co-pigmentos na presença das antocianinas (Winkel-Shirley, 2001). Já as betalainas são uma classe de pigmento bastante restrita, sendo encontradas apenas na ordem das *Caryophyllales* e são responsáveis pelas cores variando do amarelo ao vermelho (Grotewold, 2006). Os carotenoides são responsáveis pelas cores de flores amarelas, laranjas e vermelhas de uma enorme variedade de flores (Grotewold, 2006). Nesta seção, as classes de pigmentos das antocianinas/flavonoides e carotenoides serão destacadas.

Um ponto importante na relação pigmento floral e animais polinizadores está na amplitude de captação da cor que os animais possuem em relação à luz visível e invisível, do ponto de vista do polinizador. Por exemplo: os seres humanos são capazes de perceber as cores

através de reflectância ou ondas de luz em torno de 380 e 730 nm, enquanto que os insetos conseguem captar luz e pigmentos em uma amplitude de onda bem menor. As abelhas têm um espectro de visão com comprimento de onda de luz ultravioleta (UV) em torno de 300-400 nm (Dyer, 2001) e todos os insetos possuem a capacidade de enxergar na luz UV. Nesse aspecto, os flavonóis são um dos principais componentes que contribuem para a aparência das flores na luz UV (Koski & Ashman, 2014). Os polinizadores identificam e escolhem as flores usando uma variedade de características, dentre as quais, o seu tamanho e o contraste da cor servem como orientação para os visitantes florais (Papiorek *et al.*, 2016) e estão fortemente relacionados com a capacidade de captação da cor (visível e invisível) pelos polinizadores. Abelhas, por exemplo, possuem visão de cor tricromática com três diferentes classes de fotorreceptores sensíveis à luz UV e são frequentemente associadas como potenciais polinizadores de flores nas cores azul, magenta e amarela, que são tipicamente UV-reflectantes nas bordas da corola e UV-absorventes no centro, funcionando como um importante guia visual de atração à longa distância para estes insetos. As mariposas, por sua vez, parecem ser mais fortemente atraídas pelas flores de cor branca e tipicamente UV-absorventes. Para elas, as flores brancas aparecem na cor verde-azulada e fazem contraste com a cor das folhas. Já os beija-flores são conhecidos pela sua preferência em polinizar, principalmente, as flores de cor vermelha que são, na maioria das vezes, UV-absorventes. Entretanto, alguns tipos de pássaros são atraídos, principalmente, pelas flores amarelas, também tipicamente UV-absorventes (Chittka *et al.*, 1994; Papiorek *et al.*, 2016).

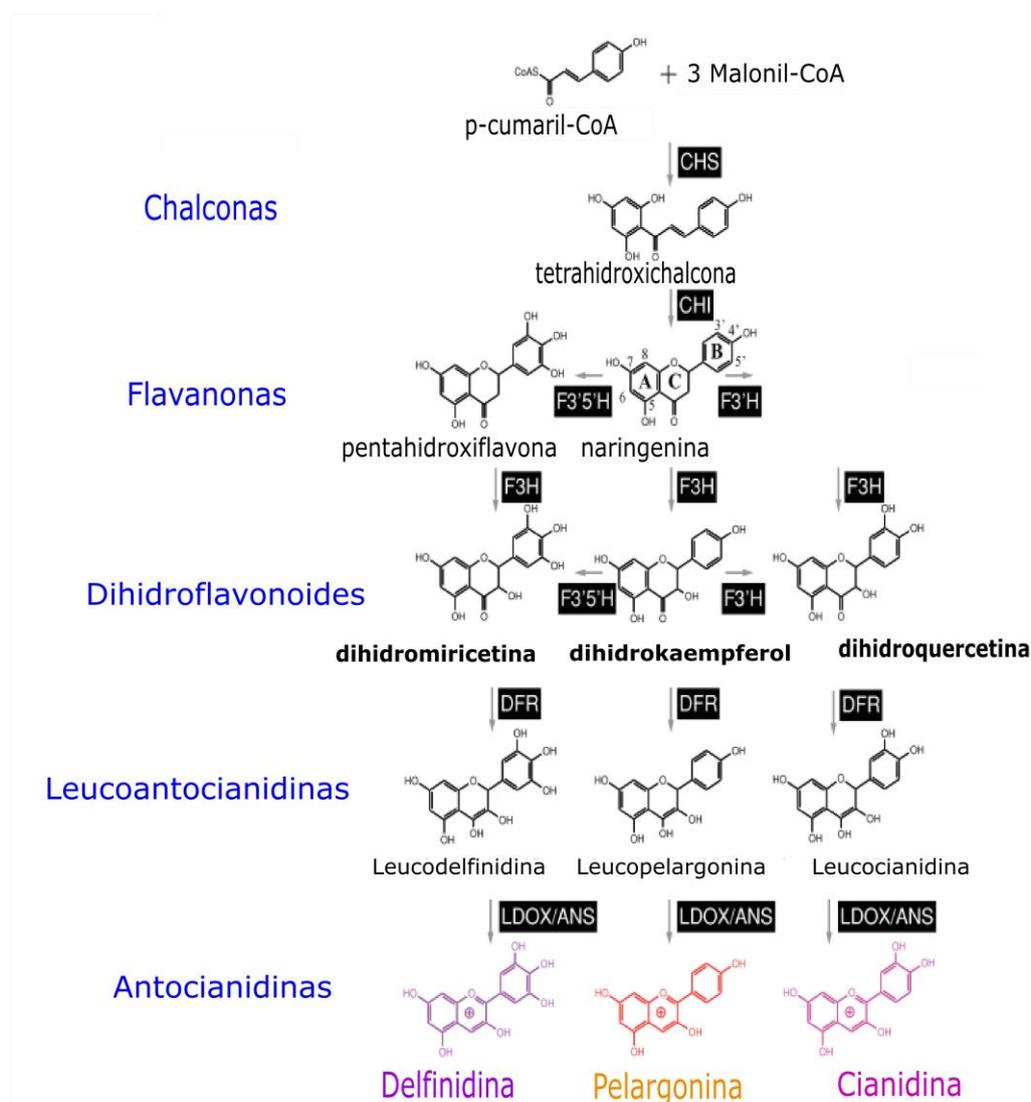


**Figura 4:** Principais classes de pigmentos encontrados na natureza e suas correspondentes estruturas **a.** flor de portulaca (*Portulaca grandiflora*), as flores dessa espécie acumulam primariamente betalainas. **b.** flor de galhardas (*Gaillardia aristata*), cujas flores acumulam grandes quantidades de carotenoides. **c.** flor de petúnia (*Petunia secreta*) na qual as flores acumulam principalmente antocianinas. Imagem adaptada de Grotewold (2006). Fonte fotos das flores; a.web; b e c: da autora.

### 3.1 Os flavonoides e antocianinas

Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários, solúveis em água, amplamente encontrados na natureza e fazem parte da classe dos compostos polifenólicos, com padrão de cor variando desde o incolor ao amarelo claro (Tanaka *et al.*, 2008). No ramo dos flavonoides estão as antocianinas, um dos pigmentos mais abundantes, ocorrendo em quase todas as plantas vasculares (Winkel-Shirley, 2001). As antocianinas são responsáveis pelas cores exuberantes das flores de cor vermelha, magenta, violeta e azul (Grotewold, 2006). A cor final das flores é determinada por uma combinação de fatores como a estrutura das antocianinas; coexistência com flavonoides (co-pigmentos); pH do vacúolo onde as antocianinas estão localizadas e a quantidade e qualidade de metais iônicos nas células das pétalas (Kondo *et al.*, 2009). Os precursores das antocianinas (cromóforos) são compostos pelas antocianidinas e

aglicones. Embora exista uma enorme diversidade de antocianinas na natureza, as quais originam os diversos tons de cor das flores, existem apenas seis maiores classes de antocianidinas que são compostas por pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina. Em termos de biossíntese, a peonidina se apresenta na forma metilada, derivada da cianidina e da petunidina, enquanto a malvidina é a forma derivada metilada da delphinidina (Fig. 5). O número de grupos hidroxilados no anel  $\beta$  vai desde monohidroxil, bihidroxil e trihidroxil. Já os grupos hidroxila contribuem para a coloração das pétalas de forma que quanto mais grupos hidroxilados, mais azuladas são as flores. Já as flores da cor violeta tendem a conter mais antocianinas da série das delphinidinas, enquanto que as de cor magenta tendem a conter, predominantemente, cianidina e as de cor alaranjada ou vermelha contêm, em sua maioria, pelargonina (Tanaka *et al.*, 2010).



**Figura 5:** Representação esquemática da rota de biossíntese das antocianinas. Os nomes de cada componente são indicados. Compostos representados pelos quadros pretos correspondem às enzimas:

CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3'H, flavonona 3-hidroxilase; F3'5'H, flavonona 3',5'-hidroxilase; DFR, dihidroflavonol 4-reductase; LDOX/ANS, leucoantocianidina dioxigenase/antocianidina sintase. Os anéis com os números de carbono A-B-C são indicados na estrutura correspondente ao flavonol naringenin. Imagem adaptada de Grotewold (2006).

A genética e os processos bioquímicos que contribuem para a coloração das pétalas das flores têm sido extensivamente estudados em diversas espécies, em especial no gênero *Petunia* (Quattrocchio *et al.*, 1993, 1999; Spelt *et al.*, 2000, 2002; Griesbach, 2002; Sheehan *et al.*, 2016). Diversos estudos, principalmente em *Petunia hybrida*, identificaram genes regulatórios que codificam fatores de transcrição e os genes estruturais que codificam enzimas envolvidas na síntese das antocianinas, acúmulo e estabilização vacuolar, síntese dos co-pigmentos (flavonoides) e acidificação vacuolar do lúmen onde as antocianinas são estocadas (Koes *et al.*, 2005; Bliet *et al.*, 2016) (Fig. 6).

### **3.1.2 Os genes biossintéticos envolvidos na rota da produção dos flavonoides e antocianinas**

A rota da biossíntese de flavonoides, metabólitos secundários, é uma das mais bem estudadas em plantas, do ponto de vista químico, bioquímico, genético e molecular (Grotewold, 2006; Tanaka *et al.*, 2008). Excelentes revisões já foram publicadas, detalhando a rota de síntese de flavonoides e antocianinas em *Petunia* e outras espécies (Winkel-Shirley, 2001; Koes *et al.*, 2005; Grotewold, 2006; Tornielli *et al.*, 2009, Tanaka *et al.*, 2010; Bliet *et al.*, 2016). Portanto, nesta seção, será mostrada uma visão geral da via de síntese de antocianinas bem como as enzimas e genes que estão envolvidos na formação da cor das flores.

Os flavonoides possuem sua estrutura básica constituída por três anéis de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, sendo amplamente distribuídos entre as plantas terrestres. Dependendo da estrutura apresentada, os flavonoides podem ser classificados em diferentes grupos como: chalconas, flavanonas, flavonóis e antocianinas (Tanaka *et al.*, 2010).

A rota da síntese dos flavonoides e antocianinas é dividida em três partes maiores (Figs. 5 e 6). A rota geral dos fenilpropanoides inicia com a conversão de fenilalanina em 4-cumaril-coenzima-A em uma reação realizada pelas enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H) e 4-cumarato-CoA ligase (4CL). Estes são os precursores para a síntese de vários compostos como os voláteis e flavonoides (Tanaka *et al.*, 2010).

A parte central do metabolismo dos flavonoides inicia com a conversão da enzima 4-cumaril-CoA em hidroflavonoides, dando origem aos precursores para a síntese de todas as classes de flavonoides, incluindo as antocianinas e flavonóis. O processo envolve a condensação da enzima 4-cumaril-coenzima-A, juntamente com três moléculas de malonil-CoA realizada pela enzima chalcona sintase (CHS) que gera, então, a chalcona amarela que é convertida pela chalcona isomerase (CHI) na classe dos flavonones, pigmento incolor (narigenina). O passo seguinte envolve isomerização espontânea, mesmo na ausência da enzima CHI, e gera uma mistura de dois esteroisômeros, dos quais apenas um pode ser convertido pela flavonona 3-hidroxilase (F3H) no hidroflavonoide (dihidrokaempferol) (Winkel-Shirley, 2001). A adição de duas hidroxilases, flavonoide 3'hidroxilase (F3'H) codificada pelo *locus HT1* e a F3'5'H (codificada por *HF1* e *HF2*) produzem 3' e ou 5' dihidroflavonoides hidroxilados: dihidroquercetina (F3'H) e dihidromiricetina (F3'5'3'H), respectivamente. Estes são os precursores dos diferentes tipos de antocianinas e dos flavonoides UV-absorventes (Fig. 5). Espécies que sintetizam grandes quantidades de chalconas e flavonoides tendem a produzir baixa quantidade de antocianinas nas pétalas, devido à competição pelo mesmo substrato (Davies *et al.*, 1998).

A primeira reação que especifica o ramo que irá produzir as antocianinas e as protoantocianidinas (taninos condensados) se dá pela catálise específica da síntese dos flavonoides que é realizada pela enzima flavonol sintase (FLS). Então a enzima dihidroflavonoide redutase (DFR) dedica-se ao ramo que dá origem às coloridas, ao olho humano, antocianinas, através do ramo de ação da enzima antocianina sintase (ANS).

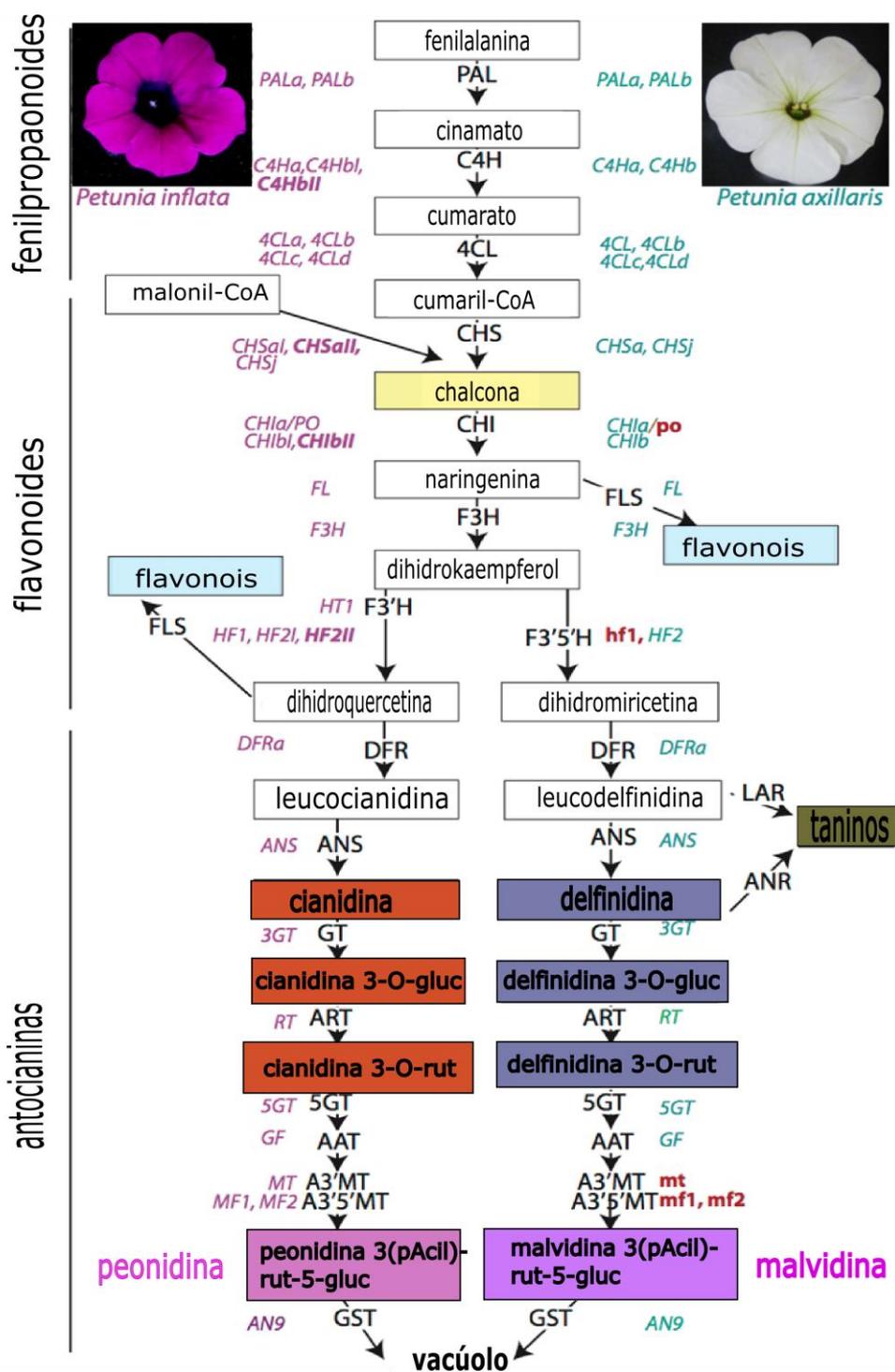
Os dihidroflavonoides são substratos comuns para a síntese das antocianinas e flavonóis, os quais se apresentam incolores ou amarelados. Existem três tipos de flavonóis glicosídeos: quercetina, kaempferol e miricetina, dos quais os mais comuns em Solanaceae são quercetina e kaempferol. *Petunia*, por exemplo, não acumula altos níveis de miricetina, presumidamente, devido à competição por substrato, uma vez que FLS compete com DFR para produzir dihidromiricetina. Em *Petunia*, FLS apresenta baixa afinidade com dihidromiricetina (Mol *et al.*, 1998).

As três principais classes de antocianidinas são compostas pelas pelargonidinas que apresentam cores alaranjada/vermelha; cianidinas que apresentam as cores magenta/púrpura e, por fim, as delphinidinas apresentando as cores violeta/azulada (Fig. 5). Estas são as antocianidinas básicas que podem ser 'decoradas' através de reações enzimáticas como, por exemplo, a adição de diferentes compostos como açúcares e grupos acil ao esqueleto das

---

antocianinas, o que resulta em produtos mais estáveis, com diferentes tonalidades de cor. Essas diferentes composições ocorrem pela adição de glucose pela 3-glucosil transferase (3GT) e 5-glucosil transferase (5GT) à mistura de ramnose pela antocianina ramnosil transferase (ART) codificada pela *RHAMNOSYLATION AT THREE* (RT) e grupos metil pela antocianina 3'metil transferase (A3'MT e A3'5'MT) codificadas pelos genes da *METHYLATION AT THREE* (MT) e *METHYLATION AT FIVE* (MF), respectivamente, e os grupos acil pela antocianina acil transferase (AAT) (Tanaka *et al.*, 2008) (ver Fig. 6).

A adição desses componentes segue uma ordem precisa que é condicionada pela especificidade do substrato das enzimas que catalisam reações individuais e produzem componentes específicos. A classe das peonidinas origina-se das cianidinas e as petunidinas e malvidinas são originadas da classe das delphinidinas. Por exemplo, *Petunia integrifolia* produz grande quantidade de antocianinas como a malvidina-3- (p-cumaril) -rutinoside-5-glucoside, enquanto que *P. exserta* produz antocianinas como as delphinidina-3-rutinoside e cianidina-3-rutinoside. Em *Petunia hybrida*, a baixa afinidade de DFR com os hidroflavonoides dihidrokaempferol e dihidroquercetina resulta na produção majoritária de antocianinas da classe das delphinidinas. Isso ocorre devido à especificidade da sequência de aminoácidos no substrato que se liga à região de DFR (Quattrocchio *et al.*, 2006). Competição por substrato pode ocorrer entre diferentes ramos da rota de síntese das antocianinas e da rota de síntese de flavonoides, resultando em diferente composição e quantidade de antocianinas produzidas (Mol *et al.*, 1998).



**Figura 6:** Via de biossíntese dos flavonoides e antocianinas em *Petunia*. A formação das antocianinas ocorre através de diversos passos enzimáticos e inicia a partir da via geral dos fenilpropanoides, que leva a produção de flavonoides em um dos ramos e segue até a formação das coloridas antocianinas. Na figura, as enzimas são grafadas em preto, os genes que codificam para *P. inflata* S6 são grafados em rosa e os genes de *P. axillaris* N em verde. Alelos mutados são grafados em letras minúsculas, na cor vermelha e duplicações são marcadas em negrito. S6 e N correspondem a linhagens cultivadas em casa de vegetação destas espécies. Abreviações correspondente ao nome das enzimas, os respectivos genes que são codificados pelas enzimas estão indicados em parenteses: PAL: fenilalanina amônia liase (*PAL-a*, *PAL-b*); C4H: cinamato-4-hidroxilase (*C4H-a*, *C4H-b*); 4CL: 4-cumarato-CoA ligase (*4CL-a*, *4CL-b*; *4CL-c*, *4CL-d*); CHS: chalcona sintase (*CHS-a*, *CHS-j*); CHI: chalcona isomerase

(*CHI\_a*, *CHI\_b*); F3H: flavonona 3-hidroxilase (*F3H*); FLS: flavonol sintase (*FLS*); F3'H and F3'5'H: flavonoide 3' e 3'5' hidroxilase (*HT1* and *HF1*, *HF2*); DFR: dihidroflavonol 4-redutase (*DFR*); ANS: antocianidina sintase (*ANS*); 3GT and 5GT: antocianidina 3 and 5 glucosiltransferase (*3GT*, *5GT*); ART: antocianidina 3-glucoside ramnosiltransferase (*RT*); 3'AMT and 3'5'AMT: antocianidina 3 e 3'5'O-metiltransferase (*MT* e *MF*); GST: glutationa-S-transferase (*AN9*). Os nomes dos genes são os mesmos das enzimas acima nomeadas, exceto para *HT1*: *HYDROXILATION AT THREE1*; *HF1*, *HF2*: *HYDROXILATION AT FIVE 1 AND 2*, respectivamente; *RT*: *RHAMNOSYLATION AT THREE*; *MT*: *METHYLATION AT THREE* and *MF2*: *METHYLATION AT FIVE 2*, respectivamente. Adaptado de Bliet *et al.* (2016), imagem das flores: da autora.

### 3.1.3 O papel do transporte e estoque das antocianinas e da acidificação do pH do vacúolo na determinação da cor das flores

A maioria das enzimas envolvidas na síntese das antocianinas reside no citoplasma, com exceção do citocromo P450 e das hidroxilases C4H, F3'H e F3'5'H que se localizam no retículo endoplasmático (Koes *et al.*, 2005). O produto final das antocianinas é acumulado no vacúolo central. O transporte das antocianinas para o vacúolo é realizado pelo gene *ANTHOCYANIN9* (*AN9*), que codifica a glutatona transferase (GST) que parece ser requerida para o transporte dos pigmentos pelo tonoplasto. A atividade do gene *AN9* está ligada à pigmentação das pétalas e mutantes desse *locus* apresentam pétalas pálidas (Gerats *et al.*, 1982; Alfenito *et al.*, 1998).

Desde que as antocianinas são estocadas no vacúolo, a regulação da acidificação do pH vacuolar é um importante fator para a cor das mesmas, pois elas são vermelhas sob pH baixo (pH < 3) e azuladas em pH alto (pH > 6) nas células epidérmicas das pétalas (Tanaka *et al.*, 2010). Em *P. hybrida*, o vacúolo é moderadamente ácido, o que leva à cor avermelhada das antocianinas. Em *Petunia*, mutações em um dos sete *loci* do pH (*PH1-PH7*) resultam em flores com pétalas mais azuladas, devido à inibição da acidificação vacuolar (Quattrocchio *et al.*, 2006). Em flores de calêndula (*Calendula* sp.), as cores das pétalas mudam de púrpura para azul, sem diferença do tipo de antocianina produzida, apresentando apenas diferenças no pH entre as flores de cada tonalidade, pH = 6.6 e pH=7.7, respectivamente. As antocianinas são pigmentos instáveis e a estabilidade das diferentes antocianinas em diferentes pH é altamente influenciada pela glicosilação e acilação aromática e alifática, o que influencia diretamente a durabilidade e a cor conferida aos determinados tecidos das plantas. Expressão dos genes *PH1*, *PH3*, *PH4* e *PH5* e acidificação vacuolar requerem um complexo de regulação e estão, conseqüentemente, ligados à síntese de antocianinas através do compartilhamento dos mesmos reguladores MBW: MYB (R2R3-MYB); *basic helix-loop-helix* (bHLH) e a proteína repetida

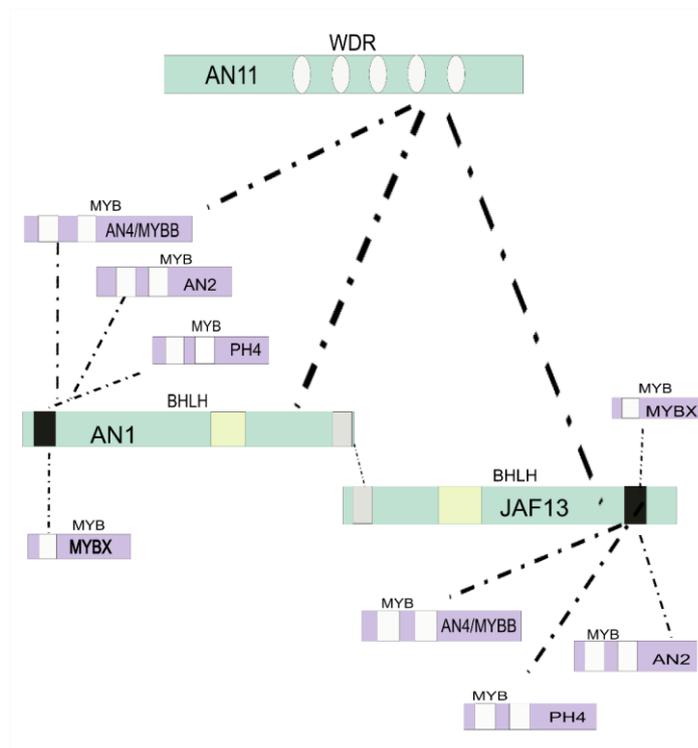
W40 (WDR) (Verweij, 2008). O complexo regulatório dos genes estruturais das antocianinas MBW será discutido na próxima seção.

### 3.1.4 Regulação da síntese de antocianinas

A pigmentação, na maioria das plantas, é limitada a tecidos específicos e regulada por fatores internos e externos, como luz e relógio circadiano (Mol *et al.*, 1998). A maioria da regulação da síntese de pigmentos ocorre via controle de transcrição de genes estruturais. Todas as angiospermas apresentam um complexo regulatório comum dos genes estruturais das antocianinas (MBW), que é composto pelos fatores de transcrição MYB (R2R3-MYB) e *basic helix-loop-helix* (bHLH) e a proteína repetida W40 (WDR) (Quattrocchio *et al.*, 1993; Koes *et al.*, 2005; Ramsay & Glover, 2005). Esse complexo regulatório atua apenas na regulação dos genes, a partir de um determinado ponto da rota de síntese das antocianinas. Por exemplo, em *Petunia*, a regulação inicia no ponto de ação da enzima dihidroflavonoide redutase (DFR) (Quattrocchio *et al.*, 1993). Os reguladores dos genes responsáveis pelo início da síntese dos genes biossintéticos (*PAL*, *C4H*, *4CL*, *CHS*, *CHI* e *F3H*) ainda não foram identificados. Sabe-se que os mesmos atuam independentemente da regulação da biossíntese dos genes posteriores a eles (Brugliera *et al.*, 1999; Sheehan *et al.*, 2012). Já em *Ipomea*, os genes *CHS*, *CHI* e *F3H* parecem ser parcialmente regulados pelo complexo MYB-bHLH-WDR (Morita *et al.*, 2006). Em milho, todos os genes biossintéticos da rota das antocianinas são regulados pelo complexo MBW (Mol *et al.*, 1998). A divisão na regulação dos genes biossintéticos é bastante espécie-específica e parece ser importante para que tecidos não pigmentados possam acumular flavonoides e flavonones (Koes *et al.*, 2005).

Em *Petunia*, muitos dos reguladores dos genes já foram identificados (Fig. 7) e diferentes MBW são responsáveis pelo acúmulo de antocianinas em diferentes partes da planta. Por exemplo, o R2R3-MYB *ANTHOCYANIN2* (*AN2*) é expresso, principalmente, no limbo da corola, podendo também ser expresso no tubo floral e é um dos principais reguladores da produção das antocianinas (Quattrocchio *et al.*, 1999). Já o gene *ANTHOCYANIN4* (*AN4*) atua primariamente na pigmentação das anteras e do tubo floral (Kroon, 2004; Povero 2011). O gene *DEEP PURPLE* (*DPL/MYBB*) está correlacionado com a venação do tubo floral, enquanto que o R2R3-MYB, *PURPLE HAZE* (*PHZ*) regula a produção de antocianinas no botão floral quando exposto à luz (Albert *et al.*, 2011). A proteína WDR regula a produção de *ANTHOCYANIN11* (*AN11*). Este gene é expresso em toda a planta e mutações no mesmo abolem a síntese de antocianina em todos os seus tecidos (de Vetten *et al.*, 1997). A proteína

bHLH regula a produção da *ANTHOCYANINI (ANI)*, sendo a expressão deste gene encontrada nos tecidos que acumulam antocianinas ou taninos e está também ao pH vacuolar (Spelt *et al.*, 2000; 2002). Outro gene regulado pela proteína bHLH é o *JOHNANDFRANCESCA13 (JAF13)*, que também atua na produção das antocianinas e provavelmente tendo função como intensificador da ação do complexo de *ANI*, *AN11* e *AN2*, mas sua função exata ainda não foi identificada (Spelt *et al.*, 2000; Tornielli *et al.*, 2009; Bliet *et al.*, 2016).



**Figura 7:** Mapa de interação entre os fatores da rede regulatória que controlam a cor da flor em *Petunia*. As interações descritas nessa figura esquemática foram demonstradas via experimentos de co-immunoprecipitação e via ensaio de leveduras com dois híbridos (Quattrocchio *et al.*, 2006). Nesse esquema os fatores bHLH (*AN1* e *JAF13*) interagem um com o outro devido ao domínio conservado da região C-terminal. Esses dois fatores interagem com diferentes proteínas do tipo MYB (*AN2*, *AN4*, *MYBB*, *PH4* e *MYBX*) através da região conservada N-terminal. O fator WDR (*AN11*) é capaz de formar complexos de interação com a parte central das proteínas bHLH (*AN1* e *JAF13*), bem como com as proteínas do tipo MYB (*AN4* e *MYBB*). Imagem adaptada de Tornielli *et al.* (2009).

### 3.2 Os pigmentos carotenoides

Os carotenoides são o segundo pigmento mais abundante encontrado na natureza (Britton, 1998). Eles fazem parte do grupo de isoprenoides, a maioria composta por 40 carbonos polienos e todos derivados do fiteno (Grotewold, 2006). Os carotenoides são sintetizados por todos os seres fotossintetizantes e também por bactérias e fungos e desempenham papel essencial para esses organismos, sendo importantes na proteção contra danos foto oxidativos

em alta intensidade de luz, estresse hormonal e no desenvolvimento (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Niyogi, 1999; Baroli & Niyogi, 2000; Dall'Osto *et al.*, 2007; Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012). Além disso, os carotenoides desempenham importante papel na atração de polinizadores e dispersores de sementes, proporcionando a coloração das pétalas das flores e dos frutos nas cores amarela, laranja e vermelha (Grotewold, 2006; Tanaka *et al.*, 2008). Os carotenoides também são pigmentos de grande interesse para a indústria de flores e para o melhoramento genético, com o objetivo de desenvolver novas tonalidades e padrões de cores nas variedades de plantas comerciais. Carotenoides são encontrados em vegetais como cenoura, tomate, pimenta e também nas flores das calêndulas, mímulus, gérberas, rosas e lírios. Os tipos de carotenoides mais abundantes nas plantas são luteína;  $\beta$ -caroteno; violaxantina e neoxantina (Britton, 1993). Os carotenoides podem coexistir com as antocianinas de cores vermelha e púrpura e, nesse caso, podem originar pigmentos de tonalidade bronze/marrom. Essa coloração só é possível de ser obtida com a interação dessas duas classes de pigmentos (Forkmann, 1991; Grotewold, 2006).

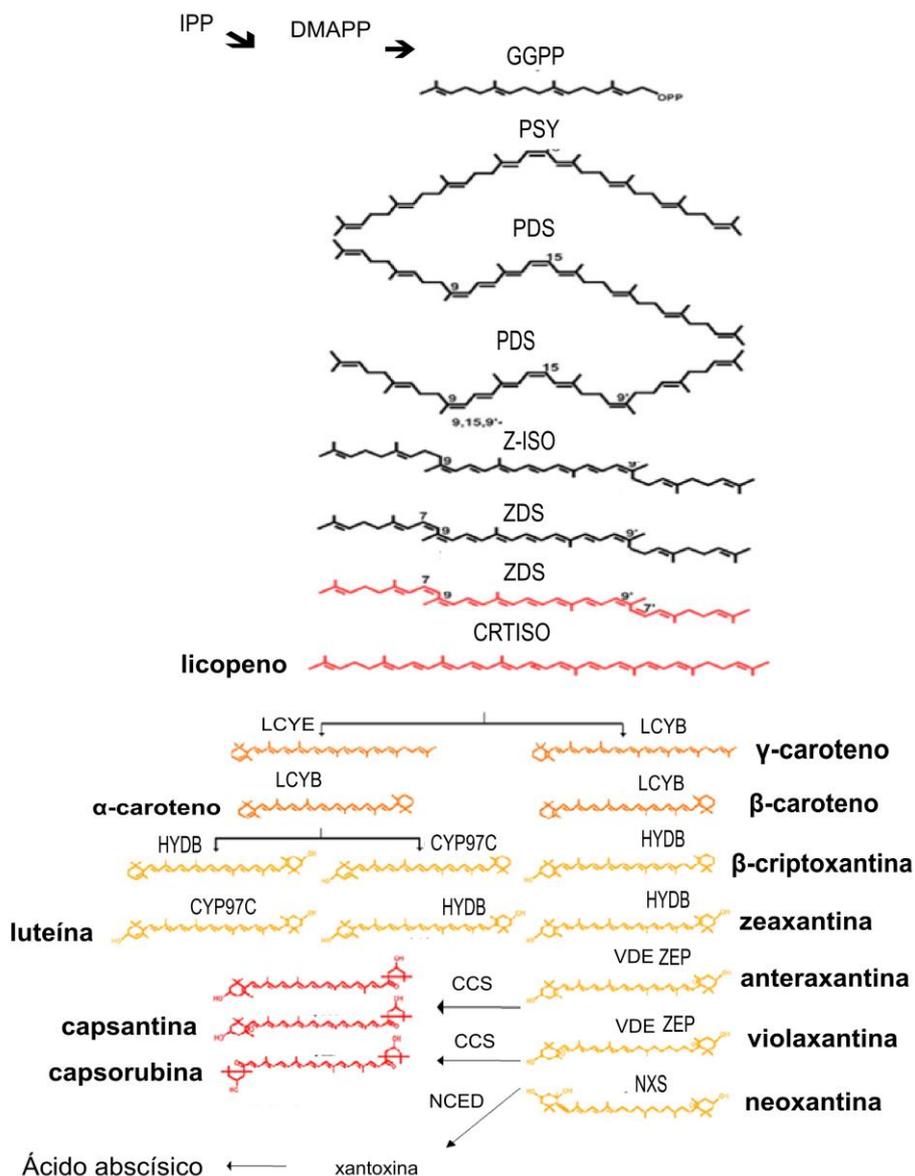
Os carotenoides são sintetizados nos plastídios e se acumulam, principalmente, nos cloroplastos em tecidos vegetativos e nos cromoplastos de frutos e pétalas (Grotewold, 2006). Nos últimos anos, muito se tem estudado sobre o impacto dos carotenoides na cor das flores e as bases moleculares, os mecanismos regulatórios envolvidos na determinação das cores das pétalas têm sido descritos usando, principalmente, espécies modelo como *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* e *Tagetes sp.* (Zhu *et al.*, 2010). Experimentos com mutantes de *Arabidopsis* também contribuíram bastante para o entendimento da síntese dos carotenoides em plantas (Cunningham & Gantt, 1998; Hirschberg, 2001; Fraser & Bramley, 2004; Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012).

### 3.2.1 A rota da síntese de carotenoides em plantas

A via de síntese de carotenoides já foi bem estabelecida. Diversas revisões detalham os passos necessários para a formação dos pigmentos e a mesma será brevemente descrita nesta seção. Para revisão mais detalhada veja referências como Grotewold (2006) Tanaka *et al.* (2008), Zhu *et al.* (2010) e Nisar *et al.* (2015), entre outras. A rota para a produção de carotenoides inicia com a isopentenil difosfato (IPP), fornecendo os 5 carbonos iniciais para a formação dos carotenoides. Então, a condensação de duas moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGPP) permite a formação do precursor incolor dos carotenoides, o fitoeno, através da atividade catalítica da enzima fitoeno sintase (PSY). O fitoeno é convertido através de uma

série de quatro reações de dessaturização, catalisadas pela fitoeno desaturase (PDS),  $\zeta$ -caroteno isomerase (Z-ISO),  $\zeta$ -caroteno desaturase (ZDS) e caroteno isomerase (CRTISO), em carotenoides vermelhos brilhantes (Fig. 8) o licopeno, este é um dos tipos de carotenoides que está presente em grande quantidade no tomate, por exemplo.

A formação de licopeno representa um importante ponto na rota de síntese de carotenoides, visto que o licopeno atua como substrato para duas enzimas competidoras, a licopeno  $\beta$ -ciclase (LYCB) e a licopeno  $\epsilon$ -ciclase (LYCE). Nesse ponto, a adição de anéis por uma das duas enzimas resultará na produção de diferentes tipos de carotenoides. A adição cíclica de um anel  $\epsilon$  e um anel  $\beta$  pela enzima LYCE ao licopeno leva à formação de  $\alpha$ -caroteno, que é então convertido em zeinoxantina e transformado pela ação da CYP97C no carotenoide amarelo luteína. Por outro lado, a enzima LYCB proporciona a adição cíclica de dois anéis  $\beta$  ao licopeno, resultando na produção dos pigmentos alaranjados conhecidos como  $\beta$ -carotenos, os quais podem então continuar sendo sintetizados e hidroxilados pela enzima HYDB ao ponto de serem convertidos, através de reações enzimáticas, no caroteno amarelo zeaxantina, que pode ser sequencialmente convertido em outros carotenoides amarelos como as anteraxantina, violaxantina e neoxantina. Algumas espécies de plantas, como as que produzem frutas vermelhas, as pimentas e os pimentões, têm a capacidade de produzir os ceto-carotenoides, conhecidos como capsantina e capsorubina, carotenoides vermelhos, que são obtidos através da via de síntese da anteraxantina, violaxantina e neoxantina e, para tanto, requerem a adição de um grupo ceto a cada anel de zeaxantina (Fig. 8).



**Figura 8:** Representação esquemática da rota de síntese de carotenoides em plantas. Abreviaturas: IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato; PSY, fitoeno sintase; PDS, fitoeno desaturase; Z-ISO, ζ-caroteno isomerase; ZDS, ζ-caroteno desaturase; CRTISO, isomerase; LYCB, licopeno β-ciclase; LYCE, licopeno ε-ciclase; CCS, capsantina-capsorubina sintase; CYP97C, anel ε-caroteno hidroxilase; HYDB, β-caroteno hidroxilase (BCH, CYP97A ou CYP97B); ZEP, zeaxantina epoxidase; VDE, violaxantina de-epoxidase; NXS, neoxantina sintase; NCED, 9-cis-epoxi carotenoide dioxigenase. As cores das estruturas dos carotenoides (vermelho, laranja e amarelo) correspondem à cor produzida por cada um dos tipos de carotenoides. Imagem adaptada de Zhu *et al.* (2010).

### 3.2.2 A biossíntese e o acúmulo dos carotenoides são controlados predominantemente por regulação em nível de transcrição

A quantidade e a diversidade de carotenoides presentes nas plantas variam grandemente nos cromoplastos, mesmo em uma única espécie (Tanaka *et al.*, 2008). A explicação para tamanha diversidade é baseada nos diferentes mecanismos regulatórios que levam à síntese dos carotenoides. Flores de cor branca, por exemplo, tendem a possuir níveis baixos de carotenoides se comparadas com flores de cor laranja. Essa diferença se dá pela capacidade de acúmulo desses pigmentos no cromoplasto. Mecanismos têm sido postulados como importantes para o acúmulo de carotenoides nos cromoplastos e estes se dão através da regulação da transcrição ou pós-transcrição dos genes que controlam a síntese e a degradação dos carotenoides e a regulação do sequestro de estruturas lipoprotéicas que atuam como dissipadoras de carotenoides de uma maneira espécie-específica (Zhu *et al.*, 2010).

A regulação da transcrição dos genes carotenóicos é um importante mecanismo que contribui para o acúmulo de carotenoides específicos durante o desenvolvimento floral. Estudos em tomate, por exemplo, servem como um bom modelo para o estudo de carotenoides, pois essa espécie é capaz de sintetizar diferentes carotenoides em diferentes tecidos como folhas, flores e frutos, seguindo diferentes mecanismos regulatórios. Por exemplo, os genes que controlam a intensa cor amarela das flores são resultantes do acúmulo de xantofila, violaxantina e neoxantina, enquanto que o vermelho dos frutos é devido ao acúmulo de licopeno. Em tomate, alguns dos genes responsáveis pela produção dos carotenoides são sintetizados em pares, nos quais *GGPPS1*, *PSY2* e *CRTL-b1* são expressos preferencialmente nas folhas, enquanto que *GGPPS2*, *PSY1* e *CRTL-b2* são expressos nas flores (Galpaz *et al.*, 2006). Giuliano *et al.* (1993) mostraram que a quantidade de carotenoides produzida nas flores de tomate é mais elevada durante os estágios de desenvolvimento floral o que coincide com o aumento dos níveis de mRNA de *PSY1* e *PDS* e evidencia que o acúmulo de carotenoides é controlado, predominantemente, a nível de transcrição. Posteriormente, Bramley (2002) demonstrou ocorrer também a regulação pós-transcrição na formação de carotenoides no fruto do tomate.

Flores do gênero *Calendula* apresentam uma grande variedade de cores devido à presença de carotenoides, desde aquelas de cor branca, amarela até as de cor laranja. A quantidade de carotenoides diverge enormemente entre as flores, nas quais as mais pigmentadas produzem cerca de 100 vezes mais carotenoides do que as flores de cor branca. Da mesma maneira que em tomate, a regulação de síntese de carotenoides em *Calendula* é

majoritariamente a nível de transcrição, sendo os níveis de *PSY* fortemente correlacionados com a quantidade de carotenoides encontrado nas flores (Zhu *et al.*, 2010). Já em *Ipomea*, as flores amarelas e brancas (*Ipomea nil*) acumulam carotenoides no mesmo nível, durante os estágios iniciais de desenvolvimento floral, porém nos estágios tardios, as flores brancas não acumulam cromoplastos para produzir carotenoides. Yamamizo *et al.* (2010) isolaram os genes responsáveis pela produção de carotenoides em botões florais de *Ipomea nil* e observaram que esses genes apresentam baixa expressão, quando comparados com as espécies de flores amarelas de *Ipomea*, sugerindo então que a cor branca das pétalas em *Ipomea nil* é causada pela perda da habilidade de sintetizar cromoplastos devido à baixa regulação dos genes carotenóicos. Contudo, em lírios, o nível de genes carotenóicos (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* e *BHC*) em flores de pétalas amarelas e brancas é similar, indicando que, diferentemente de *Ipomea nil*, outro mecanismo de regulação é o responsável pela perda de carotenoides nas flores de cor branca (Yamagashi *et al.*, 2009).

### 3.3 A cor das flores e pigmentação em *Calibrachoa*

Estudos genéticos relacionados à coloração das pétalas e aos pigmentos envolvidos no caráter cor têm sido bastante explorados, principalmente, em espécies modelo (Grotewold, 2006). Os pigmentos mais bem distribuídos em plantas são antocianinas e carotenoides, os quais têm sido amplamente estudados em espécies dos gêneros *Petunia*, *Lycopersicon* e *Mimulus* (Koes *et al.*, 2005; Galpaz *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2013; 2014). Os pigmentos, como já foi mencionado nas seções anteriores, têm papel importante na atração dos polinizadores, o que contribui para o aumento do sucesso reprodutivo da espécie e têm também importância econômica.

Espécies de flores do gênero *Calibrachoa* têm sido inseridas no mercado de floricultura desde o início dos anos 1990 (Rice, 1997). Atualmente, mais de 90 diferentes variedades de cultivares comerciais já se encontram disponíveis no mercado florista (Kanaya *et al.*, 2010) e existe um interesse crescente em desenvolver novas variedades de *Calibrachoa* através de melhoramento genético porque, em comparação com as conhecidas petúnias-de-jardim, possuem maior número de flores por planta (Kanaya *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2014).

Entretanto, apesar do interesse comercial, estudos que reportam à composição de pigmentos florais e às bases moleculares para as diferentes cores encontradas, tanto nas variedades comerciais, quanto nas espécies naturais, são escassos ou inexistentes no gênero

*Calibrachoa*. Apenas os estudos, Waterworth & Griesbach (2001), Murakami *et al.* (2004), relatam a presença de pigmentos responsáveis pela cor das flores e as bases bioquímicas em *Calibrachoa*, tendo como foco principal as cultivares comerciais, usando espécies silvestres (*C. sellowiana* e *C. thymifolia*, respectivamente) apenas como controle para os estudos. Mais recentemente, Ng & Smith (2016) relataram a presença de antocianinas e carotenoides em espécies de cor vermelha de *Calibrachoa*.

Com base nesses estudos, sabe-se que *Calibrachoa* é capaz de sintetizar tanto antocianinas como carotenoides, sendo a composição de antocianinas para as variedades comerciais magenta e púrpura compostas, principalmente, pela série das delfinidinas e suas formas derivativas a malvidina e a petunidina. Os carotenoides presentes nas variedades comerciais de coloração amarela e avermelhada são compostos, principalmente, por  $\beta$ -caroteno. Aspectos mais profundos em relação aos genes envolvidos na síntese e na regulação para a coloração em espécies selvagens de *Calibrachoa* são, ao nosso conhecimento, inexistentes até o presente momento.

Em relação ao aspecto ecológico, o caráter cor representa papel de extrema importância na atração do polinizador, devido ao fato de que determinados polinizadores possuem preferência por certas cores de flores (Fenster *et al.*, 2004, Schiestl & Johnson, 2013). Então, diversidade de características florais, como por exemplo cor, em espécies proximamente relacionadas são muitas vezes associadas a isolamento reprodutivo, e podem promover diversificação em um gênero (Ramsey *et al.*, 2003; Bradshaw & Schemske, 2003). Portanto, entender os processos que levam à transição de cor em espécies proximamente relacionadas e os genes envolvidos nesse processo, tem uma grande importância do ponto de vista ecológico e evolutivo e *Calibrachoa* aparece então como um importante grupo para o desenvolvimento desse tipo de estudo, relacionado à cor da flor e à interação com o polinizador.

Embora não se tenha, ainda, trabalhos que identifiquem os tipos de pigmentos, as bases moleculares, a rota e os genes envolvidos no processo específico de transição de cor em *Calibrachoa*, o gênero *Petunia* serve de excelente referência para estudos em espécies de *Calibrachoa*, visto que ambos os gêneros são proximamente relacionados e compartilham espécies que apresentam a mesma cor e o mesmo tipo de polinizador. Os genes relacionados com a transição de cor e a rota metabólica já foram extensamente estudados em *Petunia*, servindo então de base sólida para o processo de entendimento de cores e pigmentos em espécies nativas de *Calibrachoa*. Porém, vale salientar que, embora a rota de produção de

pigmentos e cor seja bastante conservada, ainda assim, o tipo de regulação é bastante espécie-específico.

### 3.4 Genes envolvidos na produção de cor em diferentes espécies de plantas

A cor da flor é uma das características mais óbvias de serem observadas e desempenha papel de bastante importância na ecologia e na evolução de uma espécie. Transição de cor entre espécies proximamente relacionadas envolve, frequentemente, mudanças na regulação da via de síntese de antocianinas, tanto por genes regulatórios (mudanças em *trans*), quanto por alvos de genes regulatórios ou elementos regulatórios (mudança em *cis*) (Streisfeld & Rausher, 2011; Sheehan *et al.*, 2012; Sobel & Streisfeld, 2013), além de mudanças de cor causadas por mutações em genes estruturais como, por exemplo, em *Ipomea purpurea* (Zufall & Rausher, 2003).

Em *Petunia*, como já foi citado anteriormente, os genes responsáveis pela produção de pigmentos e cor já foram bastante estudados (Quattrocchio *et al.*, 1999; Hoballah *et al.*, 2007; Sheehan *et al.*, 2016). Os genes envolvidos nas diferentes cores de *P. integrifolia* e *P. axillaris* são expressos no limbo da corola e regulados pela ação dos genes *AN2*, *HF1* e *HF2*, que em conjunto controlam a quantidade e a qualidade de antocianina produzida (Holton *et al.*, 1993; Quattrocchio *et al.*, 1999).

Diferenças na produção da cor invisível aos olhos humanos luz ultravioleta (UV) emitida pelas flores, também são importantes na atração ao polinizador e já foram caracterizadas em *Petunia*. Por exemplo, *P. axillaris* (exceto *P. axillaris* ssp. *parodii*) possui flores UV-absorvente em grande quantidade no lado adaxial do limbo da corola, a qual aparece escura (opaca) na luz UV, enquanto que flores de *P. integrifolia* são UV-reflectante, apresentando brilho (reflectiva) sob luz UV. A diferença na luz UV produzida nas duas espécies é explicada, em parte, pela variação no *locus FL* que codifica a flavonol sintase (FLS) e controla a produção de flavonóis (Holton *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 2016).

Um exemplo interessante de diferenças de cor pode ser visto no gênero *Mimulus* que tem espécies com flores coloridas devido a produção de carotenoides e outras por antocianinas. Por exemplo, o ganho da cor vermelha das espécies do gênero foi elucidado e atribuído a uma única mutação de ganho de função nos *loci* codificador da proteína R2R3-MYB do subgrupo 6. O *locus petal lobe anthocyanin 1 (pla1)* está associado à cor vermelha na espécie de *Mimulus cupreus*, enquanto que o *locus pla2* produz pigmentação vermelha nas flores de *M. luteus*

*variegatus*. Cada um dos *locus* contém homólogos duplicados de R2R3-MYBs e os próprios *loci* são provavelmente relacionados a um prévio evento de duplicação (Cooley & Willis, 2009; 2011). Na espécie de *M. lewisii*, que possui flores de cor magenta, e em *M. cardinalis*, que possui flores de cor vermelha, a diferença de cor é atribuída ao *locus yellow upper* (*yup*), no qual o alelo dominante de *M. lewisii* previne o acúmulo de carotenoides e plantas homocigotas para o alelo recessivo do mesmo *locus* em *M. cardinalis* ativa o acúmulo de carotenoides (Bradshaw & Schemske, 2003).

Conforme revisado por Sheehan *et al.* (2012), diversos genes já foram identificados, em diferentes gêneros, como responsáveis pela transição de cor observada entre espécies proximamente relacionadas ou mesmo em populações de uma mesma espécie. Em *Lochroma* (Smith *et al.*, 2008; Smith & Rausher, 2011), a deleção do gene *F3'5'H* em *I. gesnerioides* comparada com *I. cyaneum* leva a uma produção de antocianinas derivadas das pelargoninas ao invés da produção de antocianinas derivadas das cianidinas, promovendo diferença de cor das flores nestas duas espécies. Em *Mimulus aurantiacus*, a regulação diferencial do gene *DFR*, devido a uma mutação *cis*-regulatória na região proximamente ligada ao fator de transcrição R2R3-MYB (*MaMyb2*) influencia na variação de cor das flores de amarelas para vermelhas em populações distintas da mesma espécie (Streisfeld & Kohn, 2005, 2007; Streisfeld & Rausher, 2009; Streisfeld *et al.*, 2013). Ainda em *Mimulus*, o trabalho de Wu *et al.* (2013) sugere que a perda de antocianinas, tornando a cor das flores brancas em dois morfotipos de *M. lewisii*, ocorreu devido à inserção de dois pares de bases (pb) na região codificadora no gene *DFR* presente nas plantas com flores brancas, tornando-o inativo, indicando o gene *DFR* como sendo responsável pela diferença da cor observada entre esses dois morfotipos.

Caracterização e identificação de genes responsáveis pela transição de cor em espécies proximamente relacionadas têm obtido recente progresso (Hoballah *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2013, 2014) porém ainda existem muitas espécies em que os genes responsáveis pelas diferenças em cor ainda não foram identificados. O constante desenvolvimento de técnicas como o sequenciamento e a anotação de transcriptomas e genomas inteiros são de grande importância na identificação desses genes.

#### **4. Fatores de transcrição do tipo MYB e gene AN2**

Proteínas do tipo MYB constituem uma classe diversa de proteínas de ligação ao DNA (DNA ligantes), presentes em todos os eucariotos. A maioria das proteínas do tipo MYB atua

como fator de transcrição através da repetição de um número variável de domínios que conferem, assim, habilidade de se ligar ao DNA (Ramsay & Glover, 2005). Os membros da família MYB são caracterizados por ter um domínio estruturalmente conservado, conhecido como domínio MYB, sendo especialmente conservado na região N-terminal, que é essencial para a ligação do DNA durante a transcrição. A região de domínio MYB consiste de até quatro sequências imperfeitas de repetições de aminoácidos (R), em torno de 52 aminoácidos, cada um formando três  $\alpha$ -hélices que se ligam ao DNA de uma maneira bastante específica (Ogata et al., 1996). As proteínas do tipo MYB podem ser divididas em diferentes classes, de acordo com o número de repetições que apresentam desde R1 até R4 (R1, R2, R3, R4). Em plantas, os domínios de dupla repetição R2R3-MYB são os mais comuns e mais diversos (Rosinski & Atchley, 1998). As proteínas do tipo R2R3-MYB são muito importantes para o controle de processos específicos em plantas como, por exemplo, o controle do metabolismo primário e secundário, do desenvolvimento e em resposta ao estresse biótico e abiótico (Dubos et al., 2010).

Muitas proteínas do tipo R2R3-MYB estão envolvidas na regulação da biossíntese de flavonoides, por exemplo, R2R3-MYB do subgrupo 7, que controla a produção de flavonoides enquanto que a R2R3-MYB do subgrupo 6 controla a produção de antocianinas (Stracke et al., 2001; Dubos et al., 2010).

A função de cada proteína MYB é bastante conservada entre um mesmo subgrupo em diferentes angiospermas e homólogos já foram identificados em diferentes grupos de plantas como, por exemplo, em *Zea*, *Arabidopsis*, *Petunia*, *Lycopersicum*, *Antirrhinum* (Paz-Ares et al., 1987; Kranks et al., 1998; Stracke et al., 2001; Quattrocchio et al., 1999; Mathews et al., 2003; Schwinn et al., 2006). Entretanto, embora as proteínas do tipo MYB desempenhem função semelhante, a regulação de genes alvo parece funcionar de um modo bastante espécie-específico (Mol et al., 1998; Quattrocchio et al., 1999; Jin & Martin, 1999; Stracke et al., 2001; Ramsay & Glover, 2005).

Por exemplo, no gênero *Mimulus*, a cor vermelha presente em algumas espécies do gênero é atribuída ao ganho de função do locus que contém domínios R2R3-MYB do subgrupo 6. O locus *petal lobe anthocyanin 1 (pla1)* está associado à cor vermelha das pétalas das flores em *Mimulus cupreus*. Já em *M. luteus variegatus* o locus *pla2* é envolvido na produção da cor vermelha das pétalas (Cooley & Willis, 2009; Cooley et al., 2011). Cada um desses locus contém um homólogo duplicado R2R3-MYB e ambos os loci mostraram que o nível de

antocianina produzido está diretamente relacionado à regulação coordenada dos genes da rota de produção das antocianinas.

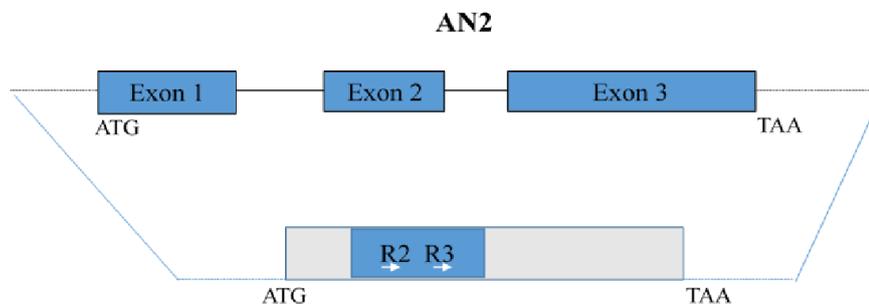
Yuan *et al.* (2014) em seu trabalho com *M. lewisii* demonstraram que a presença de dois fatores de transcrição do tipo *R2R3-MYB*, o gene *PETAL LOBE ANTHOCYANIN (PELAN)*, está diretamente envolvido com a coloração da corola e o parálogo *NECTAR GUIDE ANTHOCYANIN (NEGAN)* está envolvido na pigmentação da estrutura atuante como guia de néctar presente em *M. lewisii*. Estes autores também descobriram que em *M. cardinalis*, espécie-irmã de *M. lewisii*, a perda da expressão do gene (*PELAN*), via mecanismos distintos de ação, explica a existência de flores amarelas em algumas populações de *M. cardinalis* que possuíam, originalmente, flores de cor vermelha. Além disso, observaram que um ortólogo do gene *NEGAN* atua como o único ativador do gene *R2R3-MYB*, levando à produção de antocianinas na espécie de flores amarelas de *M. guttatus*, que possuem flores que apresentam um anel de cor na garganta da corola, o qual, possivelmente, funciona como guia de néctar para a atração do polinizador. Os resultados encontrados sugerem, então, que o gene *NEGAN* é responsável pela produção de antocianina e pigmentação nos dois diferentes clados de *Mimulus*, sugerindo que existe uma evolução paralela de função dos genes em espécies relacionadas (Yuan *et al.*, 2014).

Dentre os fatores de transcrição do tipo *R2R3-MYB* está o gene *ANTHOCYANIN2 (AN2)*. Este gene é capaz de interagir com as proteínas do tipo bHLH devido à presença na região N-terminal da sequência codificadora do motivo conservado [DE]L<sub>x2</sub>[RK]<sub>x3</sub>L<sub>x6</sub>L<sub>x3</sub>R (Zimmermann *et al.*, 2004). Conforme já foi referido nas sessões anteriores, o papel do *AN2* consiste na regulação da síntese das antocianinas, sendo um importante fator na coloração das pétalas (Quattrocchio *et al.*, 1999; Hoballah *et al.*, 2007). Quattrocchio *et al.* (1999), através de análises moleculares, identificaram a estrutura do gene *AN2*, em *Petunia*, que é composta por uma região codificadora de 765 pb, com 3 exons, dividido por duas regiões intrônicas (Fig. 9).

Quattrocchio *et al.* (1999) também investigaram o papel do gene *AN2* nas espécies de *Petunia integrifolia* e *P. axillaris*. Os autores descobriram que em *P. axillaris*, espécie com flores brancas, o *AN2* é inativo devido a diferentes mutações na região codificadora, enquanto que em *P. integrifolia*, o gene *AN2* é ativo, o que leva à completa síntese das antocianinas nessa espécie, resultando na produção de flores com corola na cor magenta.

Outro trabalho desenvolvido por Hoballah *et al.* (2007) realizaram experimentos com o gene *AN2* em plantas silvestres e transgênicas de *Petunia axillaris* e *P. integrifolia*. Nesse

trabalho, todas as sequências derivadas de diferentes indivíduos de *P. axillaris* apresentaram mutações na região codificadora do AN2 que as tornaram não-funcionais, sugerindo que a cor branca de suas flores foi adquirida em eventos evolutivos múltiplos. E quando estes autores transferiram o gene ativo AN2 de *P. integrifolia* para *P. axillaris* restaurando a funcionalidade da via de síntese das antocianinas, tornando as flores, originalmente brancas, em flores de cor magenta, sem que outras características distintivas das duas espécies fossem alteradas, independentemente da sequência original do indivíduo. Nesse estudo também observou-se o papel do AN2 na atração ao polinizador, por via de experimentos de transformação na qual o AN2 funcional, inserido em *P. axillaris*, tornaram as flores pigmentadas. Em experimentos de teste de escolha pelo polinizador, observou-se que o polinizador preferencial de *P. axillaris*, a mariposa (*Manduca sexta*), demonstrou preferência pelas flores brancas de *P. axillaris*. Já abelhas (*Bombus terrestris*) apresentaram maior preferência pelas plantas de *P. axillaris* transformadas e pigmentadas, as quais continham o AN2 funcional o que indica que a expressão do AN2 é responsável pela mudança de preferência do polinizador (Gubitz *et al.*, 2009). Comparando as espécies do gênero, no qual a maioria apresenta flores de cor púrpura, este resultado sugere que a presença de pigmento na corola de espécies como em *P. integrifolia* representaria um caráter ancestral e as flores brancas seriam um fenótipo derivado e que o gene AN2 é o responsável pela transição de cor entre as duas espécies (Hoballah *et al.*, 2007).



**Figura 9:** Representação esquemática da estrutura do R2R3, fator de transcrição do tipo MYB AN2. Esse gene é composto por três regiões exônicas, intercaladas por dois íntrons de tamanhos diferentes. Com a presença da repetição R2 e R3 entre os aminoácidos de número 13-60 e 66-111, respectivamente, em *Petunia integrifolia*. Imagem adaptada de Quatrocchio *et al.* (1999).

## 5. A emissão de aroma floral como estratégia na atração do polinizador

Os compostos orgânicos voláteis (COV), especialmente os voláteis florais, são ricamente utilizados na indústria para a elaboração de perfumes, cosméticos e essências. Porém, na natureza, esses compostos têm como função principal mediar as interações ecológicas entre

as flores e seus visitantes como, por exemplo, os polinizadores (Dudareva *et al.*, 2004; Klahre *et al.*, 2011; Muhleman *et al.*, 2014).

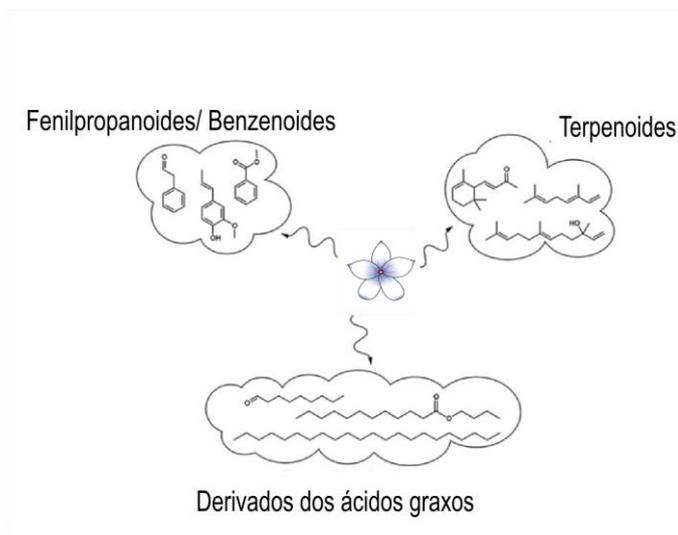
As plantas são capazes de emitir fragrância através de diversos órgãos como flores, frutos, folhas e raízes (Dudareva *et al.*, 2004; 2006). Entretanto, a emissão por via da estrutura floral é importante para maximizar seu sucesso reprodutivo (Pichersky & Gershenzon, 2002). A emissão de aroma floral atua como um sinal de linguagem olfativa para atrair o polinizador, sendo essa estratégia observada em diversas espécies (Knudsen & Gershenzon, 2006). Os COV também possuem ação de defesa, funcionando como mecanismo repelente contra herbívoros e patógenos (De Moraes *et al.*, 2001).

As flores, geralmente, emitem um conjunto de COV conhecido como buquê de essência floral. A maioria das espécies emite cerca de 20 a 60 diferentes compostos, principalmente, através das pétalas (Knudsen & Gershenzon, 2006). A quantidade e composição de compostos emitidos é bastante espécie-específica e espécies proximamente relacionadas mas que possuem diferentes polinizadores emitem diferentes odores e em diferentes quantidades, refletindo a sensibilidade olfativa e/ou a preferência do polinizador (Raguso & Pichersky, 1995). Os polinizadores como abelhas, borboletas, mariposas e morcegos são capazes de reconhecer e fazer distinção entre buquês de essência floral específicos, emitidos por uma determinada espécie, o que aumenta a especificidade e a eficiência da polinização. Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de aprendizado associativo em que os polinizadores são capazes de lembrar e associar determinada fragrância com a respectiva recompensa (néctar e/ou pólen) e, portanto, preferir determinados cheiros (Schiestl & Johnson, 2013). As plantas polinizadas por mariposas, normalmente, possuem a capacidade de emissão de compostos voláteis a longa distância, a fim de guiar o polinizador até as flores alvo, o que serve de explicação para a grande quantidade de voláteis emitidos por essas plantas em comparação com a quantidade de essência emitida pelas flores polinizadas por abelhas. Em *P. axillaris*, polinizada por mariposas da espécie *Manduca sexta*, as plantas emitem enorme quantidade de fragrância se comparadas com as flores de *P. integrifolia*, polinizadas por abelhas (Hoballah *et al.*, 2005). O mesmo se observa entre os pares de espécies como *Clarkia breweri* e *C. concina* (Raguso & Pichersky, 1995; Dudareva *et al.*, 2000) e *Silene latifolia* e *S. dioica* (Waelti *et al.*, 2008), em que a espécie polinizada por mariposas libera maiores volumes de voláteis do que a espécie polinizada por abelhas. O nível de essência emitido pelas flores varia de acordo com determinados fatores como o ritmo circadiano, o estágio de desenvolvimento floral, o estatus de polinização e condições ambientais como luz e temperatura (Dudareva *et al.*, 2004).

## 5.1 Classes dos compostos orgânicos voláteis

As plantas sintetizam e emitem uma grande variedade de compostos orgânicos voláteis de baixo peso molecular. A maioria dos COV são líquidos lipofílicos de alta pressão de vaporização que, livremente, podem transpassar as membranas biológicas das células epidérmicas das pétalas (Pichersky *et al.*, 2006).

Existem, aproximadamente, 1700 tipos de COV florais já identificados (Knudsen *et al.*, 2006), que são derivados de poucas redes bioquímicas, as quais incluem três classes principais: os terpenoides; os derivados dos ácidos graxos e os fenilpropanoides/ benzenoides (Fig. 10). Nas flores, a diversidade de compostos ocorre via modificações enzimáticas como a metilação, a acetilação e a hidroxilação dos precursores de formação de fragrância, proporcionando uma maior diversidade e volatilidade dos compostos de cheiro (Dudareva *et al.*, 2004; Muhlemann *et al.*, 2014). Os COV também são emitidos pelos tecidos vegetativos de diversas espécies e possuem importante função, como já foi citado anteriormente, porém as seções seguintes discutirão, principalmente, os COV produzidos pelas flores para atrair o polinizador.



**Figura 10:** Representação esquemática da estrutura das principais classes de compostos orgânicos voláteis emitidos pelas flores, sendo representadas pelos terpenoides, fenilpropanoides/ benzenoides e os derivados dos ácidos graxos. Imagem adaptada de Muhlemann *et al.* (2014).

Os terpenoides, também conhecidos como isoprenoides, compõem a maior classe de metabólitos secundários em plantas, possuindo muitos voláteis como representantes. São mais de 550 compostos de cheiro, os quais são sintetizados nos plastídios por precursores que contêm cinco carbonos, os mesmos utilizados para a síntese de carotenoides. O processo inicia com a

isomerização do isopentil difosfato (IPP) para dimetilalil difosfato (DMAPP). Então, uma molécula de IPP é condensada com uma molécula da enzima geranyl pirofosfatase sintase (GPPS) para formar GPP, o precursor universal de todos os monoterpenos. Para a descrição detalhada da rota de síntese dos terpenoides ver revisão em Dudareva *et al.* (2006; 2013), Vranova *et al.* (2013) e Muhlemann *et al.* (2014).

Os terpenos, especialmente, os monoterpenos como linalool, limoneno, mirceno e trans- $\beta$ -mirceno, além de alguns sesquiterpenos como farnese, nerolidol e cariofileno, são constituintes comuns da emissão de cheiro pelas flores (Dudareva & Pichersky, 2000). Estudos envolvendo os terpenoides de flores têm focado no isolamento e na caracterização da enzima terpeno sintase e nos genes responsáveis pelos passos finais da biossíntese dos terpenoides. Alguns dos produtos derivados das terpenos sintase já foram isolados e caracterizados em flores como, por exemplo, os monoterpenos linalool (*C. breweri*, *Antirrhinum majus* e *Arabidopsis thaliana*); E-( $\beta$ )-Ocimeno e mirceno (*A. majus*) (revisado por Muhlemann *et al.*, 2014). Entre os voláteis presentes em órgão vegetativos da planta, os mais extensivamente estudados são os isoprenos, cuja função está relacionada, principalmente, ao mecanismo de defesa da planta contra os danos causados por herbívoros (Sharkey & Yeh, 2001).

A segunda maior classe de COV é composta pelos fenilpropanoides e os benzenoides (Knudsen *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2010), que são derivados, exclusivamente, dos aminoácidos aromáticos fenilalaninas (PHE). Dependendo da estrutura do esqueleto carbônico, essa classe está dividida em três subclasses de acordo como o número de carbonos na cadeia: fenilpropanoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>); compostos relacionados aos fenilpropanoides (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>) e benzenoides (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>). Os fenilpropanoides e seus relativos originados das fenilalaninas constituem, aproximadamente, 24% de todos os compostos voláteis já descritos (Knudsen & Gershenzon, 2006). Exemplos de compostos voláteis produzidos por essa classe são os (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>): (iso)eugenol; metil (iso)eugenol e os compostos de cadeia dupla de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>): fenil acetaldeído e fenil etanol; já os álcoois benzil, benzaldeído, benzil benzoato, metil benzoato, benzil acetato e o metil salicílico fazem parte da cadeia composta de apenas um carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>). Diversas espécies de plantas emitem COV derivados dos benzenoides. Alguns exemplos são as flores de *Silene* (Aktar & Pichersky, 2013), *Clarkia* (Wang & Pichersky, 1998; Dudareva *et al.*, 1998), *Antirrhinum* (Murfitt *et al.*, 2000) e *Petunia* (Negre *et al.*, 2003; Hoballah *et al.*, 2005; Verdonk, 2006; Orlova *et al.*, 2006; Van Moerkercke *et al.*, 2011).

A terceira classe de COV é formada pelos derivados dos ácidos graxos (*fatty acid derivative*), os quais são derivados dos ácidos graxos insaturados (C<sub>18</sub>), que incluem o ácido

linoleno e o ácido linoleico. Uma série de reações enzimáticas leva à formação do ácido jasmônico, que é convertido no volátil éster–metil jasmonato pela enzima acil jasmônica carboxil metiltransferase. A hidroperoxidase liase possui a capacidade de converter os derivados dos ácidos graxos em aldeídos com cadeia carbônica C<sub>6</sub> e C<sub>9</sub>, que são substratos para a álcool desidrogenase e que dão origem aos álcoois voláteis, os quais são compostos comuns, presentes nos tecidos vegetativos das plantas, sendo também importantes constituintes do buquê de essência floral de espécies de plantas como *Dianthus caryophyllus* e *Antirrhinum majus* (Schade *et al.*, 2001; Suchet *et al.*, 2011). As orquídeas também produzem compostos voláteis derivados de ácidos graxos como os alquenos, que são um importante composto de emissão de fragrância na relação flor x polinizador no gênero *Ophrys* (Schlüter *et al.*, 2011). Para revisão detalhada da rota da biossíntese dos derivados dos ácidos graxos ver Dudareva *et al.* (2006, 2013).

## 5.2 Síntese dos compostos orgânicos voláteis da classe dos fenilpropanoides/ benzenoides

Os fenilpropanoides/ benzenoides constituem uma vasta classe de metabólitos secundários em plantas e muitos deles são intermediários na síntese de componentes celulares estruturais (lignina) e na formação de pigmentos (antocianinas). Existe uma certa interação na rota de biossíntese destes com a produção dos COV (Dudareva & Pichersky, 2000), previamente descritos.

Em *Petunia*, os compostos voláteis de aroma, emitidos pelas flores, fazem parte principalmente da classe dos fenilpropanoides/benzenoides (Orlova *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2009; Colquhoun *et al.*, 2010). Como o gênero *Petunia* é proximamente relacionado com *Calibrachoa* e, até o presente momento, a rota de produção de essência em espécies de *Calibrachoa* não foi reportada, existe a possibilidade de que a síntese de voláteis e algumas das enzimas e genes envolvidos na produção dos mesmos sejam semelhantes nos dois gêneros. Portanto, a rota da síntese de fenilpropanoides/benzenoides em *Petunia* será um pouco mais detalhada nesta seção (Fig. 10).

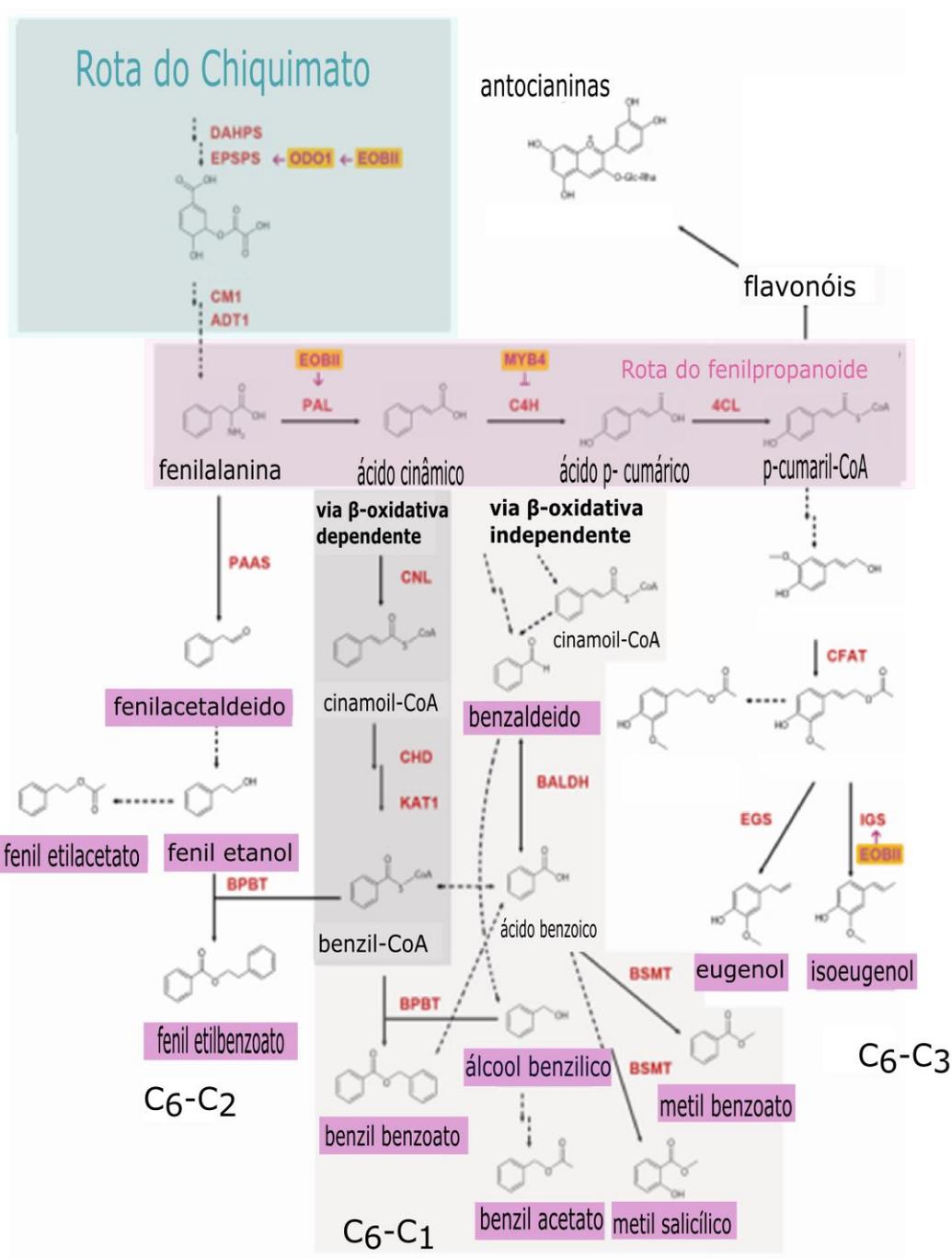
O primeiro passo da rota de síntese dos benzenos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e fenilpropanoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) inicia com a conversão de fenilalanina em ácido trans-cinâmico (CA), em uma reação catalisada pela fenilalanina-amônia-liase (PAL). Já, para o grupo dos compostos de fragrância de cadeia de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>), a enzima chave é a fenilacetaldeído sintase (PAAS) que catalisa a descarboxilação da fenilalanina no composto fenilacetaldeído, o qual pode ser subsequentemente

reduzido, oxidado ou esterificado. O fenilacetaldeído produz o composto 2-fenil etanol (Kaminaga *et al.*, 2006).

A biossíntese dos compostos voláteis florais da cadeia de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> inicia com a conversão do CA pela enzima C<sub>4</sub>H em ácido-p-cumárico que, através da ação da enzima 4CL, é convertida em p-cumaril CoA. Em seguida, por ação enzimática ainda desconhecida, forma o álcool coniferil que é acetilado pela ação da enzima aciltransferase (CFAT), produzindo coniferil acetato, que serve como substrato para a isoeugenol sintase (IGS) e a eugenol sintase (EGS), as quais catalisam a formação dos compostos de cheiro isoeugenol e eugenol, respectivamente (Clark *et al.*, 2009).

A formação dos benzenos pelo CA envolve um encurtamento do lado da cadeia propil pela C<sub>2</sub>, o qual ocorre por dois mecanismos (Fig. 11): via dependente da CoA β-oxidativa, ou via independente da CoA, tendo então benzaldeído como intermediário por via β-não-oxidativa, ou mesmo pela combinação desses dois mecanismos (Orlova *et al.*, 2006). A síntese dos voláteis florais do tipo benzoicos, presentes em grandes quantidades nas flores de *Petunia*, dá-se a partir do voláteis álcool benzílico e benzil aldeído, juntamente com o ácido benzoico (Verdonk *et al.*, 2003; Orlova *et al.*, 2006) As reações específicas que dão origem a esses grupos, pela via de ação das fenilalaninas ou mesmo por outra via da rota Chiquimato, ainda não foram elucidadas. Contudo, modificações que levam à formação dos produtos finais foram identificadas recentemente. Em *Petunia*, o gene *BSMT* codifica ácido benzoico/ácido salicílico metil transferase, os quais transferem um grupo metil da S-adenosil-L-metionina (SAM) para ácido benzoico, originando então o composto metilbenzoato (Negre *et al.*, 2003). Álcool benzílico e benzoil-CoA são combinados em éster benzilbenzoato em uma reação catalisada pela enzima álcool benzil/fenil etanol benzil transferase (BPBT). Esta enzima catalisa também a formação do éster feniletil benzoato pela ação da 2-fenil etanol e benzil-CoA (Clark *et al.*, 2009).

As espécies de plantas polinizadas por mariposas, geralmente, emitem voláteis da classe dos benzoicos e terpenoides. (Knudsen & Tollsten, 1993), enquanto que as plantas polinizadas por pássaros emitem terpenoides e derivados dos ácidos lipídicos (Knudsen *et al.*, 2004). Schiestl (2010) demonstrou que a atração ao polinizador é, frequentemente, relacionada à emissão de compostos da classe dos benzenoides.



**Figura 11:** Representação da rota de síntese dos fenilpropanoide/benzenoides que leva à produção dos compostos orgânicos voláteis de fragrância em *Petunia*. Os COV emitidos por *Petunia* estão marcados em púrpura; enzimas escritas em vermelho indicam os passos da rota já identificados; passos enzimáticos desconhecidos são identificados com setas pontilhadas; múltiplas setas indicam passos ainda desconhecidos; reguladores de transcrição são marcados em amarelo; classe de cadeia de carbono: C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Abreviaturas: (4CL) 4-cumaril CoA-ligase, (ADT) aroenate desidratase, (BALDH) benzaldeído desidrogenase, (BSMT) (S-adenosil-L-metionina) ácido benzoico / carboxil

ácido salicílico metiltransferase, (BPBT) benzil-CoA: álcool benzil /2-fenil etanol benziltransferase, (C4H) cinamato 4-hidroxilase, (CFAT) coniferil álcool aciltransferase, (CHD) cinamoil-CoA hidratase-desidrogenase, (CM) corismato mutase, (CNL) cinamato CoA-ligase, (DAHPS) 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase, (EGS) eugenol sintase, (EPSPS) 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase, (IGS) isoeugenol sintase, (KAT1) 3- cetoacil-CoA tiolase, (PAAS) fenilacetaldeído sintase, (PAL) fenilalanina amônia liase. Adaptado de Sheehan *et al.* (2012).

### 5.3 Genes envolvidos na produção e emissão de compostos orgânicos voláteis

Embora a produção dos compostos orgânicos voláteis florais seja controlada por enzimas biossintéticas, também é necessário o envolvimento dos fatores de transcrição que atuam no controle da regulação da biossíntese destes compostos (Colquhoun & Clark, 2011). Apesar do papel essencial que os fatores de transcrição desempenham na regulação da produção dos compostos orgânicos voláteis, poucos dos genes responsáveis pela síntese de fragrância foram identificados até o momento.

Dentre os fatores de transcrição já identificados que atuam na regulação da produção de fragrância estão o *ODORANT1 (ODO1)*, *EMISSION OF BENZENOIDS (EOBII)* e o *PhMYB4* (Verdonk *et al.*, 2005). Em *Petunia*, *ODO1* é positivamente regulado por *R2R3-MYB (EOBII)*, o qual ativa também o promotor do gene biossintético isoeugenol sintase (*IGS*) (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Colquhoun *et al.*, 2011b; Van Moerkercke *et al.*, 2011, 2012). O *ODO1* também é responsável por ativar o promotor do gene que codifica EPSPS (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase), uma das enzimas da via Chiquimato, o que sugere que *ODO1* está envolvido na hiperregulação da fenilalanina, como precursor da produção de voláteis (Verdonk *et al.*, 2005). Experimentos em plantas transgênicas de *Petunia hybrida* demonstraram que a regulação negativa do *ODO1* reduz em grandes proporções o nível de emissão de benzenoides (Verdonk *et al.*, 2005). O fator de transcrição *EOBII* também é responsável pela ativação dos promotores da enzima PAL (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010) (Fig. 11). Spitzer-Rimon *et al.* (2012) demonstraram que o silenciamento do *EOBII* provoca a *downregulation* do *ODO1* e que o fator de transcrição *EOBI* atua *downstream* ao *EOBII* e *upstream* ao *ODO1* e descobriram também que o silenciamento de *EOBI* leva à regulação negativa de inúmeros genes da rota do Chiquimato e que este atua *downstream* aos genes relacionados com a emissão de essência como (*PAL* e *IGS*). Em contraste com *EOB* e *ODO1*, o fator de transcrição *PhMYB4* atua como repressor da enzima C4H, controlando então o fluxo dos compostos voláteis da via dos fenilpropanoides em *Petunia* (Colquhoun *et al.*, 2011a).

## 5.4 Regulação da síntese e da emissão floral dos compostos orgânicos voláteis

Como foi dito anteriormente, a produção de compostos orgânicos voláteis desempenha papel importante nas interações ecológicas, aroma floral  $\times$  atração ao polinizador. Para atingir seu objetivo principal, as plantas regulam o tempo e espaço de síntese e emissão de fragrância a fim de maximizar a eficiência de atrair os polinizadores efetivos, garantir que sejam polinizadas e reduzir os custos energéticos (Dudareva & Pichersky, 2000; Schiestl & Ayasse 2001; Muhlemann *et al.*, 2014).

As plantas então controlam a emissão de essência de acordo com diversos fatores, tais como os mecanismos regulatórios internos, a disponibilidade de substrato, o estágio de desenvolvimento floral, além de diversos fatores externos que também influenciam como, por exemplo, a composição, a quantidade e o horário de emissão dos voláteis (Kolossova *et al.*, 2001; Colquhoun *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2010). As plantas atingem o maior nível de emissão, tanto em quantidade como em diversidade de compostos voláteis, quando as flores estão prontas para serem polinizadas, sendo reduzida a quantidade de essência liberada, ou até mesmo eliminada, quando a flor já foi polinizada ou está em fase de senescência (Negre *et al.*, 2003; Muhlemann *et al.*, 2006; Rodriguez-Saona *et al.*, 2011). Após a fertilização, diferentes mecanismos foram reportados como responsáveis pela redução da quantidade de emissão de essência. Em *Petunia*, a redução de emissão do metilbenzoato é resultado da regulação negativa da transcrição de genes cognatos ao etileno-dependente. Já em *Antirrhinum*, a diminuição de metil benzoato está relacionada à redução da enzima S-adenosill-L-metionina: ácido benzoico carboxil metil transferase (BAMT) (Negre *et al.*, 2003).

Em diversas espécies, a emissão de voláteis varia de acordo com o período específico do dia, seguindo um padrão rítmico de emissão de fragrância. Algumas espécies têm seu pico máximo de emissão durante o dia e outras, à noite (Kolossova *et al.*, 2001). Essa emissão rítmica de essência, geralmente, coincide como os hábitos de forrageio do polinizador específico, o que representa uma vantagem evolutiva para as plantas, sendo controlada pelo relógio circadiano ou pela luz (Dudareva & Pichersky, 2000; Kolossova *et al.*, 2001; Raguso *et al.*, 2003). Por exemplo, em *Petunia axillaris*, o maior pico de emissão de compostos voláteis ocorre durante o entardecer e o início da noite, período em que as mariposas são vistas em forrageio (Hoballah *et al.*, 2005). Em *P. hybrida*, três dos fatores de transcrição, *ODO1*, *EOBI* e *EOBII*, apresentam ritmo diurno na expressão de mRNA e atuam como reguladores positivos de diversos genes e enzimas na rota de síntese de compostos voláteis. Recentemente, homólogos dos genes do

relógio do ritmo circadiano em *Arabidopsis LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* foram identificados em *P. hybrida* e *Nicotiana attenuata* (Fenske *et al.*, 2015; Yon *et al.*, 2016) e, em *P. hybrida*, demonstrou-se que esse gene (*PhLHY*) atua como repressor de *ODO1* e de outras enzimas envolvidas na produção de compostos voláteis durante o dia, sendo importante para bloquear a emissão de essência durante esse período e liberar a sua emissão ao anoitecer (Fenske & Imaizumi, 2016). Já as espécies polinizadas por abelhas têm o seu pico de emissão de voláteis durante o dia, como em *Antirrhinum majus* (Dudareva *et al.*, 2000). Todavia, flores da espécie *Clarkia breweri*, embora sejam polinizadas por mariposas, não apresentam flutuação rítmica de emissão dos voláteis (Dudareva *et al.*, 2000).

Fatores ambientais como a temperatura também demonstraram influência na emissão de voláteis pelas flores. Em *Trifolium repens*, a emissão de fragrância é 58% maior a 20°C, quando comparada com os níveis de emissão de fragrância a 10°C (Jakobsen & Olsen, 1994). Entretanto, Cna'ni *et al.* (2015) demonstraram que o aumento da temperatura de 22/16°C para 28/22°C (dia/noite) promoveu um decréscimo de síntese de COV em duas variedades de *Petunia hybrida*, P720 e Blue Spark.

## 5.5 Exemplos de compostos voláteis de cheiro, polinizadores e alguns dos genes envolvidos

As plantas emitem compostos voláteis de essência que variam enormemente entre espécies e gêneros. Normalmente, o cheiro é oriundo de uma mistura de compostos que compõem o aroma, os quais variam em quantidade e qualidade e são emitidos ritmicamente, sendo regulados em tempo e espaço. Estudos demonstraram que compostos voláteis emitidos pelas flores funcionam como sinalizadores essenciais na atração de mariposas (Raguso & Willis, 2005), o que sugere que o ganho de fragrância, em determinadas espécies, pode ter sido um dos primeiros passos no recrutamento de mariposas como polinizadores. Em *Petunia axillaris*, por exemplo, os principais compostos são metilbenzoato, benzaldeído e álcool benzil emitidos durante a noite. O pico de emissão de fragrância coincide com a atividade noturna do polinizador principal de *P. axillaris*, a mariposa *Manduca sexta*. Experimentos de eletroantenograma (EAG) obtidos de fêmeas das mariposas demonstraram que os três principais voláteis emitidos por *P. axillaris* são os maiores responsáveis pela atração da mariposa polinizadora (Hoballah *et al.*, 2005).

Em relação aos genes responsáveis pela regulação da produção de essência floral, sabe-se que em *P. hybrida* o gene *ODO1* tem sido investigado como sendo o responsável pela

regulação da produção de fragrância (Verdonk *et al.*, 2005) e o fator de transcrição *EOBII*, como regulador da biossíntese dos voláteis da classe dos fenilpropanoides (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Em populações naturais de *P. axillaris*, o gene *CNL* tem sido investigado como potencial responsável pela regulação da produção de fragrância (Amhad *et al.*, submetido).

Nas espécies do gênero *Mimulus*, os principais voláteis responsáveis pelo aroma emitido pelas flores são da classe dos terpenoides. A espécie *M. lewisii* produz três diferentes tipos de voláteis florais: D-limoneno,  $\beta$ -mirceno e E- $\beta$ -ocimeno, enquanto que a espécie *M. cardinalis* produz apenas D-limoneno e em menor quantidade que *M. lewisii* (Byers *et al.*, 2014). Estudos de mapeamento de populações levaram à proposição de um modelo de dois *locus* como responsáveis pelas diferenças na produção de compostos emitidos pelas duas espécies de *Mimulus*. Um dos *locus* sendo responsável pela produção de 92% e 98% de D-limoneno e  $\beta$  – mirceno, respectivamente, e esse *locus* é provavelmente determinado devido a uma mutação do tipo sem sentido no alelo do gene estrutural *LIMONENE-MYRCENE SYNTHASE* de *M. cardinalis*. O outro *locus* explica os 98% de diferença na produção de E- $\beta$ -ocimeno e está relacionada a diferenças encontradas na sequência de aminoácidos do gene *OCIMENE SYNTHASE (OCS)* (Byers *et al.*, 2014). Experimentos controlados em que o gene *OCS* foi suprimido e o E- $\beta$ -ocimeno reduzido, resultaram na redução da visitação de polinizadores na taxa de 6% menos visitação de abelhas nas flores sem aroma ou com aroma reduzido nestas espécies.

## 6. A doce recompensa

Plantas e polinizadores mantêm uma relação de mutualismo, na qual o polinizador serve de vetor para a transferência de pólen, aumentando o sucesso reprodutivo da espécie, via fecundação cruzada, e, em contrapartida, as plantas fornecem alimento para nutrir o polinizador (Molbo *et al.*, 2003; Brandenburg *et al.*, 2009; 2012).

O néctar floral é utilizado na atração e é oferecido como recompensa ao polinizador. O mesmo é formado por uma complexa mistura de substâncias pertencentes a várias classes bioquímicas e de composição variada, podendo ser definido como uma solução aquosa, rica em açúcares e aminoácidos. Os principais tipos de açúcar presentes na sua constituição são sucrose, fructose e glucose (De La Barrera & Nobel, 2004). A maioria das angiospermas produz néctar, o qual tem a sua produção induzida pela presença do ácido jasmônico e requer um custo energético elevado para a planta (Radhika *et al.*, 2010).

Além de ser um atrativo para o polinizador, o néctar também atrai a atenção de insetos oportunistas, interessados apenas em roubá-lo, sem oferecer qualquer retribuição para a planta. Para contornar essa situação, as plantas utilizam compostos secundários que bloqueiam a ação dos insetos oportunistas devido a sua toxicidade. Ademais, o néctar é geralmente estocado em uma localização estratégica não facilmente acessível, a fim de evitar que o mesmo seja roubado inapropriadamente (Gonzalez & Heil, 2009).

O néctar floral é produzido e secretado por estruturas chamadas nectários, as quais estão localizadas, preferencialmente, na estrutura floral e possibilitam o acesso adequado ao tipo específico de polinizador. Por exemplo, as espécies polinizadas por mariposas de longa proboscídes, geralmente, possuem os nectários na base da estrutura floral (Baker & Baker, 1983; Brandenburg *et al.*, 2012). O néctar, quando não é utilizado pelo polinizador, pode ser reabsorvido pela planta, sendo utilizado no desenvolvimento dos óvulos ou na formação de novas flores (Nepi & Stpiczynska, 2008).

A composição do néctar parece estar relacionada com a preferência do polinizador específico. Por exemplo, beija-flores, borboletas e mariposas preferem o néctar rico em sucrose, enquanto que abelhas preferem maiores quantidades de hexose. Aminoácidos também parecem afetar positivamente a atratividade do polinizador, especialmente em se tratando de borboletas polinizadoras (Baker & Baker, 1983; Martinez *et al.*, 1990; Heil, 2011). O volume de néctar produzido também está associado ao tipo de polinizador. As abelhas, usualmente, se alimentam de menor quantidade de néctar quando comparado com as mariposas, por exemplo (Galliot *et al.*, 2006). Curiosamente, em orquídeas por exemplo, as plantas secretoras de néctar apresentam maior sucesso reprodutivo que aquelas que não o produzem (Neiland & Wilcock, 1998). O néctar é, portanto, um caráter seletivamente positivo para as plantas e, apesar de demandar custo energético, parece ser essencial para atrair o polinizador e favorecer o sucesso reprodutivo da planta. Um exemplo disso pode ser observado em *P. axillaris*. Esta espécie produz grande quantidade de néctar, quando comparada com a espécie proximalmente relacionada, *P. integrifolia*, polinizada por abelhas (Galliot *et al.*, 2006). Brandenburg *et al.* (2012) mostraram que a redução da quantidade de néctar em flores originadas do cruzamento de *P. axillaris* x *P. integrifolia*, com todos os caracteres semelhantes ao parental *P. axillaris*, porém com a quantidade de néctar produzido bastante reduzida, ocasionou uma diminuição do número de visitas da mariposa polinizadora.

Embora o néctar seja de grande importância para o sucesso reprodutivo de uma espécie, conforme foi demonstrado no exemplo anterior, pouco se sabe sobre os genes envolvidos na

regulação de síntese e secreção e como a interação entre a planta e o polinizador é mediada (Nicolson & Thornburg, 2007; Brandenburg *et al.*, 2009; Heil, 2011).

## **7. Ferramentas moleculares, bioquímicas e sequenciamento de transcriptoma como metodologia para desvendar processos biológicos em plantas**

Não é mais novidade o revolucionário progresso que se tem obtido em estudos moleculares na atual era genômica, através do sequenciamento de nova geração em larga escala. Desde o início do uso da reação de cadeia de polimerase (PCR), no início dos anos 50, com análises de sequência de DNA, frequentemente usada em estudos de genética de populações, filogenia, filogeografia, passando pelas análises de RNA, por meio da quantificação dos níveis de expressão de genes específicos através de qRT-PCR até a era genômica, com sequenciamento de genomas e transcriptomas completos (Pareek *et al.*, 2011; Soon *et al.*, 2013).

A prova desses grandes avanços se evidencia pelo número de trabalhos científicos publicados nos últimos anos, nos quais genomas inteiros já foram sequenciados e muitos outros estão em progresso, tanto de organismos modelo como também de espécies silvestres. O número de publicações cresce rapidamente e o custo financeiro para a realização de sequenciamento em larga escala está cada vez mais acessível (Pagani *et al.*, 2012; Soon *et al.*, 2013). Alguns exemplos de genomas já sequenciados: humano (Bernstein *et al.*, 2012); The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis* (1001genomes.org); *Drosophila melanogaster* (Consortium *et al.*, 2010); *Caenorhabditis elegans* (Gerstein *et al.*, 2010); rato (Stamatoyannopoulos *et al.*, 2012); *Heliconius* (Dasmahapatra *et al.*, 2012); *Petunia* (Bombarely *et al.*, 2016).

Todas essas técnicas têm favorecido enormemente os avanços das pesquisas de cunho molecular de biotecnologia, medicina e estudos de genética de populações e integram, especialmente, conhecimentos de outras áreas como a proteômica e a bioinformática. O uso dessas novas tecnologias moleculares é de extrema importância para que se possam entender cenários mais complexos como, por exemplo, a função de genes e as rotas metabólicas.

Estudos de genomas possibilitam a caracterização detalhada de cadeias regulatórias de genes, a caracterização de genes diferencialmente expressos em diferentes espécies, as redes regulatórias, entre inúmeras outras possibilidades. O número de dados disponíveis para serem analisados é incalculável e apresenta extrema importância na tentativa de que cenários complexos sejam entendidos em todos os tipos de organismos, de acordo com o caráter de

interesse da pesquisa. Além do avanço das técnicas, da disponibilidade de equipamentos robóticos e da grande acurácia, o desenvolvimento de diferentes kits usados para a extração de DNA e RNA também contribuem para uma maior qualidade das amostras, o que resulta em maiores chances de obtenção de resultados acurados.

As seções seguintes são referentes a algumas das principais técnicas utilizadas para a elaboração dos trabalhos da presente tese.

### **7.1 Reação de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) na determinação de expressão gênica de genes de interesse**

Para os estudos de expressão de genes, o método recorrentemente escolhido e de maior eficácia é a reação de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), a qual permite o acesso à relativa abundância de transcritos e a determinação do padrão de expressão gênica entre amostras (Van Guilder *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2015).

Reação de RT-qPCR pode ser vista como uma variante da técnica padrão de PCR. Com o uso de sequências específicas de *primers*, o número de cópias de uma sequência de DNA ou RNA pode ser determinado. Porém, em uma reação de RT-qPCR, é possível verificar a quantidade de produto obtido em cada estágio durante os ciclos da reação. Se a quantidade de transcritos for baixa, a amplificação será observada apenas nos ciclos finais da reação. A quantificação do produto amplificado é obtida através do uso de fluorescência emitida ou sonda, e é verificada e quantificada a cada ciclo termal, em tempo real, durante a reação. A capacidade de monitorar a reação durante a fase exponencial permite que seja determinada com grande precisão a quantidade inicial do gene alvo (Galchon *et al.*, 2004; Wong & Medrano, 2005).

O primeiro passo para a realização de uma reação de RT-qPCR se dá na preparação da amostra com a extração de RNA do tecido escolhido (vegetativo ou floral) e, posteriormente, faz-se a análise quantitativa e qualitativa da amostra, observando-se a concentração (ng/uL) e o valor de integridade do RNA (*RNA integrity number* – RIN, valores acima de 7 são considerados adequados) da mesma. Em seguida, realiza-se a síntese de cDNA através da utilização da enzima transcriptase reversa. Com as amostras de cDNA disponíveis, os reagentes são adicionados: fluorescência de cor (*SYBRgreen*, por exemplo) ou sondas (TaqMan®, por exemplo), conjunto de *primers* e tampão de reação. Então, as amostras são aplicadas em placa apropriada e são injetadas em termociclador de RT-qPCR (LightCycler, por exemplo). Para a garantia de acurácia dos resultados de uma reação de RT-PCR, torna-se necessária, tanto a

repetição técnica quanto a biológica das amostras analisadas, além da adição de controles para cada reação: controle positivo (amostras sem transcriptase reversa) e controle negativo (reação com todos os reagentes, mas sem a presença da amostra de cDNA). Os *primers* a serem utilizados devem ser desenhados para amplificar regiões pequenas e podem ser oligos (dT) ou de sequência específica, dependendo do objetivo do estudo (revisado em Rocha *et al.*, 2015).

Para a acurácia dos resultados de RT-qPCR, a reação precisa ser normalizada. Existem duas maneiras de normalizar uma reação de RT-qPCR: normalização para a quantidade de amostra (quantidade de DNA ou RNA), ou a mais frequentemente utilizada, normalização para genes de referência (preferencialmente mais de um gene), aqueles genes que apresentam nível de expressão relativamente constante nos diferentes tipos de tecidos, células, ou estágios de desenvolvimento. Estudos de validação de genes de referência para reações de RT-qPCR são abundantes em diversas espécies de plantas e animais (populus, Brunner *et al.*, 2004; porco, Nygard *et al.*, 2007; pêssago, Tong *et al.*, 2009; soja, Hu *et al.*, 2009; petúnia, Mallona *et al.*, 2010; amendoim, Chi *et al.*, 2012; eucalipto, Oliveira *et al.*, 2012; cenoura, Tian *et al.*, 2015; borboleta, Zhang *et al.*, 2015; sorgo, Reddy *et al.*, 2016; entre outros). Além disso, diversos programas computacionais estão disponíveis para análise dos genes que apresentam expressão mais estável e são, então, adequados para ser o gene de referência de escolha. Alguns desses são, por exemplo, o geNORM (Vandesompele *et al.*, 2002), o Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) e o NormFinder (Anderson *et al.*, 2004).

Existem diversas maneiras de analisar os resultados de uma reação de RT-qPCR. Uma delas se baseia na comparação dos resultados com a curva padrão que é, então, usada para definir a eficiência da reação, a sensibilidade e a reprodutibilidade do experimento (Gachon *et al.*, 2004), possibilitando a realização de uma quantificação absoluta. Para tanto, amostras alvo de concentração conhecida são diluídas em diversas ordens (10x, 100x, 1000x, 10000x) e amplificadas, via RT-qPCR e os dados obtidos com as diluições são usados para gerar a curva padrão, na qual, cada diluição de concentração específica é plotada contra o valor de Ct (*threshold cycle*, ou ciclo limiar). Então, as amostras que apresentarem valor de Ct desconhecido são comparadas com a curva padrão para determinar o número de cópias presentes. O Ct equivale ao ciclo em que o número de sinal fluorescente da reação cruza o limite, sendo usado para calcular o número inicial de cópias, visto que o valor de Ct é inversamente relacionado com a quantidade inicial de produto da amostra de interesse (Van Guilder *et al.*, 2008). A reação de eficiência é determinada pela percentagem de RNA alvo que é convertido em cDNA. Uma reação de 100% de eficiência significa que, a cada ciclo, a

quantidade de produto inicial foi duplicada. Para validar a eficiência de uma reação, a curva padrão deve ser analisada, juntamente com a comparação entre os genes de referência utilizados e os genes de interesse. Os tipos de dados obtidos em uma reação de RT-qPCR são referentes à quantificação absoluta, à determinação da quantidade de número de cópias do alvo, à quantificação comparativa e à *high resolution melt curve* (HRM) (Gachon *et al.*, 2004, Van Guilder *et al.*, 2008).

A quantificação comparativa é usada na maioria dos estudos de expressão gênica. Neste caso, o gene de interesse é quantificado, sob regulação positiva ou negativa, na calibração normal de uma amostra ou de um conjunto de amostras. O valor de Ct é obtido para a expressão do gene de interesse, de acordo com o teste de calibração e a diferença entre o teste e o  $\Delta\text{Ct}$ . O número de diferenças é estimado por  $2^{\Delta\text{Ct}}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Outra maneira de realizar a quantificação relativa se dá através da comparação entre o calibrador (gene alvo) e o normalizador da reação (gene de referência). Este método é conhecido como  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Para tanto, o Ct do gene de interesse no teste de amostra e no teste de calibração é ajustado em relação ao normalizador da reação. Os resultados são, então, incorporados para determinar o número de diferenças de expressão na seguinte expressão: diferença =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Portanto, a escolha do método de análise dos resultados de uma RT-qPCR depende do objetivo final do experimento, ou seja, se o interesse é a obtenção de uma quantificação absoluta ou relativa.

## 7.2 Espectrometria de Massa na identificação e quantificação de moléculas e compostos

A espectrometria de massa (*mass spectrometry*) é uma técnica usada para detectar, identificar e quantificar moléculas. É baseada na medida da relação massa/carga de íons ( $m/z$ ) da molécula. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na identificação e quantificação de peptídeos e o seu uso tem sido fundamental para o entendimento da estrutura, da função e da modificação de proteínas (Finehout & Lee, 2004). Com a espectrometria de massa acoplada (MS/MS) tem sido possível a identificação de compostos desconhecidos, através da comparação via determinação da relação  $m/z$ , além de possibilitar a quantificação de compostos conhecidos e auxiliar na elucidação estrutural de moléculas. A MS/MS apresenta uma vasta gama de aplicações como, por exemplo, estudos de ecologia, toxicologia, geologia, biotecnologia, como também na descoberta e no desenvolvimento de fármacos (Glish & Vachet, 2003).

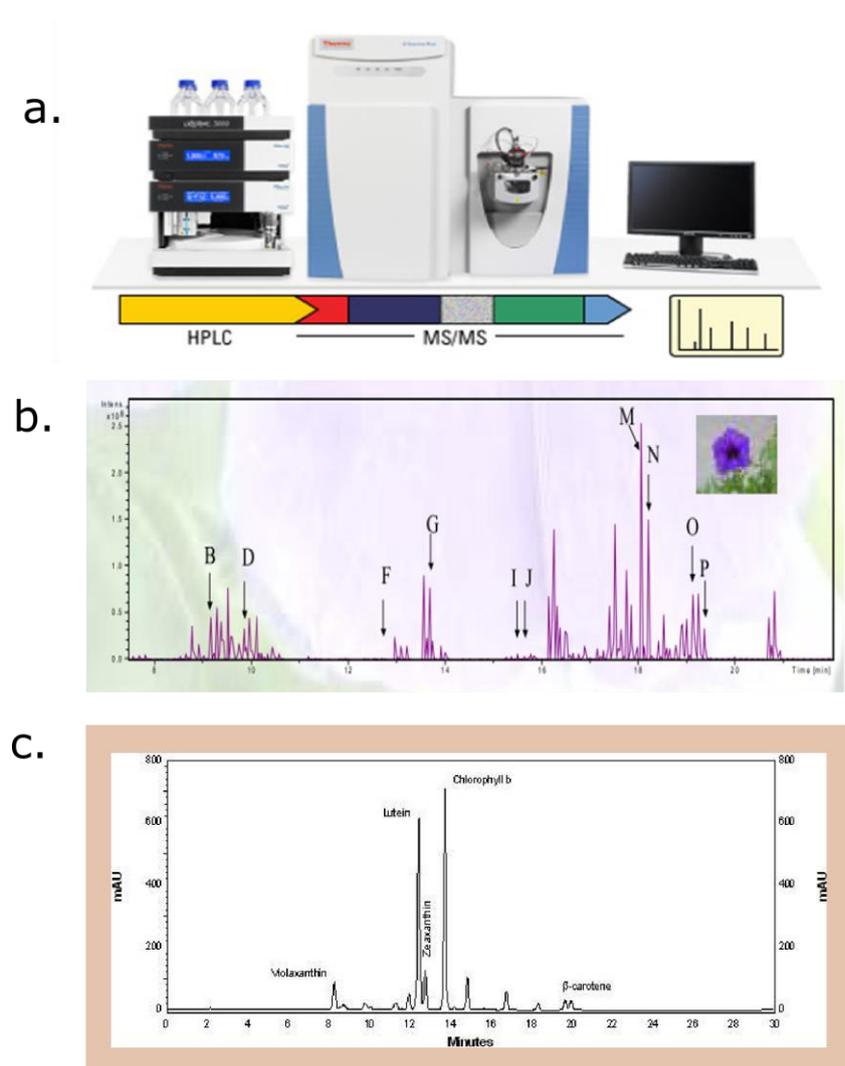
Amostras biológicas, frequentemente, são complexas e contêm moléculas que podem mascarar a detecção da molécula alvo. Para solucionar esse problema, dois métodos de separação de moléculas são comumente utilizados quando se analisam amostras complexas de líquido ou de gás. São eles a LC/MS (*Liquid chromatography/ Mass Spectrometry*; ou Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa), e a GC/MS (*Gas chromatography/ Mass Spectrometry*; ou Cromatografia de gás acoplada à Espectrometria de Massa) (Hoffmann & Stroobant, 2007).

A LC-MS é tipicamente aplicada à análise de moléculas termalmente instáveis e não voláteis (ex.: fluídos biológicos sensíveis e pigmentos), enquanto que GC-MS é utilizada na análise de compostos voláteis, como petroquímicos e compostos orgânicos voláteis florais. A técnica de HPLC (*High performance liquid chromatography* ou cromatografia líquida de alto desempenho) é a mais comumente utilizada na separação de moléculas em estudos biológicos por MS, já que a maioria das amostras biológicas são líquidas e não voláteis. As colunas usadas para experimentos de cromatografia líquida (LC) possuem, geralmente, diâmetro bem pequeno (por exemplo, 75  $\mu\text{m}$ ; nano HPLC) e baixa taxa de fluxo (ex: 200 nL/min), o que torna essa técnica ideal para uma análise rápida, sendo possível analisar múltiplos peptídeos em uma mistura complexa em poucos segundos (Mallick & Kuster, 2010).

Na técnica de HPLC, a análise dos componentes de uma mistura, mesmo em concentrações muito baixas, pode ser realizada através do emprego de detectores (por exemplo, índice de refração, ultravioleta, espalhamento de luz, fluorescência, entre outros), aliados ao uso de programas computacionais específicos. Então, as análises são baseadas no tempo de retenção que, idealmente, deveria ser único para cada componente da molécula. Porém, em amostras complexas, é possível que ocorra a presença de mais de um analítico no mesmo ponto de retenção. Para contornar esse problema, a HPLC necessita da cromatografia líquida de espectrometria de massa, que é capaz de realizar uma análise qualitativa da molécula, podendo fornecer uma identificação acurada, utilizando medidas de massa/carga e características estruturais da molécula de interesse.

Os resultados são obtidos através das análises de cromatogramas (Fig. 11), integrando valores de área, pico, tempo de retenção e comparação com os valores dos controles internos, indispensáveis para esse tipo de análise. Com esses dados, o peptídeo em estudo pode ser quantificado e, no caso de peptídeos desconhecidos, através dos valores de medida de  $m/z$ , podem ser identificados, por meio de busca em base de dados de predição de peptídeos como, por exemplo, Swiss-Prot (Bairoch *et al.*, 2004) e InterPro (Hunter *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm utilizado esse tipo de análise via LC-MS e HPLC na identificação e na quantificação de componentes como, por exemplo, na identificação de antocianinas, em diversas espécies de frutas (Wu & Prior, 2005), alcachofra (Schutz *et al.*, 2006), arroz colorido (Kim *et al.*, 2008), uva (Huang *et al.*, 2009), petúnia (Ando *et al.*, 2000; Provenzano *et al.*, 2014; Sheehan *et al.*, 2016), entre outros. Estas estratégias também foram usadas na identificação de carotenoides em tomate (Gentili *et al.*, 2015) e *Mimulus* (LaFountain *et al.*, 2015). GC-MS também tem sido bastante utilizada como metodologia para identificar compostos orgânicos voláteis em plantas, como por exemplo, em cereja (Xiao *et al.*, 2015), uva (Chalal *et al.*, 2015), hibisco (Farag *et al.*, 2015) e laranja (Pasamontes *et al.*, 2016).



**Figura 11:** a. Exemplo de equipamento utilizado para análises de HPLC e MS/MS para a identificação e a quantificação de peptídeos e da etapa final de dados gerados em forma de cromatograma. Imagem web: ThermoFischer ® b. Exemplo de cromatograma obtido através da técnica de MS/MS, com a presença de diferentes picos, correspondentes a tipos específicos de antocianinas presentes em pétalas de *Petunia hybrida* variedade blue wave. Imagem adaptada de Chapman *et al.* (2005). c. Exemplo de cromatograma

obtido através da técnica de HPLC-MS, para identificação de carotenoides, os picos correspondem aos tipos específicos de carotenoides presentes na amostra. Imagem da autora.

### 7.3 RNAseq – Uso de transcriptoma para identificação e quantificação de expressão gênica

Sequenciamento do RNA (RNAseq) é a metodologia mais utilizada, atualmente, para a obtenção de dados de transcriptoma, usando a tecnologia de sequenciamento de nova geração em larga escala. RNAseq é um método capaz de medir, acuradamente, os níveis de transcritos e suas isoformas, a diversidade (SNPs, *single nucleotide polymorphism*), além da caracterização, identificação e quantificação da expressão de determinado gene, mais do que qualquer outra metodologia utilizada anteriormente (Wang *et al.*, 2009; Todd *et al.*, 2016).

Embora seja uma técnica um tanto quanto recente, sendo os primeiros trabalhos em leveduras e células de mamíferos realizados em 2008 (Nagalakshmi *et al.*, 2008; Cloonan *et al.*, 2008), diversos organismos já tiveram seu transcriptoma obtido através dela, como por exemplo: *Mus musculus* (Mortazavi *et al.*, 2008), *Arabidopsis* (Eveland *et al.*, 2008), *Petunia* (Bombarely *et al.*, 2016) e *Brassica* (Wang *et al.*, 2016).

Para a obtenção dos dados de RNAseq, o primeiro passo consiste no isolamento do RNA das células ou tecidos alvo, seguido pela remoção de RNA ribossômico (rRNA) e pela garantia de que o RNA mensageiro (mRNA) esteja minimamente degradado, via medida de número de integridade do RNA, ou RIN (*RNA integrity number*). Uma vez que o mRNA é isolado da amostra, ele é fragmentado e reversamente transcrito em uma biblioteca de cDNA. Em experimentos de RNAseq, o uso de replicatas biológicas, no mínimo três, é essencial para aumentar o poder estatístico e a acurácia dos dados. Os fragmentos de cDNA são, então, ligados a adaptadores (compostos de nucleotídeos randômicos ligados às extremidades do cDNA), amplificados e, via sequenciamento de larga escala, irão gerar milhares de *reads*, que são pequenas sequências, em torno de 100 pb (quando obtidas na Plataforma Illumina de sequenciamento), as quais podem ser mapeadas para um genoma de referência (via metodologia conhecida como: genoma guiado) ou, em organismos que não dispõem de genoma sequenciado, através do método conhecido como *de novo assembly* (Hass *et al.*, 2013). Cada sequência (*read*) gerada pelo experimento de RNAseq é referente à medida do nível de expressão de um determinado gene. A quantidade de *reads* obtidas via RNAseq variam de 0 a milhares (Morozova *et al.*, 2009).

---

Porém, até que as *reads* possam ser acuradamente utilizadas para as análises de RNAseq, torna-se necessário um pré-processamento e um tratamento das sequências geradas (Fig. 12), o qual será brevemente discutido nesta seção. Atualmente, existem diferentes protocolos e métodos de análises de dados de RNAseq. A escolha do método depende do objetivo e do tipo de análise alvo do estudo. Para a revisão detalhada de métodos e passos para a condução de um estudo usando RNAseq ver Garg & Jain (2013), Jänes *et al.* (2015) e Conesa *et al.* (2016), entre outros.

Existem diversas metodologias para o tratamento e a análise dos dados de RNAseq, as quais demandam o uso de poderosas ferramentas computacionais (Garber *et al.*, 2011; Conesa *et al.*, 2016). Após o sequenciamento em larga escala, as sequências obtidas passam por um processamento através do qual as sequências que apresentarem baixa qualidade ou contaminação com *primers* ou adaptadores serão removidas. O uso de diferentes ferramentas de bioinformática como, por exemplo, os *softwares* FASTX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)) e Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), são bastante úteis na eliminação dessas sequências de baixa qualidade. A remoção das sequências inadequadas é um passo essencial para uma montagem acurada do transcriptoma.

O passo seguinte é a reconstrução do transcriptoma, ou seja, a montagem das sequências/alinhamentos dentro de uma unidade de transcrição para a definição dos transcriptos e isoformas presentes na amostragem. As sequências são alinhadas com o auxílio de ferramentas computacionais como, por exemplo, Bowtie/TopHat e Cufflinks (revisados em Conesa *et al.*, 2016).

Nesse ponto, existem duas metodologias a serem utilizadas. Caso o organismo em estudo tenha o genoma disponível, é possível identificar os transcriptos por meio do mapeamento das sequências de RNAseq para o genoma de referência ou o mapeamento para o transcriptoma anotado. Caso não se tenha o genoma disponível, o meio de montagem do transcriptoma e a identificação dos transcritos se dá pela montagem das sequências (*reads*) dentro de *contigs* (transcriptos) e se pode, então, realizar o mapeamento desses *contigs* contra o próprio transcriptoma, através da técnica conhecida como *de novo assembly* (Haas *et al.*, 2013). Para a realização dessa montagem de transcriptoma, existem diversos pacotes computacionais disponíveis como SOAPdenovo-Trans (Xie *et al.*, 2014), Oases (Schulz *et al.*, 2012), Trand-ABYSS (Grabherr *et al.*, 2011) e Trinity (Haas *et al.*, 2013).

A anotação dos genes, ou seja, a identificação da provável função do transcrito para transcriptomas de organismos que não possuem genoma de referência é realizada por meio de busca por sequências similares em base de dados públicas como, por exemplo, SwissProt (Bairoch *et al.*, 2004) e InterPro (Hunter *et al.*, 2011), ou busca por homólogias de proteínas de uma espécie proximamente relacionada. O uso da metodologia via ontologia gênica também pode ser útil na busca de homólogos de função. Ferramentas como Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) permitem a anotação massiva de dados de transcriptoma contra uma variedade de base de dados proporcionando a anotação funcional de 50 a 80% dos transcritos gerados por RNAseq. Os transcritos são, então, anotados e podem ser funcionalmente caracterizados (Garg & Jain, 2013).

Um passo bastante importante para a análise de dados de RNAseq, que tenham como objetivo a identificação de genes diferencialmente expressos, dá-se na anotação gênica, devido ao fato de que a identificação correta dos genes é imprescindível. Esse passo se torna ainda mais desafiador para as espécies que não possuem o genoma sequenciado. Embora existam diversas bases de dados, com um número cada vez maior de proteínas e genes sendo depositados e disponíveis para a busca por proteínas homólogas, e de muitos genes apresentarem sequência conservada entre diferentes espécies, facilitando o processo de identificação dos mesmos, a identificação correta dos genes é um ponto que demanda bastante esforço na busca por sequências similares e, para muitas sequências, ainda não existe anotação disponível.

Após a montagem do transcriptoma, é possível estimar a quantidade de genes e quantificar a expressão gênica. Essa quantificação de transcritos é baseada no número de *reads* mapeado em cada sequência do transcrito. Porém, antes da utilização das *reads* obtidas para as análises de RNAseq, elas precisam ser normalizadas, visto que o seu número pode ser afetado pelo tamanho das *reads* sequenciadas na biblioteca e por artefatos do sequenciamento.

Uma vez que os transcritos são normalizados, os valores obtidos são expressos em FPKM (*fragments per kilobase of exon model per million mapped reads*) análogos ao RPK (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) e TPM (*transcripts per millions*) e estes são os valores usados para medir os níveis de expressão gênica. Existem algoritmos que quantificam a expressão gênica obtida via mapeamento de transcriptoma, os quais incluem RSEM (Li *et al.*, 2011), eXpress (Roberts *et al.*, 2013), HTSeq (Anders *et al.*, 2014), entre outros. Esses métodos permitem o multimapamento das *reads* entre transcritos e geram, como arquivos, a normalização das sequências corrigidas para o viés de sequenciamento (Roberts *et al.*, 2013).

---

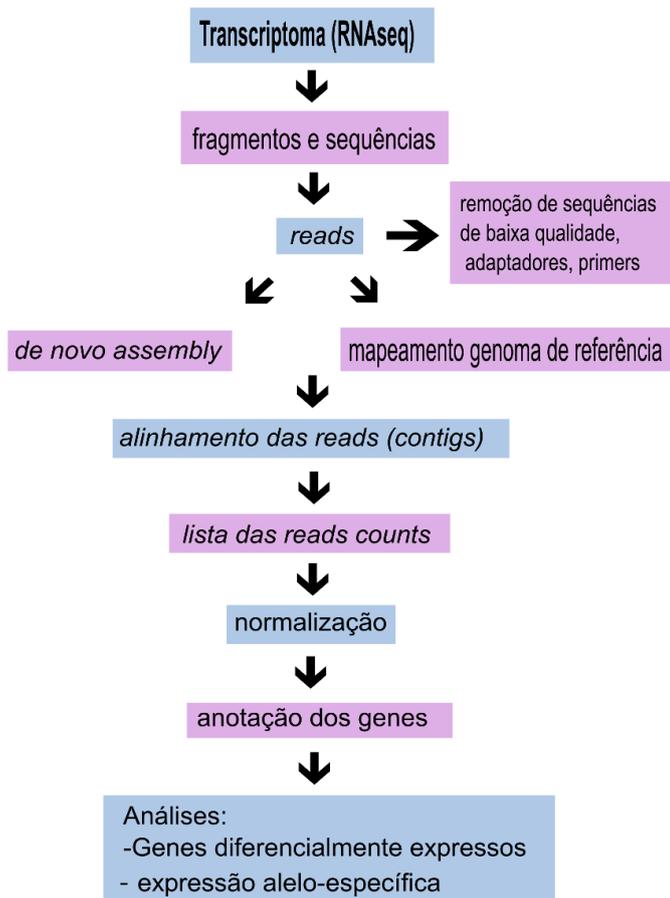
Para as análises de expressão gênica diferencial, é preciso que os valores de expressão gênica sejam comparados entre as amostras. Portanto, faz-se necessária a normalização dentro das amostras (replicatas biológicas). Esse passo é diferente da normalização do passo anterior que leva em consideração a normalização do número total de *counts*, mas não compara as amostras entre si. Para a precisa determinação da expressão gênica diferencial entre dois tipos de amostras, é fundamental que se tenha, pelo menos, três replicatas biológicas para que se possa testar se as diferenças de expressão observadas são significativamente diferentes da esperada variação biológica, sob a hipótese nula de que os transcritos não são diferencialmente expressos (Haas *et al.*, 2014). Portanto, uma normalização entre as amostras deve ser realizada. A metodologia empregada para computar a expressão gênica diferencial usa probabilidade discreta de distribuição, como Poisson, ou distribuição binomial negativa (Anders *et al.*, 2010). Métodos como edgeR (Robinson *et al.*, 2010) e DESeq (Anders *et al.*, 2010) utilizam como dados de entrada os *raw read counts* (dados brutos) e assumem a distribuição binomial negativa. Em seguida, realizam uma normalização integrada das *counts* entre as amostras a fim de proceder à análise de expressão diferencial dos genes. Ambos os métodos descritos são implementados no programa computacional estatístico R (R core team, 2013).

Outra análise bastante importante, que utiliza dados de transcriptoma, é a análise de expressão alelo-específica, a qual se baseia na quantificação da variação de expressão entre dois haplotipos de um indivíduo diploide, distinguindo-os por sítios heterozigotos. Através dessa análise, é possível detectar efeitos de regulação genética em *cis* ou *trans*, por exemplo. Dados de RNAseq são capazes de capturar a expressão alélica de um alelo presente no parental que é compartilhado na próxima geração (F1) (Castel *et al.*, 2015).

Uma vantagem do uso de RNAseq está na possibilidade da montagem do transcriptoma, sem a necessidade de se ter um genoma anotado previamente. Embora seja mais desafiador, com o auxílio de métodos computacionais, é possível a obtenção de resultados acurados, o que vem favorecendo o avanço de estudos de genômica funcional em espécies silvestres, “não-modelo”, mas que possuem extrema importância ecológica e evolutiva (Johnson *et al.*, 2012; Hass *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013; Todd *et al.*, 2016).

Especialmente em estudos com plantas, o sequenciamento de larga escala tem possibilitado o desenvolvimento acelerado de estudos aplicados a genes e interações metabólicas (Kaufmann *et al.*, 2010), identificação de genes candidatos responsáveis por diferenças em caracteres como cor, desenvolvimento (Yuan *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015; Gonzales-Plaza *et al.*, 2016), identificação de enzimas envolvidas em biossíntese de

metabólitos secundários (Desgagne-Penix *et al.*, 2010), respostas de plantas a estresses biótico e abiótico (Kulcheski *et al.*, 2011), além de fornecer uma quantidade massiva de dados para que se respondam questões relacionadas à evolução e à diversificação de plantas (Johnson *et al.*, 2012).



**Figura 12:** Visão geral dos passos necessários para a análise de transcriptoma via RNAseq. O primeiro passo, após o sequenciamento, envolve o tratamento das *reads* obtidas. Posteriormente, as sequências precisam ser mapeadas, via genoma de referência, ou via *de novo assembly*. As *reads* são então alinhadas em *contigs*, passam por um processo de normalização, seguido da anotação dos genes. Finalmente os dados de transcriptoma estão processados e prontos para serem analisados, algumas das análises mais utilizadas com dados de RNAseq são a análise de genes diferencialmente expressos e a expressão alelo-específica. Gráfico da autora.

## 8. Transição de cor – evolução e seleção

O surgimento de novos caracteres nas plantas como, por exemplo, a cor das flores, é derivado de eventos mutacionais, favorecidos e fixados por seleção natural. Um dos principais objetivos da genética evolutiva consiste em entender e prever se certos tipos de mutação são preferencialmente envolvidos em mudanças evolutivas e qual a origem das mutações genéticas

que contribuem para mudanças fenotípicas (Wessinger & Rauscher, 2012). Um dos grandes questionamentos está na busca por entender se mudanças fenotípicas ocorrem, primariamente, através de mudanças regulatórias ou de mudanças nas sequências codificadoras que afetam a função da proteína (Stern & Orgogozo, 2008; Martin & Orgogozo, 2013).

Stern & Orgogozo (2008), baseados em diversos estudos comparativos, sugeriram que a evolução de caracteres morfológicos ocorre, primariamente, via mudanças regulatórias e que a evolução de caracteres fisiológicos se dá, com maior frequência, via mutação na região codificadora da sequência. A explicação para essa diferença se dá pelo fato de que as características morfológicas e fisiológicas diferem categoricamente no posicionamento dentro da rota de desenvolvimento, na qual os caracteres morfológicos são especificados por genes que atuam *upstream* na via de desenvolvimento. Então, mudanças regulatórias de efeitos sutis na ação do gene são restritas a tecidos específicos e são favorecidas devido ao mínimo efeito causado na sequência regulatória, enquanto que os caracteres fisiológicos são especificados por genes próximos dos passos finais da rota de desenvolvimento. Portanto, as mutações funcionais, que ocorrem com maior frequência que as mutações regulatórias, têm um alcance reduzido de ação e maiores chances de serem toleradas. Entretanto, segundo Hoekstra & Coyne (2007), a definição de características morfológicas e fisiológicas parece ser um tanto superficial, sendo necessários dados imparciais para que se possa entender quando é possível prever que mutações regulatórias ou funcionais, predominantemente, contribuem para que ocorram mudanças evolutivas em determinado caráter.

A diferença na cor de flores tem sido vista como sendo adaptativa (Hopkins & Rauscher, 2012; Wessinger & Rauscher, 2012), devido ao fato de que mudanças evolutivas de uma síndrome de polinização para outra, frequentemente, envolvem transição na cor da flor. Uma das evidências se dá na evolução convergente de síndrome de polinização, observada em diversas espécies de diferentes gêneros (Fenster *et al.*, 2004).

Para qualquer característica, dois fatores são capazes de influenciar na contribuição relativa de mutações funcionais e regulatórias em evolução adaptativa: a taxa de ocorrência de diferentes mutações e o valor adaptativo (*fitness*) que essa mudança produz. As taxas de fixação para mutações regulatórias ou funcionais são dependentes do alvo (tipo de gene e função) e da relevância (contribuição) no sentido evolutivo da mutação, o qual irá se refletir no número de genes envolvidos e no número de sítios nucleotídicos por gene que, se mutado, produzirá um determinado fenótipo e também está correlacionado se o novo fenótipo envolve ganho ou perda de função (Wessinger & Rauscher, 2012).

Os fenótipos originados por mutação de perda de função são mais fáceis de ocorrer do que aqueles originados por mutação de ganho de função, devido ao fato de que existem maiores chances de que, em uma sequência codificadora, sítios nucleotídicos, caso sejam mutados, eliminem a função do gene, do que ocasionem a origem de uma nova função. Qualquer efeito pleiotrópico deletério no *fitness* irá influenciar negativamente a contribuição relativa de uma mutação para adaptação (Wessinger & Rauscher, 2012). Então, uma nova mutação que produza um fenótipo “vantajoso” e que aumente o *fitness* será mais facilmente fixada.

Entender as origens das mutações e adaptações em diversos caracteres parece ser bem desafiador, devido ao fato de que, para entender qual a contribuição das mutações regulatórias ou funcionais para um novo caráter, é necessário que se tenha dados de estudos genéticos de mudanças envolvidas em múltiplas ocorrências evolutivas de caracteres individuais. Porém, para o caráter transição de cor, esse estudo se torna mais fácil, visto que diversos exemplos de divergência em cor entre espécies proximamente relacionadas já foram observados em diferentes gêneros e famílias de plantas. Além de que, a via de formação e a estrutura do principal pigmento floral (antocianina) já foram extensivamente caracterizadas geneticamente e apresentam estrutura bastante conservada entre as angiospermas, devido ao fato de que a rota de síntese de antocianinas consiste em, relativamente, poucas enzimas codificadoras de genes e genes regulatórios. A metodologia de busca por genes candidatos, no intuito de desvendar as bases genéticas para a divergência de cor em espécies proximamente relacionadas, tem sido bem sucedida (Wessinger & Rauscher, 2012).

Considera-se que o caráter ancestral da cor das flores é serem pigmentadas (azul/magenta) e como novos fenótipos adquiridos, via mutação, flores brancas e vermelhas foram derivadas. A transição de cor mais comum entre as angiospermas é observada, via perda de pigmentação, na ausência de antocianinas, o que origina flores de cores branca ou amarelada. Aliado à transição de cor do caráter ancestral para o derivado, frequentemente, observa-se uma mudança do tipo de polinizador. No caso de flores azul/magenta para branca, o polinizador tende a mudar de abelhas para mariposas ou morcegos. Teoricamente, a mudança de flores pigmentadas para flores brancas pode envolver qualquer mutação que bloqueie um ou mais passos da rota de formação das antocianinas, as quais incluem: 1- mutação de perda de função em qualquer parte da rota de síntese do pigmento; 2- mutações *cis*-regulatórias que reduzam ou eliminem a função de qualquer enzima envolvida na rota de síntese das antocianinas; 3- mutação de perda de função em qualquer um dos três domínios proteicos (MYB-R2R3, bHLH e WR) que regulam a expressão de enzimas codificadoras; 4- mutações *cis*-regulatórias que

---

eliminam a função de qualquer um dos reguladores proteicos (MYB-R2R3, bHLH e WDR) (Wessinger & Rauscher, 2012).

A caracterização de mutação espontânea em flores brancas já foi identificada em diversas espécies como, por exemplo, em *Petunia*, *Anthirrhinum* e *Ipomea*. Nessas espécies, observou-se que a frequência de ocorrência de mutações funcionais e regulatórias é aproximadamente equivalente. Porém, em populações naturais, nas quais se observou a fixação evolutiva para o caráter de flores brancas, todas envolvem a inativação de fatores de transcrição da rota de síntese das antocianinas (Streisfeld & Rauscher, 2010). Isso indica que mutações que afetam proteínas regulatórias (fatores de transcrição) são, preferencialmente, fixadas nos casos de adaptação por perda de pigmentação. Na maioria dos casos observados as mutações fixadas por seleção natural inativaram o fator de transcrição floral MYB-R2R3. Esse padrão pode ser explicado devido à diferença de ação desses genes e à magnitude de efeito dos mesmos. As enzimas e proteínas regulatórias presentes na rota de síntese das antocianinas também estão envolvidas na produção de flavonoides, que exercem importantes funções nos tecidos vegetativos da planta (bHLH, WDR). Portanto, uma mutação que inative proteínas que também atuem em outras funções dificilmente será fixada, pois elas possuem grande efeito pleiotrópico deletério no *fitness* da planta. Por exemplo, mutações em genes *ANS* em *Phlox drumondii* e *CHS* em *Ipomea purpurea* reduziram substancialmente a fecundidade e a sobrevivência dessas espécies. Já as mutações que inativem, por exemplo, proteínas do tipo MYB-R2R3, que atuam como reguladoras, irão eliminar apenas a produção de antocianinas em um tecido específico, não afetando outros tecidos e funções da planta, sendo, portanto, mais fáceis de serem fixadas por seleção, visto que não ocasionariam grandes efeitos negativos para a planta. Por exemplo, em *I. purpurea*, ocorrendo uma mutação na proteína do tipo MYB-R2R3, nenhum efeito pleiotrópico deletério foi observado (Rauscher & Fry, 2003).

No caso da transição de cor de flores, de azul/magenta para vermelha, a qual também envolve, frequentemente, a mudança de polinizador de abelhas para beija-flores, é acompanhada de adaptações florais que favorecem a polinização por pássaros (Rauscher, 2008). A mudança de cor de flores de azul/magenta para vermelho, geralmente, envolve mudança na classe de antocianinas produzidas. A maioria dessas mutações, que originam a nova cor da flor, parece ocorrer via mutação de função em sequências codificadoras responsáveis por originar tipos específicos de antocianinas como, por exemplo, em *F3'5'H*. Mutações em *F3'5'H* impedem a formação de antocianinas do tipo delphinidinas e mudam o fluxo para a produção predominante de antocianinas vermelhas. Porém, nos casos em que o caráter ancestral da cor

---

da flor é devido à produção de cianidinas, a transição para a cor vermelha ocorre através de *downregulation* do gene *F3'H*, que ocasiona uma mudança de produção de antocianinas para pelargonidina, via mutação *cis*-regulatória (Des Marais & Rauscher, 2010). Porém, a inativação de *F3'H* acarreta um custo muito elevado para a planta, visto que esse gene é responsável pela produção de flavonoides em outros tecidos da mesma.

Em suma, a adaptação para diferentes cores de flores pode envolver tanto mutações regulatórias quanto funcionais, dependendo do tipo de mudança de cor e da posição que o gene ou a proteína ocupa na rota de síntese. A transição de cor que origina flores brancas e amarelas envolve mudanças regulatórias mediadas, principalmente, nos fatores de transcrição do tipo MYB-R2R3, enquanto que mutações de azul/magenta para vermelho envolvem tanto mutações funcionais como mutação *cis*-regulatória, dependendo do modo como a cor do caráter ancestral foi adquirida.

Diante desse cenário, um dos principais objetivos deste trabalho foi buscar a identificação dos genes responsáveis pela diferença de cor das flores em duas espécies proximamente relacionadas do gênero *Calibrachoa*, visto que o mesmo possui duas espécies com síndromes florais contrastantes e que são proximamente relacionadas na filogenia: *C. parviflora* e *C. pygmaea*. Estas espécies podem servir como bons modelos para esse tipo de estudo, bem como comparar caracteres florais e síndromes de polinização com o gênero proximamente relacionado *Petunia*.

---

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Identificar genes candidatos responsáveis pela diferença na cor das flores em espécies proximamente relacionadas no gênero *Calibrachoa*, especificamente nas espécies de *C. pygmaea* (flores brancas) e *C. parviflora* (flores magentas), bem como caracterizar o tipo de mutação envolvido no processo de transição de cor entre essas espécies, via análise de híbridos além de buscar entender como o padrão de diferença de pigmentação evoluiu nessas duas espécies que apresentam distintas síndromes de polinização.

### Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar o papel do gene *AN2* em espécies de *Calibrachoa* e *Petunia*
- Relacionar as características florais com a síndrome de polinização em *Calibrachoa parviflora* e *C. pygmaea*, comparadas com espécies do gênero proximamente relacionado *Petunia*
- Identificar as classes dos pigmentos envolvidos na produção da cor das flores em *Calibrachoa parviflora* e *C. pygmaea*.
- Identificar e caracterizar os compostos orgânicos voláteis de fragrância emitidos pelas flores de *C. pygmaea*, os quais desempenham papel importante na atração do polinizador
- Obter dados de transcriptoma para espécies naturais de *Calibrachoa* (*C. pygmaea* e *C. parviflora*) e do híbrido originado de cruzamento artificial entre estas duas espécies (Calibrachoa F1).

## CAPÍTULO IV

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho de tese aqui apresentado teve como um dos resultados principais a identificação e a análise dos genes envolvidos com a diferença de pigmentação da cor da flor em duas espécies proximamente relacionadas do gênero *Calibrachoa*, especificamente, duas espécies silvestres: *C. parviflora* e *C. pygmaea*. A identificação e quantificação de níveis de expressão diferencial de genes envolvidos com a produção de cor da flor entre as duas espécies contribuiu para estabelecer as primeiras relações entre estes genes e processos de diversificação, no gênero *Calibrachoa*. Devido ao fato de que observam-se vários casos em que a diferença da cor da flor, frequentemente, se relaciona com a transição dos polinizadores, o que leva a um isolamento reprodutivo e, em última instância, à especiação. Portanto a primeira identificação destes genes que apresentam diferentes padrões de expressão nas duas espécies nos permitirá em um futuro próximo sugerir estes genes como genes envolvidos em processos de diversificação em *Calibrachoa*. Estas duas espécies de *Calibrachoa* são proximamente relacionadas filogeneticamente e apresentam síndrome floral contrastante em que *C. parviflora* possui flores de cor rosa, com características adaptadas para serem polinizadas por abelhas e *C. pygmaea* apresenta flores brancas, adaptadas para serem polinizadas por mariposas.

Até o presente momento, de acordo com nosso conhecimento, nenhum outro trabalho havia investigado e caracterizado os genes envolvidos na diferença de cor das pétalas nessas duas espécies do gênero; bem como nenhum outro trabalho tinha identificado e reportado os tipos e classes de pigmentos responsáveis pela pigmentação das flores destas espécies. Além do que, nada se sabia sobre a identificação e caracterização dos compostos responsáveis pela emissão de fragrância floral em *C. pygmaea*. Este foi o primeiro trabalho que identificou e caracterizou, detalhadamente, esses aspectos em espécies nativas do gênero *Calibrachoa*.

Um trabalho, bastante interessante, que realizou a classificação e a taxonomia do gênero *Calibrachoa* e que foi a base deste trabalho foi desenvolvido por Fregonezi *et al.* (2012). Nesse estudo, *C. pygmaea* e *C. parviflora* foram classificadas em um subgrupo isolado no gênero *Calibrachoa*, devido às características peculiares presentes e restritas a estas espécies, que as diferenciam das demais espécies do gênero. O referido achado nos instigou a realizar uma

análise mais profunda dessas duas espécies e serviu como um ponto de partida para o início deste trabalho de tese. Ademais, adiciona-se o fato de que o gênero *Calibrachoa* encontra-se proximamente relacionado ao gênero *Petunia*, do qual se tem uma grande quantidade de informação sobre genes relacionados à atração de polinizadores e uma extensa bibliografia sobre os aspectos moleculares e evolutivos (Vandenbussche *et al.*, 2016) principalmente desenvolvidos com a espécie comercial, mundialmente conhecida, petúnias-de-jardim, devido a sua importância no mercado de plantas ornamentais, e com uma grande quantidade de trabalhos conduzidos também com as espécies nativas de *Petunia* nestes tópicos (Quattrocchio *et al.*, 1998; 1999; 2006; Ando *et al.*, 2000; 2005; Hoballah *et al.*, 2005, 2007; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; 2010; Turchetto *et al.*, 2014; Reck-Kortman *et al.*, 2014; Sheehan *et al.*, 2016; entre muitos outros). No passado, as espécies de *Calibrachoa* e *Petunia* eram agrupadas em um único gênero devido à grande quantidade de caracteres que elas compartilham, tanto do ponto de vista ecológico como evolutivo e muitos dos processos observados em *Petunia* também ocorrem em *Calibrachoa* (Fregonezi *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2015).

Em relação ao aspecto molecular, as rotas metabólicas e os genes responsáveis por determinadas características, principalmente relacionadas às estruturas florais, têm sido analisados e descritos em *Petunia*, como por exemplo, a caracterização do gene *AN2*, responsável pela diferença de cor das flores entre as espécies *P. integrifolia* e *P. axillaris* (Quattrocchio *et al.*, 1999; Hoballah *et al.*, 2007) e a identificação dos pigmentos (antocianinas) responsáveis pela cor das flores (Ando *et al.*, 1999; Spelt *et al.*, 2000), como também a identificação dos compostos responsáveis pela emissão de essência floral (Oyama-Okubo *et al.*, 2005; Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Coulquhon *et al.*, 2010). Esses estudos serviram de base para os estudos realizados aqui em *Calibrachoa*, visto que no gênero *Calibrachoa*, nenhum estudo tinha sido realizado nestes aspectos anteriormente.

Um importante resultado obtido neste trabalho de tese foi a caracterização do gene *AN2* em *Calibrachoa*. Nossa primeira hipótese sugeria a evolução paralela da função desse gene em *C. parviflora* e *C. pygmaea* comparados com o que se observa entre *Petunia integrifolia* e *P. axillaris*, em que a espécie de cor de flores brancas (*P. axillaris*) possui o gene *AN2* não-funcional, devido a mutações sem sentido que resultam em *stop codon* prematuro na região codificadora deste gene. Considerando a hipótese de evolução paralela esperaríamos encontrar esse gene sendo inativo em *C. pygmaea* e funcional em *C. parviflora*. Porém, nossos resultados não confirmam esta hipótese. Nossos dados mostraram que, em *Calibrachoa*, o gene *AN2*

encontra-se ativo e presumivelmente funcional, independentemente da cor das flores das espécies analisadas e, embora esse gene seja importante e necessário para a síntese de pigmentos (antocianinas), ele não é o responsável pela diferença de cor das pétalas entre as espécies de *Calibrachoa* (Capítulo II).

A análise do gene *AN2* e os resultados obtidos nos levaram a uma investigação mais detalhada na busca da identificação de genes que contribuem para a diferença observada na cor das flores entre as duas espécies, via análise de transcriptoma (RNAseq) gerada para ambas as espécies de *Calibrachoa*.

O transcriptoma de cada uma das espécies foi obtido usando As *reads* foram montadas em transcriptoma utilizando, o genoma de *Petunia axillaris* v6.2 (Bombarely *et al.*, 2016) como referência, posteriormente as *reads* foram re-mapeadas e foi obtido uma cobertura de 82 - 85 % das *reads* mapeadas para o transcriptoma de *C. parviflora* e *C. pygmaea*, respectivamente. O uso dessa metodologia (mapeamento via genoma guiado) nos proporcionou melhores resultados do que pelo método *de novo assembly* (Metodologia descrita mais detalhadamente no Capítulo I dessa tese, seção 7). A anotação funcional dos genes foi realizada e todos os genes conhecidos como envolvidos na produção de flavonóis e pigmentos antocianinas foram analisados (Capítulo II). Bem como uma primeira análise de como se apresenta os níveis de expressão dos genes iniciais da rota de biossíntese de carotenoides e os genes responsáveis pela emissão de essência floral em *Calibrachoa parviflora* e *C. pygmaea* (Apêndice A1, A3).

Um dos objetivos deste estudo foi analisar o caráter cor das flores e um dos questionamentos deste trabalho refere-se ao que faz com que as cores das flores dessas duas espécies sejam diferentes. A análise dos genes da rota da síntese de flavonoides e antocianinas nos mostrou que os genes responsáveis pela produção de flavonóis são expressos em maior quantidade em *C. pygmaea*. Já os genes responsáveis pela produção das coloridas antocianinas mostraram maiores níveis de expressão em *C. parviflora* e, embora a cor das flores destas espécies seja bastante contrastante, a expressão dos genes estruturais iniciais da rota de biossíntese das antocianinas (genes gerais – rota dos fenilpropanoides), não apresenta grandes diferenças. Isso ocorre, provavelmente, devido ao fato de que esses genes podem também atuar na produção de pigmentos em outros tecidos vegetativos, bem como na coloração das sementes da planta (Blied *et al.*, 2016), aliado ao fato de que, embora em menor quantidade, *C. pygmaea* também sintetiza antocianinas.

Os resultados observados estão de acordo com o fenótipo de cada espécie. Em *C. parviflora* observou-se maior quantidade de antocianinas e, portanto, flores mais pigmentadas. Já *C. pygmaea* produziu maiores quantidades de flavonóis e, devido à competição pelo mesmo substrato para a formação dos dois produtos, flavonóis e antocianinas, espécies que produzem maior quantidade de flavonóis tendem a produzir menos antocianinas e, por esse motivo, apresentam-se muito menos pigmentadas. O que também contribui para a diferença na pigmentação floral entre as duas espécies está na baixa expressão e *downregulation* dos genes biossintéticos, principalmente os genes localizados nos passos finais da rota de síntese de antocianinas em *C. pygmaea* como detalhado no Capítulo II dessa tese. Sabe-se que casos em que as diferenças em pigmentação via produção de antocianinas são causadas por alteração no nível de expressão desses genes e também envolvem mudanças na quantidade de transcriptos (Koes *et al.*, 2005; Quattrocchio *et al.*, 2006). Esse panorama foi observado em nossas análises de expressão diferencial dos genes, em que todos os genes que levam à produção de antocianinas são encontrados em baixa expressão em *C. pygmaea* comparados com *C. parviflora*, o que então reduz a pigmentação das flores em *C. pygmaea*.

Os experimentos de quantificação de antocianinas e flavonóis presentes nessas espécies corroboraram os resultados dos níveis de expressão dos genes responsáveis pela síntese de cada um desses produtos. Foi observada uma maior quantidade de antocianinas em *C. parviflora* composta por uma mistura de malvidina e petunidina, o que contribui para o tom de cor rosa observado nas flores desta espécie, além de mostrar que, de fato, esta espécie possui os genes responsáveis pela metilação 3'5'AMT. Enquanto que os resultados de *C. pygmaea* mostraram baixa síntese de antocianinas, consistindo quase que exclusivamente de petunidina, o que sugere falha dos genes responsáveis pela metilação 3'5'AMT (*MF* genes) nesta espécie. Em relação à produção de flavonóis, *C. pygmaea* sintetiza enormes quantidades quando comparada com *C. parviflora* e em ambas as espécies observa-se a produção de flavonóis kaempferol e quercetina.

As maiores diferenças encontradas entre os genes analisados envolvidos na síntese de antocianinas, quando as duas espécies são comparadas, além da quantidade de produto produzida, está no gene responsável pelo transporte das antocianinas para o vacúolo, onde as antocianinas são estocadas, o gene *AN9*. Em *C. pygmaea*, esse gene encontra-se *downregulated* e com níveis de expressão baixos (5x menores níveis de expressão quando comparado com *C. parviflora*), sugerindo que pode haver um defeito nesse gene (transportador), o que contribui

efetivamente para uma menor pigmentação na espécie, como observado em mutantes *an9* de *Petunia* (Alfenito *et al.*, 1998). Outra grande diferença observada foi em relação aos genes responsáveis pela acidificação do vacúolo (genes do *PH*: *PH1*, *PH4*, *PH5*), os quais mostraram estarem *downregulated* e também apresentaram baixos níveis de expressão em *C. pygmaea*, por exemplo o gene *PH5* apresentou as maiores diferenças nos níveis de expressão, 19x menores níveis de expressão comparados a *C. parviflora*. Estudos anteriores em *Petunia* demonstraram que esses genes estão diretamente relacionados com a cor das flores e que baixa expressão ou mutações nestes genes acarretam em flores de fenótipos com uma baixa pigmentação (Verweij *et al.*, 2008; Faraco *et al.*, 2014). Diante dessas observações, nós podemos então sugerir que os genes *AN9* e *PH* (especialmente *PH5*) são prováveis candidatos responsáveis pela diferença em pigmentação encontrada entre as espécies de *C. parviflora* e *C. pygmaea*.

Medidas de pH nessas espécies corroboraram nossa sugestão de genes do *PH* como responsáveis pela cor das flores, como já foi reportado em estudos anteriores (Verweij *et al.*, 2008; Faraco *et al.*, 2014) e discutido no capítulo II desta tese. Entretanto, para a comprovação final do papel desses genes na cor das flores de *C. pygmaea*, serão necessários trabalhos futuros que realizem experimentos de transformação e testes de complementariedade. Experimentos com os genes responsáveis pela perda de pigmentação em *C. pygmaea*, via mutação e *knock out* em *C. parviflora*, e experimentos de edição de genes usando, por exemplo, RNAi ou CRISPR/Cas9 como estratégias metodológicas, bem como super-expressão dos genes candidatos em *C. pygmaea* e observação do fenótipo obtido, comprovariam o papel desses genes na cor das pétalas das espécies. A obtenção de uma geração de plantas F2 também seria importante para a observação do fenótipo e do comportamento dos genes relacionados à cor nessa geração. Finalmente, quando for possível comprovar quantos e quais são os genes responsáveis pela diferença de cor, esses genes poderão, então, ser sugeridos como genes responsáveis pela diversificação entre as espécies de *C. parviflora* e *C. pygmaea* dirigida por adaptação a diferentes polinizadores.

No Capítulo I desta tese, um dos pontos citados aborda o fato de que fatores de transcrição do tipo MYB-R2R3, especificamente do subgrupo 6, serem frequentemente envolvidos em processos de transição de cor (pigmentadas - não pigmentadas) entre espécies proximamente relacionadas, principalmente via mutações na região codificadora ou cis-regulatória nesses fatores de transcrição (Rauscher, 2008; Wessinger & Rauscher, 2012; Streisfeld & Sobel, 2013), devido ao fato de que mutações de perda de função nessa região

seriam mais restritas a determinados órgãos e não acarretariam grandes efeitos pleiotrópicos para a planta. Considerando que, em *Calibrachoa*, o caráter ancestral seria flores pigmentadas e o caráter derivado seria flores não pigmentadas (Fregonezi *et al.*, 2012), uma das hipóteses seria encontrar um dos fatores de transcrição mutados em *C. pygmaea*, como por exemplo um dos genes *AN2*, *AN4*, *DPL/MYBB* ou *PHZ*. Porém, os nossos resultados não apontaram mutações nestes específicos fatores de transcrição do tipo MYB-R2R3.

A análise de expressão alélica específica no híbrido artificial *Calibrachoa* F1, dos genes que apresentaram maiores diferenças nos níveis de expressão *AN9* e *PH5*, mostraram que elementos do tipo *trans* são mais prováveis de estarem atuando na regulação da expressão desses genes. Devido ao fato de que na geração F1 a expressão desses dois genes apresentou níveis quase que equivalentes de contribuição alélica dos parentais, o que demonstra que o promotor desses genes encontra-se ativo, porém um fator de transcrição no parental, neste caso *C. pygmaea*, encontra-se inativo ou defeutivo. O que contribui para a baixa expressão desses genes nesta espécie.

Casos em que elementos do tipo *cis* são observados, o nível de expressão de um gene no híbrido apresenta níveis semelhantes ao observado no mesmo gene entre os parentais, com a contribuição alélica de um dos parentais sendo muito mais efetiva. Esse padrão não foi observado nesses entre *C. pygmaea* e *C. parviflora* (Capítulo III). Esses resultados sugerem que mutações em fatores de transcrição ainda não identificado contribuem para a diferença de expressão desses dois genes, e por conseguinte contribuem para a diferença de cor das flores observada entre as duas espécies de *Calibrachoa*.

Diferenças de expressão genica regulada por fatores atuando em *trans* foram observados em *Mimulus aurantiacus*. Streisfeld & Rauscher (2009) observaram que flores de diferentes populações da mesma espécie apresentam diferenças de cor devido à *downregulation* dos genes estruturais da rota de síntese de antocianinas, *F3H*, *DFR* e *ANS*. Posteriormente, Streisfeld *et al.* (2013) identificaram um fator de transcrição do tipo MYB-R2R3, regulador dos genes estruturais, como sendo um importante fator determinante para a diferença de pigmentação floral em populações desta espécie

Outros exemplos encontrados na literatura mostram mutações em genes estruturais associados à mudança de cor e à produção de diferentes pigmentos entre espécies. Como exemplo, em *Ipomea purpurea*, mutação no gene *CHS* é responsável pela cor das flores nesta

espécie (Coberly & Rauscher, 2003; Fehr & Rauscher, 2004). Já em *Iochroma*, mutações nos genes *DFR* e *CYP75* foram observadas como responsáveis pela diferença de antocianinas produzidas entre *I. gesnerioides* e *I. cyaneum* (Smith *et al.*, 2008; Smith & Rauscher, 2011).

Embora ainda não identificado, nossos resultados indicam ainda o envolvimento de fatores de transcrição regulando a expressão dos genes aqui analisados e influenciando na diferença de cor das flores nestas duas espécies de *Calibrachoa*.

Aliado aos resultados de expressão diferenciada dos genes, as análises de identificação e quantificação dos tipos de pigmentos sintetizados pelas espécies também contribuíram para um melhor entendimento de como se dá a pigmentação nessas espécies de *Calibrachoa*. Um fato novo, descoberto nesse estudo, foi a identificação da produção de pigmentos florais do tipo carotenoides em espécies nativas de *Calibrachoa*, principalmente dos tipos  $\beta$ -caroteno e luteína (Capítulo II). Esse tipo de pigmento não é produzido nas flores das espécies de *Petunia*. Embora a quantidade de carotenoides sintetizado em *C. parviflora* não seja tão expressiva, em *C. pygmaea* a presença de carotenoides foi um pouco mais evidenciada e também apresenta uma contribuição para a cor das pétalas desta espécie. Entretanto, comparando os níveis de síntese de ambos os pigmentos, os níveis de antocianinas e flavonóis foram muito mais altos do que os níveis de carotenoides. Futuros estudos de análises de carotenoides em outras espécies do gênero *Calibrachoa* seriam bastante interessantes, especialmente na espécie do gênero que apresenta cor de flores laranja/avermelhadas, *C. sendtneriana*, nesta espécie, conforme observado neste trabalho de tese, já sabemos que produz tanto antocianinas quanto carotenoides, provavelmente originando flores de tom alaranjado, a caracterização dos genes envolvidos na pigmentação floral, desta espécie seria bastante interessante, aliado ao fato de que esta espécie é polinizada por pássaros, seria mais um exemplo de relação cor da flor *versus* polinizador (Schemske & Bradshaw, 1999; Ng & Smith, 2016). Neste trabalho de tese, nós observamos que a composição de carotenoides entre as espécies *Calibrachoa pygmaea* e *C. parviflora* se diferenciam, *C. parviflora* possui maior quantidade de carotenoide do tipo luteína, enquanto que *C. pygmaea* possui maior quantidade de carotenoide do tipo  $\beta$ -caroteno. Essa diferença na composição de carotenoides já havia sido reportada em outros estudos, em que espécies proximamente relacionadas apresentam diferenças em composição, intensidade e padrão de pigmentação (Bradshaw & Schemske, 2003; Yamamizo *et al.*, 2010). Essa diversidade é atribuída ao fato de que carotenoides em flores não são essenciais para a planta e, então, estariam submetidos a diferentes processos regulatórios. A diversidade de

pigmentação via carotenoides em flores e frutos é determinada principalmente pela expressão diferencial de genes da biossíntese destes pigmentos e regulada em nível de transcrição (Moehs *et al.*, 2001; Yamamizo *et al.*, 2010). Devido a essas características, estudos de identificação de genes e quantificação da composição de carotenoides em espécies de *Calibrachoa* seriam importantes para comparação em espécies que possuem diferentes cores de flores e poderia levar à proposição de um gene relacionado aos processos de diversificação do gênero baseado na produção de carotenoides, além dos genes já identificados envolvidos na produção das antocianinas. Uma primeira identificação de como se dá a expressão dos genes iniciais da rota de síntese dos carotenoides em *Calibrachoa pygmaea* e *C. parviflora* foi realizada, porém futuros estudos mais detalhados envolvendo todos os genes responsáveis pela produção desses pigmentos florais ainda são necessários (Apêndice A1).

Um ponto a ser discutido aqui, o qual foi exposto no Capítulo I desta tese, está relacionado à produção de flavonóis e luz ultravioleta (UV) que, embora não seja perceptível aos olhos humanos, é de grande importância para a visualização das flores pelos polinizadores, especialmente insetos. Em geral, as espécies que produzem pouca quantidade de flavonóis apresentam-se UV-reflectante e são, frequentemente, associadas à polinização por abelhas. Já as espécies que produzem maiores quantidades de flavonóis tendem a ser UV-absorbantes e têm síndrome de polinização associada às mariposas. *Calibrachoa parviflora* e *C. pygmaea* se encaixam nesta classificação, pois as flores de *C. parviflora* são UV-reflectantes e as de *C. pygmaea* UV-absorbantes com áreas reflectantes (Apêndice A2).

### **Características florais e sua importância na atração do polinizador em *Calibrachoa pygmaea***

Um fenômeno bastante interessante, reportado pela primeira vez neste trabalho (Capítulo III), consiste na observação de que *C. pygmaea* muda a cor das flores durante o dia, variando a cor das pétalas de brancas para amarelo-claro na parte superior da corola e púrpura/amarronzado na parte inferior da corola ao longo do dia e retornando à cor branca da corola ao entardecer e permanecendo com as flores brancas durante a noite, até o amanhecer. Neste trabalho, nós demonstramos que essa mudança de cor das pétalas é influenciada positivamente pela presença de luz, que ativa a produção de pigmentos florais. Via análise de espectrometria de massa e líquido cromatografia, foi possível identificar os pigmentos envolvidos nesse mecanismo, sendo composto pelas antocianinas e carotenoides. Corroborando

a hipótese da influência da luz na mudança da cor das flores, observamos que plantas submetidas a períodos constantes sem a presença de luz, não são afetadas pela mudança de cor das pétalas. Também observamos que, nas plantas expostas a alta intensidade de luz em diferentes horas do dia, por exemplo, 3 PM e 6 PM o efeito da mudança de cor das flores foi mais visível e correlacionado com a quantidade de pigmento produzido (Resultados expostos detalhadamente no Capítulo III).

Os resultados obtidos neste trabalho (Capítulo III) abrem perspectivas para um estudo detalhado sobre como se dá a expressão dos genes carotenóicos (Zhu *et al.*, 2010; Segawa *et al.*, 2016) em *C. pygmaea*, usando como ponto inicial os em períodos específicos do dia: 3 PM e 6 PM, visto que nestes períodos já foi identificadas diferenças em pigmentação floral. Com os resultados de expressão dos genes carotenóicos em *C. pygmaea* seria possível identificar quais genes são responsáveis pela coloração das flores expostas a alta intensidade de luz durante o dia. Vale salientar que todas as análises e resultados obtidos no capítulo II desta tese em *C. pygmaea* utilizaram as flores com fenótipo de cor branca, visto que este é o fenótipo relacionado com a síndrome de polinização da espécie.

Uma das teorias propostas para explicar a mudança de cor de flores observadas em *C. pygmaea* ao longo o dia, bem como o fechamento do limbo da corola em presença de luz, baseia-se no fato de que a espécie é adaptada para a polinização via mariposas e sabe-se que os hábitos de forrageio das mariposas são noturnos. Então, uma das hipóteses seria que *C. pygmaea* apresenta a corola fechada durante o dia para evitar que o néctar já produzido e estocado nos nectários seja pilhado por insetos oportunistas, que não contribuiriam para a polinização da espécie. Esse comportamento também reduziria o custo energético de manter as flores abertas durante o dia e também como proteção para as flores contra danos causados pela alta intensidade de luz. Este trabalho de tese abre oportunidades para experimentos de observação em campo do polinizador de *C. pygmaea* para identificar o tipo específico de mariposa, bem como confirmar a hipótese proposta neste trabalho para explicar o fechamento da corola durante o dia, conforme foi observado nesta espécie.

*Calibrachoa pygmaea* possui todas as características relacionadas à síndrome de polinização por mariposas, desde a cor das flores (brancas – a partir do entardecer e durante toda a noite), à produção de néctar e à emissão noturna de aroma floral. A emissão de fragrância pelas flores dessa espécie, característica esta que contribui positivamente para a atração do polinizador, foi investigada neste trabalho de tese (Capítulo III). Através de experimentos de

GC-MS (Cromatografia de gás acoplada à Espectrometria de Massas), nós conseguimos identificar os principais compostos voláteis emitidos pelas flores de *C. pygmaea*. Nossos resultados mostraram que a maioria desses compostos pertence à classe dos benzenoides/fenilpropanoides e que a emissão de fragrância apresenta ritmo controlado, ocorrendo no período noturno. Este fato, novamente, remete-nos aos hábitos noturnos de forrageio do seu polinizador específico. Os resultados observados neste trabalho foram semelhantes aos encontrados para *P. axillaris* (Hoballah *et al.*, 2005), nos quais esta espécie, também polinizada por mariposas, apresenta emissão de fragrância noturna e a maioria dos compostos orgânicos voláteis também pertencem à classe dos fenilpropanoides/ benzenoides.

Todos os resultados aqui reportados para *Calibrachoa pygmaea* se relacionam com a convergência de características florais observada em diversas espécies e a capacidade de aprendizado associativo do polinizador específico. Em que espécies que possuem o mesmo tipo de polinizador apresentam similares características florais como a cor das pétalas, emissão de aroma floral, produção de néctar (Schiestl & Johnson, 2013).

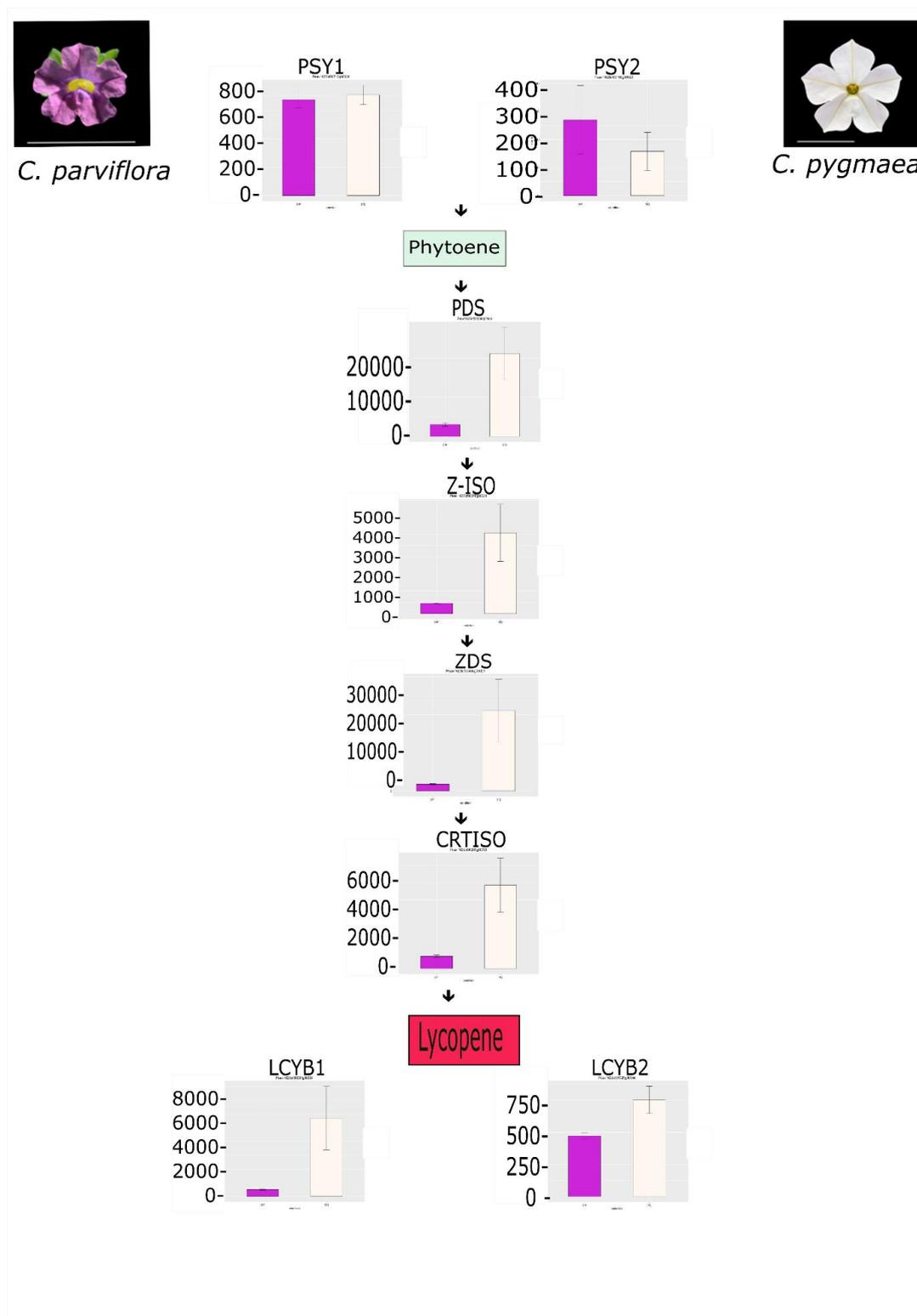
Outra abordagem que pode ser realizada em futuros estudos envolvendo a espécie *C. pygmaea* seria a identificação dos genes responsáveis pela emissão dos compostos orgânicos voláteis emitidos por suas flores. Uma estratégia seria analisar, primeiramente, os genes já conhecidos em *Petunia* como sendo importantes para a emissão de essência em *P. axillaris* como, por exemplo, *ODOI* e *EOBII* (Verdonk *et al.*, 2005; Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Van Moerkercke *et al.*, 2011) e o mais recentemente caracterizado *CNL* (Amhad *et al.*, submetido) e observar como estes genes são expressos em *C. pygmaea*. Para esse tipo de análise, seria necessária a geração de novos dados de transcriptoma, oriundos de um estágio de desenvolvimento mais tardio, visto que, diferentemente dos genes relacionados com a produção de cor, os genes de produção de aroma são expressos em estágios mais avançados do desenvolvimento floral, quando a flor encontra-se totalmente desenvolvida. No entanto, a disponibilidade dos dados de transcriptoma aqui gerados (estágios iniciais de desenvolvimento floral) são importantes para finalidades comparativas. Uma inicial comparação da expressão dos genes responsáveis pela emissão de compostos voláteis foi realizada durante este trabalho de tese, utilizando os dados de transcriptoma aqui gerados e nos dá uma clara ideia de que os genes responsáveis pela produção dos compostos orgânicos voláteis já identificados via GC-MS em *C. pygmaea* apresentam-se já nos estágios iniciais de desenvolvimento floral, em altos níveis de expressão (Apêndice A3). Esses dados também poderão ser comparados com os dados

de transcriptoma obtidos para Calibrachoa F1, os híbridos aqui produzidos pelo cruzamento entre *C. pygmaea* e *C. parviflora*, visto que essas plantas, assim como o parental *C. pygmaea*, também emitem aroma floral.

Finalmente, uma outra importante contribuição deste trabalho de tese foi a geração de dados de transcriptoma para ambas as espécies de *Calibrachoa*, bem como para o híbrido originado do cruzamento artificial entre as duas espécies, Calibrachoa F1. Antes deste trabalho, não havia qualquer informação sobre os genes nestas espécies. A disponibilidade dos dados de transcriptoma gerou uma enorme quantidade de informação, o que permitirá o desenvolvimento de numerosos estudos utilizando os dados aqui obtidos como, por exemplo, a análise de genes relacionados a características morfológicas e ecológicas distintivas entre estas duas espécies; a identificação de outros genes da rota de síntese dos carotenoides; genes relacionados a processos fisiológicos; a análise filogenética de diversos genes, entre tantos outros tipos de abordagens extremamente interessantes e importantes para o entendimento de processos metabólicos e evolutivos de diversificação no gênero *Calibrachoa*.

# APÊNDICE

**Apêndice 1. Os níveis de expressão dos genes biossintéticos envolvidos nos passos iniciais da síntese de carotenoides em *Calibrachoa parviflora* e *C. pygmaea*.**



---

**Figura A1:** Comparação dos níveis de expressão dos genes estruturais iniciais da síntese de carotenoides encontrados em *C. parviflora* e *C. pygmaea*. Números na vertical correspondem aos *counts* para cada um dos genes, sigla de cada gene está indicada acima de cada gráfico; barra em cor rosa corresponde aos níveis de expressão em *C. parviflora*, barra em branco corresponde a *C. pygmaea*. Barras em preto correspondem ao desvio padrão. Os dois primeiros carotenoides obtidos na via de síntese de carotenoides estão grafados em quadrados verde e vermelho, respectivamente. Dados obtidos via análise de transcriptoma, correspondente aos estágios de desenvolvimento floral S1-S3, metodologia utilizada: análises de genes diferencialmente expressos usando DESeq2 (implementado no programa R). Abreviações: *PSY*, fitoeno sintase; *PDS*, fitoeno desaturase; *Z-ISO*, ζ-caroteno isomerase; *ZDS*, ζ-caroteno desaturase; *CRTISO*, isomerase; *LYCB*, licopeno β-ciclase.

**Apêndice 2: Fenótipo das flores de *Calibrachoa* cor visível e cor UV.**



**Figura A2:** *Calibrachoa parviflora*, *C. pygmaea*, *Calibrachoa F1*, *C. sendtneriana* e *C. ovalifolia* imagens das flores em cor e luz ultravioleta (UV). *C. pygmaea* apresenta flores UV intermediárias, porém mais absorbentes, quando comparadas com *C. parviflora*, com áreas UV reflectantes, provavelmente devido à produção de carotenoides. *C. parviflora*; *C. ovalifolia* e *Calibrachoa F1* possuem flores UV reflectantes, já *C. sendtneriana* apresenta flores UV absorbentes. Imagens foram obtidas usando câmera Nikon 60 mm 2.8D micro lentes. Câmera Nikon D7000 SLR foi convertida para fotografar luz UV através de substituição do filtro do fabricante por um filtro UV específico que bloqueia luz visível e infra-vermelho (Advanced Camera Services Ltd). Uma fonte de luz foi provida pela Metz MZ76 flash, que foi modificado para produzir UV-A light (320-390 nm; Advanced Camera Services Ltd). As imagens coloridas foram obtidas usando câmera fotográfica Panasonic Lumix DMC-TZ10 câmera, lentes 35mm Leica, com configuração manual de diafragma e tempo de exposição.



**Figura A3:** Comparação dos diferentes níveis de expressão dos genes conhecidos na literatura (*Petunia*) envolvidos com a emissão de essência floral encontrados em *C. parviflora* e *C. pygmaea*. Números na vertical correspondem aos *counts* obtidos para cada um dos genes, sigla de cada gene está indicada acima de cada gráfico; barra em cor rosa corresponde aos níveis de expressão em *C. parviflora*, barra em branco corresponde a *C. pygmaea*. Barras em preto correspondem ao desvio padrão. Nome dos compostos orgânicos voláteis de essência (produtos) grafados em azul. Setas indicam a direção da via de síntese dos produtos. Dados obtidos via análise de transcriptoma, correspondente aos estágios de desenvolvimento floral S1-S3, metodologia utilizada: análises de genes diferencialmente expressos usando DESeq2 (implementado no programa R). Abreviaturas: *4CL*, 4-cumaril CoA-ligase; *ADT*, aroenate desidratase; *BALDH*, benzaldeído desidrogenase; *BSMT*, S-adenosil-L-metionina ácido benzoico/ carboxil ácido salicílico metiltransferase; *BPBT*, benzil-CoA: álcool benzil /2-fenil etanol benziltransferase; *C4H*, cinamato 4-hidroxilase; *CFAT*, coniferil álcool aciltransferase; *CHD*, cinamoil-CoA hidratase- desidrogenase; *CM* corismato mutase; *CNL*, cinamato CoA-ligase; *DAHPS*, 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase; *EGS*, eugenol sintase; *EPSPS*, 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase; *IGS*, isoeugenol sintase; *KATI*, 3- cetoacil-CoA tiolase; *PAAS*, fenilacetaldéido sintase; *PAL*, fenilalanina amônia liase

---

## REFERÊNCIAS (Capítulo I e IV)

- Akhtar TA and Pichersky E (2013) Veratrole biosynthesis in white campion. *Plant Physiol* 162: 52-62.
- Albert NW, Lewis DH, Zhang H, Schwinn KE, Jameson PE and Davies KM (2011) Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *Plant J* 65: 771-784.
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R and Walbot V (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell*. 10:1135-1149.
- Anders S and Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11: R106.
- Anders S, Pyl PT and Huber W (2014) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31: 166-169.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250.
- Ando T, Kurata M, Sasaki S, Ueda Y, Hashimoto G and Marchesi E (1995) Comparative morphological studies on infraspecific taxa of *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz et Thell. (Solanaceae). *J Jap Bot* 70: 205-217.
- Ando T (1996) Distribution of *Petunia axillaris* (Solanaceae) and its new subspecies in Argentina and Bolivia. *Acta Phytotax Geobot* 47: 19-30.
- Ando T, Saito N, Tatsuzawa F, Kakefuda T, Yamakage K, Ohtani E, Koshi-ishi M, Matsusake Y, Kokubun H, Watanabe H and Tsukamoto T (1999) Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Bioch Syst Ecol* 27:623-650.
- Ando T, Tatsuzawa F, Saito N, Takahashi M, Tsunashima Y, Numajiri H, Watanabe H, Kokubun H, Hara R, Seki H and Hashimoto G (2000) Differences in the floral anthocyanin content of red petunias and *Petunia exserta*. *Phytochem* 54: 495-501.
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watanabe H, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E and Kitching IJ (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88: 403-413.
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E and Basualdo I (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96: 289–297.
- Baker HG and Baker I (1983) Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE and Little RJ (eds.) *Handbook of experimental pollination biology*. New York, NY: Van Nostrand Reinhold, pp. 117-141.

- Baroli I and Niyogi KK (2000) Molecular genetics of xanthophyll–dependent photoprotection in green algae and plants. *Philos Trans R Soc London [Biol]* 355: 1385-1394.
- Barros MJF, Silva-Arias GA, Fregonezi JN, Turchetto-Zolet AC, Iganci JRV, Diniz Filho JAF and Freitas LB (2015) Environmental drivers of diversity in subtropical highland grasslands: a comparative analysis of *Adesmia*, *Calibrachoa*, and *Petunia*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17: 360-368.
- Bernstein BE, Birney E, Dunham I, Green ED, Gunter C and Snyder M (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74.
- Bliek M, Spelt K, Passeri V, Urbanus SL, Koes R and Quattrocchio FM (2016) The genes behind the different colors of *P. axillaris* and *P. inflata* flowers. *Suppl. Manuscript: Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida**. *Nature Plants* 2: 16074.
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
- Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao M, Bapaume L, Barry CS, Bliek M, Boersma MR, Borghi L, Bruggmann R, Bucher M et al. (2016) Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants* 2: 16074.
- Bradshaw HD and Schemske DW (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 426: 176-178.
- Bramley PM (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 53: 2107-2113.
- Brandenburg A, Dell’Olivo A, Bshary R and Kuhlemeier C (2009) The sweetest thing: advances in nectar research. *Curr Opin Plant Biol* 12: 486-490.
- Brandenburg A, Kuhlemeier C and Bshary R (2012) Innate adjustment of visitation behavior to rewarding and reward-minimized *Petunia axillaris* (Solanaceae) plants by hawkmoth *Manduca sexta* (Sphingidae). *Ethology* 118: 654-661.
- Britton G (1993) Biosynthesis of carotenoids. In: Young AJ and Britton G (eds.) *Carotenoids in photosynthesis*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 96-126.
- Britton G (1998) Overview of carotenoid biosynthesis. *Carotenoids* 3: 13-47.
- Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA and Mason JG (1999) Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. *Plant J* 19: 441-451.
- Brunner AM, Yakovlev IA and Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* 4: 1.
- Byers KJRP, Bradshaw HD and Riffell JA (2014) Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). *J Exp Biol* 217: 614-623.
- Castel SE, Levy-Moonshine A, Mohammadi P, Banks E and Lappalainen T (2015) Tools and best practices for data processing in allelic expression analysis. *Genome Biol* 16: 1.

- Chalal M, Winkler JB, Gourrat K, Trouvelot S, Adrian M, Schnitzler JP, Jamois F and Daire X (2015) Sesquiterpene volatile organic compounds (VOCs) are markers of elicitation by sulfated laminarine in grapevine. *Front Plant Sci* 19: 350.
- Chandler S (2003) Commercialization of genetically modified ornamental plants. *J Plant Biotechnol* 5: 69-77.
- Chi X, Hu R, Yang Q, Zhang X, Pan L, Chen N, Chen M, Yang Z, Wang T, He Y, Yu S (2012) Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR. *Mol Genet Genomics* 287: 167-176.
- Chittka L, Shmida A, Troje N and Menzel R (1994) Ultraviolet as a component of flower reflections, and the colour perception of Hymenoptera. *Vision Research* 34: 1489-1508.
- Chittka L and Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Curr Opin Plant Biol* 9: 428-435.
- Chu Y, Pan J, Wu A, Cai R and Chen H (2014) Molecular cloning and functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase gene from *Calibrachoa hybrida*. *Sci Hort* 165: 398-403.
- Clark DG, Pichersky E, Verdonk J, Dudareva N, Haring M, Klahre U and Schuurink R (2009) Benzenoids dominate the fragrance of *Petunia* flowers. In: Gerats T and Strommer J (eds.) *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*. New York: Springer, pp. 51-69.
- Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, Gardiner BB, Faulkner GJ, Brown MK, Taylor DF, Steptoe AL, Wani S, Bethel G and Robertson AJ (2008) Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat Methods* 5: 613-619.
- Cna'ani A, Muhlemann K, Ravid J, Masci T, Klempien A, Nguyen TT, Dudareva N, Pichersky E and Vainstein A (2015) *Petunia x hybrida* floral scent production is negatively affected by high-temperature growth conditions. *Plant Cell Environ* 38: 1333-1346.
- Coberly LC and Rausher MD (2003) Analysis of a chalcone synthase mutant in *Ipomoea purpurea* reveals a novel function for flavonoids: amelioration of heat stress. *Mol Ecol* 12:1113-1124.
- Cocucci A (1999) Evolutionary radiation in neotropical Solanaceae. In: Nee M, Symon DE, Lester RN and Jessop JP (eds) *Solanaceae IV*. Richmond, Surrey: Royal Botanical Gardens, Kew. pp. 9-22.
- Colquhoun TA, Verdonk JC, Schimmel BC, Tieman DM, Underwood BA and Clark DG (2010) *Petunia* floral volatile benzenoid/phenylpropanoid genes are regulated in a similar manner. *Phytochem* 71: 158-167.
- Colquhoun TA and Clark DG (2011a) Unraveling the regulation of floral fragrance biosynthesis. *Plant Signal Behav* 6: 378-381
- Colquhoun TA, Schwieterman ML, Wedde AE, Schimmel BCJ, Marciniak DM, Verdonk JC, Kim JY, Oh Y, Gális I, Baldwin IT, *et al* (2011b) *EOBII* controls flower opening by functioning as a general transcriptomic switch. *Plant Physiol* 156: 974-984.

- Comba L, Corbet SA, Hunt H, Outram S, Parker JS and Glover BJ (2000) The role of genes influencing the corolla in pollination of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Environ* 23: 639-647.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M and Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X and Mortazavi A (2016) A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* 17: 1.
- Consortium TM, Roy S, Ernst J, Kharchenko PV, Kheradpour P, Negre N, Eaton ML, Landolin JM, Bristow CA, Ma L, Lin MF, Washietl S, Arshinoff BI, Ay F, Meyer PE, Robine N, Washington NL, Di Stefano L, Berezikov E, Brown CD *et al.* (2010) Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science* 330: 1787-1797.
- Cooley AM and Willis JH (2009) Genetic divergence causes parallel evolution of flower color in Chilean *Mimulus*. *New Phytol* 183: 729-739.
- Cooley AM, Modliszewski JL, Rommel ML and Willis JH (2011) Gene duplication in *Mimulus* underlies parallel floral evolution via independent trans-regulatory changes. *Curr Biol* 21: 700-704.
- Coyne JA and Orr HA (2004) *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Cunningham Jr FX and Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 49: 557-583.
- Dall'Osto L, Cazzaniga S, North H, Marion-Poll A and Bassi R. (2007) The *Arabidopsis* aba4-1 mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell* 19: 1048-1064.
- Darwin C (1862) On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing. London: J. Murray.
- Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD, Davey JW, Whibley A, Nadeau NJ, Zimin AV, Hughes DS, Ferguson LC, Martin SH and Salazar C (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature* 487: 94-98.
- Davies KM, Bloor SJ, Spiller GB and Deroles SC (1998) Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. *Plant J* 13: 259-266.
- De la Barrera E and Nobel PS (2004) Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends Plant Sci* 9: 65-69.
- De Moraes CM, Mescher MC and Tumlinson JH (2001) Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410: 577-580.
- De Vetten N, Quattrocchio F, Mol J and Koes R (1997) The *AN11* locus controlling flower pigmentation in *Petunia* encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes Dev* 11: 1422-1434.

- Dell'Olivo A and Kuhlemeier C (2013) Asymmetric effects of loss and gain of a floral trait on pollinator preference. *Evolution* 67: 3023-3031.
- Demmig-Adams B and Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1: 21-26.
- Desgagne-Penix I, Khan MF, Schriemer DC, Cram D, Nowak J and Facchini PJ (2010) Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy cell cultures. *BMC Plant Biol* 10: 252
- Des Marais DL and Rausher MD (2010) Parallel evolution at multiple levels in the origin of hummingbird pollinated flowers in *Ipomoea*. *Evolution* 64: 2044-2054.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C and Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 15: 573-581.
- Dudareva N, D'auria JC, Nam KH, Raguso RA and Pichersky E (1998) Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase—an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J* 14: 297-304.
- Dudareva N, Murfitt LM, Mann CJ, Gorenstein N, Kolosova N, Kish CM, Bonham C and Wood K (2000) Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell* 12: 949-961.
- Dudareva N and Pichersky E (2000) Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol* 122: 627-34.
- Dudareva N, Pichersky E and Gershenzon J (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* 135: 1893-902.
- Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA and Orlova I (2006) Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci* 25: 417-440.
- Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK and Kaplan I (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol* 198: 16-32.
- Dyer AG (2001) Ocular filtering of ultraviolet radiation and the spectral spacing of photoreceptors benefit von Kries colour constancy. *J Exp Biol* 204: 2391-2399.
- Eveland AL, McCarty DR and Koch KE (2008) Transcript profiling by 3'-untranslated region sequencing resolves expression of gene families. *Plant Physiol* 146: 32-44.
- Faegri K and van der Pijl L (1979) *The principles of pollination ecology*, (3rd ed.) Pergamon Press, Oxford, New York.
- Faraco M, Spelt C, Bliet M, Verweij W, Hoshino A, Espen L, Prinsi B, Jaarsma R, Tarhan E, de Boer AH, Di Sansebastiano GP, Koes R and Quattrocchio F (2014) Hyperacidification of vacuoles by the combined action of two different P-ATPases in the tonoplast determines flower color. *Cell Rep* 6: 32-43.
- Farag MA, Rasheed DM and Kamal IM (2015) Volatiles and primary metabolites profiling in two *Hibiscus sabdariffa* (roselle) cultivars via headspace SPME-GC-MS and chemometrics. *Food Res Int* 78: 327-335.

- Fenske MP, Hazelton KD, Hempton AK, Shim JS, Yamamoto BM, Riffell JA and Imaizumi T (2015) Circadian clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 9775-9780.
- Fenske MP and Imaizumi T (2016) Circadian rhythms in floral scent emission. *Front Plant Sci* 7: 462
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR and Thomson JD (2004) Pollination syndromes and floral specialization. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 31: 375-403.
- Fehr C and Rausher MD (2004) Effects of variation at the flower-colour A locus on mating system parameters in *Ipomoea purpurea*. *Mol Ecol* 13:1839-1847.
- Finehout EJ and Lee KH (2004) An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem Mol Biol Educ* 32: 93-100.
- Forkmann G (1991) Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed* 106: 1-26.
- Fraser PD and Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43: 228-265.
- Fregonezi JN, Freitas LB, Bonatto SL, Semir J and Stehmann JR (2012) Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence *Taxon* 61: 120-130.
- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL and Freitas LB (2013) Biogeographic history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Bot J Linn Soc* 171: 140-153.
- Gachon C, Mingam A and Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot* 55: 1445-1454.
- Galliot C, Hoballah ME, Kuhlemeier C and Stuurman J (2006) Genetics of flower size and nectar volume in *Petunia* pollination syndromes. *Planta* 225: 203-212.
- Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D and Hirschberg J (2006) A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *Plant Cell* 18: 1947-1960.
- Garber M, Grabherr MG, Guttman M and Trapnell C (2011) Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods* 8: 469-477.
- Garg R and Jain M (2013) RNA-Seq for transcriptome analysis in non-model plants. *Methods Mol Biol* 1069: 43-58.
- Gavrilets S and Losos JB (2009) Adaptive radiation: contrasting theory with data. *Science* 323: 732-737.
- Gentili A, Caretti F, Ventura S, Perez-Fernandez V, Venditti A and Curini R (2015) Screening of carotenoids in tomato fruits by using liquid chromatography with diode array-linear ion trap mass spectrometry detection. *J Agricult Food Chem* 63: 7428-7439.

- Gerats AG, De Vlaming P, Doodeman M, Al B and Schram AW (1982) Genetic control of the conversion of dihydroflavonols into flavonols and anthocyanins in flowers of *Petunia hybrida*. *Planta* 155: 364-368.
- Gerstein MB, Lu ZJ, Van Nostrand EL, Cheng C, Arshinoff BI, Liu T, Yip KY, Robilotto R, Rechtsteiner A, Ikegami K, Alves P, Chateigner A, Perry M, Morris M, Auerbach RK, Feng X, Leng J, Vielle A, Niu W, Rhrissorakkrai K *et al.* (2010) Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science* 330: 1775-1787.
- Giuliano G, Bartley GE and Scolnik PA (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5: 379-87.
- Glish GL and Vachet RW (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2: 140-150.
- Glover B (2007) *Understanding flowers and flowering: an integrated approach*. Oxford: Oxford University Press.
- González-Teuber M and Heil M (2009) Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signal Behav* 4: 809-813.
- González-Plaza JJ, Ortiz-Martín I, Muñoz-Mérida A, García-López C, Sánchez-Sevilla JF, Luque F, Trelles O, Bejarano ER, De La Rosa R, Valpuesta V and Beuzón CR (2016) Transcriptomic analysis using olive varieties and breeding progenies identifies candidate genes involved in plant architecture. *Front Plant Sci* 7: 240.
- Goyret J, Pfaff M, Raguso RA and Kelber A (2008) Why do *Manduca sexta* feed from white flowers? Innate and learnt colour preferences in a hawkmoth. *Naturwissenschaften* 95: 569-76.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q and Chen Z (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnol* 29: 644-652.
- Grant V (1949) Pollination systems as isolating mechanisms in Angiosperms. *Evolution* 3: 82-97.
- Griesbach RJ (2002) Inheritance of the *AN2* gene and epistatic interactions in *Petunia exserta* × *P. axillaris* hybrids. *J Am Soc Hortic Sci* 127: 947-956.
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 57: 761-780.
- Gübitz T, Hoballah ME, Dell'Olivo A and Kuhlemeier C (2009) *Petunia* as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In: Gerats T and Strommer J (eds.) *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*. New York: Springer, pp. 29-49.
- Gumbert A (2000) Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*): innate preferences and generalization after learning. *Behav Ecol Sociobiol* 48: 36-43.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M and MacManes MD (2013) De novo transcript sequence reconstruction

- from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc* 8: 1494-1512.
- Heil M (2011) Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends Plant Sci* 16: 191-200.
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4: 210-218.
- Hoballah ME, Stuurman J, Turlings TC, Guerin PM, Connetable S and Kuhlemeier C (2005) The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta* 222: 141-150.
- Hoballah ME, Gübitz T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell'Olivo A, Arnold M and Kuhlemeier C (2007) Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *Plant Cell* 19: 779-790.
- Hoekstra HE and Coyne JA (2007) The locus of evolution: evodevo and the genetics of adaptation. *Evolution* 61: 995-1016.
- Hoffmann E and Stroobant V (2007) *Mass spectrometry: principles and applications*. (3rd ed.) Wiley, Chichester 502 pp.
- Hopkins R and Rausher MD (2012) Pollinator-mediated selection on flower color allele drives reinforcement. *Science* 335: 1090-1092.
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JG, Lu CY, Farcy E, Stevenson TW and Cornish EC (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366: 276-279.
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q and Fu YF (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Mol Biol* 10: 1.
- Huang Z, Wang B, Williams P and Pace RD (2009) Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT-Food Sci Technol* 42: 819-824.
- Jakobsen HB and Olsen CE (1994) Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta* 192: 365-371.
- Jänes J, Hu F, Lewin A and Turro E (2015) A comparative study of RNA-seq analysis strategies. *Brief Bioinform* 16: 932-940.
- Jin H and Martin C (1999) Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family. *Plant Mol Biol* 41: 577-585.
- Johnson MT, Carpenter EJ, Tian Z, Bruskiwich R, Burris JN, Carrigan CT, Chase MW, Clarke ND, Covshoff S, Edger PP and Goh F (2012) Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. *PLoS One* 7: e50226.
- Kaminaga Y, Schnepf J, Peel G, Kish CM, Ben-Nissan G, Weiss D, Orlova I, Lavie O, Rhodes D, Wood K and Porterfield DM (2006) Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional

- homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *J Biol Chem* 281: 23357-23366.
- Kanaya T, Watanabe H, Kokubun H, Matsubara K, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L and Ando T (2010) Current status of commercial Calibrachoa cultivars as assessed by morphology and other traits. *Sci Hort* 123: 488-495.
- Kaufmann K, Muino JM, Osteras M, Farinelli L, Krajewski P and Angenente GC (2010) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of plant transcription factors followed by sequencing (ChIP-SEQ) or hybridization to whole genome arrays (ChIP-CHIP). *Nat Protoc* 5: 457-472.
- Kim MK, Kim HA, Koh K, Kim HS, Lee YS and Kim YH (2008) Identification and quantification of anthocyanin pigments in colored rice. *Nutr Res Pract* 2: 46-49.
- Klahre U, Gurba A, Hermann K, Saxenhofer M, Bossolini E, Guerin PM and Kuhlemeier C (2011) Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic loci for floral scent production. *Curr Biol* 21: 730-739.
- Knapp S (2010) On 'various contrivances': pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Phil Trans R Soc Lond B* 365: 449-60.
- Knudsen JT and Tollsten L (1993) Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Bot J Linn Soc* 113: 263-84.
- Knudsen JT, Tollsten L, Groth I, Bergström G and Raguso RA (2004) Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. *Bot J Linn Soc* 146: 191-199.
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J and Ståhl B (2006) Diversity and distribution of floral scent. *Bot Rev* 72: 1-20.
- Knudsen JT and Gershenzon J. (2006) The Chemical Diversity of Floral Scent. In Dudareva N, Pichersky E, eds. *Biology of floral scent*. CRC Press.
- Koes R, Verweij W and Quattrocchio F (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 10: 236-242.
- Kolossova N, Gorenstein N, Kish CM and Dudareva N (2001) Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant Cell* 13: 2333-2347.
- Kondo E, Nakayama M, Kameari N, Tanikawa N, Morita Y, Akita Y, Hase Y, Tanaka A and Ishizaka H (2009) Red-purple flower due to delphinidin 3, 5-diglucoside, a novel pigment for *Cyclamen* spp., generated by ion-beam irradiation. *Plant Biotechnol* 26: 565-569.
- Koski MH and Ashman TL (2014) Dissecting pollinator responses to a ubiquitous ultraviolet floral pattern in the wild. *Funct Ecol* 28: 868-877.
- Kroon AR (2004) Transcription Regulation of the Anthocyanin Pathway in *Petunia hybrida*. Doctoral thesis, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Kulcheski FR, de Oliveira LFV, Molina LG, Almerao MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimarães FC, Abdelnoor RV (2011)

- Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics* 12: 307-313.
- LaFountain AM, Frank HÁ and Yuan YW (2015) Carotenoid composition of the flowers of *Mimulus lewisii* and related species: implications regarding the prevalence and origin of two unique, allenic pigments. *Arch Biochem Biophys* 573: 32-39.
- Li B and Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12: 1.
- Linder HP (2008) Plant species radiations: where, when and why? *Phil Trans R Soc B* 363: 3097-3105.
- Livak KJ and TD Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM and Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridisation 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, Bonatto SL, Salzano FM, and Freitas LB (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: A phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Mol Ecol* 19: 5240–5251.
- Maeda H, Shasany AK, Schnepf J, Orlova I, Taguchi G, Cooper BR, Rhodes D, Pichersky E and Dudareva N (2010) RNAi suppression of arogenate dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in *Petunia* petals. *Plant Cell* 22: 832-849.
- Mallick P and Kuster B (2010) Proteomics: A pragmatic perspective. *Nat Biotechnol* 28: 695-709.
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B and Egea-Cortines M (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol* 10: 1.
- Martínez del Rio C (1990) Dietary, phylogenetic, and ecological correlates of intestinal sucrase and maltase activity in birds. *Physiol Zoo* 63: 987-1011.
- Martin A and Orgogozo V (2013) The loci of repeated evolution: a catalog of genetic hotspots of phenotypic variation. *Evolution* 67: 1235-1250.
- Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, Liu XL, Connors K, Matheis N, Schuster DK, Menasco D, Wagoner W and Lightner J (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15: 1689-1703.
- Mishiba KI, Ando T, Mii M, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G and Marchesi E (2000) Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 85: 665-673.

- Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, DellaPenna D (2001) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol Biol* 45:281-93.
- Mol J, Grotewold E and Koes R (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci* 3: 212–217.
- Molbo D, Machado CA, Sevenster JG, Keller L and Herre EA (2003) Cryptic species of fig-pollinating wasps: implications for the evolution of the fig–wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5867-5872.
- Morita Y, Saitoh M, Hoshino A, Nitasaka E and Iida S (2006) Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol* 47: 457-470.
- Morozova O, Hirst M and Marra MA (2009) Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 135-51.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nat Methods* 5: 621-628.
- Muhlemann JK, Waelti MO, Widmer A and Schiestl FP (2006) Postpollination changes in floral odor in *Silene latifolia*: adaptive mechanisms for seed-predator avoidance? *J Chem Ecol* 32: 1855-1860.
- Muhlemann JK, Klempien A and Dudareva N (2014) Floral volatiles: from biosynthesis to function. *Plant Cell Environ* 37: 1936-1949.
- Murakami Y, Fukui Y, Watanabe H, Kokubun H, Toya Y and Ando T (2004) Floral coloration and pigmentation in *Calibrachoa* cultivars. *J Hortic Sci Biotechnol* 79: 47-53.
- Murfitt LM, Kolosova N, Mann CJ and Dudareva N (2000) Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. *Arch Biochem Biophys* 382: 145-151.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M and Snyder M (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320: 1344-1349.
- Negre F, Kish CM, Boatright J, Underwood B, Shibuya K, Wagner C, Clark DG and Dudareva N (2003) Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and *Petunia* flowers. *Plant Cell* 15: 2992–3006.
- Neiland MR and Wilcock CC (1998) Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *Am J Bot* 85: 1657-1671.
- Nepi M and Stpiczyńska M (2008) The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate nectar features. *Naturwissenschaften* 95: 177-184.
- Ng J and Smith SD (2016) Widespread flower color convergence in Solanaceae via alternate biochemical pathways. *New Phytol* 209:407-417.
- Nicolson SW and Thornburg RW (2007) Nectar chemistry. In *Nectaries and nectar*. Springer Netherlands.

- Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC and Pogson BJ (2015) Carotenoid metabolism in plants. *Mol Plant* 8: 68-82.
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Ann Rev Plant Biol* 50: 333-359.
- Nygaard AB, Jørgensen CB, Cirera S and Fredholm M (2007) Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 8: 1.
- Ogatallz K, Kanei-Ishii C, Sasakiz M, Hatanaka H, Nagadoiz A, Enariz M, Nakamura H and Nishimuraz Y (1996) The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA. *Nat Struct Mol Biol* 3: 178-187.
- Oliveira LA, Breton MC, Bastolla FM, da Silva Camargo S, Margis R, Frazzon J and Pasquali G (2012) Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species. *Plant Cell Physiol* 53: 405-422.
- Orlova I, Marshall-Colón A, Schnepf J, Wood B, Varbanova M, Fridman E, Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS, Rhodes D and Pichersky E (2006) Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. *Plant Cell* 18: 3458-3475.
- Orr HA (2005) The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat Rev Genet* 6: 119-127.
- Oyama-Okubo N, Ando T, Watanabe N, Marchesi E, Uchida K and Nakayama M (2005) Emission mechanism of floral scent in *Petunia axillaris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 69: 773-777.
- Pagani I, Liolios K, Jansson J, Chen IM, Smirnova T, Nosrat B, Markowitz VM and Kyrpides NC (2012) The Genomes OnLineDatabase (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res* 40: D571–D579.
- Papiorek S, Junker RR, Alves-dos-Santos I, Melo GAR, Amaral-Neto LP, Sazima M, Wolowski M, Freitas L and Lunau K (2016) Bees, birds and yellow flowers: pollinator-dependent convergent evolution of UV patterns. *Plant Biol* 8: 46-55.
- Pareek CS, Smoczynski R and Tretyn A (2011) Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet* 52: 413-435.
- Pasamontes A, Cheung WH, Simmons J, Aksenov AA, Peirano DJ, Grafton-Cardwell EE, Kapaun T, Dandekar AM, Fiehn O and Davis CE (2016) *Citrus tristeza* virus infection in sweet orange trees and a mandarin×tangor cross alters low molecular weight metabolites assessed using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *Metabolomics* 12: 1-10.
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA and Saedler H (1987) The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *MYB* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J* 6: 3553.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper—excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515.

- Pichersky E and Gershenzon J (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* 5: 237-243.
- Pichersky E, Noel JP and Dudareva N (2006) Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.
- Povero G (2011) Physiological and genetic control of anthocyanin pigmentation in different species. Doctoral thesis, VU-University, Amsterdam.
- Proctor M, Yeo P and Lack A (1996) The natural history of pollination. HarperCollins Publishers London, 479p.
- Provenzano S, Spelt C, Hosokawa S, Nakamura N, Brugliera F, Demelis L, Geerke DP, Schubert A, Tanaka Y, Quattrocchio F and Koes R (2014) Genetic control and evolution of anthocyanin methylation. *Plant Physiol* 165: 962-977.
- Quattrocchio F, Wing JF, Leppen HT, Mol JN and Koes RE (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell* 5: 1497-1512.
- Quattrocchio F, Wing JF, Va K, Mol JN and Koes R (1998) Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J* 13:475-488.
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J and Koes R (1999) Molecular analysis of the *Anthocyanin2* gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* 11: 1433-44.
- Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J and Koes R (2006) *PH4* of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell* 18:1274-1291.
- Quattrocchio FR, Baudry AN, Lepiniec LO, Grotewold ER. The regulation of flavonoid biosynthesis. In *The science of flavonoids 2006* (pp. 97-122). Springer New York.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Radhika V, Kost C, Boland W and Heil M (2010) The role of jasmonates in floral nectar secretion. *PLoS One* 5: e9265.
- Raguso RA and Pichersky E (1995) Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): Recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Syst Evol* 194: 55-67.
- Raguso RA and Willis MA (2005) Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta*. *Anim Behav* 69: 407-418.
- Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW and McDade LA (2003) Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 63: 265-284.
- Ramsay NA and Glover BJ (2005) MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* 10: 63-70.

- 
- Rauscher MD and Fry JD (1993) Effects of a locus affecting floral pigmentation in *Ipomoea purpurea* on female fitness components. *Genetics* 134: 1237-1247.
- Rauscher MD (2008) Evolutionary transitions in floral color. *Int J Plant Sci* 169: 7-21.
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL and de Freitas LB, (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: new insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Mol Phyl Evol* 81:19-28.
- Reddy PS, Reddy DS, Sivasakthi K, Bhatnagar-Mathur P, Vadez V and Sharma KK (2016) Evaluation of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.)] reference genes in various tissues and under abiotic stress conditions for quantitative real-time PCR data normalization. *Front Plant Sci* 7: 529.
- Rice G (1997) *Petunias: a garden paradigm*. Garden, Royal Horticultural Society.
- Roberts A and Pachter L (2013) Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat Methods* 10: 71-73.
- Roberts A, Feng H and Pachter L (2013) Fragment assignment in the cloud with eXpress-D. *BMC Bioinformatics* 14: 1-9.
- Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140.
- Rocha AJ, Monteiro-Júnior JE, Freire JE, Sousa AJ and Fonteles CS (2015) Real time PCR: the use of reference genes and essential rules required to obtain normalisation data reliable to quantitative gene expression. *J Mol Biol* 5: 45.
- Rodriguez-Saona C, Parra L, Quiroz A and Isaacs R (2011) Variation in highbush blueberry floral volatile profiles as a function of pollination status, cultivar, time of day and flower part: implications for flower visitation by bees. *Ann Bot* 107: 1377-1390.
- Rosinski JA and Atchley WR (1998) Molecular evolution of the *MYB* family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J Mol Evol* 46: 74–83.
- Ruiz-Sola MÁ and Rodríguez-Concepción M. (2012) Carotenoid biosynthesis In *Arabidopsis: a colorful pathway*. The *Arabidopsis* Book. Jan:e0158.
- Sagawa JM, Stanley LE, LaFountain AM, Frank HA, Liu C and Yuan YW (2016) An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in *Mimulus lewisii* flowers. *New Phytol* 209: 1049-1057.
- Schade F, Legge RL and Thompson JE (2001) Fragrance volatiles of developing and senescing carnation flowers. *Phytochemistry* 56: 703-710.
- Schemske DW and Bradshaw HD (1999) Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 910-915.
- Schiestl FP (2010) The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecol Lett* 13: 643-656.

- Schiestl FP and Ayasse M (2001) Post-pollination emission of a repellent compound in a sexually deceptive orchid: a new mechanism for maximising reproductive success? *Oecologia* 126: 531-534.
- Schiestl FP and Johnson SD (2013) Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends Ecol Evol* 28: 307-315.
- Schlüter PM, Xu S, Gagliardini V, Whittle E, Shanklin J, Grossniklaus U and Schiestl FP (2011) Stearoyl-acyl carrier protein desaturases are associated with floral isolation in sexually deceptive orchids. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 5696-5701.
- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M and Birney E (2012) Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics* 28: 1086-1092.
- Schütz K, Persike M, Carle R and Schieber A (2006) Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC–DAD–ESI–MS n. *Anal Bioanal Chem* 384: 1511-1517.
- Schwinn K, Venail J, Shang Y, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Bailey P, Davies K and Martin C (2006) A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell* 18: 831-851.
- Segatto AL, Ramos-Fregonezi AM, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *Am J Bot* 101: 119-127.
- Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Mol Phyl Evol* 70: 504-512.
- Sharkey TD and Yeh S (2001) Isoprene emission from plants. *Annu Rev Plant Biol* 5: 407-436.
- Sheehan H, Hermann K and Kuhlemeier C (2012) Color and scent: how single genes influence pollinator attraction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77: 117-133.
- Sheehan H, Moser M, Klahre U, Esfeld K, Dell'Olivo A, Mandel T, Metzger S, Vandenbussche M, Freitas L and Kuhlemeier C (2016) *MYB-FL* controls gain and loss of floral UV absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nat Genet* 48: 159-166.
- Smith SD, Ané C and Baum DA (2008) The role of pollinator shifts in the floral diversification of *Iochroma* (Solanaceae). *Evolution* 62: 793-806.
- Smith SD and Rausher MD (2011) Gene loss and parallel evolution contribute to species difference in flower color. *Mol Biol Evol* 28: 2799-2810.
- Sobel JM and Streisfeld MA (2013) Flower color as a model system for studies of plant evo-devo. *Front Plant Sci* 4: 321.
- Soon, WW; Hariharan M and Snyder MP (2013) High-throughput sequencing for biology and medicine. *Mol Syst Biol* 9: 640.
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JN and Koes R (2000) *Anthocyanin1* of *Petunia* encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* 12: 1619-1631.

- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JN and Koes R (2002) *ANTHOCYANINI* of *Petunia* controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell* 14: 2121-2135.
- Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, Prathapani N-K, Shklarman E, Ovadis M and Vainstein A (2010) *EOBII*, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in *Petunia*. *Plant Cell* 22: 1961-1976.
- Stamatoyannopoulos JA, Snyder M, Hardison R, Ren B, Gingeras T, Gilbert DM, Groudine M, Bender M, Kaul R, Canfield T, Giste E, Johnson A, Zhang M, Balasundaram G, Byron R, Roach V, Sabo PJ, Sandstrom R, Stehling AS, Thurman RE *et al.* (2012) An encyclopedia of mouse DNA elements (Mouse ENCODE). *Genome Biol* 13: 418.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don Solanaceae: revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* e o estabelecimento do novo genero *Petuniopsis*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, UNICAMP, Campinas, SP. 228 p.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB and Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats T and Strommer J (eds.) *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*. New York: Springer, pp. 1-28.
- Stern DL and Orgogozo V (2008) The loci of evolution: how predictable is genetic evolution? *Evolution* 62: 2155-2177.
- Stracke R, Werber M and Weisshaar B (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4: 447-456.
- Streisfeld MA and Kohn JR (2005) Contrasting patterns of floral and molecular variation across a cline in *Mimulus aurantiacus*. *Evolution* 59: 2548-2559.
- Streisfeld MA and Kohn JR (2007) Environment and pollinator-mediated selection on parapatric floral races of *Mimulus aurantiacus*. *J Evol Biol* 20: 122-132.
- Streisfeld MA and Rausher MD (2009) Altered trans-regulatory control of gene expression in multiple anthocyanin genes contributes to adaptive flower color evolution in *Mimulus aurantiacus*. *Mol Biol Evol* 26: 433-444.
- Streisfeld MA and Rausher MD (2011) Population genetics, pleiotropy, and the preferential fixation of mutations during adaptive evolution. *Evolution* 65: 629-642.
- Streisfeld MA, Young WN and Sobel JM (2013) Divergent selection drives genetic differentiation in an R2R3-MYB transcription factor that contributes to incipient speciation in *Mimulus aurantiacus*. *PLoS Genet* 9: e1003385.
- Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C and Kuhlemeier C (2004) Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. *Genetics* 168: 1585-99.
- Suchet C, Dormont L, Schatz B, Giurfa M, Simon V, Raynaud C and Chave J (2011) Floral scent variation in two *Antirrhinum majus* subspecies influences the choice of naïve bumblebees. *Behav Ecol Sociobiol* 65: 1015-1027.

- Tanaka Y, Sasaki N and Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 54: 733-749.
- Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N, Katsumoto Y and Chandler S (2010) Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 1760-1769.
- Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang GL, Xu ZS and Xiong AS (2015) Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS One* 10: e0117569
- Todd EV, Black MA and Gemmell NJ (2016) The power and promise of RNA-seq in ecology and evolution. *Mol Ecol* 25: 1224-1241.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J and Zhang Z (2009) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 10: 1.
- Tornielli G, Koes R and Quattrocchio F (2009) The genetics of flower color. In: Gerats T and Strommer J (eds.) *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*. New York: Springer, pp. 269-299.
- Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, Kuhlemeier C, Solís-Neffa VG, Speranza PR, Bonatto SL and Freitas LB (2014) Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Mol Ecol* 23: 374-389.
- Van der Niet T and Johnson SD (2012) Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends Ecol Evol* 27: 353-361.
- Van der Pijl L (1960) Ecological aspects of flower evolution I. Phyletic evolution. *Evolution* 1: 403-416.
- Van Moerkercke A, Haring MA and Schuurink RC (2011) The transcription factor *EMISSION OF BENZENOIDES II* activates the *MYB ODORANT1* promoter at a *MYB* binding site specific for fragrant petunias. *Plant J* 67: 917-928.
- Van Moerkercke A, Galván-Ampudia CS, Verdonk JC, Haring MA and Schuurink RC (2012) Regulators of floral fragrance production and their target genes in *Petunia* are not exclusively active in the epidermal cells of petals. *J Exp Bot* 63: 3157-3171.
- Vandenbussche M, Chambrier P, Bento SR and Morel P (2016) *Petunia*, your next supermodel? *Frontiers in Plant Science*, 7: 72.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A. *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: 10806.
- Van Guilder HD, Vrana KE and Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44: 619.
- Verdonk JC, De Vos CR, Verhoeven HA, Haring MA, van Tunen AJ and Schuurink RC (2003) Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* 62: 997-1008.

- Verdonk JC (2006) Floral Scent Production by *Petunia hybrida*. Doctoral thesis, University of Amsterdam, Amsterdam.
- Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ and Schuurink RC (2005) *ODORANT1* regulates fragrance biosynthesis in *Petunia* flowers. *Plant Cell* 17: 1612-1624.
- Verweij W, Spelt C, Di Sansebastiano GP, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, Koes R and Quattrocchio F (2008) An H<sup>+</sup> P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. *Nat Cell Biol* 10: 1456-1462.
- Vranova E, Coman D and Grussem W (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64: 665-700.
- Waelti MO, Muhlemann JK, Widmer A and Schiestl FP (2008) Floral odour and reproductive isolation in two species of *Silene*. *J Evol Biol* 21: 111-121.
- Wang A, Hu J, Huang X, Li X, Zhou G and Yan Z (2016) Comparative transcriptome analysis reveals heat-responsive genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*). *Front Plant Sci* 7: 939.
- Wang J and Pichersky E (1998) Characterization of S-Adenosyl-L-Methionine:(Iso) eugenol-O-methyltransferase involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Arch Biochem Biophys* 349: 153-60.
- Wang Z, Gerstein M and Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57-63.
- Waser NM and Ollerton J (Eds) (2006) Plant–Pollinator Interactions. University of Chicago Press.
- Waser NW, Chittka L, Price MV, Williams NM and Ollerton J (1996) Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043–1060.
- Watanabe H, Ando T, Iida S, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Hashimoto G and Marchesi E (1996) Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *J Jpn Soc Hort Sci* 65: 625-634.
- Watanabe H, Ando T, Iida S, Suzuki A, Buto K, Tsukamoto T, Kokubun H, Hashimoto G and Marchesi E (1997) Cross compatibility of *Petunia pubescens* and *P. pygmaea* with native taxa of *Petunia*. *J Jpn Soc Hort Sci* 66: 607-612.
- Watanabe H, Ando T, Nishino E, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G and Marchesi E (1999) Three groups of species in *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) inferred from the intact seed morphology. *Am J Bot* 86: 302-305.
- Waterworth RA and Griesbach RJ (2001) The biochemical basis for flower color in *Calibrachoa*. *HortSci* 36: 131-132.
- Wei H, Chen X, Zong X, Shu H, Gao D and Liu Q (2015) Comparative transcriptome analysis of genes involved in anthocyanin biosynthesis in the red and yellow fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *PloS One* 10: e0121164.
- Wessinger CA and Rausher MD (2012) Lessons from flower colour evolution on targets of selection. *J Exp Bot* 63: 5741-5749.

- 
- Whitney HM and Glover BJ (2007) Coevolution: plant–insect. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Whittall JB, Voelckel C, Kliebenstein DJ and Hodges SA (2006) Convergence, constraint and the role of gene expression during adaptive radiation: floral anthocyanins in *Aquilegia*. *Mol Ecol* 15: 645-657.
- Wijsman HJ (1982) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. *Acta Bot Neerl* 31: 477-490.
- Wijsman HJ and Jong JH (1985) On the Interrelationships of certain species of *Petunia*. IV. Hybridization and nomenclatural consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot Neerl* 34: 337-349.
- Wijsman HJ (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.
- Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126: 485-493.
- Wong ML and Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.
- Wu CA, Streisfeld MA, Nutter LI and Cross KA (2013) The genetic basis of a rare flower color polymorphism in *Mimulus lewisii* provides insight into the repeatability of evolution. *PLoS One* 8: e81173
- Wu F and Tanksley SD (2010) Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genomics* 11: 1.
- Wu X and Prior RL (2005) Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J Agric Food Chem* 53: 2589-2599.
- Xiao M, Zhang Y, Chen X, Lee EJ, Barber CJ, Chakrabarty R, Desgagné-Penix I, Haslam TM, Kim YB, Liu E and MacNevin G (2013) Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *Biotechnol J* 166: 122-134.
- Xiao Z, Zhou X, Niu Y, Yu D, Zhu J and Zhu G (2015) Optimization and application of headspace-solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in cherry wines. *J Chromatogr B* 978: 122-130.
- Xie Y, Wu G, Tang J, Luo R, Patterson J, Liu S, Huang W, He G, Gu S, Li S and Zhou X (2014) SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics* 30: 1660-1666.
- Yamagishi M, Kishimoto S and Nakayama M (2009) Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of Asiatic hybrid lily. *Plant Breed* 128: 172-177.

- 
- Yamamizo C, Kishimoto S and Ohmiya A (2010) Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *J Exp Bot* 61: 709-719.
- Yon F, Joo Y, Cortés Llorca L, Rothe E, Baldwin IT and Kim SG (2016) Silencing *Nicotiana attenuata* LHY and ZTL alters circadian rhythms in flowers. *New Phytol* 209: 1058-1066.
- Yuan YW, Byers KJ and Bradshaw HD (2013) The genetic control of flower–pollinator specificity. *Curr Opin Plant Biol* 16: 422-428.
- Yuan YW, Sagawa JM, Frost L, Vela JP and Bradshaw HD (2014) Transcriptional control of floral anthocyanin pigmentation in monkeyflowers (*Mimulus*). *New Phytol* 204: 1013-1027.
- Zhang S, An S, Li Z, Wu F, Yang Q, Liu Y, Cao J, Zhang H, Zhang Q and Liu X (2015) Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene* 555: 393-402.
- Zhu C, Bai C, Sanahuja G, Yuan D, Farré G, Naqvi S, Shi L, Capell T and Christou P (2010) The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Arch Biochem Biophys* 504: 132-141.
- Zimmermann IM, Heim MA, Weisshaar B and Uhrig JF (2004) Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J* 40: 22-34.
- Zufall RA and Rausher MD (2003) The genetic basis of a flower color polymorphism in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). *J Hered* 94: 442-448.

