

DIEGO ISMAEL ROCHA

**ESTUDO DOS CARACTERES FLORAIS ASSOCIADOS À ORNITOFILIA E  
QUIROPTEROFILIA EM ESPÉCIES DE *Passiflora* (PASSIFLORACEAE)**

**CAMPINAS  
2015**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**DIEGO ISMAEL ROCHA**

**ESTUDO DOS CARACTERES FLORAIS ASSOCIADOS À ORNITOFILIA E  
QUIROPTEROFILIA EM ESPÉCIES DE *Passiflora* (PASSIFLORACEAE)**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de  
Doutor em Biologia Vegetal.



Orientador: Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO  
DIEGO ISMAEL ROCHA, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. MARCELO CARNIER DORNELAS

---

**CAMPINAS  
2015**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R582e Rocha, Diego Ismael, 1986-  
Estudo dos caracteres florais associados à ornitofilia e quiropterofilia em espécies de *Passiflora* (Passifloraceae) / Diego Ismael Rocha. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Marcelo Carnier Dornelas.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Passiflora*. 2. Desenvolvimento Floral. 3. Polinização. 4. Auxina. I. Dornelas, Marcelo Carnier, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of floral traits associated with ornithophily and chiropterophily in *Passiflora* species (Passifloraceae)

**Palavras-chave em inglês:**

*Passiflora*

Floral development

Pollination

Auxin

**Área de concentração:** Biologia Vegetal

**Titulação:** Doutor em Biologia Vegetal

**Banca examinadora:**

Marcelo Carnier Dornelas [Orientador]

Isabela Galarda Varassin

Juliana Lischka Sampaio Mayer

Marlies Sazima

Tamara Canto Fonseca

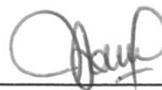
**Data de defesa:** 30-03-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal

Campinas, 30 de março de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (orientador)



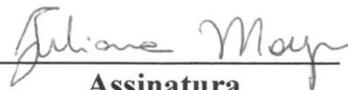
Assinatura

Profa. Dra. Isabela Galarda Varassin



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer



Assinatura

Dra. Tamara Canto Fonseca



Assinatura

Profa. Dra. Marlies Sazima



Assinatura

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Assinatura

Dra. Lilian Cristina Baldon Aizza

Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador

Assinatura



## RESUMO

Em *Passiflora*, a grande variabilidade das estruturas florais e cores permitiu adaptação dessas espécies a diversos tipos de polinizadores. Em geral, espécies polinizadas pelo mesmo grupo de animais exibem um conjunto de caracteres que determinam esses sistemas de polinização. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento de estruturas florais peculiares de espécies do gênero (androgínóforo e corona), bem como, os aspectos bioquímicos (cor, aroma e néctar) de espécies com diferentes sistemas de polinização (ornitofilia e quiropterofilia) e nos híbridos interespecíficos obtidos entre as mesmas. Nossas análises evidenciaram que a espécie ornitófila (*P. coccinea* - flor vermelha) e a espécie quiropterófila (*P. setacea* - flor branca) apresentaram caracteres morfológicos, bem como, a composição química do néctar contrastantes estando essas características florais de acordo com os seus sistemas de polinização. Nos híbridos, nem todas as características foram intermediárias, em relação às espécies parentais. O androgínóforo curvo, comumente, observado em espécies do gênero polinizadas por morcegos foi atribuído como resposta à barreira física exercida pelo perianto e a redistribuição de auxina nos tecidos dessa estrutura. Com relação à cor, os híbridos apresentaram tonalidades de vermelho diferentes da coloração escarlate observada em *P. coccinea*. Porém, a diversidade de pigmentação caracterizada nestes genótipos de *Passiflora* pôde ser explicada pela combinação de moléculas específicas de antocianinas acumuladas em suas pétalas. Quanto à composição química do aroma, os híbridos apresentaram uma composição qualitativamente similar ao de *P. coccinea*, não sendo observados a herdabilidade de compostos característicos do aroma de *P. setacea* (benzenoides). Possível correlação entre cor e aroma foi sugerida. Acredita-se que esses

resultados possam contribuir para a compreensão da evolução destes sistemas de polinização dentro do gênero *Passiflora*.

## ABSTRACT

In *Passiflora*, the great variability of floral structures and colours allowed adaptation of these species to different types of pollinators. In general, species pollinated by the same group of animals exhibit a set of characters that determine these pollination systems. This study aimed to characterize the development of unique floral structures of the genus (androgynophore and corona), as well as the biochemical aspects (colour, scent and nectar) of species with different pollination systems (ornithophily and chiropterophily) and in interspecific hybrids obtained between of them. Our analyzes have shown that both, morphology and nectar composition from ornithophilous (*P. coccinea* - red flower) and chiropterophilous species (*P. setacea* - white flower) are contracting, and these resources according to their pollination systems. In hybrids, not all features were intermediate in relation to the parental species. The bend androgynophore, commonly observed in the *Passiflora* species pollinated by bats was assigned in response to the physical barrier exerted by the perianth and the redistribution of auxin in tissues of that structure. Regarding colour, the hybrids showed different shades of red staining in comparison to the scarlet red observed in *P. coccinea*. However, the diversity of pigmentation characterized in these *Passiflora* genotypes could be explained by the combination of specific molecules anthocyanins accumulated in their petals. Regarding scent composition, hybrids showed a similar composition to the *P. coccinea* and, it was not observed heritability of characteristic *P. setacea* compounds (benzenoids). Possible correlation between colour and scent has been suggested. It is believed that these results may contribute to understanding the evolution of these pollination systems within the genus *Passiflora*.



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Referências Bibliográficas.....	7
CAPÍTULO I: Auxina e a constrição física exercida pelo perianto promovem a curvatura do androginóforo em <i>Passiflora mucronata</i> L. (Passifloraceae).....	13
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
Introdução .....	17
Materiais e Métodos.....	19
Material vegetal e medidas do androginóforo.....	19
Experimento para remoção do Perianto .....	20
Tratamentos com auxina e com inibidor do transporte de auxina.....	20
Análises Estatísticas.....	22
Resultados .....	23
Desenvolvimento do androginóforo de <i>P. mucronata</i> .....	23
A barreira exercida pelo perianto afeta a flexão do perianto .....	25
Auxina e inibidores do transporte polar de auxina afetam a flexão e crescimento do androginóforo .....	25
Expansão de células diferenciais contribui para curvatura androginóforo .....	29
Discussão .....	34
A barreira exercida pelo perianto afeta a curvatura do androginóforo .....	34
Expansão celular diferencial contribui para a curvatura do androginóforo .....	37
Curvatura do androginóforo e a evolução da quiropterofilia em <i>Passiflora</i> .....	37
Referências Bibliográficas .....	39
CAPÍTULO II: Caracterização da morfologia floral e composição do néctar em espécies de <i>Passiflora</i> com diferentes sistemas de polinização e seus híbridos interespecíficos .....	43
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	45

Introdução .....	47
Materiais e métodos .....	50
Material Vegetal .....	50
Análises Morfométricas .....	51
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	52
Composição de açúcares no néctar.....	52
Análise do perfil de aminoácidos .....	53
Resultados .....	54
Caracterização morfológica dos genótipos de <i>Passiflora</i> .....	54
Desenvolvimento da coroa.....	57
Período de antese e secreção do néctar .....	60
Composição do néctar - Açúcares e Aminoácidos.....	61
A morfologia floral de <i>P. coccinea</i> e <i>P. setacea</i> estão associadas aos respectivos sistemas de polinização .....	67
Os híbridos exibem um mosaico complexo de caracteres parentais e transgressivos... 68	
Desenvolvimento da coroa.....	69
As características do néctar de <i>P. coccinea</i> e de <i>P. setacea</i> estão relacionadas aos seus respectivos sistemas de polinização .....	70
Aminoácidos.....	72
Herdabilidade dos caracteres do nectar .....	74
Considerações finais .....	75
Referências Bibliográficas .....	76
Material suplementar .....	82
CAPÍTULO III: Desvendando a relação entre cor e aroma em espécies de <i>Passiflora</i> com diferentes sistemas de polinização e seus respectivos híbridos interespecíficos.....	85
RESUMO .....	85
ABSTRACT .....	87
Introdução .....	89
Materiais e métodos .....	91
Material Vegetal.....	91
Coloração das flores .....	92

Identificação de antocianinas .....	92
Coleta de compostos voláteis florais por microextração em fase sólida (MEFS).....	94
Resultados .....	95
Variação e classificação da coloração das flores .....	95
Identificação e quantificação das antocianinas presente nas pétalas.....	97
Emissão de odores - Caracterização micromorfológica da epiderme dos filamentos da corona .....	101
Discussão .....	106
Caracterização do perfil de pigmentação das pétalas de <i>Passiflora</i> .....	106
Micromorfologia dos filamentos da corona .....	110
Composição do aroma floral de <i>P. coccinea</i> e <i>P. setcaea</i> e a relação com os seus sistemas de polinização .....	111
Comparação da composição do aroma floral entre os híbridos interespecíficos e as possíveis relações entre cor e aroma .....	113
Considerações finais .....	116
Referências Bibliográficas .....	117
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	127



*Aos meus pais,  
“por me ensinarem que a vida é repleta de obstáculos,  
e que a honestidade e o trabalho são os pré-requisitos para superá-los!!”*



## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudos (Projeto 2010/52336-4).

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Biologia Vegetal que ofereceram toda estrutura necessária para realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo Carnier Dornelas. Obrigado pela paciência, confiança, ensinamentos e pelas inúmeras oportunidades que me ajudaram a crescer como pesquisador.

Aos Profs; João Carlos de Oliveira e Kátia Pivetta, por disponibilizarem o acesso no campo experimental da UNESP-Jaboticabal e que foi imprescindível para a coleta do material vegetal.

Ao prof. Nilton Junqueira (EMBRAPA) pelas facilidades oferecidas ao desenvolvimento desta pesquisa no campo experimental da EMBRAPA CERRADOS.

Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/ UNICAMP e o Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz pelo suporte dado para a realização da microscopia eletrônica de varredura.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (UNICAMP) pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do departamento de Biologia Vegetal pelo agradável convívio.

À Prof<sup>a</sup> Claudia Haddad, pelas boas risadas, agradável convívio e ensinamentos.

Ao Prof. Marcos Salvador pelas valiosas idéias e pelo auxílio na avaliação das análises dos compostos voláteis.

Às professoras Alexandra Sawaya, Juliana Mayer, Kayna Agostini e Marlies Sazima pelas valiosas sugestões realizadas na qualificação e pré-banca.

À Begoña Gimenez Cassina Lopez pelo auxílio na identificação das antocianinas.

Ao Geraldo Caetano (Geraldinho) e Idelma Gonçalves pelas boas risadas e excelente companhia durante minha passagem por Brasília.

Aos companheiros do laboratório de desenvolvimento vegetal por sempre tornarem o ambiente de trabalho mais prazeroso, descontraído e alegre. Agradeço também pela disponibilidade e auxílio de todos vocês durante a realização do meu trabalho. Obrigado pelas ótimas companhias!

À minha noiva, Mariana Fonseca Machado, pelo amor, carinho, amizade, e atenção. Obrigado pelo incentivo e apoio incondicional!

Às minhas queridas irmãs Damila e Dirliane que tanto amo. Obrigado por me ensinarem a aproveitar a vida e mesmo nos momentos difíceis a extrair o que há de proveitoso.

Ao Paulo Zanoni, “Paulão”, pelas sábias palavras me ditas em momentos de dificuldade. Obrigado por ser esse pai tão amoroso e cuidadoso com toda nossa família.

Ao meu pai José Benedito, “Rochinha”, *in memoriam*, que tanto me ensinou e tanta falta me faz. Tenho certeza que, onde quer que esteja, está feliz com esse momento tão especial.

À minha mãe, Ana Maria Ismael Zanoni, fonte de inspiração que seguirei por toda vida. Amo você!

A Deus, pela constante proteção e por me dar força, coragem, saúde e fé para ultrapassar as dificuldades e seguir em frente!

**MUITO OBRIGADO!**

## BIOGRAFIA

Diego Ismael Rocha, filho de José Benedito Rocha e Ana Maria Ismael Rocha, nasceu em Belo Horizonte, MG, em 21 de março de 1986. cursou o ensino médio no colégio Frei Orlando II, em Belo Horizonte, MG, concluindo em 2003.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa em março de 2004. Concluiu o curso de Agronomia em janeiro de 2009. Foi bolsista de Iniciação Científica durante três anos, desenvolvendo projetos no laboratório de Anatomia Vegetal, de 2006 a 2009.

Em 2008 foi agraciado com o Prêmio Verde, concedido pela Sociedade Botânica do Brasil durante o 59º Congresso Nacional de Botânica, pela apresentação do trabalho “Morfoanatomia, ontogenia e química da secreção dos nectários extraflorais de *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae)”.

Em 2009 iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso com a defesa da dissertação intitulada “Estudos anatômicos e ultraestruturais de sistemas de regeneração *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora cincinnata* Masters (Passifloraceae)”, em fevereiro de 2011.

Em março de 2011 iniciou o programa de doutorado em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, concluindo os requisitos para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em março de 2015.



## INTRODUÇÃO GERAL

A impressionante diversidade de características florais nas angiospermas é geralmente atribuída a um reflexo da coevolução entre flores e seus agentes polinizadores (Grant 1994; Fenster et al. 2004; Johnson 2006). Ao longo da evolução dessas espécies, diversas inovações reprodutivas foram incorporadas às estruturas florais otimizando o processo reprodutivo e possibilitando a alta taxa de diversificação das angiospermas (Hermann e Kuhlemeier 2011).

Os polinizadores apresentam diferentes requisitos energéticos, morfologias e sistemas sensoriais que causam uma seleção direcional no sentido de reconhecerem fenótipos específicos, como determinada arquitetura floral (tamanho e simetria), cor e aroma (Harbone 1994; Fenster et al. 2004; Kay e Sargent 2009). Esse conjunto de caracteres adaptados a determinado grupo de polinizadores, no qual espécies vegetais que não são filogeneticamente relacionadas podem se convergir caracterizam os sistemas de polinização (Proctor et al. 1996; Thomson e Wilson, 2008; Rausher, 2008; Kay e Sargent, 2009). As características que constituem os sistemas de polinização podem ser categorizadas em: (1) Caracteres que atraem os polinizadores, como a cor das peças florais e o aroma emitido; (2) Caracteres que recompensam o polinizador, como o néctar e em alguns casos, grãos de pólen e (3) caracteres de eficiência, como a morfologia e posicionamentos dos órgãos reprodutivos (Bradshaw et al. 1995).

O sucesso da interação planta-polinizador depende da compatibilidade entre a morfologia floral e de seu polinizador cognato. Um exemplo dessas adaptações são os estiletes alongados com estigmas evidentes, livres e projetados para a periferia da flor,

típicos de flores ornitófilas. Essas características asseguram a deposição de pólen na cabeça do beija-flor, enquanto se alimenta dos recursos disponibilizados pela planta (Cronk e Ojeda 2008). Em alguns casos, as adaptações morfológicas podem ser extremas, como observado em *Tacsonia* (Passifloraceae), no qual as espécies apresentam um tubo floral longo e que são apenas polinizadas por uma espécie de beija-flor andino que também apresentam um longo aparelho bucal (Abrahamczyk et al. 2014)

A coloração do perianto é outra característica floral que exerce uma importante função na atração de polinizadores, uma vez que os pigmentos podem refletir diferentes comprimentos de onda da luz propiciando sinais específicos aos animais (Bradshaw e Schemske, 2003; Chittka e Kevan 2005; Lunau et al. 2006). Estes pigmentos são, em sua grande maioria, compostos do metabolismo secundário, mais especificamente os flavonoides, tendo as antocianinas como a principal classe de metabólitos responsáveis pela pigmentação de tecidos vegetais (Fenster et al. 2004; Grotewold 2006; Miller et al. 2011).

As antocianinas acumulam-se nos vacúolos de células epidérmicas de pétalas, de flores e de frutos (Martin e Gerarts 1993), podendo também ser encontradas em órgãos vegetativos em resposta aos estresses abióticos e bióticos (Davies 2004; Castellarin et al. 2008; Vogt 2010; Katerova et al. 2012). O espectro de cor desses pigmentos vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura (Grotewold 2006). As antocianinas são derivadas de três tipos básicos de antocianidinas: pelargonidina, cianidina e delphinidina, as quais apresentam diferentes formas estruturais e conseqüentemente assumem diferentes colorações: a pelargonidina reflete a cor laranja-avermelhada, cianidina produz cores vermelha e magenta e delphinidina reflete cores entre o roxo e o azul (Rauscher 2008). Em geral, flores polinizadas

por abelhas apresentam peças florais de cor azul ou amarelo, mas raramente vermelho, uma vez que, essa cor é percebida como preto pelas abelhas. Em contrapartida, beija-flores, que usam principalmente sinais visuais para encontrar as flores, tendem a visitar por flores com colorações pronunciadas como o vermelho (Miller et al. 2011).

Assim como a coloração das peças florais, a emissão de compostos voláteis tem mostrado exercer grande influência na atração de polinizadores (Raguso 2008; Delle-Vedove et al. 2011; Bischoff et al. 2014; Dormont et al. 2014), embora sua importância tenha sido ignorada até recentemente (Raguso 2008). Estudos recentes têm demonstrado experimentalmente que cor e aroma podem ser igualmente importantes para o polinizador (Glover 2011; Klahre et al. 2011). Muitos visitantes florais orientam o seu comportamento de voo explorando, concomitantemente, as sinalizações visuais e olfativas fornecidas pelas flores (Burger et al. 2010; Milet-Pinheiro et al. 2012). A composição química do aroma floral tem sido investigado e caracterizado em algumas espécies vegetais (Knudsen et al. 2006; Schiestl 2010; Piechowski et al. 2009; Delle-Vedove et al. 2011; Bischoff et al. 2014; Dormont et al. 2014) embora, o potencial desse carácter, na mediação das interações com os polinizadores, ainda permanece pouco compreendida.

Cor e aroma parecem não estar somente associados como sinalizadores na atração de visitantes florais. Estudos têm evidenciado o compartilhamento de vias biossintéticas entre esses compostos. Isso sugere que combinações específicas entre aroma e cores podem ser resultados de processos bioquímicos relacionados já que antocianinas e compostos voláteis da classe dos aromáticos são derivados da fenilalanina (Zuker et al. 2002; Majetic et al. 2007; Sheehan et al. 2012).

O néctar é outra característica bioquímica importante e que estabelece uma relação direta com o tipo de polinizador, uma vez que é usado como a principal recompensa em plantas com flores e é consumida por uma grande variedade de animais (Baker e Baker 1983). Composto principalmente por açúcares, néctar também pode incluir aminoácidos, proteínas, lipídios e outras substâncias na sua composição. Especialmente para a proporção de açúcares (glicose, frutose e sacarose) no néctar, correlações têm sido estabelecidas para os diferentes sistemas de polinização. Em geral, flores visitadas principalmente por beija-flores, por exemplo, tendem a apresentar néctares predominantemente compostos de sacarose, enquanto aqueles visitados por morcegos e abelhas são predominantemente constituídos por hexose (Baker e Baker 1983; Galetto e Bernardello 2003). Outras características do néctar, como o volume secretado, concentração e composição de aminoácidos também podem apresentar relações com os polinizadores (Baker e Baker 1983; Pacini et al. 2003; Galetto e Bernardello 2003; 2005; Nicolson 2007; Amela Garcia e Gottsberger 2009).

As flores de *Passiflora*, principal gênero da família Passifloraceae, são exemplos de complexidade e diversidade entre as angiospermas, exibindo características peculiares em sua morfologia floral. Todas as espécies desse gênero, que compreende cerca de 600 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, apresentam um androginóforo que eleva todos os órgãos reprodutivos da flor (Cervi 1997; Ulmer e MacDougal 2004). A presença de uma corona de filamentos, entre o androginóforo e o perianto, também representa uma marcante característica de *Passiflora*, sendo a estrutura mais derivada e diferenciada de todos os gêneros da família (Janzen 1968; Ulmer e MacDougal 2004; Hemingway et al. 2011). Dentre outras características particulares da morfologia floral do

gênero destaca-se a presença do opérculo, situado no interior do tubo floral, a elaborada câmara nectarífera e o límen, que é uma estrutura em forma de anel ou uma membrana em forma de taça que circunda a base do androginóforo (Ulmer e MacDougal 2004).

A grande variabilidade de cor, tamanho, forma e padrões de fusão das estruturas florais de *Passiflora* spp., permitiram adaptação a diversos tipos de polinizadores como beija-flores (Janzen 1968; Fischer e Leal 2006; Varassin et al. 2001), morcegos (Sazima e Sazima 1978; Buzato e Franco 1992; Kay 2001) e diferentes espécies de abelhas e vespas (Koschnitzke 1997), tornando o gênero excelente candidato para estudos comparativos de sistemas de polinização.

Dentre os sistemas de polinização já descritos para *Passiflora*, a ornitofilia é o segundo maior sistema prevalecente no gênero (Pérez 2007). Geralmente, está associado a espécies que apresentam corola tubular vermelha, rosa ou laranja, corona com filamentos curtos e eretos em torno do androginóforo longo e baixa emissão de aromas, como descrito em *P. coccinea* e *P. speciosa*, que possuem flores com corona de filamentos curtos, pouco atrativos para insetos, flores vermelhas e rosas, respectivamente, com pétalas reflexas e longa coluna do androginóforo, facilitando a visita do agente polinizador (beija-flor; Fischer e Leal 2006; Longo e Fischer 2006).

A quiropterofilia foi descrita pela primeira vez no gênero em *P. mucronata* Lam (Sazima e Sazima 1978). Desde então, diversos estudos tem reportado a ocorrência dessa síndrome em outras espécies como: *P. ovalis* Vell. ex Roemer (Buzato e Franco 1992) e *P. penduliflora* Bert. (Kay 2001). Essas espécies polinizadas por morcegos compartilham características como antese noturna, flores brancas, androceu zigomórfico com as anteras voltadas somente para um lado da flor e um androginóforo curvo. Essa disposição dos

órgãos florais facilita o acesso dos morcegos à recompensa e permitem seu contato com as partes reprodutivas da flor, aumentando a eficiência da polinização (Sazima e Sazima 1978).

Destacado a ocorrência de diferentes sistemas de polinização no gênero *Passiflora* e como a variação dos caracteres florais pode estar associado aos diferentes grupos de polinizadores, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento de estruturas florais peculiares de espécies do gênero (androgínóforo e corona), bem como, os aspectos bioquímicos (cor, aroma e néctar) de espécies com diferentes sistemas de polinização (ornitofilia e quiropterofilia).

Para facilitar a compreensão, o estudo foi subdividido em três capítulos. No **capítulo I** foi apresentada uma série de evidências dos possíveis mecanismos associados ao desenvolvimento da curvatura do androgínóforo de *Passiflora mucronata*, característica morfológica de grande importância no estabelecimento das interações com morcegos. Nos **capítulos II e III** foi apresentada uma análise comparativa da composição dos principais caracteres florais que determinam os sistemas de polinização (morfologia, cor, aroma e néctar) entre *Passiflora coccinea* (espécie ornitófila), *Passiflora setacea* (espécie quiropterófila) e os híbridos interespecíficos provenientes do cruzamento e retrocruzamento com as mesmas. Esses híbridos são genótipos comerciais produzidos pela Embrapa Cerrados / Transferência de Tecnologia, sendo eles: BRS Estrela do Cerrado (*P. coccinea* x *P. setacea*), BRS Rubiflora: (*P. coccinea* x Estrela do Cerrado) e BRS Roseflora (*P. setacea* x Estrela do Cerrado). Essas análises poderão auxiliar o entendimento da segregação desses caracteres florais bem como, colaborar para a melhor compreensão da evolução destes dois sistemas de polinização dentro do gênero *Passiflora*.

## Referências Bibliográficas

Abrahamczyk S, Souto-Vilarós D, Renner SS (2014) Escape from extreme specialization: passionflowers, bats and the sword-billed hummingbird. **Proceedings of the Royal Society B** 281: 20140888

Amela García MT, Gottsberger G (2009) Composition of the floral nectar of different subgenera of Argentinian *Passiflora* species. **Plant Systematics and Evolution** 283: 133-147

Baker HG, Baker I (1983) Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE, Little RJ (eds) Handbook of experimental pollination biology. Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp 117-141

Bischoff M, Jürgens A, Campbell DR (2014) Floral scent in natural hybrids of *Ipomopsis* (Polemoniaceae) and their parental species. *Annals of Botany* 113: 533-544

Bradshaw HD, Schemske DW (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. **Nature** 426: 176-178

Bradshaw HD, Wilbert SM, Otto KG, Schemske DW (1995) Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). **Nature** 376: 762-765

Burger H, Dötterl S, Ayasse M (2010) Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. **Functional Ecology** 24: 1234-1240

Buzato S, Franco ALM (1992) *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). **Plant Systematic and Evolution** 181: 261-267

Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G (2008) Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. **Plant Cell Environment** 30: 1381-1399

Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** 45: 1-92

Chittka L, Kevan PG (2005) Flower colours as advertisement. In **Practical Pollination Biology** (ed. A. Dafni, P. G. Kevan and B. C. Husband), pp. 157-230. Cambridge, ON, Canada: Enviroquest Ltd.

Cronk Q, Ojeda I (2008) Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. **Journal Experimental of Botany** 59: 715-727

Davies KM (2004) Important rare plant pigments. In: Davies, K.M. (ed.) **Plant Pigments and their Manipulation**. Annual Plant Reviews, Blackwell Press, UK, pp. 214-247

Delle-Vedove R, Juillet N, Bessière JM, Dormont L, Pailler T, Schatz B (2011) Colour-scent associations in a tropical orchid: three colours but two odours. **Phytochemistry** 72: 735-742

Dormont L, Delle-Vedove R, Bessière JM, Schatz B (2014) Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. **Phytochemistry** 100: 51-59

Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD (2004) Pollination syndromes and floral specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 35: 375-403

Fischer, E, Leal IR (2006) Effect of nectar secretion rate on pollination success of *Passiflora coccinea* (Passifloraceae) in the central Amazon. **Brazilian Journal of Biology** 66:29-41

Galetto L, Bernardello G (2003) Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? **Plant Systematics and Evolution** 238: 69-86

Galetto L, Bernardello G (2005) Nectar. In: Dafni A, Kevan P (Eds), **Pollination ecology: a practical approach**. Enviroquest Ltd, Cambridge, Ontario, Canada, pp 156-212

Glover BJ (2011) Pollinator attraction: the importance of looking good and smelling nice. **Current Biology** 21: 307-309

Grant V (1994) Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 91: 3-10.

Grotewold E. (2006) The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. **Annual Review Plant Biology** 57: 761-780

Harborne JB (1994) **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**. 1st ed. New York: Chapman & Hall/CRC

Heil M, Fiala B, Baumann B, Linsenmair KE (2000) Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. **Functional Ecology** 14: 749-757

Hemingway CA, Christensen AR, Malcomber ST (2011) B- and C-class gene expression during corona development of the blue passionflower (*Passiflora caerulea*, Passifloraceae). **American Journal of Botany** 98: 923-934

Hermann K, Kuhlemeier C (2011) The genetic architecture of natural variation in flower morphology. **Current Opinion in Plant Biology** 14: 60-65

Janzen DH (1968) Reproductive behavior in the Passifloraceae and some of its pollinators in Central America. **Behavior** 32: 33-48

Johnson SD (2006) Pollinator-driven speciation in plants. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. **Ecology and evolution of flowers**. Oxford: Oxford University Press, 295–310

Katerova Z, Todorova D, Tasheva K, Sergiev I (2012) Influence of ultraviolet radiation on plant secondary metabolite production. **Genetics and Plant Physiology** 2: 113-144

Kay E (2001) Observations on the pollination of *Passiflora penduliflora*. **Biotropica** 33:709-713

Kay KM, Sargent RD (2009) The role of animal pollination in plant speciation: integrating ecology, geography, and genetics. **Annual Review Ecology, Evolution and Systematics** 40: 637-656

Klahre U, Gurba A, Hermann K, Saxenhofer M, Bossolini E, Guerin PM, Kuhlemeier C (2011) Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic Loci for floral scent production. **Current Biology** 21: 730-739

Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Stahl B (2006) Diversity and distribution of floral scent. **The Botanical Review** 72: 1-120

Koschnitzke C, Sazima M (1997) Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica** 20: 119-126

Longo JM, Fischer E (2006) Efeito da taxa de secreção de néctar sobre a polinização e a produção de sementes em flores de *Passiflora speciosa* Gardn. (Passifloraceae) no Pantanal. **Revista Brasileira de Botânica** 29: 481-488

Lunau K, Fieselmann G, Heuschen B, van de Loo A (2006) Visual targeting of components of floral colour patterns in flower-naive bumblebees (*Bombus terrestris*; Apidae). **Naturwissenschaften** 93: 325-328

Majetic CJ, Raguso RA, Tonsor SJ, Ashman TL (2007) Flower color-flower scent associations in polymorphic *Hesperis matronalis* (Brassicaceae). **Phytochemistry** 68: 865-874

Martin C, Gerats T (1993) Control of pigment biosynthesis genes during petal development. **Plant Cell** 5: 1253-1264

Milet-Pinheiro P, Ayasse M, Schlindwein C, Dobson HEM, Dötterl S (2012) Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behaviour. **Behaviour Ecology** 23: 531-538

Miller R, Owens SJ, Rorslett B (2011) Plant and colour: flowers and pollination. **Optics & Laser Technology** 43: 282-294

Nicolson SW (2007) Amino acid concentrations in the nectars of Southern African bird-pollinated flowers, especially Aloe and Erythrina. **Journal of Chemistry Ecology** 33: 1707-1720

Pacini E, Nepi M, Vesprini JL (2003) Nectar biodiversity: a short review. **Plant Systematic and Evolution** 238: 7-2

Pérez JO (2007) **Study of the diversity of genus *Passiflora* L. (Passifloraceae) and its distribution in Colombia.** Doctoral Thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France

Piechowski P, Dötterl S, Gottsberger G (2009) Pollination biology and floral scent chemistry of the Neotropical chiropterophilous *Parkia pendula*. **Plant Biology** 12: 172-182

Proctor M, Yeo P, Lack A (1996) **The Natural History of Pollination.** Portland: Timber Press

Raguso RA (2008) Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 128: 196–207

Rausher MD (2008) Evolutionary transitions in floral color. **International Journal Plant Sciences** 169: 7-21

Sazima M, Sazima I (1978) Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. **Biotropica** 10: 100-109

Schiestl F (2010) The evolution of floral scent and insect chemical communication. **Ecology Letters** 13: 643-656

Sheehan H, Hermann K, Kuhlemeier C (2012) Color and scent: how single genes influence pollinator attraction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** 77: 117-133

Thomson JD, Wilson P (2008) Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. **International Journal of Plant Sciences** 169 :23-38

Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora, Passion flowers of the world*. Timber Press, Cambridge, UK

Varassin IG, Trigo JR, Sazima M (2001) The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** 136: 139-152

Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant** 3: 2-20

Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Forkmann G, Martens S, Neta-Sharir I, Weiss D, Vainstein A (2002) Modification of flower colour and fragrance by antisense suppression of the flavonone 3-hydroxylase gene. **Molecular Breeding** 9: 33-41



**CAPÍTULO I: Auxina e a constrição física exercida pelo perianto promovem a curvatura do androginóforo em *Passiflora mucronata* L. (Passifloraceae)**

**RESUMO**

A coluna do androginóforo, característica floral distintiva em flores de *Passiflora*, é curva em muitas espécies quiropterófilas do gênero. Esta é uma adaptação floral que facilita a polinização por morcegos. O entortamento ou flexão de órgãos vegetais são geralmente causados por estímulos ambientais (barreiras mecânicas, por exemplo) e pode envolver a distribuição diferencial de auxina. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos órgãos do perianto e o efeito de auxina na curvatura do androginóforo ao longo do desenvolvimento floral de *P. mucronata*, espécie polinizada por morcegos. O crescimento assimétrico do androginóforo, levando à flexão, ocorreu em um estágio avançado de desenvolvimento da flor. Removendo a restrição física exercida por órgãos do perianto ou tratamento com NPA, a flexão do androginóforo foi significativamente reduzida. Além disso, os androginóforos de plantas tratadas com 2,4-D foram mais curvos quando comparados ao controle. Uma maior expansão celular foi observada no lado dorsal dos androginóforos das plantas tratadas com 2,4-D e em ambos os lados do androginóforo de plantas tratadas com a NPA. Este estudo sugere que a restrição física exercida pelo perianto e a redistribuição de auxina promovem a curvatura do androginóforo em *P. mucronata* e pode estar relacionado com a evolução da quiropterofilia no gênero *Passiflora*.

**Palavras-chave:** Androginóforo, auxina, desenvolvimento floral, crescimento diferencial, *Passiflora*



**Auxin and physical constraint exerted by the perianth promote the androgynophore bending in *Passiflora mucronata* L. (Passifloraceae)**

**ABSTRACT**

The androgynophore column, a distinctive floral feature in passiflowers, is strongly crooked or bent in many *Passiflora* species pollinated by bats. This is a floral feature that facilitates the adaptation to bat-pollination. Bending of plant organs are generally caused by environmental stimulus (e.g. mechanical barriers) and might involve the differential distribution of auxin. Our aim was to study the role of the perianth organs and the effect of auxin in the bending of the androgynophore of the bat-pollinated species *P. mucronata*. Asymmetric growth of the androgynophore, leading to bending, occurs at a late stage of flower development. Removing the physical constraint exerted by perianth organs or treatment with NPA significantly reduced androgynophore bending. Additionally, the androgynophores of plants treated with 2.4-D were more curved when compared to control. A greater cellular expansion at the dorsal side of the androgynophores of plants treated with 2.4-D and in both sides of the androgynophores of plants treated with NPA. This study suggests that the physical constraint exerted by perianth and auxin redistribution promote the androgynophore bending in *P. mucronata* and might be related to the evolution of chiropterophily in the genus *Passiflora*.

**Keywords:** Androgynophore, auxin, flower development, differential growth, *Passiflora*



## **Introdução**

As espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) exibem uma gama de complexidade e diversidade floral. Acredita-se que a alta variabilidade da morfologia das flores de *Passiflora* é resultado de interações com uma vasta gama de polinizadores (Ulmer e MacDougal 2004; Aizza e Dornelas 2011). O androginóforo é uma estrutura floral presente em todas as espécies do gênero e suporta os órgãos florais férteis (Cervi 1997). Ele é composto por um ovário superior inserido numa longa coluna pelos quais os estames estão ligados. Os filamentos estaminais formam um tubo que rodeia ou encontra-se adnato a coluna (Ulmer e MacDougal 2004). O comprimento do androginóforo é variável entre as espécies de *Passiflora* e reflete uma adaptação ao tamanho de seus respectivos polinizadores (Aizza e Dornelas 2011). Nas espécies de *Passiflora* polinizadas por morcegos (quiropterofilia), o androginóforo é extremamente curvado e este atributo representa uma importante característica adaptativa para este sistema de polinização. As evidências da quiropterofilia em Passifloraceae foram descritas pela primeira vez em *Passiflora mucronata* (Sazima e Sazima 1978). Nesta espécie, o androginóforo curvo eleva o grupo de anteras e estigmas que se orientam para o lado ventral da flor, para o exterior da folhagem, facilitando o acesso dos morcegos ao nectário e, conseqüentemente, otimizando o contato do polinizador com os órgãos reprodutivos (Sazima e Sazima 1978; Ulmer e MacDougal 2004).

A flexão unidirecional de órgãos vegetais em resposta a uma pressão mecânica (resistência mecânica) tem sido caracterizada em diversos trabalhos (Goss e Russell 1979; Atwell 1993; Lucas et al. 2008a, b). O tegumento da semente, por exemplo, exerce uma pressão mecânica sobre a expansão do embrião resultando no encurvamento dos

cotilédones, especialmente nas dicotiledóneas (Mayer e Shain 1974; Welbaum et al. 1998). O crescimento da raiz também pode ser reorientado ao entrar em contato com uma barreira causando a flexão da mesma (Atwell 1993; Ritchter et al. 2009; Monshausen e Gilroy 2009) e observações semelhantes foram relatados para o crescimento de caules axiais (Mader 2005). Sazima e Sazima (1978) relataram que o cálice das flores de *P. mucronata* é composto por cinco sépalas e sua prefloração apresenta elevada resistência, uma vez que, durante a antese as sépalas se abrem com um rápido estouro (popping) causando movimentos em todo o ramo. A partir desta observação, levantou-se a hipótese de que o perianto pode estar agindo como uma restrição mecânica durante o desenvolvimento do androginóforo de *P. mucronata* e promovendo, em parte, a flexão deste órgão.

Evidências experimentais indicam que a curvatura de órgãos vegetais envolve a sinalização por auxina (Friml e Palme 2002; Blancaflor e Masson 2003; Lucas et al. 2008a;. Laskowski et al. 2008;. Zcai et al. 2009; Kumar et al. 2011). Essa sinalização desempenha um papel importante no desenvolvimento das plantas e nas respostas de crescimento de órgãos vegetais aos estímulos ambientais. Dentre os eventos controlados por auxina incluem a divisão, a expansão e a diferenciação celular, modulando o crescimento diversificado em processos de desenvolvimento (Smith 2008;. Vieten et al. 2007). A distribuição de auxina em toda a planta ocorre principalmente por transporte polar (Muday e DeLong 2001; Vanneste e Friml 2009). Assim, a auxina é diferencialmente distribuída entre os tecidos, produzindo um gradiente de concentração que desencadeia respostas de desenvolvimento em diferentes partes da planta. Dependendo da concentração desse hormônio e a identidade do tecido, as auxinas podem estimular ou inibir o alongamento das

células em um dos lados de um determinado órgão, levando a um crescimento diferencial e, conseqüentemente, resultando na flexão do mesmo (Vanneste e Friml 2009).

No presente estudo, caracterizou-se o desenvolvimento do androginóforo de *P. mucronata*. Avaliou-se o possível papel do perianto como uma barreira física para o seu crescimento. Nós também averiguamos os efeitos da auxina e de inibidores do transporte polar da auxina sobre a curvatura do androginóforo. Nossos resultados podem contribuir para elucidar as vias de desenvolvimento sobre o qual mecanismos evolutivos, exercidos pela pressão seletiva de polinizadores, interferiram para fornecer a extraordinária diversidade de morfologias florais em *Passiflora*.

## **Materiais e Métodos**

### **Material vegetal e medidas do androginóforo**

Ramos reprodutivos com botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento de *Passiflora mucronata* foram selecionados em plantas cultivadas no campo experimental do Departamento de Biologia Vegetal, IB/UNICAMP em Campinas SP, Brasil. Os botões florais, em vários estádios de desenvolvimento (entre 5,0 e 40,0 mm de comprimento) foram coletados e medidos com paquímetro digital eletrônico (Worker Inc., USA). O comprimento do androginóforo foi medido a partir da distância de sua base até a base do ovário. Uma vez que a curvatura do androginóforo dificultou sua medida com um paquímetro, a medida foi realizada usando uma fita métrica flexível (Singer, Brasil). Os botões florais foram classificados em estádios de desenvolvimento de acordo com a posição do nó que ocupavam, em relação ao ápice (Nave et al. 2010; Sobol et al. 2014). Em média, a primeira folha, em *P. mucronata*, se desenrola no nó quatorze, que também contém um

botão floral com 10 mm de comprimento. As flores alcançam a antese por volta dos nós 22-24. De forma semelhante a *P. edulis* (Sobol et al. 2014), o plastocrono (taxa de formação de primórdios pelo meristema) em *P. mucronata* leva cerca de 2 dias, nessas condições de cultivo. Botões florais foram fotografados usando uma câmera SONY Cyber-shot DSC-HX100V.

### **Experimento para remoção do Perianto**

Para testar se a restrição mecânica exercida pelo perianto afeta a curvatura androginóforo, botões florais nos nós 15-16, medindo 12,0 - 17,0 mm de comprimento, tiveram 2 mm do perianto, a partir do ápice, cuidadosamente removidos com um bisturi estéril, evitando qualquer dano ao outras peças florais. Então, esses botões florais foram cobertos com sacos de plástico a fim de protegê-los do ataque de insetos e/ou perda de umidade. Flores controle foram deixadas intactas, mas também foram cobertas com sacos plásticos. Os botões florais permaneceram nas plantas até antese da flor. A curvatura do androginóforo das flores em que o perianto foi cortado foi medida e comparada com as flores controle. A curvatura do androginóforo foi definida pela medição do ângulo ( $\alpha$ ) formado entre o eixo apical / basal da base do androginóforo e o eixo longitudinal médio do ovário. As análises do ângulo de curvatura foram feitas utilizando o software Screen Protractor 4.0 (Iconico, Inc., [www.iconico.com](http://www.iconico.com)).

### **Tratamentos com auxina e com inibidor do transporte de auxina**

Com base em experimentos preliminares, decidiu-se usar a auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ao invés de ácido indol-acético (IAA), uma vez que, a

primeira mostrou-se mais estável e proporcionou resultados mais consistentes sob condições de campo. Foi utilizada a técnica de injeção pelo pedicelo descrita por Lin et al. (2011), em que se injeta 2,4-D, ácido naftil-p-talâmico (NPA) ou água (tratamento controle) nos ramos de *P. mucronata*, com as seguintes modificações: ramos de *P. mucronata* com botões florais que mediam cerca de 20 mm (nós 16-17) foram previamente selecionados para receber tratamentos. A ponta de uma seringa de 5 ml, foi ligado a um tubo de 50 milímetros de silicone flexível (diâmetro interno de 2,6 mm; diâmetro exterior de 4,8 mm), a qual foi, em seguida, ligado ao corte do pedúnculo de um botão floral em pré-antese (em torno do nó 22). Para isso, o botão floral foi removido e o seu pedúnculo foi cortado perpendicularmente usando uma lâmina de bisturi estéril e foi inserida dentro do tubo de silicone. Pelo menos 10 mm do pedúnculo floral foi inserido e a junção foi selada utilizando cola de silicone, resistente a água e não tóxica (INTERFIX 180, Brasil). Três mL de solução dos tratamentos (5  $\mu$ M 2,4-D, 10  $\mu$ M NPA ou de água Milli-Q® (controle) foram introduzidos na seringa, sendo as bolhas de ar presentes no tubo de silicone removidas com uma agulha hipodérmica e uma seringa (0,30x70, BD, Brasil). Como resultado, a solução foi capaz de entrar no tubo de silicone imediatamente. A abertura traseira das seringas foi selada com Parafilm ® para evitar a contaminação e as seringas foram fixadas ao corpo da planta numa posição vertical com fita plástica.

Após uma semana de tratamento, os botões florais que, no início do experimento estavam nos nós 16-17, tinha progredido para pré-antese (nó 20) e foram coletados para as medições. O comprimento máximo dos botões florais e dos androginóforos, bem como o ângulo de curvatura dos androginóforos ( $\alpha$ ) das plantas tratadas e do controle foram medidos e comparados como descrito acima.

## **Microscopia**

Para a caracterização anatômica, os androginóforos de flores na antese, que foram submetidas aos tratamentos com 2,4-D, NPA ou controle, como descrito acima, foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4% (m/v). Amostras fixadas foram desidratadas em série crescente de etanol e embebidos em metacrilato (Historresina, Leica Instruments, Alemanha). Secções longitudinais (5 µm de espessura) foram obtidas utilizando um micrótomo rotativo de avanço automático (RM2125RT, Leica, Alemanha), coradas com azul de toluidina a 0,05% (O'Brien e McCully 1981) e montadas em Entellan (Fluka, Alemanha). A captura de imagem foi realizada em um microscópio Zeiss Axioskop-40 com câmera digital acoplada (Zeiss, Alemanha).

Para as análises micromorfométricas, o comprimento máximo de células parenquimáticas subepidérmicas, tanto do lado dorsal/convexo (CX) quanto ventral/côncavo (CE) das secções longitudinais foram mensurados usando o software Axioskop 1,0 (Zeiss, Alemanha). Pelo menos 10 células por secção foram medidas a partir de pelo menos 10 secções em torno da secção longitudinal média para cada repetição (n=3) do tratamento.

## **Análises Estatísticas**

Trinta botões florais e seus androginóforos foram medidos por tratamento para se obter valores médios. Foi realizada análise de variância (ANOVA), utilizando o software SAS/STAT para avaliar a significância dos resultados. Os valores médios de todos os dados experimentais foram comparados utilizando o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

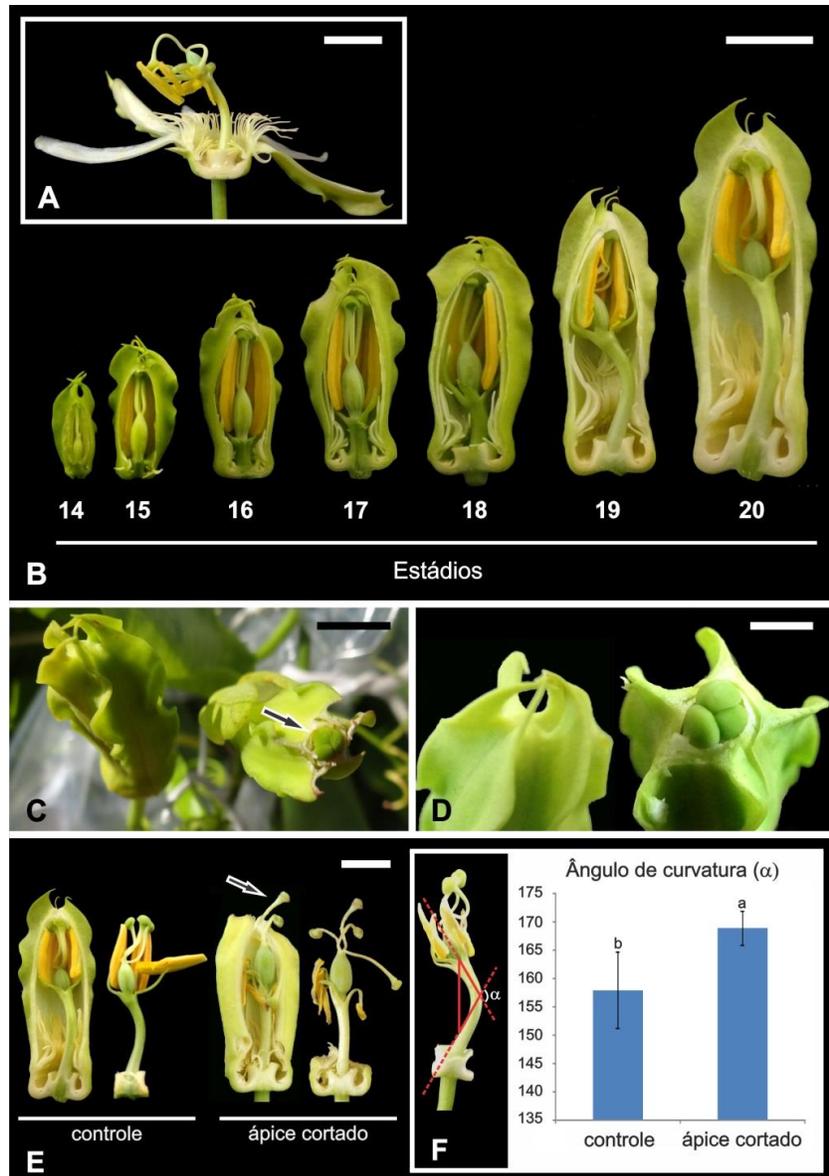
## Resultados

### Desenvolvimento do androginóforo de *P. mucronata*

A curvatura do androginóforo, característica de flores *P. mucronata*, é mostrada na Figura 1A. O arranjo das anteras orientadas para o lado ventral da flor, virada para fora em relação à planta, caracterizam as flores zigomorfas desta espécie.

A fim de caracterizar o desenvolvimento do androginóforo de *P. mucronata*, estudamos botões florais, longitudinalmente dissecados, em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 1B). Nas fases 14-15, o androginóforo não estava morfológicamente visível a olho nu, enquanto que nos estádios 16-17 encontrava-se reto e curto, constituindo menos de um terço do comprimento total do botão floral (Figura 1B). Nos estádios 14-15 as anteras e o pistilo ocupavam todo o comprimento dos botões florais e mais de dois terços dos botões nas fases 16-17. Nos estádios 16-18 o ovário ocupava uma posição mais ou menos central de botões florais. O androginóforo gradualmente aumentou de tamanho em relação ao botão floral, empurrando os órgãos reprodutivos para cima.

Nos estádios 17-18 ele começou a flexionar, sendo que os botões florais encontravam-se com cerca de 17-20 mm de comprimento (Figura 1B). Isto correspondeu a botões florais com cerca de uma semana antes da antese. No final das fases de pré-antese (nós ~ 19-20), o ovário foi localizado no terço superior dos botões florais e o androginóforo alongado era curvo (Figura 1B).



**Figura 1:** Desenvolvimento floral de *Passiflora mucronata*. (A) Flor em antese para mostrar a posição relativa dos órgãos florais. (B) Estádios morfológicos de desenvolvimento do botão floral. Fases estão numeradas de acordo com as diferentes posições do nó (em relação ao ápice). (C) Botões com o perianto cortado (lado direito), mostrando o estigma que cresce fora do botão (seta). (D) A maior ampliação dos botões florais exibidos em C. (E) Aspectos morfológicos da curvatura do androginóforo no controle e em plantas com o ápice cortada (seta) em fase de pré-antese (20). (F) Comparação da flexão do androginóforo a partir do ângulo de curvatura entre as plantas controle e corte ápice após a antese. As diferentes letras minúsculas acima das barras indicam resultados estatisticamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). As linhas barradas sobre as barras em F indicam o erro padrão. Barras: A-C e E: 10 mm; D: 5 mm.

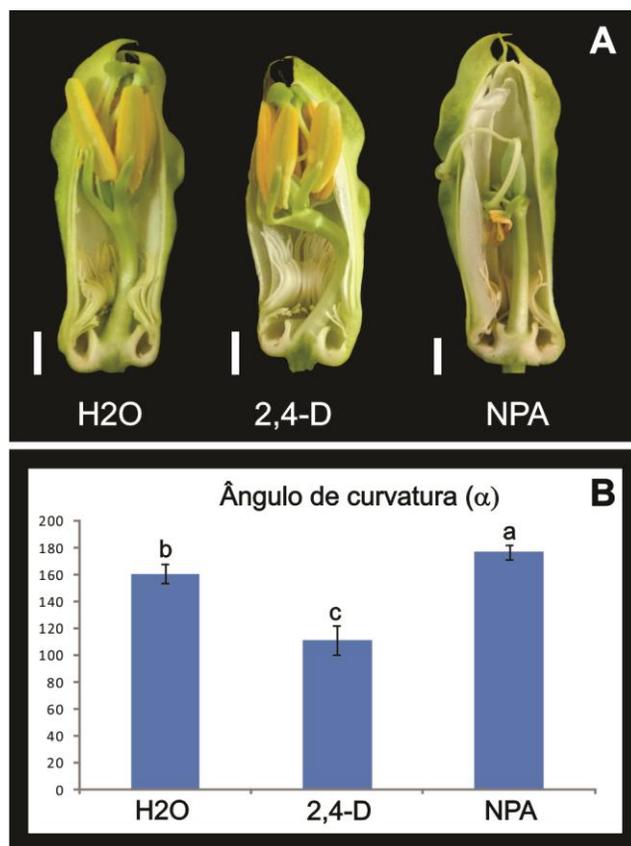
### **A barreira exercida pelo perianto afeta a flexão do perianto**

Os estigmas dos botões florais que tiveram o perianto cortado, geralmente emergiram a partir desses devido à remoção da barreira (Figura. 1C-E). Na antese, alguns dos botões florais com perianto cortado apresentavam sinais de injúrias nos órgãos reprodutivos, possivelmente devido à dessecação. Todos eles apresentaram um androginóforo quase reto (Figura 1E). O grau de flexão do androginóforo foi quantificado por medição do ângulo de curvatura ( $\alpha$ , ver Materiais e Métodos). O valor médio de  $\alpha$  em flores com perianto cortado foi  $168,9 \pm 3,0^\circ$ , em contraste com os botões do controle, com um perianto intacto, que mostraram  $\alpha = 158,1 \pm 6,7^\circ$  (Figura 1E) e esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). O comprimento do androginóforo de flores com o perianto cortado foi ligeiramente reduzido quando comparado ao grupo de flores controle (Figura 1E), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Isto pode ser devido a uma resposta a lesão causada por eliminação parcial do perianto ou devido propriedades de indução do crescimento exercidas pelo perianto. Não foram observadas diferenças no comprimento dos ovários, estiletos ou estigmas entre flores com perianto cortado e flores controle.

### **Auxina e inibidores do transporte polar de auxina afetam a flexão e crescimento do androginóforo**

Um aumento significativo na curvatura foi observado em plantas tratadas com 2,4-D, enquanto nas plantas tratadas com o NPA, o androginóforo foi quase completamente linear (Figura. 2A), sugerindo que o transporte polar de auxina desempenha um papel importante na flexão do androginóforo de *P. mucronata*. Consistentemente, as diferenças

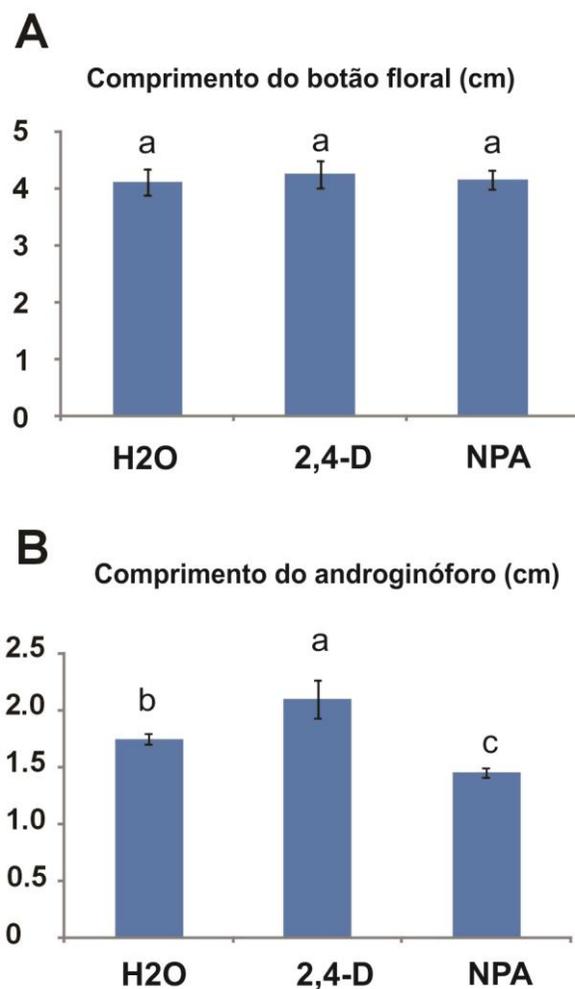
entre os valores médios de  $\alpha$  das plantas controle (tratados com água), e aquelas tratadas com 2,4-D e NPA ( $158,1 \pm 6.7^\circ$ ;  $111,6 \pm 10.7^\circ$  e  $177,0 \pm 5.2^\circ$ , respectivamente) foram estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ; teste de Tukey, Figura 2B).



**Figura 2:** Morfologia (A) e média do ângulo de curvatura (B) do androginóforo de *P. mucronata* de plantas controle (simulados / tratados com água) e plantas tratadas com 5  $\mu\text{M}$  2,4-D ou 10  $\mu\text{M}$  NPA. Todos os botões florais foram analisados na fase 20. Barras em (A) 5 mm. As linhas barradas sobre as barras indicam o erro padrão. Diferentes letras acima das barras indicam resultados estatisticamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

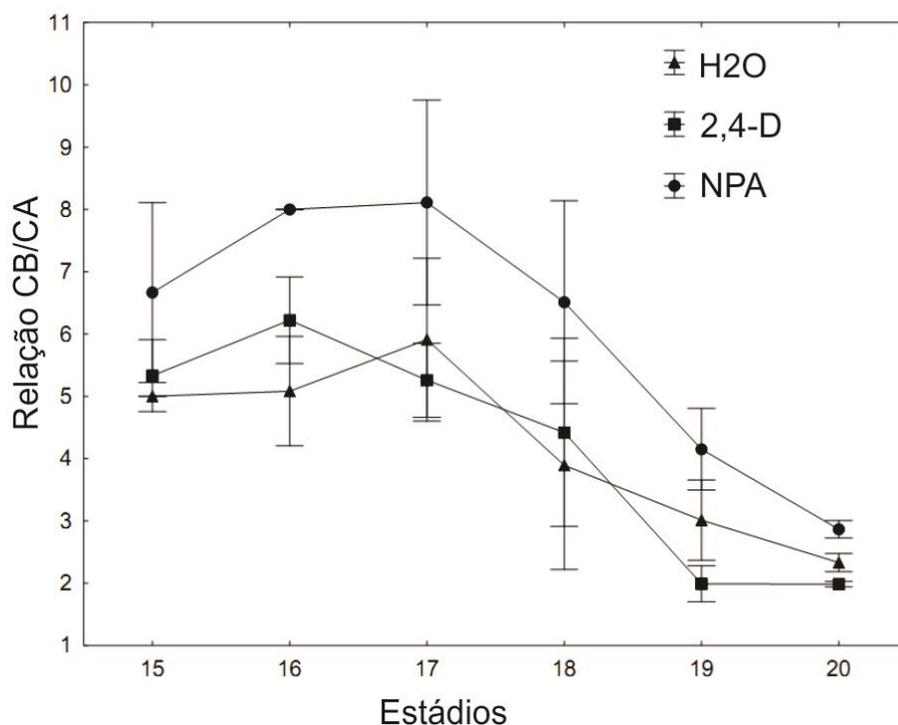
Nós levantamos a hipótese de que estas diferenças na curvatura podem ser devido ao crescimento diferencial do androginóforo e/ou do botão floral induzido por auxina. Embora não tenham sido detectadas diferenças no comprimento médio de botões florais

(Figura 3A), uma diferença significativa foi detectada no comprimento do androginóforo das flores tratadas com 2,4-D e NPA, quando comparado ao grupo controle (plantas tratadas com água). Os androginóforos dos botões florais tratados com 2,4-D foram significativamente mais longos e os de flores tratadas com NPA foram significativamente mais curtos do que os do controle (Figura 3B).



**Figura 3:** Comprimento dos botões florais (A) e do androginóforo (B) de plantas de *P. mucronata* controle (tratadas com água) e tratados com 5  $\mu$ M 2,4-D ou 10  $\mu$ M NPA. Todos os botões florais foram analisados na fase 20. As linhas barrados sobre as barras indicam o erro padrão. Diferentes letras acima das barras indicam resultados estatisticamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Também foi avaliada a relação entre o comprimento do botão floral (CB) e o comprimento do androginóforo (CA) de botões coletados em diferentes estádios de desenvolvimento após a aplicação dos tratamentos. Em plantas controle, as relações de CB/CA não permaneceu constante ao longo do desenvolvimento floral. Nos estádios iniciais (nós 15 - 17) o androginóforo ocupava em torno de 20% do comprimento total do botão, enquanto no estágio 20 ocupava 50% do comprimento total do mesmo (Figura 4). O aumento do crescimento do androginóforo após o estágio 17 mudou a posição relativa do pistilo e anteras dentro do botão floral (Figuras 1B, 4).



**Figura 4:** Relação entre o comprimento do botão floral (CB) e do androginóforo (CA), durante o desenvolvimento de botões florais de *P. mucronata* do controle ou plantas tratadas com 5  $\mu$ M 2,4-D ou 10  $\mu$ M NPA. A linha entre os estádios evidencia a tendência (trajeto) da relação CB/CA ao longo do desenvolvimento.

Botões florais submetidos aos tratamentos com 2,4-D e NPA mostraram o mesmo padrão geral de desenvolvimento observado nas flores controle. No entanto, a aplicação de 2,4-D induziu uma curvatura precoce do androginóforo. Nestas plantas, a proporção CB/CA foi significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) a partir do estágio de desenvolvimento 16 em diante, quando o androginóforo começou a flexionar (Figura 4). Esta característica foi melhor percebida nas fases finais (após a etapa 20), quando o androginóforo de plantas tratadas com 2,4-D apresentou maior curvatura em relação ao controle (Figura 5).

Em alguns botões florais, a forte curvatura foi acompanhada por um desenvolvimento anormal dos órgãos reprodutivos que não mostram a distribuição unilateral, típico da síndrome de quiropterofilia (por exemplo, compare as posições do estigma e das anteras das plantas controle com aquelas com androginóforo tratado com 2,4-D no estágio 21 da Figura 5). Os botões florais, submetidos ao tratamento com NPA apresentaram a maior razão CB/CA ao longo do desenvolvimento floral, sugerindo uma redução no crescimento do androginóforo (Figuras 4 e 5). Além disso, a distribuição zigomorfa das anteras e dos estigmas não foi observada (por exemplo, compare as posições do estigma e das anteras das plantas controle e tratadas com NPA no estágio 21 na Figura 5).

### **Expansão de células diferenciais contribui para curvatura androginóforo**

Para investigar os efeitos da aplicação exógena de 2,4-D ou NPA na curvatura do androginóforo de *P. mucronata* a nível celular, comparamos o comprimento médio de células parenquimáticas do lado dorsal/convexo e ventral/côncavo do androginóforo coletadas de flores em antese de plantas controle e também tratadas.



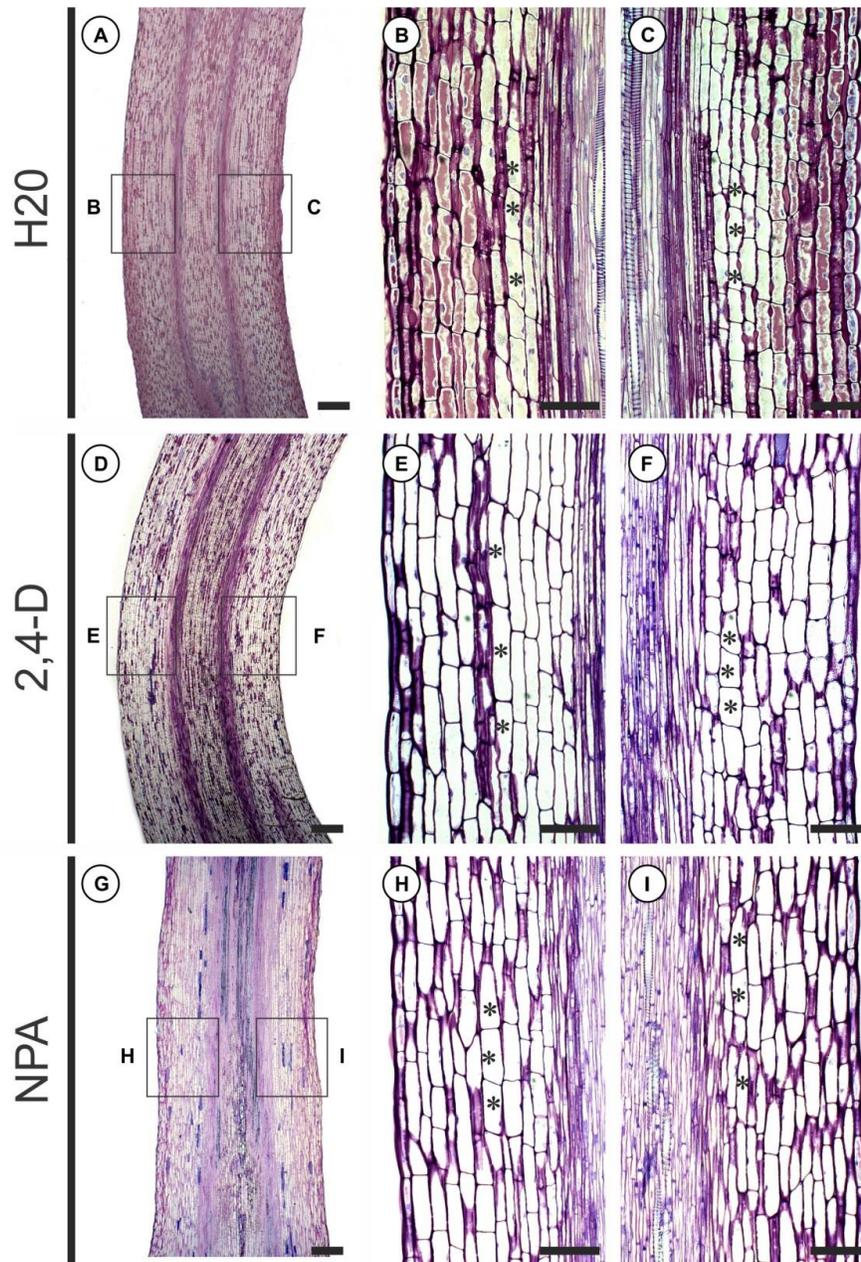
**Figura 5:** Efeitos morfológicos da aplicação de auxina exógena (2,4-D), inibidor do transporte de auxina (NPA) e água (controle) sobre os órgãos reprodutivos de botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento de *P. mucronata*. Barra: 10 mm.

Cortes longitudinais do androginóforo de *P. mucronata* mostraram uma organização anatômica básica consistindo de uma epiderme uniestratificada, cerca de 10 fileiras de células parenquimáticas, feixes vasculares relacionados com estames e carpelos e um tecido medular composto por cerca de 8 fileiras de células (Figura 6). Nas flores controle, a curva do androginóforo poderia ser explicada pela expansão diferencial das células parenquimáticas, que eram significativamente maiores do lado dorsal/convexo, quando comparados com aquelas no lado ventral/côncavo ( $p < 0,05$ ; Figuras 6A-C; Tab. 1).

Os androginóforos das flores tratadas com 2,4-D mostraram um crescimento diferencial exacerbado (Figuras 6D-F). Embora as células parenquimáticas dos androginóforos tratados com 2,4-D em seu lado ventral/côncavo mostraram um aumento significativo no comprimento de cerca de 80% quando comparado com o controle, as células parenquimáticas no lado convexo/dorsal foram 160% maiores do que aqueles do controle na mesma posição (Tabela 1). Assim, a razão significativamente maior ( $p < 0,005$ ) entre o comprimento celular do parênquima dos lados dorsal/convexo (CX) e ventral/côncavo (CE) (Figura 7) é a base celular das flores de androginóforos tratados com 2,4-D- aparecendo exageradamente curvos, quando comparados com o controle (Figuras 2, 5, 6D-F). No entanto, não podemos excluir que a divisão celular diferencial também está ocorrendo no presente caso.

Androginóforos das flores tratadas com NPA também mostraram células parenquimáticas mais longas quando comparado ao grupo controle (Figuras 6G-I; Tabela 1). No entanto, o androginóforo de flores tratadas com NPA apresentaram mais curtos que o controle (Figura 3B), sugerindo, assim, uma redução na divisão celular ou a influência de outro mecanismo compensatório. As células do parênquima localizados na parte proximal

(basal) dos androginóforo tratados com NPA foram ligeiramente mais longas do que aquelas localizados na parte distal (apical) (não estatisticamente significativo, dados não mostrados), provavelmente devido à acumulação de auxina na região da base do androginóforo prejudicando assim o transporte de auxina polar. No entanto, a expansão diferencial das células parenquimáticas entre os lados dorsal/convexas e côncavas/ventral do androginóforo foi observado no controle e nas flores tratadas com 2,4-D e não nos androginóforos tratados com NPA. Portanto, os androginóforos tratados com NPA apresentaram-se mais reto e com menor curvatura do que os observados nas flores controle e/ou aquelas tratadas com 2,4-D (Fig. 2, 5 e 6). Assim, a relação comprimento celular parenquimático CX/CE nos androginóforos tratados com NPA apresentou-se próximo de 1 (Figura 7).



**Figura 6:** Efeitos da aplicação exógena auxina e inibidor do transporte de auxina em *P. mucronata* na anatomia do androgínóforo. Todas as seções são longitudinais e medianas. (A-C) plantas controle (plantas tratadas com água - Mock). (A) Vista geral. As áreas marcadas em A são as faces dorsal/convexo (B) e ventral/côncavo (C) do androgínóforo, respectivamente. (D-F) Plantas tratadas com 5  $\mu\text{M}$  2,4-D. (G-I) Plantas tratadas com 10  $\mu\text{M}$  NPA. Note a diferença no comprimento das células parenquimáticas entre as faces dorsal e ventral de cada tratamento (\*). Barras: A, D e G: 400  $\mu\text{m}$ ; B, C, E, F, H e I: 100  $\mu\text{m}$ .

**Tablela 1:** Efeitos da aplicação de água (controle), 5  $\mu$ M 2,4-D ou 10  $\mu$ M NPA sobre o comprimento celular ( $\mu$ m).

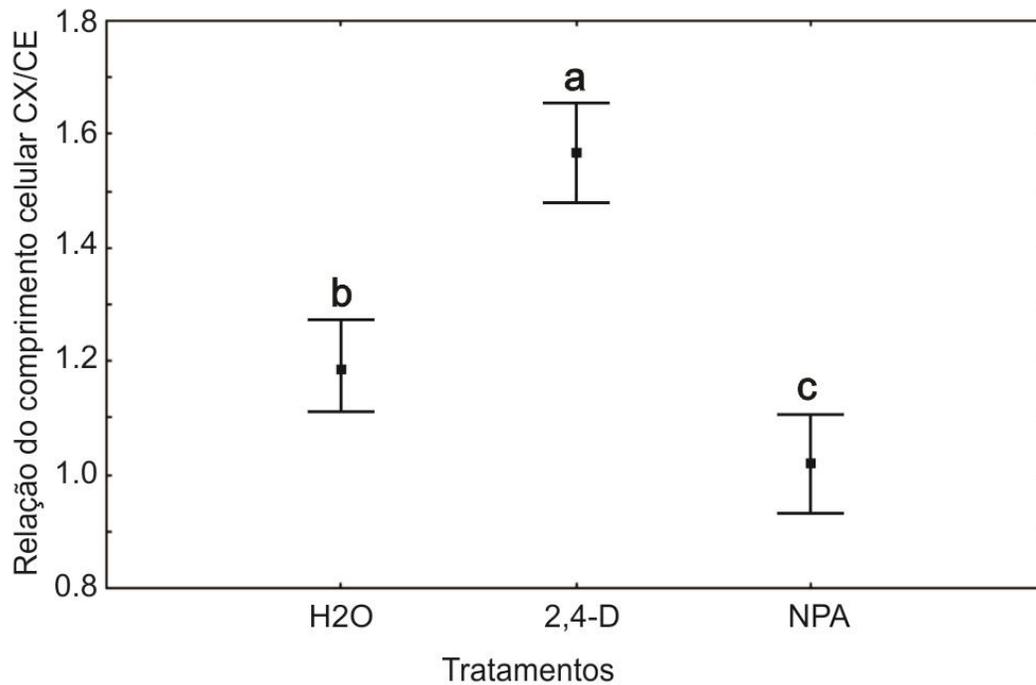
Tratamentos <sup>b</sup>	Comprimento celular ( $\mu$ m) <sup>a</sup>	
	Dorsal/convexo (CX)	Ventral/côncavo (CE)
H <sub>2</sub> O	101,7 $\pm$ 4,0 Ca	85,9 $\pm$ 3,0 Cb
2,4-D	164,8 $\pm$ 4,0 Aa	105,4 $\pm$ 6,3 Bb
NPA	132,5 $\pm$ 13,9 Ba	130,0 $\pm$ 13,3 Aa

## Discussão

### A barreira exercida pelo perianto afeta a curvatura do androginóforo

A flexão de órgãos vegetais devido a limitações mecânicas exercidas pelo ambiente é bem conhecida, tanto como crescimento aéreo quanto radicular, e podem ser reorientados ao entrar em contato com uma barreira física (Atwell 1993;. Richter et al. 2009; Monshausen e Gilroy 2009). No entanto, nestes casos, a flexão do órgão é dependente ou não de uma barreira física a ser encontrada. Os casos de resistência mecânica que levam à curvatura do órgão como parte do programa de desenvolvimento normal de uma planta são menos frequentes. A curvatura de cotilédones durante a expansão do embrião, causada pela barreira mecânica exercida pela lignificação do tegumento da semente pode ser o exemplo mais conhecido (Mayer e Shain 1974;. Welbaum et al. 1998). Nossos resultados indicaram que o perianto age como um obstáculo físico ao desenvolvimento do anginóforo de *P. mucronata* afetando a sua curvatura, uma vez que nos botões florais com o perianto parcialmente removido houve o endireitamento do androginóforo. Entretanto, a curvatura

de órgãos de plantas também pode ser devido ao crescimento diferencial que geralmente é mediado pela sinalização de auxina (Edelmann 2001; Friml e Palme 2002; Friml et al. 2002).



**Figura 7:** Relação do comprimento celular entre os lados dorsal/convexo (CX) e ventral/côncavo (CE) do androginóforo de *P. mucronata* de plantas controle (plantas tratadas com água) e plantas tratadas com 5  $\mu$ M 2,4-D ou 10  $\mu$ M NPA. As linhas barradas indicam o erro padrão da média (quadrado preto). As letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

### **Auxina e inibidores do transporte polar de auxina afetam a curvatura e crescimento do androginóforo**

O papel da sinalização por auxina na curvatura de órgãos vegetativos, especialmente devido à distribuição não uniforme de auxina em um dado tecido/órgão é bem conhecido (Friml e Palme 2002; Blancaflor e Masson 2003 ; Smith 2008; Vieten et al. 2007; Zacai et

al. 2009; Kumar et al. 2011). O papel da sinalização de auxina na curvatura de órgãos florais é menos documentado. Em espécies de *Alpinia* (Zingiberaceae), o transporte polar de auxina parece modular o estilete de curvatura em diferentes morfotipos (Luo et al. 2012). A aplicação de auxina exógena nas plantas de *P. mucronata* induziu um aumento da curvatura do androginóforo, indicando que a sinalização de auxina pode desempenhar um papel importante na morfologia floral, em espécies de *Passiflora* polinizadas por morcegos. Por outro lado, a aplicação de NPA, um inibidor do transporte polar de auxina produziu androginóforos mais curtos e retos, o que sugere que sua curvatura é dependente do transporte polar de auxina. No entanto, como demonstramos que a barreira física gerada pelo perianto causou a flexão do androginóforo, não podemos excluir a possibilidade de que outro componente químico, além de auxina, que alongue o androginóforo influenciará a curvatura ou, qualquer outro produto químico que encurte o androginóforo poderá conduzir à perda da mesma. Tendo dito isso, outro problema não resolvido permanece: a curvatura do androginóforo de *P. mucronata* sempre resulta em um lado dorsal/convexo e um lado côncavo/ventral. Nem a exagerada curvatura pela aplicação de auxina exógena ou a redução da mesma, ao alterar o transporte polar de auxina altera a direção da curvatura. Por conseguinte, seja qual for o mecanismo que determina o sentido do flexionamento do androginóforo, é aparentemente independente da auxina.

Outra característica importante das flores de *Passiflora* polinizadas por morcegos é o posicionamento assimétrico das anteras e os estigmas na antese. Eles são orientados para o lado ventral da flor, otimizando o contato do polinizador com os órgãos reprodutivos (Sazima e Sazima 1978; Ulmer e MacDougal 2004). A reorientação das anteras e os estigmas para alcançar um posicionamento assimétrico ocorre tardiamente no

desenvolvimento da flor e, de acordo com nossos resultados, também são dependentes do transporte polar de auxina.

### **Expansão celular diferencial contribui para a curvatura do androginóforo**

Auxina promove a curvatura do androginóforo de *P. mucronata* aparentemente devido à expansão diferencial de células parenquimáticas do lado dorsal/convexo do androginóforo em relação às células do lado côncavo/ventral. Embora prejudicando o transporte polar de auxina reduziu-se drasticamente a curvatura do androginóforo, células parenquimáticas de androginóforo tratados com NPA foram mais longas do que o controle, sugerindo que um mecanismo compensatório está no lugar do que deveria levar à redução do tamanho final do órgão. Tais mecanismos compensatórios têm sido descritos em outros sistemas (Danisman et al. 2012). Taxas de divisão celular e diferenças na proliferação celular são de difícil acesso a nível do órgão. Por conseguinte, não se pode excluir que, além de expansão celular, divisão celular está também envolvido no mecanismo curvatura do androginóforo de *P. mucronata*.

### **Curvatura do androginóforo e a evolução da quiropterofilia em *Passiflora***

As flores de *Passiflora mucronata* mostram diferentes características associadas com a polinização por morcegos. Além das características clássicas de flores polinizadas por esses animais, como antese noturna, perianto branco e cheiro pungente, esta espécie tem um androginóforo fortemente curvado (Sazima e Sazima 1978). Estas parecem ser características adaptativas à quiropterofilia. Acredita-se que a presença de um androginóforo curvado facilita o acesso dos morcegos aos nectários permitindo também, o

contato entre do polinizador com as anteras e estigmas da flor otimizando o processo de polinização (Sazima e Sazima 1978). Conseqüentemente, a compreensão do desenvolvimento do androginóforo e os mecanismos básicos envolvidos em sua curvatura são essenciais para a compreensão da evolução das flores polinizadas por morcegos em *Passiflora*. Androginóforo com curvaturas tem sido relatados em flores de diversas outras espécies de *Passiflora* polinizadas por morcegos distantemente relacionadas (Muschner et al. 2003), incluindo *P. ovalis* (Buzato e Franco, 1992), *P. galbana* (Varassin et al. 2001), *P. contracta* (Vitta e Bernacci 2004), *P. discophora*, *P. lobata*, *P. setacea*, *P. macropoda* (Ulmer e MacDougal 2004), *P. trisecta* (Hansen et al. 2006) e *P. recurva* (Fleming et al. 2009). Isto pode sugerir, pelo menos, dois cenários de evolução: 1) a curvatura do androginóforo de espécies filogeneticamente distantes (Muschner et al. 2003) é controlada por diferentes mecanismos, não relacionados (implicando assim a convergência morfológica); ou 2) a curvatura do androginóforo é o resultado de um mecanismo simples, universal que a mesma solução a esta pressão adaptativa foi recrutado várias vezes durante a evolução.

Considerando a importância dessa característica floral, os resultados obtidos no presente estudo contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa adaptação peculiar das flores de *Passiflora* à polinização por morcegos. Novas investigações em outras espécies de *Passiflora* quiropterófilas são de grande interesse a fim de determinar se os outros mecanismos estão envolvidos na curvatura do androginóforo.

## Referências Bibliográficas

Aizza LCB, Dornelas MC (2011) A role for pollinators in the “genomic tinkering” that modulates evolutionary changes in molecular networks controlling flower development. In: Yaish MW (ed), **The Flowering Process and its Control in Plants: Gene Expression and Hormone Interaction**. Research Signpost, Kerala, India: 51-69

Atwell BJ (1993) Response of roots to mechanical impedance. **Environmental and Experimental Botany** 33: 27-40

Blancaflor EB, Masson PH (2003) Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. **Plant Physiology**, 133: 1677-90

Buzato S, Franco ALM. (1992) *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution** 181: 261-267

Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** 45: 1-92

Danisman S, Van der Wal F, Dhondt S, Waites R, de Folter S, Bimbo A, van Dijk ADJ, Muino JM, Cutri L, Dornelas MC, Angenent GC, Immink RGH (2012) *Arabidopsis* class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. **Plant Physiology** 159: 1511-1523

Edelmann HG (2001) Lateral redistribution of auxin is not the means for gravitropic differential growth of coleoptiles: a new model. **Physiologia Plantarum** 112: 119-126

Fleming TH, Geiselman C, Kress WJ (2009) The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. **Annals of Botany** 104: 1017-1043

Friml J (2003) Auxin transport – Shaping the plant. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 7-12

Friml J, Palme K (2002) Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* 49: 273-284

Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. **Nature** 415: 806-809

Goss MJ, Russell RS (1979) Effects of mechanical impedance on root growth in barley. **Journal of Experimental Botany** 31: 577-588

Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31: 138-150

Kumar R, Tyagi AK, Sharma AK (2011) Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. **Molecular Genetics and Genomics** 285: 245-260

Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, ten Hove CA, Hogeweg P, Maré AFM, Scheres B (2008) Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport. **PLoS Biology** 6: e307

Lin YH, Lin MH, Gresshoff PM, Ferguson BJ (2011) An efficient petiole-feeding bioassay for introducing aqueous solutions into dicotyledonous plants. **Nature Protocols** 6: 36-45

Lucas M, Godin C, Jay-Allemand C, Laplaze L (2008a) Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation. **Journal of Experimental Botany** 59: 55-66

Lucas M, Guedon Y, Jay-Allemand C, Godin C, Laplaze L (2008b) An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One** 3: e3673

Luo Y-L, Bi T-J, Li D, Su Z-L, Tao C, Luo Y-J, Li Q-J (2012) Effects of indole-3-acetic acid and auxin transport inhibitors on the style curvature of three *Alpinia* species (Zingiberaceae). **Acta Physiologica Plantarum** 34: 2019-2025

Mader E (2005) **Ueki No Te Ire: the Japanese Art of Giant Bonsai**. Kingyo Press, St. Paul, USA: 62 pp

Mayer AM, Shain Y (1974) Control of seed germination. **Annual Review of Plant Physiology** 25: 167-193

Monshausen GB, Gilroy S (2009) Feeling green: mechanical signaling in plants. **Trends Cell Biology** 9: 228-235

Muday GK, DeLong A (2001) Polar auxin transport: Controlling where and how much. **Trends Plant Science** 6: 535-542

Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM, Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 90: 1229-1238

Nave N, Katz E, Chayut N, Gazit S, Samach A (2010) Flower development in the passion fruit *Passiflora edulis* requires a photoperiod-induced systemic graft-transmissible signal. **Plant, Cell and Environment** 33: 2065-2083

O'Brien TP, McCully ME (1981) **The study of plant structure principles and selected methods**, Termarcarphi Pty, Melbourne, Australia: 357pp

Richter GL, Monshausen GB, Krol A, Gilroy S (2009) Mechanical Stimuli Modulate Lateral Root Organogenesis. **Plant Physiology**, 151: 1855-1866

Sazima M, Sazima I (1978) Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. **Biotropica** 10: 100-109

Smith RS (2008) The role of auxin transport in plant patterning mechanisms. **PLoS Biology** 6 e323

Sobol S, Chayut N, Nave N, Kafle D, Hegele M, Kaminetsky R, Wünsche JN, Samach A (2014) Genetic variation in yield under hot ambient temperatures spotlights a role for cytokinin in protection of developing floral primordia. **Plant Cell and Environment** 37: 643-657

Ulmer T, MacDougal JM (2004) **Passiflora: Passionflowers of the world**. Timber Press Portland, USA: 430 pp

Vanneste S, Friml J (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. **Cell** 136: 1005-16

Varassin IG, Trigo JR, Sazima M (2001) The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** 136: 139-152

Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. **Trends in Plant Science** 12: 160-168

Vitta FA, Bernacci LC (2004) A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. **Brittonia** 56: 89-95

Welbaum GE, Bradford KJ, Yim KO, Booth DT, Oluoch MO (1998) Biophysical, physiological and biochemical process regulating seed germination. **Seed Science and Research** 8: 161-172

Zaccai M, Ackerman R, Genis O, Riov J, Zik M (2009) The bent peduncle phenomenon in roses is a developmental process involving auxin. **Plant Science** 176: 736-743



## **CAPÍTULO II: Caracterização da morfologia floral e composição do néctar em espécies de *Passiflora* com diferentes sistemas de polinização e seus híbridos interespecíficos**

### **RESUMO**

A morfologia floral, bem como, a coloração do perianto e composição do néctar possivelmente explicam as diferenças de polinizadores entre *Passiflora coccinea* (perianto vermelho, filamentos da corona curto, polinizadas por beija flores) e *Passiflora setacea* (perianto branco, antese noturna, polinizadas por morcegos). Nesse estudo, a morfologia floral e a composição química do néctar (açúcares e aminoácidos) foram analisadas de forma comparativa nessas duas espécies e nos híbridos provenientes do cruzamento e retrocruzamento com cada uma das espécies parentais. Em geral, *P. coccinea* e *P. setacea* apresentaram caracteres morfológicos e químicos do néctar consideravelmente diferentes e foram correlacionados com as preferências dos seus respectivos agentes polinizadores. Os híbridos não apresentaram características intermediárias entre as espécies parentais, exibindo um mosaico complexo de caracteres parentais e transgressivos. Nossos resultados também indicam maior similaridade entre os híbridos do que em relação as espécies *P. coccinea* e *P. setacea* e sugerem que os caracteres florais estudados apresentam um padrão complexo de herdabilidade, possivelmente controlado por mais de um loco.

Palavras-chave: Morfometria floral, néctar, *Passiflora*, híbridos, herdabilidade, sistemas de polinização



**Characterization of floral morphology and nectar composition in *Passiflora* species  
with different pollination systems and their interspecific hybrids**

**ABSTRACT**

The floral morphology, as well as, perianth colour and nectar composition account for differences between pollinators of *Passiflora coccinea* (red perianth, short corona filaments, hummingbird pollinated) and *Passiflora setacea* (perianth white, nocturnal anthesis, bat pollinated). In this study, the floral morphology and chemical nectar composition (sugars and amino acids) were analyzed comparatively in these two species and hybrids from crosses and backcross to each of the parental species. In general, *P. coccinea* and *P. setacea* presented both morphological and nectar characters significantly different to each other and were correlated with the preferences of their pollinators. The hybrids showed no intermediate characteristics between the parental species, showing a complex mosaic of parental and transgressive characters. Our results also indicate greater similarity among the hybrids than for *P. coccinea* and *P. setacea* species and suggest that the floral characters have a complex pattern of heritability, possibly controlled by more than one locus.

Keywords: floral morphometry, nectar, *Passiflora*, hybrids, heritability, pollination systems



## **Introdução**

A diversidade floral é um reflexo das interações especializadas-generalistas entre as espécies de plantas e seus polinizadores (Johnson 2006). Ao longo da história evolutiva das angiospermas, as interações planta-polinizador foram selecionadas, constituindo uma importante estratégia reprodutiva que atua de forma a otimizar as taxas de reprodução e fluxo de genes.

O sucesso da polinização biótica depende da compatibilidade entre a morfologia da flor e do seu polinizador cognato, permitindo uma eficiente transferência de pólen durante a visita do animal (Hermann e Kuhlemeier 2011). Além da morfologia floral, uma ampla gama de características florais parece estar sob uma seleção mediada por polinizadores em plantas (Harder e Johnson 2009). Dentre eles, estudos têm evidenciado a evolução dirigida por polinizador na coloração das flores (Bradshaw e Schemske 2003), aroma e néctar. O conjunto desses caracteres, associados com a atração de um grupo específico de polinizadores, aos quais flores de diferentes origens evolutivas podem convergir, definem os sistemas de polinização (Proctor et al. 1996, Hermann e Kuhlemeier 2011).

O néctar é uma solução que contém concentrações elevadas de mono- e dissacarídeos, principalmente frutose, glucose e sacarose, podendo apresentar, também, outros compostos como aminoácidos, lipídeos e minerais, em menores concentrações (Koptur 1994; Heil et al. 2000). Os açúcares constituem a principal fonte de energia para a maioria dos polinizadores e a variação da proporção de glicose, frutose e sacarose tem apresentado uma forte correlação com o tipo de polinização (Baker e Baker 1983; Galetto e Bernardello 2005). Além dos açúcares, a concentração de solutos, o volume secretado e a composição de aminoácidos também têm sido correlacionados aos diferentes tipos de

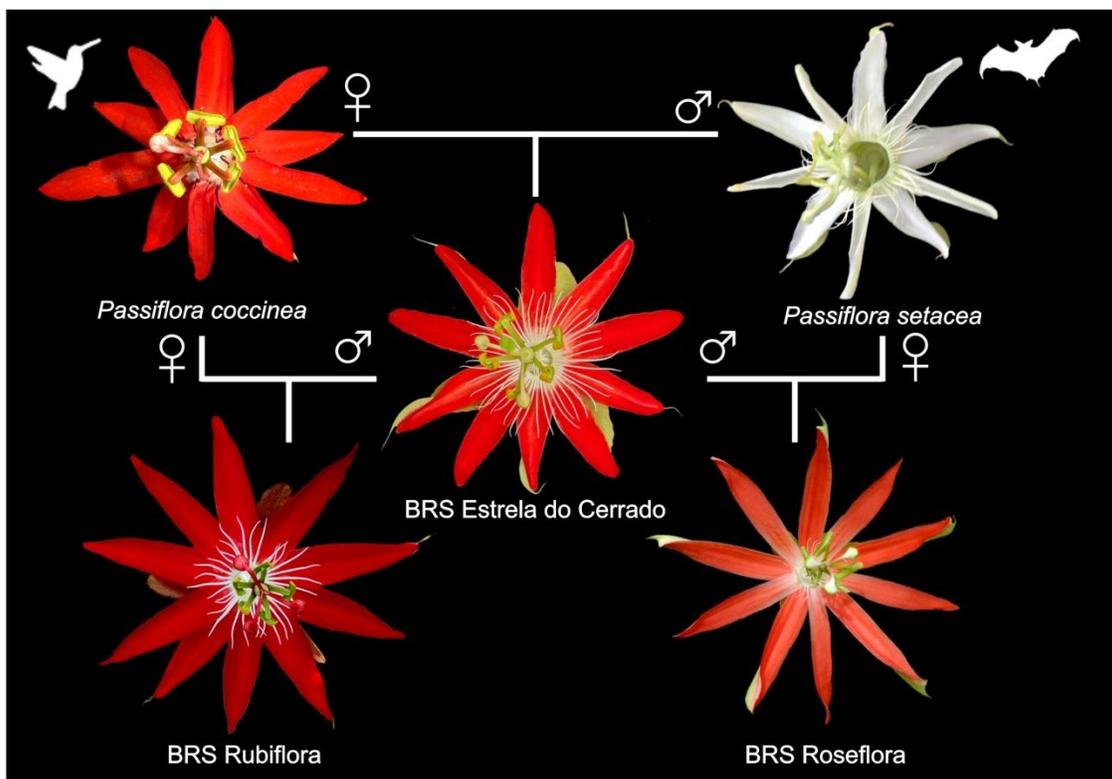
polinização, embora a associação com esse último carácter ainda seja pouco compreendida (Amela García e Gottsberger 2009; Nepi et al. 2012; Rodríguez-Penã et al. 2013).

As espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) são exemplos de complexidade e diversidade floral, exibindo características peculiares em sua morfologia (Aizza e Dornelas 2011). A grande variabilidade de cor, tamanho, forma e padrões de fusão das estruturas florais permitiram adaptação a diversos tipos de polinizadores como beija-flores (Janzen 1968; Longo e Fischer 2006), morcegos (Sazima e Sazima 1978) e diferentes espécies de abelhas e vespas (Koschnitzke e Sazima 1997), tornando o gênero excelente candidato para estudos comparativos de sistemas de polinização.

Recentemente, o desenvolvimento de híbridos interespecíficos de *Passiflora*, obtidos a partir do cruzamento e retrocruzamento entre *Passiflora coccinea* Aubl e *Passiflora setacea* D.C. representaram um interessante caso de hibridação entre espécies com diferentes sistemas de polinização. *P. coccinea* é uma espécie ornitófila. É constituída por um perianto vermelho, corona curta, tubular e se distribui, principalmente, na região amazônica (Fischer e Leal 2006). *P. setacea* é uma espécie quiropterófila. Apresenta antese noturna, perianto branco, filamentos da corona longos e está distribuída pela região sudeste do Brasil (Cervi 1997). A partir dessas espécies, três híbridos foram produzidos (Figura 1). O híbrido F1, denominado BRS Estrela do Cerrado e os híbridos provenientes do retrocruzamento de F1 com *P. coccinea* e *P. setacea*, denominados BRS Rubiflora e BRS Roseflora, respectivamente (Figura 1). Esse sistema tornou-se uma ferramenta importante para avaliar a segregação de caracteres florais que definem os diferentes sistemas de polinização (Figura 1).

As expectativas sobre diversidade fenotípica dentro de uma população de híbridos prevê uma gama complexa de fenótipos que podem ter uma base genética em alelos de um efeito aditivo ou em alelos que têm uma expressão mais complicada, por exemplo, em alelos dominantes ou em loci, interagindo entre si (Wilson e Jordan 2009).

Quando os híbridos apresentam um fenótipo intermediário, em relação às espécies parentais, dizemos que a divergência ocorreu através de alelos que apresentam efeito aditivo. Porém, os híbridos também podem se assemelhar à população parental ou apresentarem uma segregação transgressiva, demonstrando fenótipos extremos que estão fora da faixa de variação parental (Bell e Travis 2005; Ackermann 2010).



**Figura 1:** Cruzamento interespecífico entre *P. coccinea* e *P. setacea* e as relações com os híbridos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora, BRS Roseflora.

Destacado a ocorrência de diferentes sistemas de polinização no gênero *Passiflora*, nosso grupo de pesquisa tem-se dedicado em caracterizar os aspectos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento floral dessas espécies, bem como, compreender os mecanismos envolvidos na interação com os agentes polinizadores (Dornelas et al. 2006; Scorza e Dornelas 2011, 2014; Aizza e Dornelas 2011; Cutri et al. 2013; Rocha et al. 2015). No presente estudo, avaliou-se de forma comparativa a morfologia floral e composição do néctar de *P. coccinea* (espécie ornitófila), *P. setacea* (espécie quiropterófila) e dos híbridos BRS Estrela do Cerrado (*P. coccinea* X *P. setacea*), BRS Rubiflora (*P. coccinea* X BRS Estrela do Cerrado) e BRS Roseflora (*P. setacea* X BRS Estrela do Cerrado). Foi hipotetizado se o híbrido F1 apresenta um fenótipo intermediário entre as espécies parentais e se o mesmo comportamento é, também, observado nos híbridos provenientes do retrocruzamento. Esses resultados podem contribuir para a compreensão da evolução destes dois tipos de sistemas de polinização dentro do gênero *Passiflora*.

## **Materiais e métodos**

### **Material Vegetal**

Foram utilizadas amostras florais de populações de *Passiflora coccinea* Aubl e *Passiflora setacea* D.C., e dos híbridos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora localizadas nos campos experimentais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e no banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Cerrados), conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1:** Amostras coletadas de populações dos genótipos estudados, com suas respectivas localizações geográficas.

<b>Genótipo</b>	<b>Município</b>	<b>Localização</b>
<i>Passiflora coccinea</i>	Campinas – SP (UNICAMP)	22°48'S, 47° 03'W
	Planaltina – DF (Embrapa Cerrados)	15°36'S, 47°42'W
<i>Passiflora setacea</i>	Jaboticabal – SP (UNESP)	21°15'S, 48° 15'W
BRS Estrela do Cerrado	Campinas – SP (UNICAMP)	22°48'S, 47° 03'W
	Planaltina – DF (Embrapa Cerrados)	15°36'S, 47°42'W
BRS Rubiflora	Planaltina – DF (Embrapa Cerrados)	15°36'S, 47°42'W
BRS Roseflora	Planaltina – DF (Embrapa Cerrados)	15°36'S, 47°42'W

### **Análises Morfométricas**

As flores utilizadas nas análises morfométricas foram coletadas durante o período de antese, no intervalo de até três horas após a sua abertura. Para a realização das medidas, as amostras foram seccionadas longitudinalmente e fotografadas com o auxílio de uma câmera digital (Samsung ES60). Foram analisadas 12 flores de cada genótipo. Para a determinação dos marcos e tomada de medidas vetoriais, as imagens foram analisadas com o programa tpsDIG (versão 2.16; Rohlf e Marcus, 1993). Foram determinados 20 pontos, usados como marcos e semi-marcos, que delimitavam as estruturas florais de interesse a serem analisadas e comparadas entre os genótipos, sendo eles: região de inserção do pedúnculo floral; extremidades basais do tubo floral; região de inserção, curvatura e ápice do opérculo; base e ápice dos filamentos das séries interna e externa da coroa; base, meio e ápice do androginóforo; base e ápice do ovário (Figura suplementar 1). As medidas

vetoriais obtidas foram tratadas, como proposto por Klingenberg (2010). Posteriormente, todas as análises de composição vetorial, uniformização dos dados e análises dos componentes principais (e suas covariâncias) foram realizadas de acordo com Blackith e Reyment (1971), com as modificações sugeridas por Rohlf e Marcus (1993) utilizando-se o programa MorphoJ (Klingenberg, 2010).

### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Botões florais de *P. coccinea*, *P. setacea*, e dos híbridos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora em diferentes estádios de desenvolvimento, foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4% (p/v) em tampão fosfato sob vácuo (aproximadamente 600 mmHg) por 20 minutos e conservados em geladeira (4°C). As amostras fixadas foram desidratadas em série de concentração crescente de acetona, secas ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha), dissecadas sob lupa binocular, montadas em suporte metálico com fita dupla-face e metalizadas com ouro coloidal (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital (LEO 435-VP, Cambridge, Inglaterra).

### **Composição de açúcares no néctar**

As amostras de néctar foram obtidas a partir de plantas adultas dos genótipos estudados situados no Banco de germoplasma de *Passiflora* da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, com exceção de *P. setacea*, no qual as amostras foram coletadas em Jaboticabal – SP (Tabela 1). A composição de açúcares no néctar foi verificada em nove

flores presentes em três indivíduos diferentes (três flores/indivíduo) de cada um dos genótipos. As amostras foram coletadas em flores não visitadas e, num período de até duas horas após a antese. Com o auxílio de capilares, 100 µl de néctar de cada flor foram colocados sobre papel cromatográfico Whatman #1 (Maidstone, England) e armazenados em freezer -20°C. Posteriormente, o néctar foi redissolvido em 1 mL de água destilada e a detecção dos açúcares foi realizada a partir da utilização de kits de quantificação de glicose, frutose e sacarose (Sigma-aldrich, USA). Esses kits se baseiam em métodos enzimáticos com elevada especificidade e sensibilidade. Após as reações serem realizadas, as concentrações de cada açúcar foram determinadas a partir de leituras em espectrofotômetro (Shimadzu, USA) no comprimento de absorbância de 340 nm.

### **Análise do perfil de aminoácidos**

A separação e análise de aminoácidos foi conduzida com base no sistema OPA (o-ftaldialdeído; Benson e Hare 1975; Jarrett et al., 1986) modificado por (Marur et al., 1994). Para cada amostra, uma alíquota de 20 µL de néctar foi misturada com 60 µL do reagente OPA (50 mg de OPA dissolvidos inicialmente em 1 mL de metanol, depois acrescidos de 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 e, no dia de uso, mais 10 µL de 2-mercaptoetanol para cada 1,25 mL de OPA-Borato). Após 2 minutos de reação com OPA, 10 µL da mistura foram injetados na coluna do HPLC (ODS-2 Superpac, tipo C18, 250 x 4,6 mm) eluída, com fluxo de 0,8 mL/min. por um gradiente formado por quantidades crescentes de metanol a 65% em relação ao tampão fosfato, pH 7,25 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 50 mM, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> - 50 mM, 1,5 mL de ácido acético glacial, 20 mL de tetrahydrofurano e 20 mL de metanol em 1 L de solução). O gradiente foi programado para aumentar a proporção de

20 a 58% de metanol nos primeiros 35 minutos, seguidos por 58 a 95% durante o período de 35 a 60 min. e de 95 a 100% entre 60 e 61 min. A saída da coluna foi monitorada por um detector de fluorescência (Shimadzu RF10AxL) ajustado em 265 nm (luz de excitação) e 450 nm (emissão de fluorescência).

A concentração de cada aminoácido nas amostras foi determinada pela relação entre a área dos picos integrados das amostras, aos picos integrados de um padrão comercial AAS-18 (Sigma®, USA) com os aminoácidos Aspartato, Glutamato, Serina, Histidina, Glicina, Treonina, Arginina, Alanina, Tirosina, Metionina, Valina, Fenilalanina, Leucina, Isoleucina, e Lisina, aos quais também foram adicionados os aminoácidos Asparagina, Glutamina e Ácido gamma-aminobutírico, todos à concentração de 50 nmol.mL<sup>-1</sup>.

## **Resultados**

### **Caracterização morfológica dos genótipos de *Passiflora***

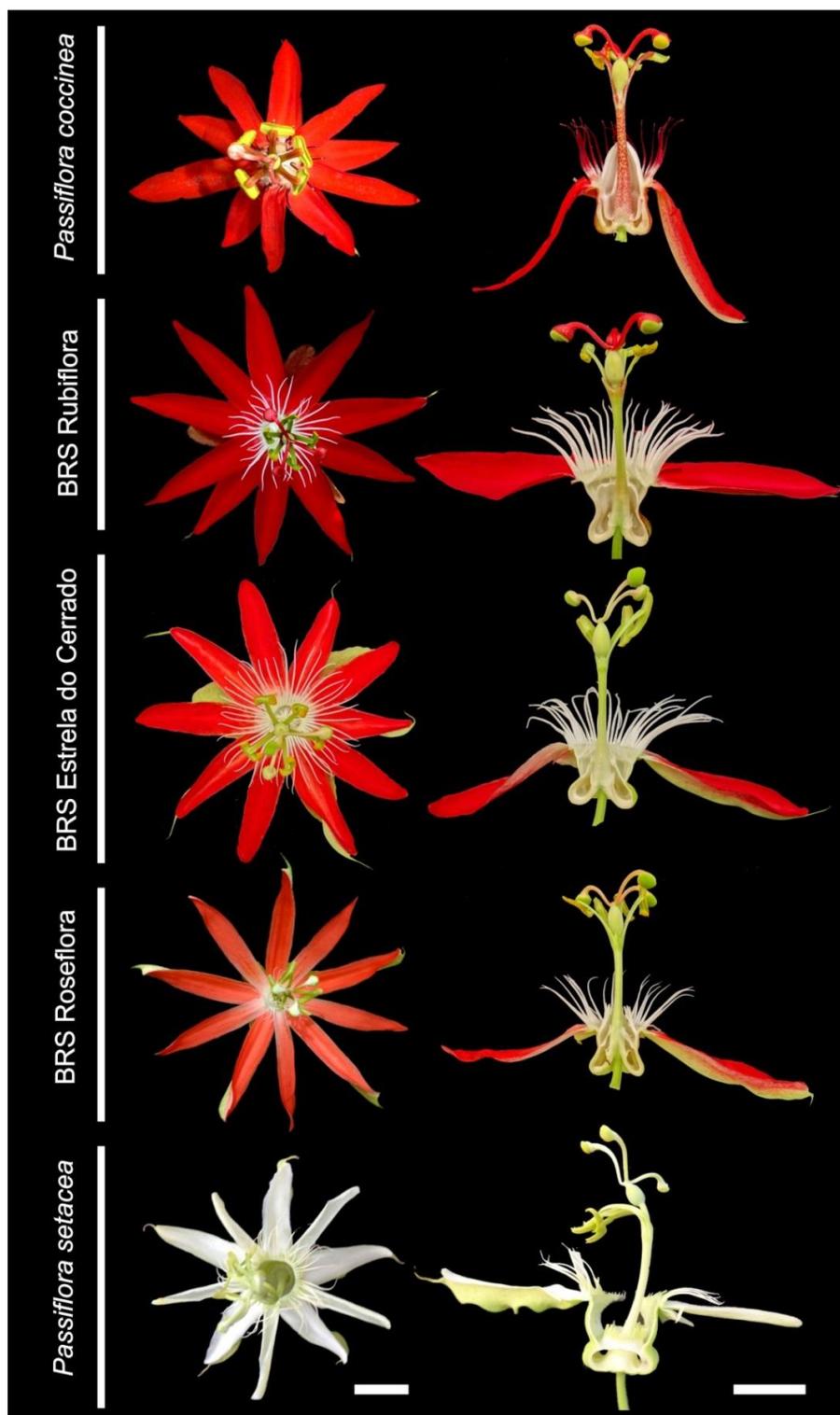
As flores de *P. coccinea* apresentaram perianto com sépalas e pétalas vermelhas, estiletos e filetes avermelhados, androginóforo longo e uma corona curta constituída por duas séries de filamentos. As flores de *P. setacea* eram constituídas por sépalas e pétalas brancas, estiletos e filetes esverdeados, androginóforo longo e curvo e uma corona formada por uma única série de filamentos brancos (Figura 2).

As flores do híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado (*P. coccinea* x *P. setacea*), apresentaram características de ambas às espécies genitoras, assim como, características intermediárias a esses genótipos. Esse híbrido possuía sépalas e pétalas vermelhas, porém com tonalidade menos intensa que em *P. coccinea*; filetes e estiletos esverdeados, como em *P. setacea*, androginóforo longo e corona com duas séries de filamentos, como descrito em

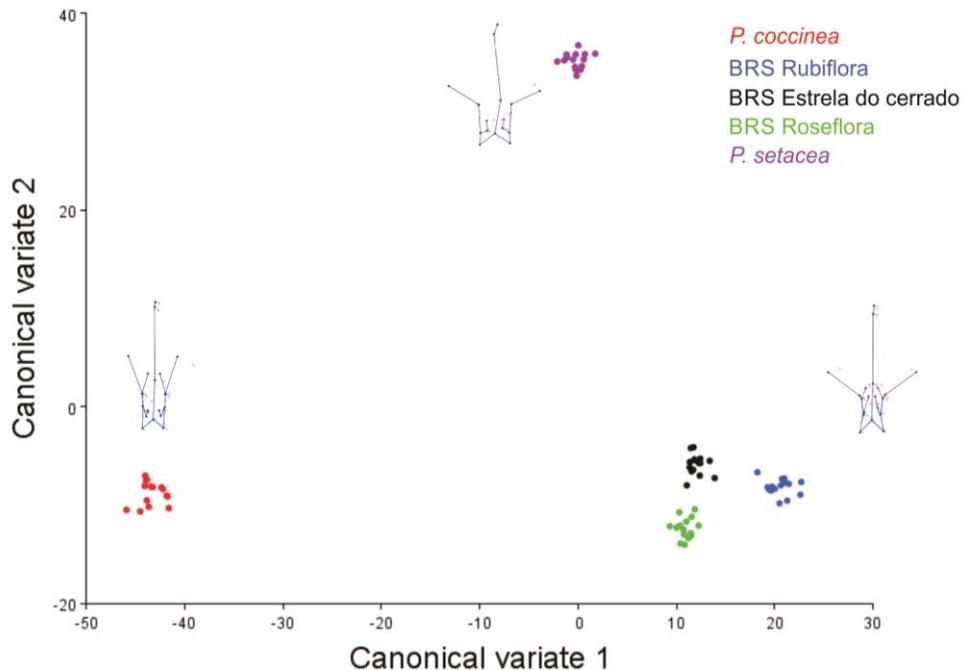
*P. coccinea*, porém brancos, como em *P. setacea* (Figura 2). O híbrido BRS Rubiflora (*P. coccinea* X BRS Estrela do Cerrado) possuía flores com brácteas roxo-avermelhadas, como em *P. coccinea*. As sépalas e pétalas eram vermelho-escuro, coloração mais intensa que à dos seus genótipos progenitores. A corona tinha duas séries de filamentos brancos e filetes esverdeados, como BRS Estrela do Cerrado, e estilete e estigma com a parte dorsal vermelha, herança de *P. coccinea*.

Em BRS Roseflora (*P. setacea* X BRS Estrela do Cerrado), as flores apresentaram pétalas e sépalas vermelho-alaranjado, intermediária a dos progenitores. Os filetes e estiletes eram verdes, como em *P. setacea*. O androginóforo era longo e reto e a corona possuía duas séries de filamentos brancos, como observado em BRS Estrela do Cerrado (Figura 2).

A partir da análise multivariada dos caracteres morfológicos florais, as amostras dos cinco genótipos de *Passiflora* constituíram grupos distintos ao longo dos eixos CV1 e CV2, que explicaram 57,53% e 35,22% da variação morfológica observada, respectivamente (Figura 3). O eixo CV1 refletiu a variação observada na estrutura do opérculo e no diâmetro da corona, uma vez que a maioria dos caracteres relacionado a esses caracteres contribuíram negativamente para o CV1. A variação no eixo CV2 foi menor e refletiu, principalmente, a largura do tubo floral e a curvatura do androginóforo. Em geral, os genótipos de *Passiflora* apresentaram uma morfologia floral significativamente diferente ( $p < 0.0001$ ). Embora, os grupos de cada um dos híbridos apresentaram-se mais próximos entre si (Figura 3), evidenciando maior similaridade morfológica entre os mesmos, em relação às espécies parentais, *P. coccinea* e *P. setacea*.



**Figura 2:** Morfologia floral de *P. coccinea* e *P. setacea* e dos híbridos interespecíficos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora, BRS Roseflora em vista frontal e em secção longitudinal. Barra = 20 mm.



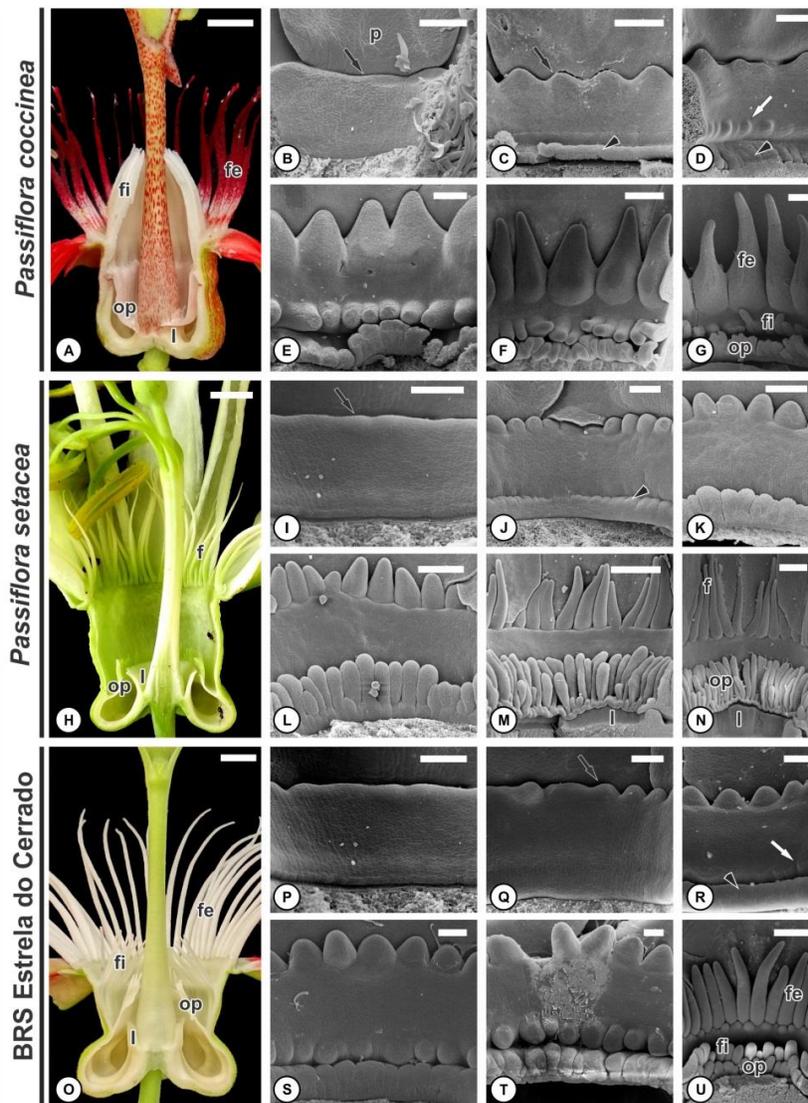
**Figura 3:** Análise de variáveis canônicas com as projeções dos indivíduos das espécies parentais *P. coccinea* e *P. setacea* e dos híbridos BRS Estrela do Cerrado (*P. coccinea* x *P. setacea*), BRS Rubiflora (*P. coccinea* x BRS Estrela do Cerrado) e BRS Roseflora (*P. setacea* x BRS Estrela do Cerrado). Cada um dos pontos no gráfico representa uma flor analisada; cada genótipo está representada por pontos de cores diferentes. As variáveis canônicas CV1 x CV2 explicam 92,75% da variação encontrada entre os materiais analisados. (ver também anexo 1).

### Desenvolvimento da coroa

Considerando que a estrutura do sistema de membranas, constituído pelos filamentos da coroa e opérculo, contribuíram significativamente para a separação dos genótipos (Figura 3), realizou-se uma análise micromorfológica comparativa do desenvolvimento dessas estruturas. *P. coccinea*, apresenta uma coroa tubular ereta, constituída por duas séries distintas de filamentos, sendo os filamentos internos mais unidos ao androginóforo (Figura 4A). O desenvolvimento da coroa iniciou-se como uma emergência na base do tubo floral (Figura 4B). Na porção superior da emergência, deu

início à formação dos filamentos externos, enquanto na porção inferior o opérculo como um crescimento anular (Figura 4C). O opérculo expandiu-se em direção à base do androginóforo e simultaneamente iniciaram-se a formação dos primórdios da segunda série de filamentos da corona, logo acima do dessa estrutura (Figura 4D). Num estágio posterior, o opérculo elevou-se em direção ao androginóforo (Figura 4E). Os filamentos das duas séries da corona apresentam um crescimento gradual, sendo que os filamentos filiformes da série externa apresentam-se mais alongados e unidos na base, enquanto os filamentos da série interna são menores (Figura 4E-G). No final do desenvolvimento, o opérculo mostrou-se recurvado, unido na base e denticulado na extremidade (Figura 4G).

Em *P. setacea*, a corona é constituída por somente uma série de filamentos e uma grande separação espacial é observada entre os filamentos da corona e o opérculo, nas flores completamente desenvolvidas (Figura 4H). Contudo, o desenvolvimento inicial desses órgãos foi similar ao processo descrito anteriormente, a partir de uma pequena emergência do tubo floral (Figura 4I). Na porção superior, iniciou-se a formação da única série de filamentos (Figura 4I-J) e na porção inferior deu início à formação do opérculo (Figura 4J). Os filamentos da corona apresentaram um crescimento gradual, a partir do mesmo nível de inserção e totalmente livres. O opérculo tornou-se plicado verticalmente, mas unido na base (Figura 4K-M). Durante esses estádios foi possível observar o desenvolvimento do hipanto e o afastamento desses órgãos (Figura 4K-M). Em estágio tardio de desenvolvimento verificou-se os filamentos livres e alongados da corona, o opérculo unido na base e denticulado na extremidade e o início do desenvolvimento do límen abaixo do opérculo (Figura 4M-N).



**Figura 4:** Desenvolvimento da coroa em *Passiflora coccinea*, *Passiflora setacea* e do híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado. **(B-G, I-N, P-U)** Micografias em microscopia eletrônica de varredura; **(A-G)** *P. coccinea*. **(A)** Morfologia da flor; **(B)** Início da formação da série externa de filamentos (seta); **(C)** Primeiros filamentos na porção superior (seta) e opérculo na porção inferior (cabeça de seta); **(D)** Início do desenvolvimento da segunda série de filamentos (seta branca); **(E-G)** Expansão dos filamentos da coroa; **(H-N)** *P. setacea*; **(H)** Morfologia da flor; **(I)** Início da formação da série externa de filamentos (seta); **(J)** Formação do opérculo na porção inferior (cabeça de seta); **(K-N)** Expansão dos filamentos da coroa e do opérculo. Note em **(M)** o início do desenvolvimento do límen e a base unida do opérculo (cabeça de seta branca); **(O-U)** BRS Estrela do Cerrado. **(P)** Emergência do tubo floral no início do desenvolvimento; **(Q-R)** Primeiros filamentos na porção superior (seta) e opérculo na porção inferior e o início do desenvolvimento da segunda série de filamentos (seta branca); **(S-U)** Expansão dos filamentos da coroa. *Abreviaturas:* f, filamentos; fe, filamentos externos; fi filamentos internos; l, límen; op, opérculo; p, pétala. *Barras* (A, H, O= 0,5 mm; B-D, I-K, P-T= 100 µm; E= 50 µm; F, G, L, M= 200 µm; N, U = 500 µm).

Nos híbridos BRS Estrela do Cerrado (Figura. 4O-U), BRS Rubiflora e BRS Estrela do Cerrado (Figura suplementar 2), o início do desenvolvimento da corona foi similar à *P. coccinea*, como uma pequena emergência do tubo floral e em seguida os filamentos externos começaram a surgir na porção superior da emergência como pequenas protuberâncias (Figura 4P, Q), evidenciando os filamentos externos filiformes eretos. A formação do opérculo ocorreu na porção inferior da emergência (Figura 4Q, R). A segunda série de filamentos da corona teve início logo acima do opérculo (Figura 4R, S). No estágio tardio de desenvolvimento é possível observar o opérculo plicado e os filamentos filiformes da série externa e interna alongando-se (Figura 4T,U).

#### **Período de antese e secreção do néctar**

O período de antese das flores dos genótipos de *Passiflora* estudados variou de 06 à 11h de duração. As flores de *P. coccinea* apresentaram o menor período de vida útil. As flores abriram por volta de 05:00-05:30 h, começando a se fecharem às 11:00 h. Em *P. setacea*, a antese era noturna. A abertura das flores ocorreu às 20:00 h e permaneceram abertas até às 07:00 h do dia seguinte. Nos três híbridos, a antese era diurna, como observado em *P. coccinea*. No híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado, as flores abriram em torno de 10:00-10:30 h enquanto, em BRS Rubiflora e BRS Roseflora as flores abriram entre 09:00-09:30 h. Nesses três híbridos as flores se fechavam as 18:00 h.

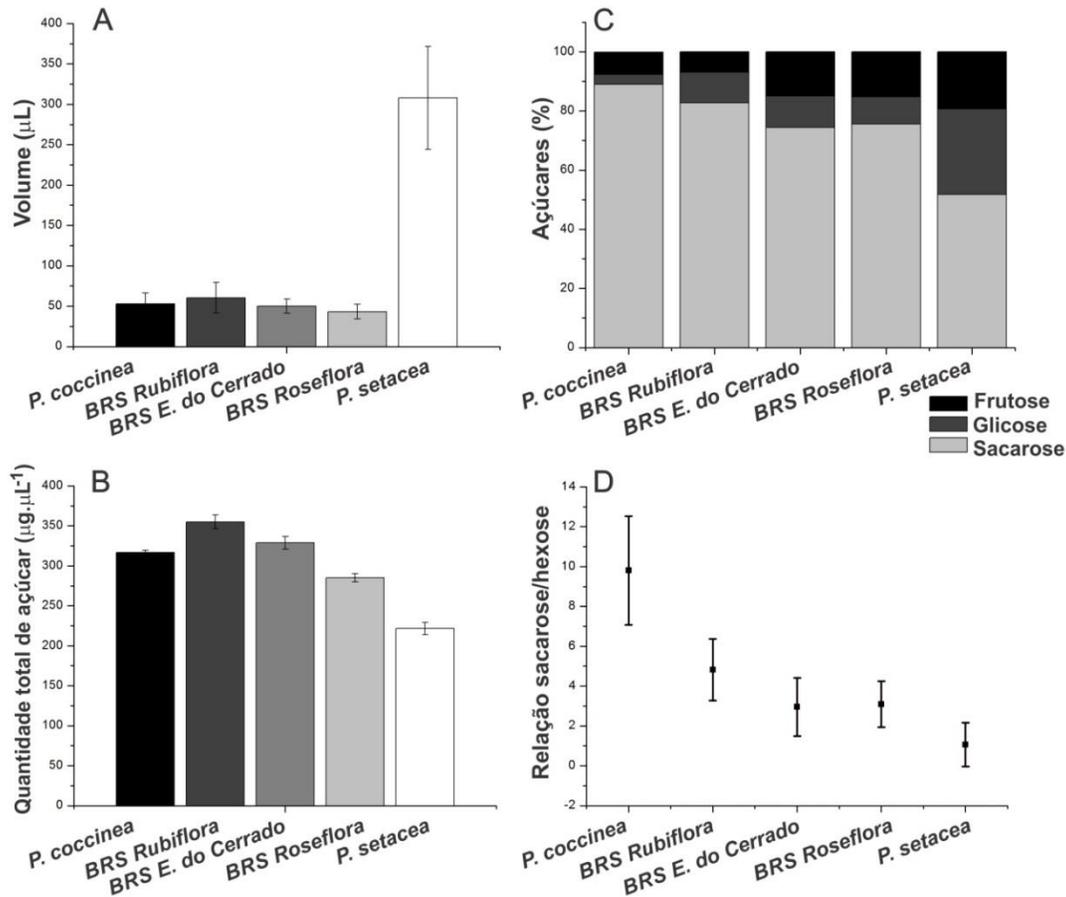
O néctar estava presente, em pequenas quantidades, desde a abertura das flores. O volume total médio secretado durante a vida útil das flores de *P. coccinea*, BRS Rubiflora, BRS Estrela do Cerrado e BRS Roseflora foi similar (45 – 60  $\mu$ L), não apresentando

diferenças significativas ( $P > 0.05$ ) entre esses genótipos. Em *P. setacea*, as flores secretaram volume seis vezes superior aos demais genótipos (Figura 5A).

### **Composição do néctar - Açúcares e Aminoácidos**

O néctar de *P. coccinea*, do híbrido F1 e do híbrido proveniente do retrocruzamento com *P. coccinea*, BRS Rubiflora, apresentaram concentrações superiores a 30% de solutos totais. Em *P. setacea* e BRS Roseflora a concentração do néctar era de 22% e 28%, respectivamente (Tabela 2). A quantidade total de açúcares também foi menor nesses dois últimos genótipos. A maior quantidade total de açúcares foi observada no genótipo que apresentou o néctar mais concentrado, BRS Rubiflora, seguido de BRS Estrela do Cerrado e *P. coccinea*, ambos não significativamente distintos ( $P > 0.05$ ; Figura 5B).

Frutose, glicose e sacarose estiveram presentes no néctar floral, em diferentes proporções, de todas as espécies / híbridos (Figura 5C; Tabela 2). A percentagem de cada açúcar foi relativamente constante dentro de cada genótipo, conforme os baixos valores de desvio padrão exibidos (Tabela 2). A percentagem média de sacarose foi superior a 50% em todos os genótipos, representando cerca de 90% total de açúcares do néctar de *P. coccinea* (Figura 5C; Tabela 2). Em *P. setacea*, a percentagem desse dissacarídeo foi de 51%, embora o néctar ainda fosse caracterizado sacarose dominante. Os híbridos apresentaram percentagens intermediárias de sacarose, em relação às espécies parentais (*P. coccinea* e *P. setacea*), sendo notada uma percentagem maior de hexose nos híbridos que apresentam herança direta de *P. setacea* (Figura 5C), o que acarretou numa diminuição gradativa da razão sacarose / hexose entre genótipos, sendo a menor razão observada em *P. setacea* (Figura 5D; Tabela 2).



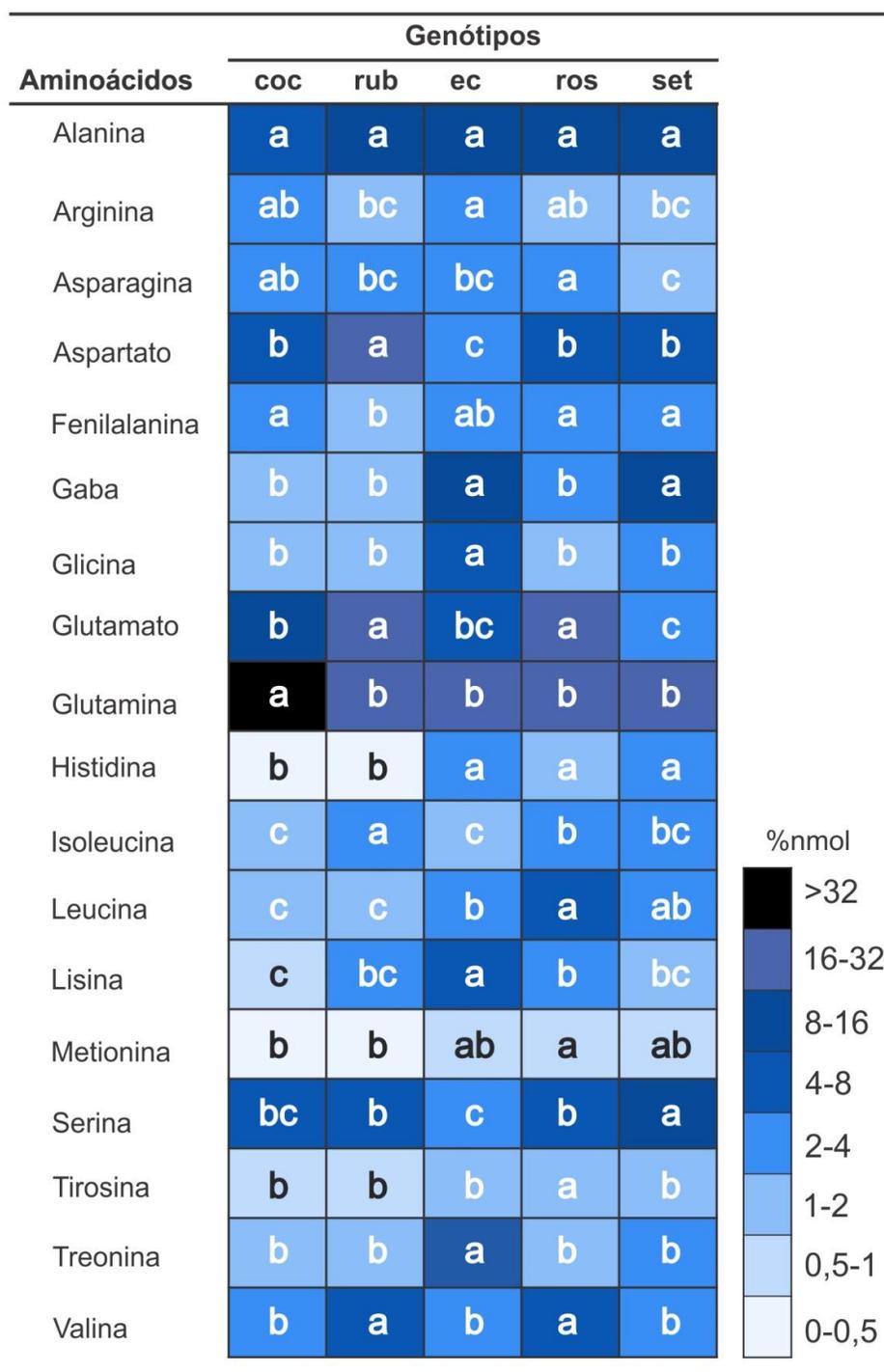
**Figura 5:** Volume de néctar secretado (A), quantidade total de açúcar (B), quantidade relativa de açúcares (C) e relação sacarose / hexose (D) no néctar floral de *Passiflora coccinea*, *Passiflora setacea* e dos híbridos BRS Estrela do cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora.

A quantidade total de aminoácidos apresentou grande variação intragenotípica. Entretanto, a composição e a proporção dos aminoácidos foram conservadas entre amostras de um mesmo genótipo (Material suplementar 3). Dos aminoácidos analisados, histidina e metionina não foram detectados em *P. coccinea* e no híbrido BRS Rubiflora (Figura 6). Nos demais genótipos, a metionina foi observada em baixas proporções não sendo, detectada em uma das amostras do híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado. A lisina também

não esteve presente em uma das amostras de *P. coccinea* e *P. setacea* (Material suplementar 3).

**Tabela 2:** Quantidade total e composição de açúcares do néctar floral de *Passiflora coccinea*, *Passiflora setacea* e dos híbridos BRS Estrela do cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora.

<b>Genótipos</b>	<b><i>P. coccinea</i></b>	<b>BRS Rubiflora</b>	<b>BRS Estrela do Cerrado</b>	<b>BRS Roseflora</b>	<b><i>P. setacea</i></b>
Concentração (%)	31,67 ± 0,29	35,50 ± 0,87	32,83 ± 0,76	28,05 ± 0,50	22,17 ± 0,76
Quantidade total de açúcares (µg/µl)	316,60 ± 2,93	355,03 ± 8,71	328,69 ± 7,98	284,87 ± 5,07	221,68 ± 7,65
Quantidade total de açúcares (mg/lor)	16,66 ± 4,23	21,38 ± 6,19	16,50 ± 3,30	12,37 ± 2,85	68,35 ± 14,85
Glicose (%)	3,36 ± 0,64	10,42 ± 1,42	10,53 ± 0,83	9,14 ± 0,83	28,89 ± 4,17
Frutose (%)	7,58 ± 4,30	6,85 ± 0,34	14,98 ± 2,21	15,23 ± 2,58	19,34 ± 1,93
Sacarose (%)	88,98 ± 4,94	82,73 ± 1,53	74,46 ± 2,78	75,59 ± 3,29	51,76 ± 6,08
Sacarose / Hexose	9,8	4,82	2,95	3,15	1,05



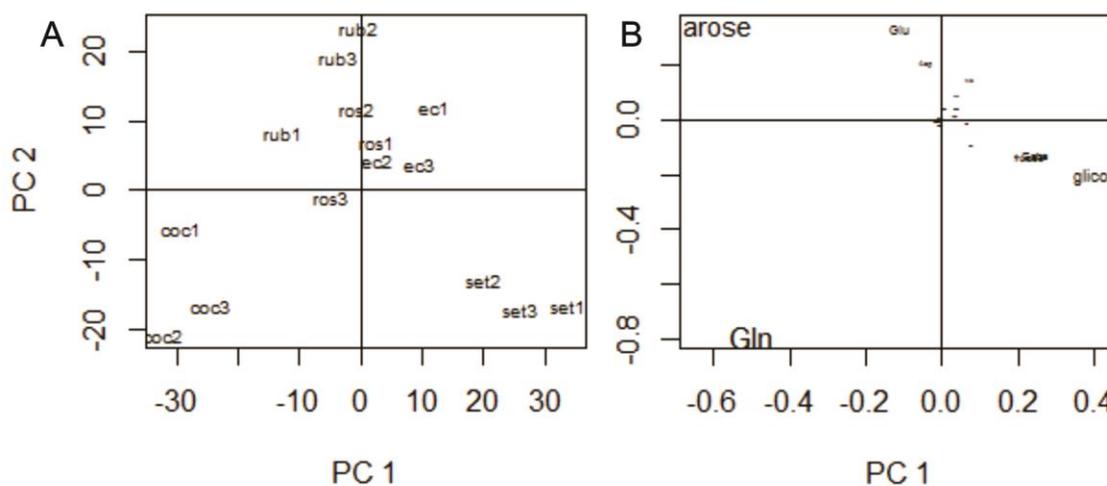
**Figura 6:** Mapa de calor representando as diferenças nas concentrações relativas (%nmol) de aminoácidos presentes no néctar floral de *Passiflora coccinea* (coc), *Passiflora setacea* (set) e dos híbridos interespecíficos: BRS Estrela do cerado (ec), BRS Rubiflora (rub) e BRS Roseflora (ros). Letras diferentes em cada linha representam médias (n = 3) significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0.05).

A glutamina foi o aminoácido mais abundante, em quatro dos cinco genótipos estudados (Material suplementar 3). Em *P. coccinea* e em *P. setacea*, esse composto representou cerca de 50% e 26% dos aminoácidos presentes no néctar floral, respectivamente. Nos demais híbridos a sua proporção variou de 30 à 15% (Figura 6; Material suplementar 3) . Em BRS Rubiflora, o glutamato e o aspartato foram os aminoácidos que apresentaram-se em maiores proporções no néctar (Figura 6). O glutamato também foi detectado em elevada concentração no néctar floral de BRS Roseflora (Figura 6). A espécie *P. setacea* e o híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado, foram os genótipos que apresentaram grande similaridade, quanto à composição de aminoácidos. Além da glutamina, esses genótipos também apresentaram elevadas concentrações de GABA (Figura 6). Apesar da grande variabilidade intraespecífica, a quantidade total de aminoácidos (nmol/flor) não diferiu significativamente entre os genótipos ( $P > 0,05$ ; Tabela 3).

**Tabela 3:** Quantidade total e número de aminoácidos identificados no néctar floral de *Passiflora coccinea*, *Passiflora setacea* e dos híbridos BRS Estrela do cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora.

Genótipos	<i>P. coccinea</i>	BRS Rubiflora	BRS Estrela do Cerrado	BRS Roseflora	<i>P. setacea</i>
Número de aminoácidos	15 – 16	16	17-18	18	17-18
Quantidade total de aminoácidos (nmol/flor)	36.23 ± 18.05	33.11 ± 13.38	48.52 ± 26.98	60.64 ± 27.05	57.25 ± 15.11
Plantas	3	3	3	3	3

A análise de componentes principais mostrou que os eixos da componente um (PC1) e dois (PC2) forneceram separações das 15 amostras para a composição de açúcares e aminoácidos identificados no néctar floral de cada genótipo. PC1 x PC2 representaram 86,7% da variação. As amostras ( $n=3$ ) dos cinco genótipos foram separadas em três grupos. As espécies parentais, *P. coccinea* e *P. setacea* apresentaram uma composição claramente distinta, sendo as amostras de cada uma dessas espécies agrupadas em diferentes grupos localizados em lados extremos do eixo PC1. As amostras dos híbridos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora não apresentaram uma separação evidente, constituindo o terceiro grupo, localizado na região central do eixo PC1, entre os grupos de *P. coccinea* e *P. setacea* (Figura 7). As variáveis: sacarose, glicina e glicose foram as mais importantes para a separação das amostras (Figura 7).



**Figura 7:** Análise de componentes principais para amostras ( $n=3$ ) de *Passiflora coccinea* (coc), *Passiflora setacea* (set) e dos híbridos BRS Estrela do cerrado (ec), BRS Rubiflora (rub) e BRS Roseflora (ros). Separação dos genótipos a partir dos dois primeiros componentes principais (PC1 x PC2) da composição de açúcares e aminoácidos do néctar floral (A) e os vetores correspondentes das variáveis utilizadas para análise do PCA (B). O tamanho dos nomes das variáveis evidencia a importância do carácter para a análise.

## Discussão

### A morfologia floral de *P. coccinea* e *P. setacea* estão associadas aos respectivos sistemas de polinização

Os genótipos de *Passiflora* apresentaram uma morfologia floral distinta entre si, como evidenciado pela análise multivariada. A variação interespecífica contrastante entre as amostras de *P. coccinea* e *P. setacea*, que foram agrupadas em regiões opostas dos eixos CV1 e CV2, podem ser reflexo de suas adaptações em relação aos seus respectivos agentes polinizadores. *Passiflora coccinea* e *P. setacea* apresentaram atributos florais típicos descritos para ornitofilia e quiropterofilia, respectivamente. A presença de sépalas e pétalas fletidas para baixo durante a antese, androginóforo reto e longo, corona tubular com filamentos filiformes que possuem a base unida e, conseqüentemente, ausência de uma plataforma de pouso são alguns dos caracteres que definem *P. coccinea* como espécie ornitófila (Longo e Fischer 2006; Fischer e Leal 2006; Aizza e Dornelas 2011). Acredita-se que o longo androginóforo e a corona tubular, constituída por filamentos curtos indicam uma especialização desta espécie a beija-flores. Esses agentes polinizadores teriam maior eficiência na transferência de pólen ao acessar a câmara nectarífera que está protegida pela corona tubular, dificultando o acesso de outros visitantes florais (Fischer e Leal 2006).

Em *P. setacea*, os caracteres florais relacionam-se com os agentes polinizadores de maneira diferente. Além das características clássicas de flores polinizadas por morcegos, como a antese noturna e perianto branco (Fleming et al. 2009), esta espécie apresentou o androginóforo curvo. Esse atributo tem sido reportado em diversas espécies quiropterófilas do gênero e parece ser uma característica adaptativa à morcegos, facilitando o seu acesso à câmara nectarífera e, conseqüentemente, o contato do polinizador nas anteras e estigma

(Sazima e Sazima 1978). Ao contrário de *P. coccinea*, a presença de apenas uma série filamentos da corona e a disposição com esses filamentos estão arranjos nas flores de *P. setacea*, parecem facilitar o acesso dos visitantes florais ao néctar. Essas variações morfológicas do androginóforo e da corona foram os principais caracteres responsáveis pela distinção dos genótipos, nas análises morfométricas, corroborando a ideia de que adaptações em relação aos diferentes agentes polinizadores refletem a variação interespecífica observada entre *P. coccinea* e *P. setacea*.

### **Os híbridos exibem um mosaico complexo de caracteres parentais e transgressivos**

Os resultados da análise de covariância da morfologia floral indicaram que o híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado, e os híbridos BRS Rubiflora e BRS Roseflora, provenientes do retrocruzamento com *P. coccinea* e *P. setacea*, respectivamente, exibiram um mosaico de caracteres diferentes em relação à *P. coccinea* e *P. setacea*. Essa observação foi baseada no posicionamento das amostras dos híbridos que foram agrupados em espaços que não eram intermediários aos grupos de *P. coccinea* e *P. setacea* e, conseqüentemente, não cobriram a variação morfológica existente entre as mesmas. Este fato indica que os híbridos possivelmente expressavam alta percentagem de caracteres transgressivos. A transgressividade é uma consequência frequente em processos de hibridação, principalmente nos processos de retrocruzamento, em que se reestabelece a variação fenotípica (López-Caamal et al. 2013), podendo representar elevadas percentagens de caracteres dos híbridos (Rieseberg et al. 1999). Estudando a variação morfológica dos híbridos derivados de duas espécies progenitoras de girassol, *Helianthus annuus* e *H. petiolaris*, Schwarzbach et al. (2001) encontraram diferentes tipos de expressão dos

caracteres. Apenas um atributo dos híbridos era estritamente intermediário, em relação às espécies progenitoras. A maioria dos caracteres era transgressiva ou similar a uma das espécies progenitoras. Resultados similares também foram reportados por López-Caamal et al. (2013) ao compararem os caracteres fenotípicos de *Tithonia tubaeformis*, *T. rotundifolia* (Asteraceae) e os híbridos naturais provenientes do cruzamento dessas espécies em diferentes regiões.

A proximidade das amostras provenientes do retrocruzamento, em relação ao híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado, na análise de covariância, também revelou a similaridade morfológica entre os três híbridos. Essa semelhança pode ser, em parte, explicada pela genealogia dos três híbridos que foram obtidas a partir de uma mesma base genética e sugere que mais de um loco seja responsável pelas características morfológicas que determinam os sistemas de polinização em *Passiflora*.

### **Desenvolvimento da corona**

A composição e o arranjo dos filamentos da corona foi um dos principais caracteres responsáveis pela distinção morfológica dos genótipos estudados. Contudo, o desenvolvimento dessa estrutura foi similar em todas as espécies/híbridos. O desenvolvimento da corona apresentou uma formação tardia e posterior aos demais órgãos florais. Estas observações estão de acordo com Kunze (1990), Endress (1994) e Bernhard (1999), de que a corona se desenvolve após a corola e o androceu terem alcançado um estágio avançado de desenvolvimento. Na porção superior da emergência, pequenas protuberâncias adjacentes à base das sépalas e pétalas originaram a série de filamentos mais externa. Em seguida, na porção inferior formou-se o opérculo. Esses resultados

evidenciaram também que os filamentos da corona e o opérculo derivam de um mesmo tecido. Observação semelhante foi obtida por Bernhard (1999) em estudos com *P. racemosa*. Os filamentos da corona e o opérculo são estruturas altamente conservadas em todo o gênero. Porém, devem ser consideradas distintas funcionalmente, independente da ontogenia (Krosnick e Freudenstein 2005). A corona aparentemente atua na interação com polinizadores (Aizza e Dornelas 2011). O opérculo tem grande importância em proteger a câmara nectarífera: exclui pequenos insetos e previne a perda do néctar em espécies com flores pendentes ou em dias chuvosos (Ulmer e MacDougal, 2004).

#### **As características do néctar de *P. coccinea* e de *P. setacea* estão relacionadas aos seus respectivos sistemas de polinização**

A caracterização do padrão de secreção e composição de néctar floral tem sido documentada em algumas espécies de *Passiflora* (Amela García e Hoc 1997, 1998; Amela García e Gottsberger 2009; Torres et al. 2012). No entanto, poucos estudos têm abordado os aspectos do néctar de espécies ornitófilas e quiropterófilas do gênero. As características observadas no néctar floral de *P. coccinea* e de *P. setacea* podem estar relacionadas aos seus respectivos agentes polinizadores.

O período de antese, volume e a concentração de açúcar do néctar floral de *P. coccinea* estão de acordo com traços descritos para espécies polinizadas por beija-flores, como anteriormente reportado por Fischer e Leal (2006). Em *P. setacea*, o grande volume de néctar secretado e sua concentração foram similares ao de várias espécies quiropterófilas, como registrado para 33 espécies polinizadas por morcegos da região Neotropical (von Helversen 1993). Essas características também foram reportadas em

outras espécies quiropterófilas de *Passiflora* (Varassin et al. 2001). Morcegos nectarívoros, geralmente, apresentam maior massa corporal que os demais agentes polinizadores logo, grandes quantidades de néctar são requeridas para abastecerem, metabolicamente, suas atividades noturnas (Voigt e Speakman 2007). A concentração de açúcar observada no néctar de *P. setacea* (22%) foi outra característica adequada à quiropterofilia uma vez que, essa concentração associada a um grande volume de néctar, forneceria uma quantidade de água suficiente para os polinizadores (von Helversen e Reyer 1984). Em geral, néctares com elevadas quantidades de hexoses, como observado em *P. setacea*, podem ser usados pelos polinizadores para extrair mais água devido ao aumento da osmolaridade, em relação ao néctar rico em sacarose (Nicolson 2007).

A composição de açúcares no néctar de *P. coccinea* e *P. setacea* corroborou com as inferências realizadas quanto aos diferentes sistemas de polinização dessas espécies. As amostras do néctar de *P. coccinea* apresentaram elevada proporção de sacarose, representando cerca de 90% do total de açúcares. Em geral, beija-flores são reconhecidos como polinizadores principais de espécies vegetais que produzem néctares compostos predominantemente por sacarose (Galletto e Bernardello 2003) uma vez que, esses animais são capazes de hidrolisar grandes quantidades desse dissacarídeo (Schondube e Martinez del Rio, 2003; Lotz e Schondube 2006). Essas características, bem como, a secreção de um néctar rico em açúcar em curto período de antese somam-se aos caracteres morfológicos, já discutidos, caracterizando uma especialização dessa espécie a polinização por beija-flores, como proposto por Johnson e Nicolson (2008) ao estabelecerem caracteres distintivos entre sistemas de polinização por pássaros especialistas e generalistas.

As amostras de *P. setacea* apresentaram um néctar balanceado quanto à proporção de sacarose e hexose (proporções similares), não estando de acordo com a classificação sugerida por Baker e Baker (1983) e Baker et al (1998) de que espécies quiropterófilas apresentam néctares com predominância de hexose. Resultados similares também foram reportados em *Mucuna urens* (Agostini et al. 2011). Apesar da quantidade considerável de sacarose, esse néctar ainda poderia ser consumido por determinadas espécies de morcegos, uma vez que, esses animais também apresentam sucrase, enzima que converte dissacarídeo em monossacarídeo, em abundância no trato digestivo (Voigt e Speakman 2007).

### **Aminoácidos**

O nosso estudo foi o primeiro a analisar a composição de aminoácidos presentes no néctar floral de espécies ornitófilas e quiropterófilas de *Passiflora*. O número total de 15-18 aminoácidos encontrados foi similar ao reportado no néctar de outras espécies do gênero, polinizadas por insetos (Amela García e Gottsberger 2009). A quantidade total de aminoácidos observada foi inferior aos valores conhecidos para espécies polinizadas por abelhas e vespas, mas se assemelharam aos valores descritos para espécies polinizadas por morcegos e beija-flores (Baker e Baker 1983; Petanidou et al. 2006). Em geral, a quantidade de aminoácidos encontrados no néctar de espécies polinizadas por vertebrados é baixa e não supre o requerimento mínimo de nitrogênio (N) necessário por estes animais, sendo preciso suplementar sua dieta com outras fontes de N como: pólen, insetos e frutos (Howell 1974; Herrera et al. 2001; Petanidou et al. 2006). Acredita-se, que essa seria uma das razões pela qual não houve uma seleção quanto ao aumento do conteúdo de

aminoácidos no néctar destas espécies (Baker e Baker 1983; Heil 2011). Mas, apesar das pequenas quantidades de aminoácidos, esses compostos podem apresentar um efeito potencial sobre a ecologia de beija-flores e morcegos, uma vez que, a presença, quantidade e composição dos aminoácidos podem alterar o sabor e a preferência do agente polinizador a determinado néctar floral (Gardener e Gillman 2002; Nepi et al. 2012; Rodríguez-Penã et al. 2013).

A composição dos aminoácidos identificados, em todas as amostras, foi claramente dominada por aminoácidos não essenciais. A glutamina e a alanina foram responsáveis por, pelo menos, 30% do total de aminoácidos em todas as amostras avaliadas. Estes aminoácidos estão entre os mais ocorrentes em amostras de néctar floral (Baker e Baker, 1975, 1983; Piechowski et al. 2009), sendo a abundância de alanina, também, reportada em espécies de *Passiflora* polinizadas por insetos (Amela García e Gottsberger 2009). A glutamina é um intermediário importante como fonte de nitrogênio e esqueletos de carbono bem como, para a construção de outros aminoácidos e compostos nitrogenados. O glutamato também esteve presente em elevada concentração nos híbridos BRS Rubiflora e BRS Roseflora e está diretamente relacionado à glutamina por reações de transaminação.

Em muitas espécies de plantas, o GABA foi encontrado em abundância no néctar floral (Petanidou et al. 2006; Nepi et al. 2012) como também observado em *P. setacea* e no híbrido BRS Estrela do Cerrado. O GABA é um aminoácido não-proteico e que no néctar, parece estar relacionado a um mecanismo de proteção contra a invasão de organismos patogênicos (Park e Thornburg 2009; Nepi et al. 2012). Outros estudos sugeriram que o GABA também possa estar relacionada à estimulação de quimiorreceptores gustativos, sensíveis aos açúcares, aumentando o comportamento

alimentar de insetos (Mitchell e Harrison, 1984; Shoonhoven et al. 2005). Contudo, não há evidências se o mesmo ocorre em vertebrados. A função que cada aminoácido desempenha no néctar floral bem como, esses compostos intermediam as relações planta-polinizador ainda não é evidente e precisa ser melhor compreendida.

### **Herdabilidade dos caracteres do néctar**

Poucos estudos têm abordado os mecanismos genéticos envolvidos na produção e herdabilidade dos caracteres do néctar floral (Mitchell 2004; Kaczorowski et al. 2008; Wilson e Jordan 2009). Uma das principais razões, apontadas por Mitchell (2004 - ver revisão), é a grande variação intraespecífica comumente observada no volume secretado, concentração e composição do néctar, mesmo em condições de cultivo controladas. Para os caracteres avaliados no presente trabalho, a composição de açúcares (relação sacarose / hexose) demonstrou uma tendência à linearidade, uma vez que, os híbridos apresentaram valores aproximadamente intermediários, em relação, aos seus respectivos genótipos parentais (Figura 5D; Tabela 2). Embora, a percentagem de sacarose observada em BRS Roseflora tenha sido maior que o valor esperado. Esses resultados sugerem que a composição de açúcares no néctar floral de *Passiflora* não seja, em parte, controlada por epistasia, apresentando um padrão aditivo de herdabilidade. Resultados similares foram reportados em outras espécies (Kaczorowski et al. 2008; Wilson e Jordan 2009) na qual, o mesmo padrão de herdabilidade foi detectado não apenas na composição de açúcares, como também no volume de néctar secretado, evidenciando que a herdabilidade dos caracteres do néctar podem ser observadas apesar de consideráveis variações ambientais e intraespecíficas (Kaczorowski et al. 2008).

A composição dos aminoácidos presentes no néctar das espécies parentais foi distinta. Contudo, a proporção dos diferentes aminoácidos, presentes no néctar dos híbridos, apresentaram valores intermediários, similares e transgressivos, em relação aos genótipos parentais, não apresentando uma tendência quanto à herdabilidade desses caracteres, como observada nos açúcares. Quando a composição do néctar (açúcar e aminoácidos) foi analisada de forma conjunta, por PCA, ficou evidente a distinta composição do néctar de *P. coccinea* e *P. setacea* e a similaridade entre a composição do néctar dos três híbridos, constituindo um mosaico de fenótipos parentais, com uma parte considerável de caracteres transgressivos. Esses resultados corroboram a análise morfométrica da morfologia floral desses genótipos que apresentaram padrão de herdabilidade complexo.

### **Considerações finais**

As espécies genitoras, *P. coccinea* e *P. setacea* apresentaram características contrastantes, tanto na morfologia floral quanto na composição química do néctar o que pode ser interpretado como estratégias divergentes que foram selecionadas em função de seus agentes polinizadores, beija-flores e morcegos, respectivamente. Por sua vez, os híbridos interespecíficos provenientes dessas espécies exibiram um padrão de herdabilidade complexo desses mesmos caracteres que determinam os sistemas de polinização sugerindo que tais caracteres são controlados por epistasia. Esses resultados fornecem subsídios importantes para se compreender a evolução da ornitofilia e quiropetrofilia em *Passiflora*, bem como, conhecer como as características florais associadas a esses sistemas de polinização, podem ser herdadas. A partir desse panorama geral, sugere-se que cada

aspecto floral seja avaliado de forma individualizada permitindo determinar os aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na variação desses caracteres.

### **Referências Bibliográficas**

Ackermann RR (2010) Phenotypic traits of primate hybrids: Recognizing admixture in the fossil record. **Evolutionary Anthropology** 19: 258-270

Aizza LCB, Dornelas MC (2011) A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in passionflowers. **Journal of Nucleic Acids** 2011: 1-17

Agostini K, Sazima M, Galetto L (2011) Nectar production dynamics and sugar composition in two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae) with different specialized pollinators. **Naturwissenschaften** 98: 933-942

Amela García MT, Gottsberger G (2009) Composition of the floral nectar of different subgenera of Argentinian *Passiflora* species. **Plant Systematics and Evolution** 283: 133-147

Amela García MT, Hoc OS (1998) Biología floral de *Passiflora foetida* (Passifloraceae) **Revista de Biología Tropical** 46: 9-20

Amela García MT, Hoc PS (1997) Floral biology and reproductive system of *Passiflora caerulea* (Passifloraceae). *Beitrage zur Biologie der Pflanzen* 70: 1-20

Baker HG, Baker I (1975) Studies on the nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. In: Gilbert LE, Raven PH (eds) **Coevolution of animals and plants**. University Texas Press, Austin, pp 100-140

Baker HG, Baker I (1983) Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE, Little RJ (eds) **Handbook of experimental pollination biology**. Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp 117-141

Baker HG, Baker I, Hodges SA (1998) Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. **Biotropica** 30: 559-58

Bell MA, Travis MP (2005) Hybridization, transgressive segregation, genetic covariation, and adaptive radiation. **Trends in Ecology & Evolution** 20: 358-361

Benson JR, Hare PE (1975) O-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorecamine and ninhydrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 72: 619-622

Bernhard, A (1999) Flower structure, development and systematics in Passifloraceae and *Abatia* (Flacourtiaceae). **International Journal of Plant Sciences** 160: 135-150

Blackith RE, Reyment RA (1971) *Multivariate Morphometrics*, Academic Press

Bradshaw HD, Schemske DW (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. **Nature** 426: 176-178

Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** 45: 1-92

Cutri L, Nave N, Ami MB, Chayut N, Samach A, Dornelas MC (2013) Evolutionary, Genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. **Mechanisms of Development** 130: 61-69

Dornelas MC, Fonseca TC, Rodriguez APM (2006) Brazilian passionflowers and novel passionate tropical flowering gems. In: Jaime A Teixeira da Silva. (Org.). **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. Londres: Global Science Books 4: 629-639

Endress PK (1994) **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, Cambridge

Faleiro FG, Almeida BC, Sousa PFC, Junqueira NTV, Costa AM, Guimaraes TG, Junqueira KP (2009) Obtenção e análise de descritores dos híbridos de maracujazeiro ornamental BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora. In: Ferrão RG, MATTA FP, Ferrão MAG, Souza JC, Costa AFS, Ferrão LMV. (Org.) **5o Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Vitória: Incaper.

Fischer, E, Leal IR (2006) Effect of nectar secretion rate on pollination success of *Passiflora coccinea* (Passifloraceae) in the central Amazon. **Brazilian Journal of Biology** 66:29-41

Fleming TH, Geiselman C, Kress WJ (2009) The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. **Annals of Botany** 104: 1017-1043

Galetto L, Bernardello G (2003) Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? **Plant Systematic and Evolution** 238, 69-86

Galetto L, Bernardello G (2005) Nectar. In: Dafni A, Kevan P, Husband BC (eds) **Practical pollination biology**. Enviroquest, Ontario 261-313

Gardener MC, Gillman MP (2002) The taste of nectar—a neglected area of pollination ecology. **Oikos** 98: 552-557

Harder LD, Johnson SD (2009) Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. **New Phytologist** 183: 530-545

Heil M (2011) Nectar: generation, regulation and ecological functions. **Trends in Plant Science** 16: 191-200

Heil M, Fiala B, Baumann B, Linsenmair KE (2000) Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. **Functional Ecology** 14: 749-757

Hermann K, Kuhlemeier C (2011) The genetic architecture of natural variation in flower morphology. **Current Opinion in Plant Biology** 14: 60-65

Herrera LG, Hobson KA, Ramirez N, Mirón L, Mendez, G, Sanchez-Cordero, V (2001) Sources of protein in two species of phytophagous bats in a seasonal dry forest: evidence from stable isotope analysis. **Journal of Mammalogy** 82: 352-361

Howell, DJ (1974) Bats and pollen: physiological aspects of the syndrome of chiropterophily. **Comparative Biochemistry and Physiology** 48: 263-276

Janzen DH (1968) Reproductive behavior in the Passifloraceae and some of its pollinators in Central America. **Behavior** 32: 33-48

Jarret HW, Cooksey KD, Ellis B, Andersen JM (1986) The separation of o-Pthaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. **Analytical Biochemistry** 153: 189-198

Johnson SD (2006) Pollinator-driven speciation in plants. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. **Ecology and evolution of flowers**. Oxford: Oxford University Press, 295–310

Johnson SD, Nicolson SW (2008) Evolutionary associations between nectar properties and specificity bird pollination systems. **Biology Letters** 4: 49-52

Kaczorowski RL, Juenger TE, Holtsford TP (2008) Heritability and Correlation Structure of Nectar and Floral Morphology Traits in *Nicotiana glauca*. **Evolution** 62: 1738-1750

Klingenberg CP (2010) Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. **Nature Reviews** 11: 623-635

- Koptur S (1994) Floral and extrafloral nectars of Costa Rica Inga trees: a comparison of their constituents and composition. **Biotropica** 26: 276-284
- Koschnitzke C, Sazima M (1997) Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica** 20: 119-126
- Krosnick SE, Freudenstein JE (2005) Monophyly and Floral Character Homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). **Systematic Botany** 30: 139-152
- Kunze, H (1990) Morphology and evolution of the corona in Asclepiadaceae and related families. *Tropische und Subtropische*. **Pflanzenwelt** 76: 1-49
- Longo JM, Fischer E (2006) Efeito da taxa de secreção de néctar sobre a polinização e a produção de sementes em flores de *Passiflora speciosa* Gardn. (Passifloraceae) no Pantanal. **Revista Brasileira de Botânica** 29: 481-488
- López-Caamal A, Mussali-Galante P, Valencia-Cuevas L, Ramírez JJ, Flores KV, Tovar-Sánchez E (2013) Transgressive character expression in hybrid zones between the native invasives *Tithonia tubaeformis* and *Tithonia rotundifolia* (Asteraceae) in Mexico. **Plant Systematics and Evolution** 299: 1781-1792
- Lotz CN, Schondube JE (2006) Sugar preferences in nectar- and fruit-eating birds: behavioral patterns and physiological causes. **Biotropica** 38: 1-13
- Marur CJ, Sodek L, Magalhães AC (1994) Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 6: 103-108
- Mitchell BK, Harrison GD (1984) Characterization of *Galeal chemosensilla* in the adult Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Physiological Entomology** 9: 49-56
- Mitchell RJ (2004) Heritability of nectar traits: why do we know so little? **Ecology** 85: 1527-1533
- Nicolson SW (2007) Nectar consumers. In: Nicolson SW, Pacini E, Nepi M (eds) **Nectaries and nectar**. The Netherlands Springer, 289-342
- Nepi M, Soligo C, Nocentini D, Abate M, Guarnieri M, Cai G, Bini L, Puglia M, Bianchi L, Pacini E (2012) Amino acids and protein profile in floral nectar: Much more than a simple reward. **Flora** 207: 475-481
- Park S, Thornburg WR (2009) Biochemistry of nectar proteins. **Journal of Plant Biology** 52: 27-34

- Petanidou T, Vanlaere A, Ellis WN, Smets E (2006) What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? **Oikos** 115: 155-169
- Piechowski P, Dötterl S, Gottsberger G (2009) Pollination biology and floral scent chemistry of the Neotropical chiropterophilous *Parkia pendula*. **Plant Biology** 12: 172-182
- Proctor M, Yeo P, Lack A (1996) **The Natural History of Pollination**. Portland: Timber Press
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK (1999) Transgressive segregation, adaptation, and speciation. **Heredity** 83: 363-372
- Rocha DI, Bello M, Cassano C, Sobol S, Samach A, Dornelas MC (2015) Auxin and physical constraint exerted by the perianth promote androgynophore bending in *Passiflora mucronata* L. (Passifloraceae). **Plant Biology** in press
- Rodríguez-Peña N, Kathryn E, Stoner KE, Ayala-Berdon J, Flores-Ortiz CM, Duran A, Schondube JE (2013) Nitrogen and amino acids in nectar modify food selection of nectarivorous bats. **Journal of Animal Ecology** 82: 1106-1115
- Rohlf FJ, Marcus LF (1993) A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology & Evolution** 8: 129-132
- Sazima M, Sazima I (1978) Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. **Biotropica** 10: 100-109
- Schaefer HM, Schmidt V, Bairlein F (2003) Discrimination abilities for nutrients: which difference matters for choosy birds and why? **Animal Behaviour** 65: 531-541
- Schondube JE, Martínez del Rio C (2003) Concentration-dependent sugar preferences in nectar-feeding birds: mechanisms and consequences. **Functional Ecology** 17: 445-453
- Schwarzbach AE, Donovan LA, Rieseberg LH (2001) Transgressive character expression in a hybrid sunflower species. **American Journal of Botany** 88: 270-277
- Scorza LCT, Dornelas MC (2011) Plants on the move: Towards common mechanisms governing mechanically-induced plant movements. **Plant Signaling & Behavior** 6: 1979-1986
- Scorza LCT, Dornelas MC (2014) Rapid touch-stimulated movement in the androgynophore of *Passiflora* flowers (subgen. *Decaloba*; Sect. *Xerogona*): An adaptation to enhance cross-pollination? **Plant Signaling & Behavior** 9: e27932

Shoohoven LM, van Loon JJA, Dicke M (2005) **Insect-Plant Biology**. Oxford University Press, Oxford

Torres C, Dambolena JS, Zunino MP, Galetto L (2012) Nectar characteristics and pollinators for three native, co-occurring insect pollinated *Passiflora* (Passifloraceae) from central Argentina. **The International Journal of Plant Reproductive Biology** 4: 121-126

Ulmer T, MacDougal JM (2004) **Passiflora, Passion flowers of the world**. Timber Press, Cambridge, UK

Varassin IG, Trigo JR, Sazima M (2001) The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** 136: 139-152

von Helversen O (1993) Adaptations of flowers to the pollination by Glossophagine bats. In: Barthlott W (ed) **Plant-animal interactions in tropical environments**. Museum Alexander Koenig, Bonn 41-59

von Helversen O, Reyer HU (1984) Nectar intake and energy expenditure in a flower visiting bat. **Oecologia** 63: 178-184

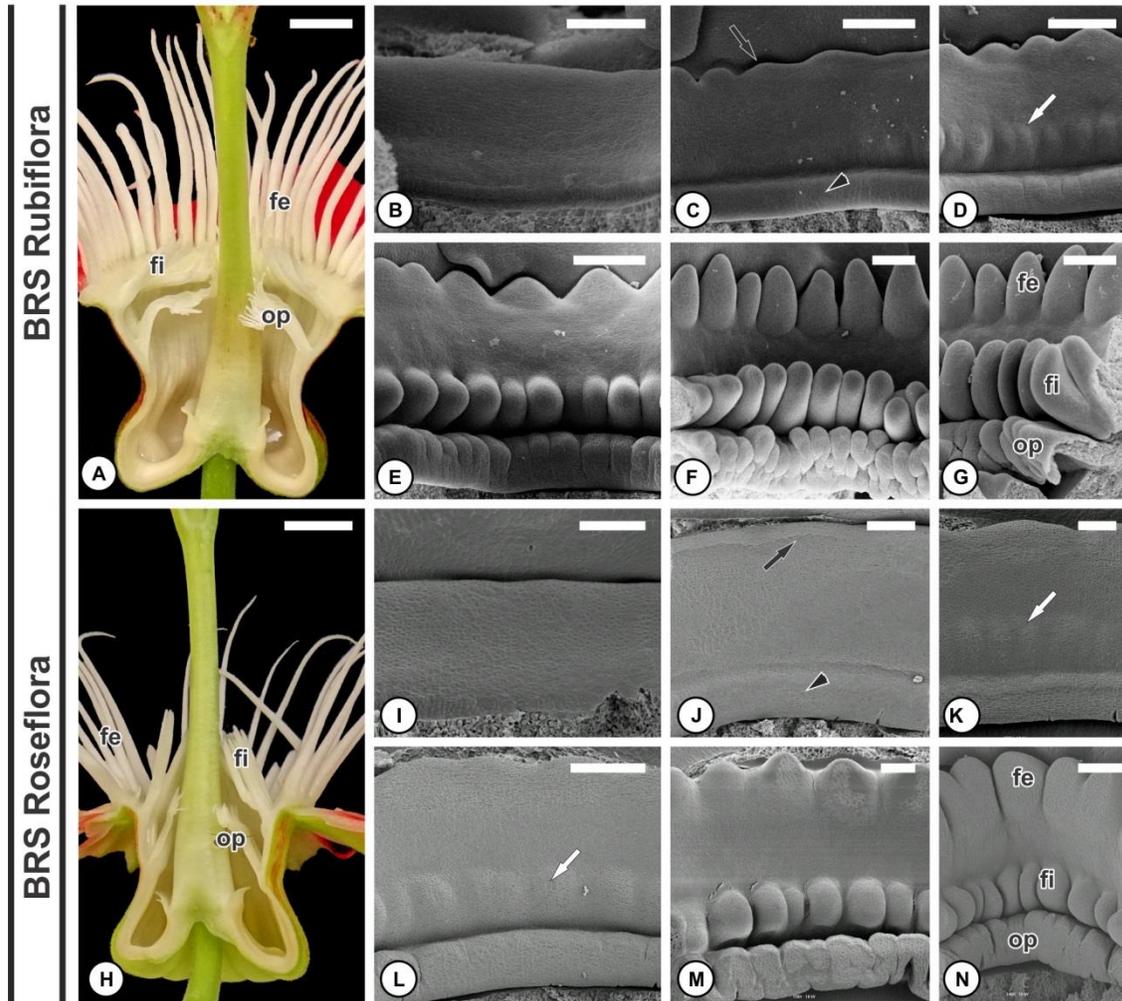
Voigt CC, Speakman JR (2007) Nectar-feeding bats fuel their high metabolism directly with exogenous carbohydrates. **Functional Ecology** 21: 913-92

Wilson P, Jordan EA (2009) Hybrid intermediacy between pollination syndromes in *Penstemon*, and the role of nectar in affecting hummingbird visitation. **Botany** 87: 272-282

## Material suplementar



**Material suplementar 1:** Imagem digital da flor do híbrido F1, BRs Estrela do Cerrado, em secção longitudinal. Os pontos amarelos e vermelhos enumerados indicam o posicionamento dos marcos e semi-marcos, respectivamente.



**Material suplementar 2:** Desenvolvimento da coroa em BRS Rubiflora (A-G) e BRS Roseflora (H-N). (A, H) Morfologia da flor; (B, I) Emergência do tubo floral no início do desenvolvimento; (C, J) Início da formação da série externa de filamentos (seta) e do opérculo na porção inferior (cabeça de seta); (D, K) Formação da segunda série de filamentos da coroa (seta branca) (E-G, L-N) Expansão dos filamentos da coroa e do opérculo. *Abreviaturas:* fe, filamentos externos; fi filamentos internos; op, opérculo; *Barras* (A,H = 0,5 mm; B, D, I, K= 100  $\mu$ m; C, E-G, J, L-N = 200  $\mu$ m).

**Material suplementar 3:** Perfil de aminoácidos do néctar floral de *Passiflora coccinea*, *P. setacea* e dos híbridos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora

Genótipos	% nmol																			Total (nmol.mL <sup>-1</sup> )
	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gli	Tre	Arg	Ala	Gaba	Tir	Met	Val	Fen	Ile	Leu	Lis	Outros	
<i>P. coccinea</i> (coc)																				
coc 1	5,1	8,7	2,3	5,4	45,5	----	1,5	1,5	3,0	7,0	1,8	1,3	----	3,2	3,4	1,9	2,2	----	6,4	318,18
coc 2	5,2	8,4	3,0	3,8	60,8	----	1,1	1,1	1,5	2,7	1,2	0,6	----	2,3	1,9	1,1	1,0	0,8	3,8	994,41
coc 3	5,2	8,8	2,8	3,8	53,2	----	0,9	0,9	1,8	4,3	2,0	1,0	----	2,6	3,3	1,6	1,7	1,1	5,0	749,75
Rubiflora (rub)																				
rub1	18,3	17,1	2,1	6,0	28,6	----	1,4	1,4	0,9	6,0	1,1	0,8	----	4,3	1,8	3,3	1,7	1,8	3,3	779,48
rub2	17,2	20,5	2,2	5,8	10,2	----	1,9	1,9	1,7	11,4	0,5	1,3	----	5,7	2,3	4,7	3,2	3,6	6,0	524,17
rub3	17,4	20,4	1,8	3,6	16,2	----	1,4	1,3	1,1	13,9	2,6	0,5	----	4,3	1,5	3,9	1,8	2,2	6,1	339,01
Estrela do Cerrado (ec)																				
ec1	4,2	7,8	2,4	1,9	10,4	5,5	8,2	8,2	3,3	10,0	10,8	1,4	1,1	2,4	2,0	1,5	3,1	8,3	7,5	380,31
ec2	2,9	6,2	2,3	2,4	21,1	2,9	6,2	6,2	2,7	8,6	12,9	1,2	0,8	2,7	2,1	1,4	3,0	6,1	8,2	1438,16
ec3	3,0	6,2	2,4	2,1	18,4	2,5	5,3	5,3	2,7	10,2	16,9	1,1	----	3,5	2,0	1,5	3,1	6,4	7,5	1089,82
Roseflora (ros)																				
ros1	5,8	19,4	3,3	6,2	21,6	1,7	1,6	1,6	1,9	9,6	1,6	1,9	0,9	4,7	2,9	2,8	4,7	3,7	4,0	1235,03
ros2	5,1	16,6	3,3	5,8	18,3	2,3	2,2	2,2	2,4	10,1	3,6	1,9	1,2	4,4	2,9	2,7	4,7	4,5	5,8	2089,41
ros3	6,8	14,4	3,4	4,4	31,0	2,0	1,0	0,8	1,2	6,3	2,5	2,0	0,7	5,3	3,0	3,1	3,8	1,7	6,6	873,79
<i>P. setacea</i> (set)																				
set1	5,4	3,7	1,5	11,1	24,7	3,5	2,4	2,4	1,7	11,0	13,2	1,3	0,6	2,8	2,6	2,3	3,9	----	5,8	153,59
set2	5,7	3,4	2,4	9,9	27,3	3,7	1,8	1,8	1,3	7,3	14,0	1,2	0,6	3,0	2,8	2,0	3,0	2,3	6,6	242,41
set3	5,6	4,5	1,9	9,8	28,7	2,6	2,2	2,2	1,3	6,4	15,1	1,1	0,7	3,6	2,6	2,9	3,7	2,6	2,6	161,86

### **CAPÍTULO III: Desvendando a relação entre cor e aroma em espécies de *Passiflora* com diferentes sistemas de polinização e seus respectivos híbridos interespecíficos**

#### **RESUMO**

Cor e aroma são as principais características florais associadas à atração de polinizadores e a síntese desses compostos pode ser ligada por vias biossintéticas compartilhadas. No presente estudo foi caracterizada a pigmentação das pétalas e a composição dos voláteis que constituem o aroma de *Passiflora coccinea* (flor vermelha, polinizada por beija-flor), *Passiflora setacea* (flor branca, polinizada por morcego) e dos híbridos provenientes do cruzamento e retrocruzamento com cada uma das espécies parentais a fim de verificar as alterações bioquímicas envolvidas na mudança entre diferentes sistemas de polinização. A diversidade de pigmentação observada nestes genótipos de *Passiflora* pôde ser explicada pela combinação de pelargonidina e cianidina acumuladas nas pétalas. Quanto à composição dos compostos voláteis, diferenças significativas foram observadas no perfil das espécies parentais. Apesar da grande percentagem relativa de monoterpenos, em ambas as espécies, compostos aromáticos foram observados apenas em *P. setacea*. O aroma dos híbridos apresentou composição qualitativamente similar ao aroma de *P. coccinea*. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que antocianinas e compostos benzoicos aromáticos possam interagir por vias biossintéticas comuns estabelecendo a ligação entre cor e aroma floral.

**Palavras-Chave:** Antocianinas, compostos voláteis, coloração floral, associação entre cor-aroma, *Passiflora*, sistemas de polinização



**Unraveling the relationship between color and scent in *Passiflora* species with  
different pollination systems and their interspecific hybrids**

**ABSTRACT**

Colour and scent are the major pollinator attractants to flowers, and their production may be linked by shared biosynthetic pathways. The present study characterized the pigmentation of the petals and the scent composition of *Passiflora coccinea* (red flower, hummingbird pollinated), *Passiflora setacea* (white flower, bat pollinated) and hybrids from crosses and backcross with each of the parental species in order to determine the biochemical changes involved the shift between different pollination systems. The diversity of pigmentation observed in these *Passiflora* genotypes could be explained by the combination of pelargonidin and cyanidin accumulated in the petals. Regarding scent composition, significant differences have been observed in the scent pattern of parental species. Despite the large relative percentage of monoterpenes, in both species, aromatics compounds (benzenoid) have been observed only in *P. setacea*. The scent of hybrids showed qualitatively similar to *P. coccinea* scent composition. These results are consistent with the current hypothesis that anthocyanins and aromatic compounds may interacting with common biosynthetic pathways establishing the connection between floral color and scent.

**Keywords:** Anthocyanins, volatile compounds, floral colour, colour-scent associations, *Passiflora*, hybrids, pollination systems



## **Introdução**

A diversidade de caracteres florais é geralmente atribuída à polinização biótica (Fenster et al. 2004; Johnson et al. 2006). Através da seleção evolutiva, as plantas tornam-se adaptadas à morfologia e fisiologia sensorial dos seus polinizadores (Fenster et al. 2004). Esse processo produz padrões florais convergentes, no qual espécies não relacionadas filogeneticamente adquirem caracteres florais similares tornando-as adaptadas a um mesmo grupo funcional de polinizadores. Esses padrões são chamados sistemas de polinização (Proctor et al. 1996)

Sistemas de polinização são descritos para os diversos grupos de polinizadores e têm sido usados para prever os possíveis agentes de uma espécie vegetal em específico, bem como, gerar hipóteses a fim de compreender a diversificação floral e transições evolutivas entre os diferentes grupos de polinizadores (Kingston e Mc Quillan 2000; Fenster et al. 2004; Thomson e Wilson 2008; Ollerton et al. 2009; Smith e Rausher 2011; Steenhuisen et al. 2012). Por exemplo, considerando que flores polinizadas por beija flores normalmente refletem comprimentos de onda mais longos (especialmente vermelho) e não apresentam aroma aparente (Vogel, 1990; Knudsen et al. 2004) enquanto, flores polinizadas por morcegos são brancas e geralmente apresentam odores característicos (Knudsen et al. 1993; Fleming et al. 2009) é possível sugerir que alterações marcantes na coloração e composição do aroma estariam associadas a possíveis mudanças entre estes dois sistemas de polinização.

A coloração do perianto e o aroma floral emitido são os principais estímulos envolvidos na atração de visitantes florais (Dobson 1994, 2006; Chittka e Raine 2006). Em alguns casos, esses caracteres atuam de forma sinérgica, o que permite uma sinalização

mais eficiente, aos polinizadores, na distinção entre as espécies vegetais (Kunze e Gumbert 2001; Galizia et al. 2004). Além disso, estudos têm demonstrado que a combinação entre esses caracteres, cor e aroma, aumentou o número de visitas e o grau de atividade de forrageamento de muitos polinizadores (Kunze e Gumbert 2001; Raguso e Willis 2002, 2005; Andersson e Dobson 2003), maximizando a atividade desses animais e possivelmente, melhorando o sucesso reprodutivo da planta (Majetic et al. 2007). A relação entre cor e aroma é complexa, uma vez que, pigmentos (antocianinas) e compostos benzoicos aromáticos podem compartilhar vias biossintéticas comuns (Armbruster 2002; Majetic et al. 2007). Muitos dos precursores, produtos e/ou subprodutos destas vias biossintéticas podem ser volatilizados e reconhecidos como estímulos olfativos (van Schie et al. 2006). Isto sugere que as associações específicas entre cor e aroma floral poderiam ser uma consequência das vias bioquímicas conservadas (Armbruster 2002).

Cruzamentos interespecíficos entre espécies polinizadas por diferentes animais constituem modelos interessantes para se estudar a evolução conjunta dos caracteres florais, bem como, as alterações relacionadas à transição entre os diferentes sistemas de polinização (Kaczorowski et al. 2008; Smith e Rausher 2011). Recentemente, o desenvolvimento de híbridos interespecíficos de *Passiflora*, obtidos a partir do cruzamento e retrocruzamento entre *Passiflora coccinea* Aubl e *Passiflora setacea* D.C. representaram um interessante caso de hibridação entre espécies com diferentes sistemas de polinização. As espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) constituem modelos pertinentes para estudos de interação planta-polinizador dado a complexidade e diversidade de sua estrutura floral o que permitiu adaptação a diversos tipos de polinizadores (Ulmer e MacDougal 2004; Aizza e Dornelas 2011). *P. coccinea* é uma espécie ornitófila. É constituída por um

perianto vermelho, corona curta, tubular (Fischer e Leal 2006). *P. setacea* é uma espécie quiropterófila. Apresenta antese noturna, perianto branco e filamentos da corona longos (Cervi 1997). A partir dessas espécies, três híbridos foram produzidos. O híbrido F1, denominado BRS Estrela do Cerrado e os híbridos provenientes do retrocruzamento de F1 com *P. coccinea* e *P. setacea*, denominados BRS Rubiflora e BRS Roseflora, respectivamente.

No presente estudo objetivou-se analisar a existência de uma possível associação entre a coloração e o aroma dessas duas espécies de *Passiflora*: *P. coccinea* (flor vermelha) e *P. setacea* (flor branca) e os híbridos provenientes do cruzamento, BRS Estrela do Cerrado e retrocruzamento, BRS Rubiflora e BRS Roseflora, com as espécies parentais, respectivamente. Para elucidar essa hipótese, classificou-se a coloração das pétalas de cada um dos genótipos e caracterizou-se a composição de antocianinas e compostos voláteis presentes nas pétalas e no aroma, respectivamente, de cada um dos genótipos

## **Materiais e métodos**

### **Material Vegetal**

Foram utilizadas amostras florais de indivíduos de *Passiflora coccinea* Aubl e dos híbridos: BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora localizados no banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Cerrados - 15°36'S, 47°42'W). Para *Passiflora setacea* D.C. foram usadas amostras de flores de indivíduos situados no campo experimental da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Jaboticabal - 21°15'S, 48° 15'W).

## **Coloração das flores**

A coloração das flores de cada um dos genótipos foi classificada de acordo com a Royal Horticultural Society Colour Chart [(RHSCC); <http://www.azaleas.org/index.pl/rhsmacfan3.html>] e a Inter-Society Color Council (ISCC) ambas consideradas referências na padronização de cores. Para a classificação, foram feitas fotografias digitais de pétalas de 10 flores de cada genótipo. A partir desses registros, utilizando o software Corel Draw X6, estabeleceu-se o valor dos canais de cor RGB a partir de três avaliações da região mediana de cada pétala, totalizando 150 avaliações. A partir dessas medidas, os valores RGB médio de cada genótipo foram estabelecidos.

## **Identificação de antocianinas**

Para a caracterização bioquímica dos pigmentos foram coletadas pétalas de cinco flores de cada um dos genótipos estudados. Todas as amostras foram liofilizadas, maceradas e armazenadas até o momento das análises. Para a extração dos pigmentos utilizou-se 10 mg de pétalas liofilizadas e 1 mL de uma solução extratora (água com 1% [v/v] ácido fórmico) por 30 minutos no banho de ultra-som. Em seguida o material foi centrifugado, o sobrenadante retirado e novamente 1 mL da solução aquosa acidificada foi adicionado ao restante, retornando ao banho de ultra-som. Repetiu-se duas vezes este procedimento para garantir a extração dos pigmentos, juntando os extratos aquosos. Este extrato passou por um processo de purificação para obtenção de antocianinas totais, com este intuito utilizou-se cartucho C18 (Merck, LiChrolut RP-18) e uma lavagem inicial com 3 mL de água deionizada. Antocianinas e outros compostos fenólicos foram adsorvidos à mini-coluna; enquanto açúcares, ácidos e outros compostos foram removidos. Os fenólicos

não-antocianinas, isto é, os demais flavonóides foram lavados da coluna com 3 mL de acetato de etila e subsequentemente as antocianinas foram eluídas com metanol contendo 0,1% de ácido fórmico. O extrato metanólico foi concentrado até eliminação do solvente sob atmosfera de nitrogênio (por se tratar de pequena quantidade de extrato) e os pigmentos foram dissolvidos em 1 mL de água deionizada. Padrões de cianidina-3-O-glicosídeo e pelagornidina-3-O-glicosídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram dissolvidos em metanol, para se obter as concentrações iniciais de 1 mg / mL. Estes foram diluídos em água Milli-Q purificada e concentrações compreendidas entre 0,1 e 100 ug / mL foram utilizados para construir as curvas de calibração.

A cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC – ultra high-performance liquid chromatography) foi usada para analisar os pigmentos extraídos. A cromatografia foi realizada em um sistema ACQUITY UPLC (Waters) acoplado à espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS). As separações foram desenvolvidas em colunas próprias para UPLC: BEH C18 (2,1 mm x 50 mm, 1.7 µm de tamanho da partícula). Os solventes usados na fase móvel foram: (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila. O gradiente iniciou com 95% de A e 5% de B, mudando para 50% de A e 50% de B em 5 min, e até 5% de A e 95% de B em 9 min, mantendo esta proporção até 10 min e retornando às condições iniciais até 12 min. O fluxo foi 0,250 mL/min, a temperatura de 30°C e o volume de injeção foi 5µL dos extratos obtidos e dos padrões.

As amostras foram submetidas à ionização por eletrospray em modo positivo realizando uma varredura entre massa/carga ( $m/z$ ) 190 e 1000. A ionização ocorreu somente no modo positivo por ter apresentado melhores condições para análise das antocianinas em avaliações prévias. As voltagens do capilar e do cone foram de 3KV e 30 V,

respectivamente. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram 150 °C e 300 °C, respectivamente. As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Waters) com nitrogênio como gás de dessolvatação.

### **Coleta de compostos voláteis florais por microextração em fase sólida (MEFS)**

Para a coleta dos compostos voláteis que compõem o aroma, foram utilizadas fibras Supelco encapadas com polidimetilsiloxano (PDMS, 100 µm). As fibras foram pré-condicionadas de acordo com as instruções do fabricante. Previamente, flores dos genótipos estudados foram ensacadas logo após a antese por um saco de poliéster (14 x 20 cm), permanecendo nessa condição por 60 minutos para o equilíbrio dos voláteis dentro deste sistema fechado. Após o período para o equilíbrio do sistema, efetuou-se a exposição da fibra ao headspace por um orifício feito no saco com a própria agulha do aparato de microextração, por 15 minutos. Foram coletadas amostras de pelo menos cinco flores de cada genótipo.

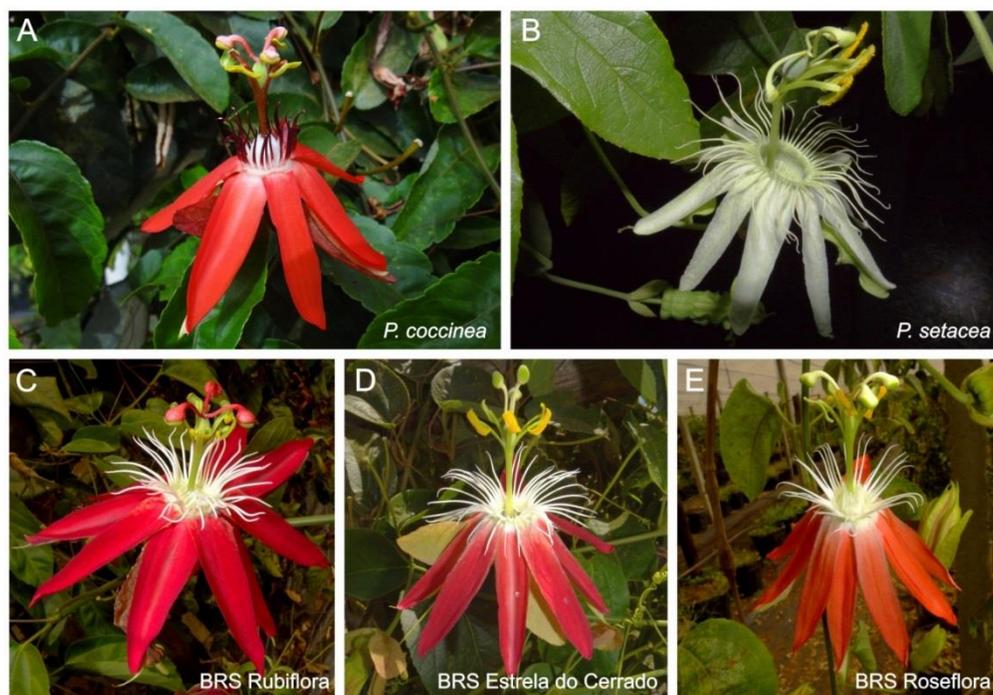
As fibras expostas ao aroma foram transportadas para o laboratório e injetadas diretamente na porta de injeção de um cromatógrafo a gás CGMS-QP2010 Plus equipado com uma coluna DB-5 capilar (30 m x 0,25 milímetros, de espessura com revestimento de 25 µm) e acoplado a um espectômetro de massa Varian Saturno 2000. As condições de análise foram: temperatura do injetor e linha de transmissão em 250° C; temperatura do forno programado para ir de 60° C a 240° C a 3° C min<sup>-1</sup>; gás hélio como gás de arraste em 1 ml.min<sup>-1</sup>. A identificação dos componentes foi baseada na análise dos espectros obtidos comparando-os com os espectros compatíveis em uma biblioteca digitalizada (NIST 2005) e também, dados encontrados na literatura. Para verificar o desempenho do sistema CG/MS permitindo uma identificação mais precisa dos componentes, foi obtido o índice de

retenção (IR) a partir da injeção do padrão analítico de n-alcanos (C8–C20; Sigma-Aldrich, USA; material suplementar 1).

## Resultados

### Varição e classificação da coloração das flores

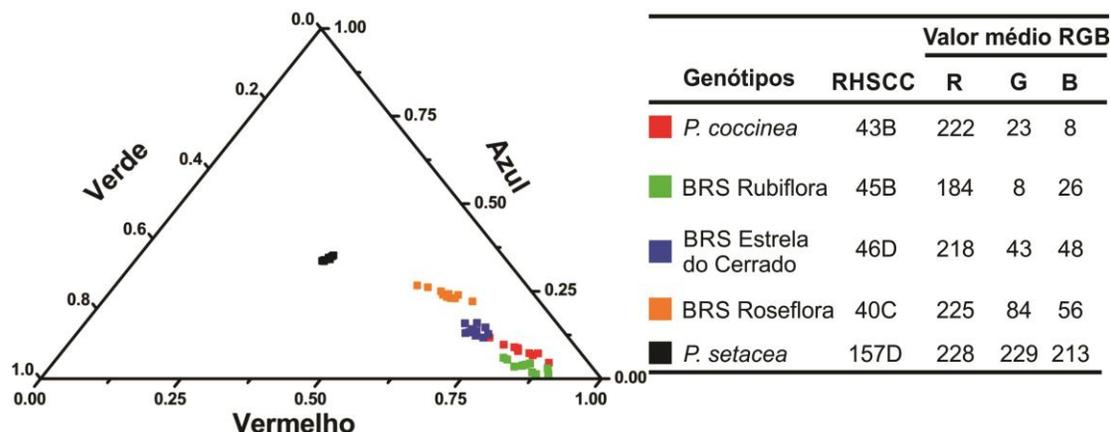
A coloração das pétalas das espécies parentais, do híbrido F1 e dos híbridos provenientes do retrocruzamento foram categorizadas de acordo RHSCC, com valores variando de 40C a 157D. *P. coccinea* apresentou pétalas com coloração escarlate (Figura 1A) que foram classificadas como vermelho-alaranjado vivo (SCC 43B). *P. setacea* foi classificada como branco-amareladas (RHS 157D; Figura 1B).



**Figura 1:** Flores dos genótipos de *Passiflora* usados no estudo. (A) *P. coccinea*, (B) *P. setacea*, (C) BRS Rubiflora (*P. coccinea* x BRS Estrela do Cerrado), (D) BRS Estrela do Cerrado (*P. coccinea* x *P. setacea*), (E) BRS Roseflora (*P. setacea* x BRS Estrela do Cerrado).

O híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado, que apresentava flores com coloração rosa-amarelada (Figura 1D), foi classificado como SCC 46D. As flores do híbrido BRS Rubiflora possuíam uma tonalidade de vermelho mais escuro que *P. coccinea* (Figura 1C) e foram classificadas como vermelho vivo (SCC 45B), enquanto BRS Roseflora possuía flores rosa-alaranjadas (SCC 40C, Figura 1E).

A distribuição de cada um dos genótipos no gráfico ternário, obtido a partir dos valores médios das coordenadas RGB da coloração das pétalas, foi distinta, evidenciando a variação fenotípica e um gradiente de coloração entre os mesmos (Figura 2). As amostras analisadas de *P. setacea* e do híbrido BRS Rubiflora apresentaram-se distribuídos em opostos extremos do gráfico, uma vez que esses genótipos possuíam as colorações mais contrastantes (Figura 2). As amostras de *P. setacea* apresentaram-se concentradas na região central do gráfico ternário enquanto os demais genótipos, *P. coccinea*, BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora, estavam concentrados em um dos vértices. Contudo, os genótipos que foram resultados de cruzamentos com *P. setacea* como BRS Estrela do cerrado e BRS Roseflora, apresentaram-se deslocados para a região central, estando distribuídos em posições intermediárias entre os seus respectivos genótipos genitores, evidenciando um gradiente de coloração (Figura 2).



**Figura 2:** Classificação e distribuição dos genótipos de *Passiflora* na pirâmide ternária a partir das coordenadas média RGB (Vermelho, Verde e Azul, respectivamente) da coloração das pétalas.

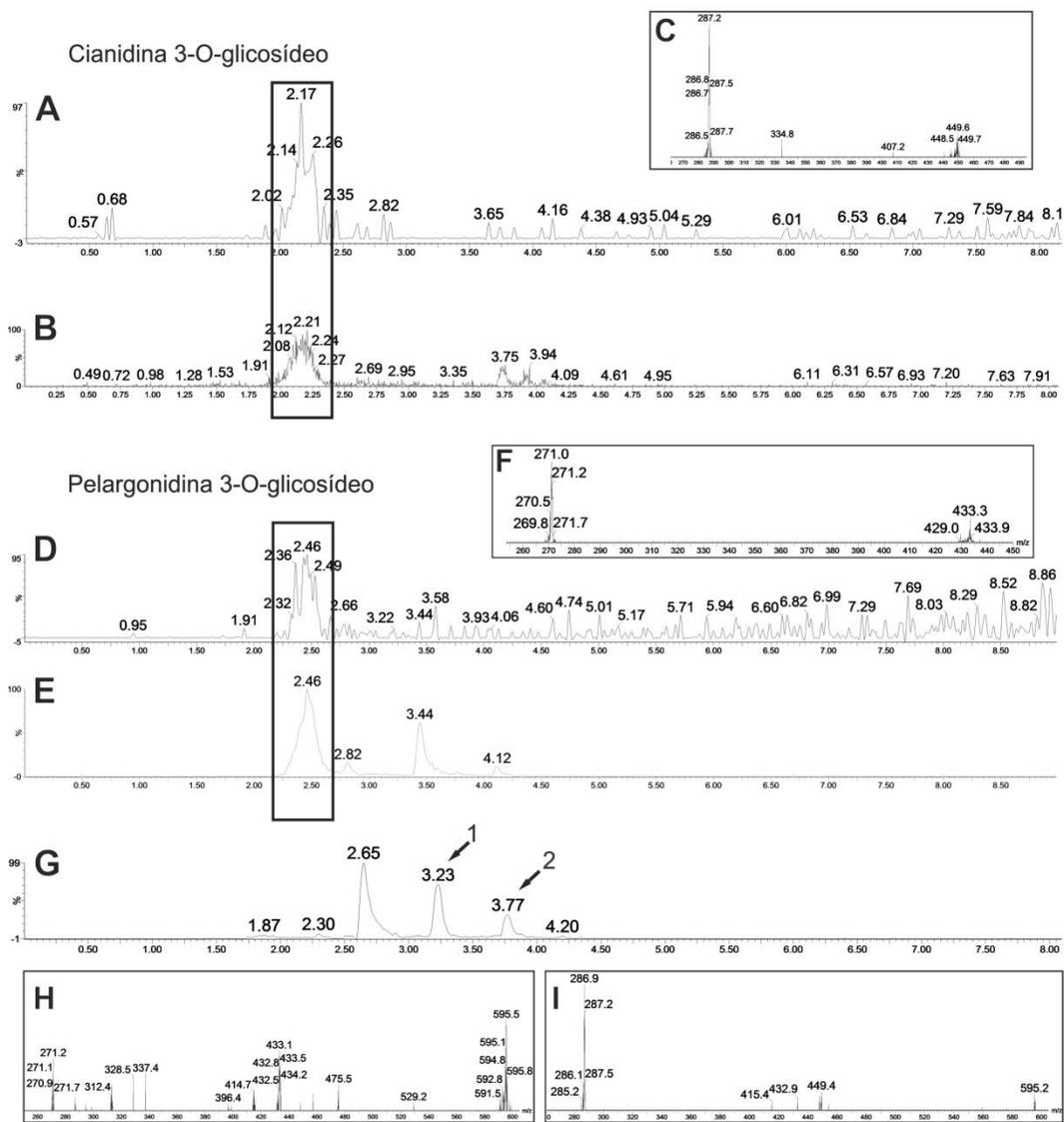
### Identificação e quantificação das antocianinas presente nas pétalas

Diferentes antocianinas foram isoladas e identificadas nas pétalas dos genótipos de *Passiflora*. Em geral, as antocianinas identificadas apresentaram tempos de retenção relativamente curtos indicando a ausência de antocianinas com derivados acilados. Os resultados das análises cromatográficas e espectrométricas bem como informações quanto ao tempo de retenção, razão massa/carga ( $m/z$ ) do íon principal e dos íons produtos de fragmentação MS/MS foram sumarizados nas figuras 3 e 4 e tabela 1.

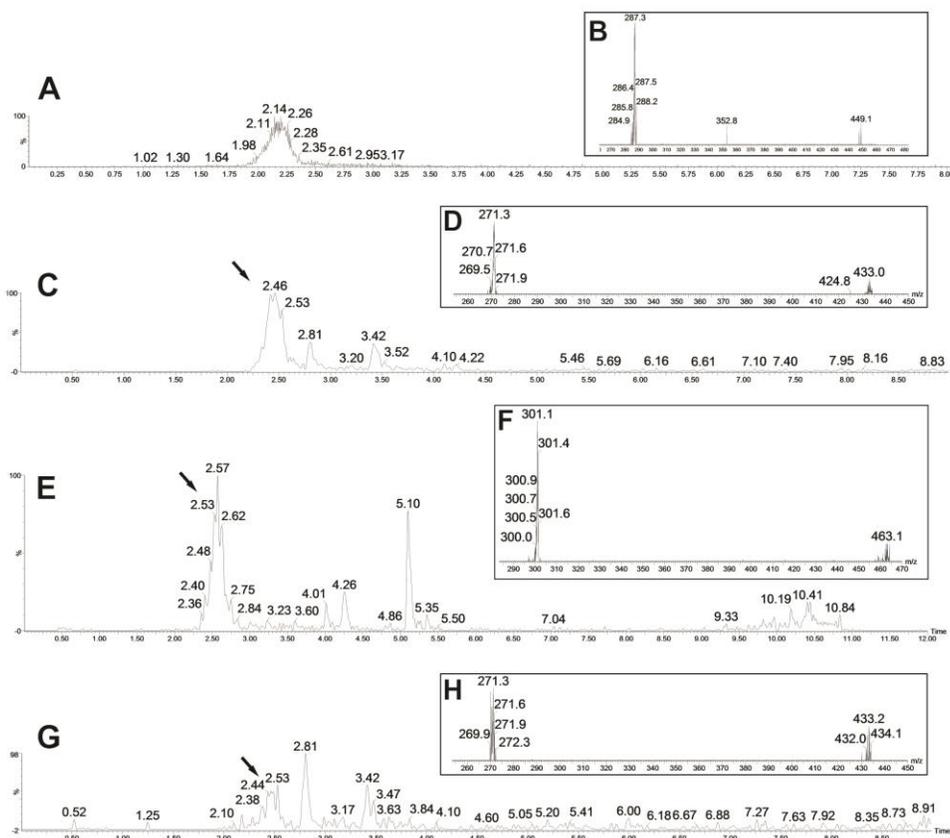
Quatro antocianinas foram identificadas nas pétalas de *P. coccinea* (Figura 3). A primeira antocianina apresentou um íon de  $m/z$  449 e fragmento principal de  $m/z$  287, correspondendo à cianidina 3-O-glicosídeo (Figura 3A-C). O segundo pico com o íon de  $m/z$  433 e um fragmento de  $m/z$  271 indicou ser pelargonidina 3-O-glicosídeo (Figura 3D-F). A identidade de ambas, cianidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3-O-glicosídeo foram confirmadas a partir de comparações com os dados espectrais de amostras de padrões autênticos (Figura 3A, D) e foram resultados da perda de uma molécula de hexose ([M-

162]). Três picos mostraram íons de  $m/z$  595 com tempos de retenção e padrões de fragmentação MS/MS diferentes (Figura 3G). O primeiro íon, com um tempo de retenção de 2,65 min. não foi identificado. O segundo íon, com tempo de 3,20 min. apresentou uma fragmentação em dois íons de  $m/z$  433 e  $m/z$  271, indicando ser a presença de pelargonidina 3,5-diglicosídeo (Figura 3H). O outro íon de  $m/z$  595, com um tempo de retenção de 3,77 minutos mostrou um fragmento principal de  $m/z$  287 devido à perda de 308 Da que corresponde a uma molécula de rutinosídeo (composta por dois açúcares: ramnose e glicose), sendo caracterizada como cianidina 3-O-rutinosídeo (Figura 3I).

Embora *Passiflora setacea* apresentasse flores brancas, os dados espectrais sugeriram a presença de pelargonidina 3,5-diglicosídeo (Figura suplementar 2A) como também, reportado em *P. coccinea*. No híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado e em BRS Roseflora foram identificados apenas pelargonidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3,5-O-diglicosídeo (Figura 4G-H; Figura suplementar 2B, D). Embora tenha sido observados apenas traços ( $\leq 0,05 \mu\text{g/mL}$ ) da forma monoglicosilada desse pigmento em BRS Estrela do Cerrado. No híbrido BRS Rubiflora, além de cianidina 3-O-glicosídeo, pelargonidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3,5-O-diglicosídeo (Figura 4A-D), também identificados nos demais genótipos, observou-se a presença de um íon de  $m/z$  463 e um único fragmento de  $m/z$  301 que sugere ser a aglicona-peonidina com a perda de uma molécula de hexose [M-162], correspondendo à peonidina 3-O-glicosídeo (Figura 4E-F).



**Figura 3:** Identificação das antocianinas presentes em *Passiflora coccinea*. (A, B) Cromatogramas UHPLC-MS selecionados do íon ( $m/z$  449) do padrão comercial de cianidina 3-O-glicosídeo (A) e do extrato de *P. coccinea* (B). (C) fragmentação ESI(-)-MS/MS do íon selecionado em A e B (retângulo). (D, E) Cromatogramas selecionados do íon ( $m/z$  433) do padrão comercial de pelargonidina 3-O-glicosídeo (D) e do extrato de *P. coccinea* (E). (F) fragmentação ESI(-)-MS/MS do íon selecionado em D e E (retângulo). (G) Cromatograma extraído do íon  $m/z$  595 no extrato de *P. coccinea* (H) evidenciando dois picos (setas) que foram identificados, a partir dos espectros de fragmentação ESI(-)-MS/MS como cianidina-3-O-rutósido (I) e pelargonidina-3,5-O-diglicosídeo (J).



**Figura 4:** Identificação das antocianinas presentes nos híbridos BRS Rubiflora e BRS Roseflora. Cromatogramas (A, C, E, G) e fragmentações ESI(-)-MS/MS (B, D, F, H) de cianidina 3-O-glicosídeo (A, B), pelargonidina 3-O-glicosídeo (C, D) e peonidina 3-O-glicosídeo (E, F) em amostras de BRS Rubiflora e pelargonidina 3-O-glicosídeo (G, H) em amostras de BRS Roseflora. Nos cromatogramas, as setas indicam o pico e o tempo de retenção correspondente às antocianinas identificadas.

Considerando que a presença de cianidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3-O-glicosídeo foi confirmadas a partir de comparações com dados espectrais de padrões autênticos, a concentração dessas antocianinas foi calculada a partir de curvas de calibração estabelecidas para as mesmas. Cianidina-3-O-glicosídeo esteve presente apenas em amostras de *P. coccinea* e BRS Rubiflora apresentando-se em maiores concentrações nas pétalas do híbrido. Pelargonidina-3-O-glicosídeo foi o pigmento mais abundante presente

no extrato de pétalas de *P. coccinea*, seguido de BRS Rubiflora, BRS Roseflora e BRS Estrela do Cerrado (Tabela 1).

**Tabela 1:** Concentração de cianidina-3-O-glicosídeo e pelargonidina-3-O-glicosídeo das pétalas dos genótipos estudados.

Antocianinas	[M+] (m/z)	<i>P. coccinea</i>	BRS Rubiflora	BRS Estrela do Cerrado	BRS Roseflora	<i>P. setacea</i>
pelargonidina- 3-O-glicosídeo	433	8,22 ± 0,45	1,65 ± 0,18	(≤ 0,01)	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01
cianidina-3-O- glicosídeo	449	0,62 ± 0,17	1,96 ± 0,29	-----	(≤ 0,01)	-----

### **Emissão de odores - Caracterização micromorfológica da epiderme dos filamentos da corona**

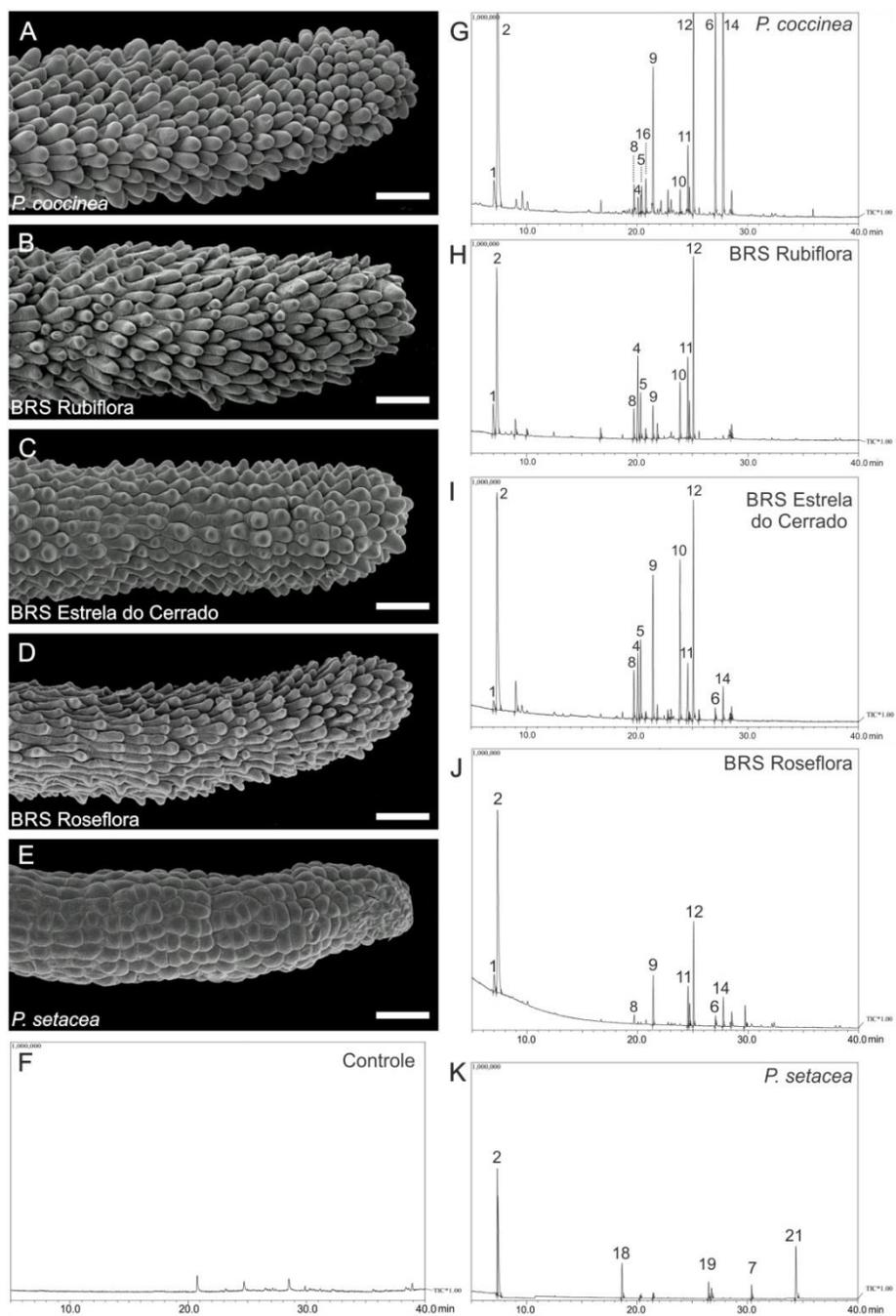
A emissão de odores em flores de *Passiflora* tem sido atribuída aos filamentos da corona (MacDougal 1994; Amela García et al. 2007). Baseado nessa informação investigou-se a micromorfologia da corona nos genótipos estudados (Figura 5A-E). Imagens de microscopia eletrônica de varredura da região apical dessa estrutura evidenciaram que a epiderme dos filamentos externos da corona de *P. coccinea* eram espessos e compostos por papilas alongadas (Figura 5A). Em *P. setacea*, os filamentos da corona eram finos e constituídos por células planas, ao longo de toda estrutura (Figura 5E). Os filamentos da corona do híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado, também apresentaram papilas. Contudo, os filamentos eram finos e a papilas pouco pronunciadas (Figuras 5C) e de maneira similar foi observado em BRS BRS Roseflora (Figuras 5D). Em BRS Rubiflora,

os filamentos da corona eram espessos e apresentavam papilas mais alongadas, como observado em *P.coccinea* (Figuras 5B).

### **Composição do aroma floral**

Um total de 21 compostos foi detectado sob as condições analíticas utilizadas (Figura 6). Os compostos voláteis identificados pertenceram a quatro classes de compostos. A classe de compostos voláteis mais abundante (percentagem relativa) do aroma de todos os genótipos foi dos terpenos. Os picos enumerados nos cromatogramas obtidos (Figura 5G-K) e identificados na Figura 6 foram comuns às amostras avaliadas de cada genótipo e não estiveram presentes no cromatograma da condição controle (saco de poliéster vazio; Figura 5F).

As espécies parentais, *P. coccinea* e *P. setacea* apresentaram diferenças na quantidade e composição dos voláteis emitidos no aroma floral. Em *P. coccinea*, foram identificados 15 compostos sendo que, três quartos pertenciam à classe dos terpenos. Mono- e sesquiterpenos estiveram presentes em números quase iguais de compostos individuais (Figura 6). Os compostos (E)- $\beta$ -Ocimeno,  $\alpha$ -Farneseno, Farnesil cianeto e Cariofileno foram os compostos majoritários do headspace floral de *P. coccinea* (Figuras 5G, 6) representando juntos em torno de 75% dos voláteis (Material suplementar 3). Em *P. setacea*, foram identificados 6 compostos (Figuras 6, 7A). O (E)- $\beta$ -Ocimeno também foi o composto majoritário, representando sozinho cerca de 60% do headspace floral. Contudo, a maior parte dos compostos identificados pertencia à classe dos aromáticos benzênicos, ausente no headspace de *P.coccinea* (Figura 6).



**Figura 5:** Aroma floral. (A-E) Micromorfologia da região apical dos filamentos da série externa da coroa de *P. coccinea* (A), BRS Rubiflora (B), BRS Estrela do cerrado (C), BRS Roseflora (D), *P. setacea* (E). Barras = 100μm. (F-K) Perfis cromatográficos obtidos por GC-MS do saco vazio de poliéster (condição controle) (F) e do bouquet floral de *P. coccinea* (G), BRS Rubiflora (H), BRS Estrela do cerrado (I), BRS Roseflora (J), *P. setacea* (K). Os números correspondem aos compostos identificados e descritos na figura 6.

A composição do aroma de *P. coccinea* foi herdada pelo híbrido F1, BRS Estrela do Cerrado e também, pelos híbridos BRS Rubiflora e BRS Roseflora provenientes do retrocruzamento com *P. coccinea* e *P. setacea*, respectivamente. Como relatado em *P. coccinea*, mono- e sesquiterpenos representaram em torno de 80% dos compostos identificados e abundância do headspace de cada um dos híbridos. Nos híbridos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora foram identificados 15, 14 e 9 compostos, respectivamente (Figuras 6, 7A). O (E)- $\beta$ -Ocimeno e  $\alpha$ -Farneseno foram os compostos majoritários do aroma floral de BRS Rubiflora e BRS Roseflora. No híbrido F1, além desses dois compostos, Cariofileno e Germacreno D também apresentavam uma percentagem relativa significativa do aroma floral (Figura 6).

O (E)- $\beta$ -Ocimeno foi o único composto volátil presente em todas as amostras avaliadas (Figura 7A), sendo também, o composto majoritário do aroma floral de todos os genótipos estudados. Compostos voláteis específicos de *P. setacea* (benzenoides) não foram observados em nenhuma das amostras dos híbridos (Figuras 6, 7A).

Compostos	TR	<i>P. coccinea</i>	BRS Rubiflora	BRS Estrela do Cerrado	BRS Roseflora	<i>P. setacea</i>
<b>Monoterpenos</b>						
01 (Z)- $\beta$ -Ocimeno	6.99	b	ab	ab	a	c
02 (E)- $\beta$ -Ocimeno	7.35	c	c	c	b	a
03 Linalol	9.00	ab	ab	a	bc	c
04 $\alpha$ -Borboneno	20.05	b	a	a	b	b
05 $\alpha$ -Cubeno	20.30	b	a	a	b	b
06 Geranioleno	27.10	a	c	b	b	c
07 Metil Jasmonato	30.37	b	b	b	b	a
<b>Sesquiterpenos</b>						
08 Copaneno	19.70	c	b	a	c	c
09 Cariofileno	21.46	b	c	a	b	d
10 Germacreno D	23.91	c	b	a	c	c
11 (Z)- $\alpha$ -Bergamoteno	24.61	a	a	a	a	b
12 $\alpha$ -Farneseno	25.11	a	a	b	a	c
13 $\delta$ -Cardieno	25.60	ab	a	a	b	b
14 Farnesil cianeto	27.80	a	c	bc	b	c
<b>Benzóicos Aromáticos</b>						
15 Butanoato de benzilo	18.63	b	b	b	b	a
16 Hexanoato de benzilo	26.48	b	b	b	b	a
17 Benzil-fenil-éter	26.75	b	b	b	b	a
18 Benilato	34.39	b	b	b	b	a
<b>Hidrocarbonetos</b>						
19 Tridecano	16.70	b	a	b	b	b
20 Tretradecano	20.76	a	a	b	b	b
21 Pentadecano	24.76	bc	a	bc	ab	bc
<b>Número de compostos</b>		15	14	15	9	6
<b>Monoterpenos</b>		41,15	48,48	46,07	51,21	68,77
<b>Sesquiterpenos</b>		54,21	41,26	47,35	38,68	-----
<b>Benzóicos Aromáticos</b>		-----	-----	-----	-----	25,71
<b>Hidrocarbonetos</b>		2,68	5,58	1,00	3,98	-----
<b>Total (%)</b>		98,04	95,32	94,42	93,87	94,48

Percentagem Relativa (%)	
	0-0,5   0,5-1   1,1-2   2,1-4   4,1-8   8,1-16   16,1-32   >32

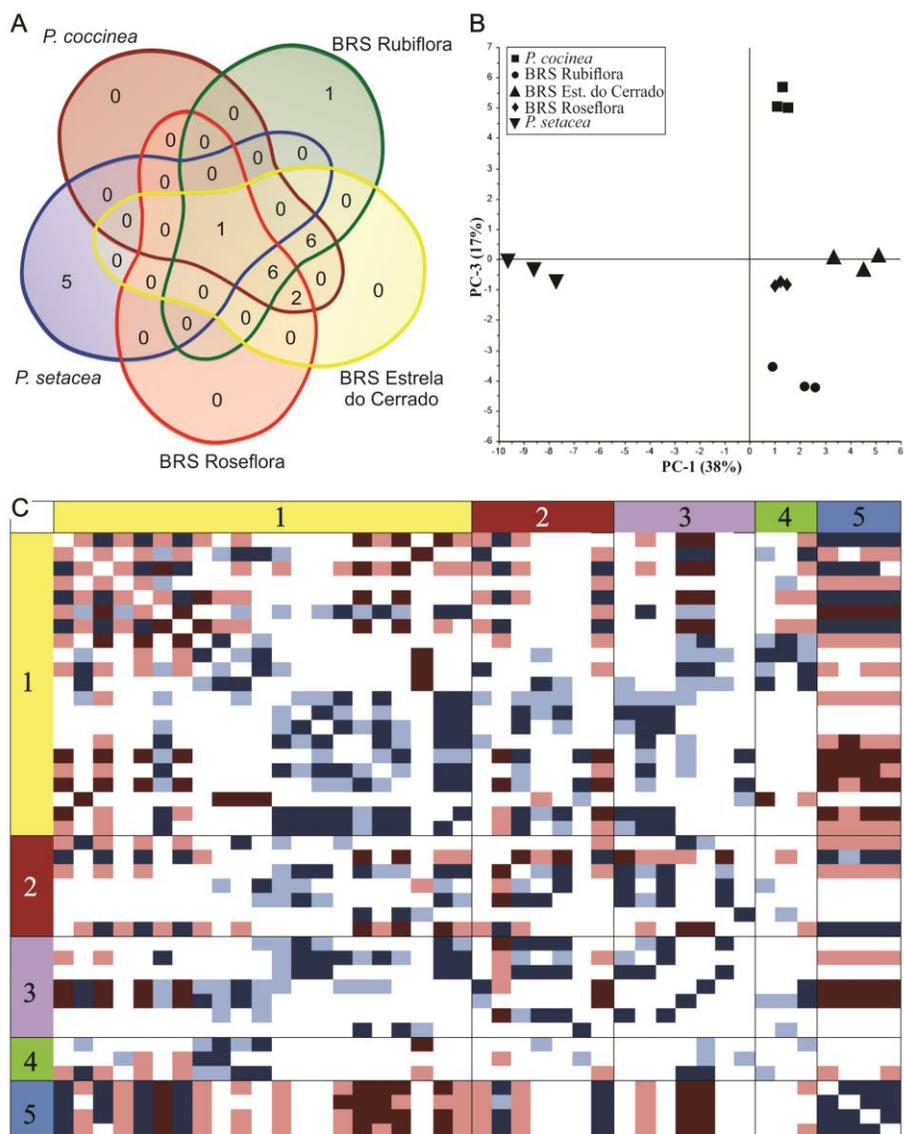
**Figura 6:** Mapa de calor dos compostos voláteis identificados no aroma de *P. coccinea*, *P. setacea*, BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora. Os genótipos seguidos por letras diferentes, em cada linha, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). *Abv.* TR, tempo de retenção.

Os valores e abundância dos íons ( $m/z$ ) detectados no fingerprint dos extratos de antocianinas e os compostos voláteis dos aromas florais dos genótipos estudados foram comparados utilizando Análise de Componentes Principais (Figura 7B). PC1 X PC3 foram capazes de representar 55% da variação. As amostras de *P.setacea* apresentaram-se completamente separadas das amostras dos demais genótipos, pelo eixo PC1, uma vez que, a composição de pigmentos (íons  $m/z$ ) e compostos voláteis dessas amostras eram claramente diferente dos demais genótipos (Material suplementar 4). Interessantemente, a maior parte dos íons ( $m/z$ ) detectados nos extratos de antocianinas dos genótipos avaliados apresentou correlação negativa com os compostos aromáticos benzênicos, grupo de voláteis característico do aroma de *P. setacea* (Figura 7C).

## **Discussão**

### **Caracterização do perfil de pigmentação das pétalas de *Passiflora***

As análises fenotípicas de *P. coccinea* (flor vermelha), *P. setacea* (flor branca) e dos híbridos obtidos pelo cruzamento e retrocruzamento com cada uma das espécies parentais demonstraram uma clara diferença na tonalidade da coloração de cada um dos genótipos. Em *Passiflora*, a diversidade de cores observada nas flores têm sido atribuída aos diferentes tipos e combinações de antocianinas observados nessas espécies (Halim e Collins 1970, Aizza e Dornelas 2011), tornando esses pigmentos hidrossolúveis, um importante carácter para o estudo da evolução das cores florais (He et al. 2011).



**Figura 7:** Comparação dos parâmetros de cor e aroma de *Passiflora coccinea*, *P. setacea* e dos híbridos BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora. **(A)** Diagrama de Venn ilustrando o número de compostos voláteis compartilhados e únicos entre os cinco genótipos. **(B)** Análise de componentes principais baseado no fingerprinting dos extratos de pétalas e na composição e abundância relativa dos compostos voláteis e identificados no aroma floral de três amostras avaliadas de cada genótipo. **(C)** Matriz de correlação de Pearson com base em coeficientes de correlação entre os íons ( $m/z$ ) detectados no extrato de antocianinas (1) e os compostos voláteis identificados no aroma floral dos cinco genótipos (2-5). As relações que são significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas pelo gradiente de intensidade de coloração sendo as correlações positivas e negativas são distinguidas pelas cores azul e vermelho, respectivamente. Os dados foram organizados em cinco classes: (1) antocianinas (íons -  $m/z$ ); (2) monoterpenos; (3) sesquiterpenos; (4) hidrocarbonetos; (5) compostos aromáticos benzênicos.

A partir das comparações entre os dados de separação dos compostos por UPLC e do padrão de fragmentação por ESI-MS/MS, que disponibilizaram informações estruturais importantes dos compostos, foi observado que as antocianinas identificadas nos cinco genótipos estudados derivaram-se de diferentes ramos da via biossíntese de antocianina. *P. coccinea* apresentou antocianidinas provenientes de duas das três vias de síntese; cianidina e pelargonidina, não sendo observado delphinidina. A presença das formas monoglicosiladas de cianidina e pelargonidina, confirmadas pela comparação com os seus respectivos padrões autênticos (Figura 3A-G), foi previamente relatada como responsáveis pela coloração dos filamentos da corona dessa mesma espécie (Aizza 2013). Este fato evidencia que a coloração de diferentes estruturas florais de *P. coccinea* foi obtida a partir dos mesmos tipos de antocianinas. A pelargonidina 3-O-glicosídeo foi a antocianina mais abundante tanto nas pétalas quanto nos filamentos da corona, nessa espécie. O acúmulo desse pigmento está de acordo com a coloração escarlate de *P. coccinea*, uma vez que, pigmentos derivados da pelargonidina geralmente produzem colorações avermelhadas, como observados nas pétalas e na corona dessa espécie.

O ramo de delphinidina pode ter sido perdido no decorrer da evolução como resultado de alguma mutação ao longo da via metabólica perdendo assim, a capacidade de produzir flores azuladas e/ou violetas (Aizza 2013). Considerando a posição derivada de *P. coccinea* em um clado que inclui diversas espécies polinizadas por insetos e que apresentam peças florais de coloração azulada (Muschner et al. 2003), a supressão do ramo de delphinidina parece ter conferido uma vantagem adaptativa à essa espécie, que é polinizada por beija-flores. Transições evolutivas de um estado ancestral de flores azuladas para um estado derivado de flores vermelhas têm sido reportadas repetidamente em angiospermas a partir

das alterações das vias biossintéticas principais de delphinidina para pelargonidina (Whittall e Hodges 2007; Wilson et al. 2007; Streisfeld e Rausher 2009). Além disso, flores vermelhas, como observado nessa espécie, não apenas têm sido associadas à ornitofilia como, também, são consideradas uma barreira para a polinização por abelhas (Castellanos et al. 2004, Cronk e Ojeda 2008), evidenciando uma possível mudança evolutiva em relação à preferência do agente polinizador.

Em *P. setacea*, a presença de traços de pelargonidina foi provavelmente devido à hidrólise de leucoantocianidinas durante a extração. Esses compostos são altamente instáveis e podem ser convertidas nas suas respectivas antocianidinas quando extraídas em solução alcoólica ebulição com cloreto de hidrogênio alcoólico (Harborne 1984, Shimada et al. 2004). Este resultado sugere que as pétalas brancas de *P. setacea* possam sintetizar leucopelargonidina ou seus derivados em baixas concentrações. Além dos pequenos traços de pelargonidina, os cromatogramas e espectros de massas obtidos por UPLC das pétalas brancas de *P. setacea* indicaram a presença de demais compostos (dados não mostrados). Embora tenha sido utilizado um método eficiente e usual para a extração de antocianinas existe a possibilidade de outros flavonoides terem, também, extraídos. O teor de flavonoides em flores brancas é superior em relação às flores coloridas (Saito et al. 1994, Yamamizo et al. 2012) e podem influenciar na coloração final exibida pelas flores (Mizuta et al. 2009). A relação do conteúdo de antocianinas e flavonoides não foi analisada no presente estudo e exige uma caracterização mais aprofundada em trabalhos futuros.

Acredita-se que a composição de antocianinas dos híbridos interespecíficos, que apresentaram fenótipos específicos e distintos entre si, foi basicamente herdada de *P. coccinea*, dada a ausência desses pigmentos em *P. setacea*. Os fenótipos ligeiramente

rosados dos híbridos que variavam de vermelho-púrpura a vermelho-alaranjado foi, possivelmente, devido a menor produção de pelargonidina. O conteúdo dessa antocianina diferiu significativamente entre os genótipos, apresentando-se em maior concentração nas flores escarlates de *P. coccinea*. Resultados similares também foram reportados em cultivares de *Disa* (Orchidaceae) e *Rhododendron* (Ericaceae), no qual os genótipos classificados como vermelho intenso apresentaram quantidades significativamente maiores de pelargonidina, em relação aos demais genótipos com colorações rósea / púrpura (Mizuta et al. 2009, Tatsuzawa et al. 2010). Poderíamos, portanto, postular que antocianinas associadas ao ramo de pelargonidina pode ser um dos principais fatores que determinaram a coloração das pétalas nos genótipos de *Passiflora* avaliados neste estudo, mesmo que o retrocruzamento com *P. coccinea* (flor vermelha) tenha propiciado o aumento da atividade do ramo de cianidina, conferindo uma tonalidade mais escura para BRS Rubiflora.

### **Micromorfologia dos filamentos da corona**

A corona é uma estrutura floral complexa comum em espécies de *Passiflora* e que, aparentemente, intermedia a relação planta-polinizador sobre diversos aspectos (Amela-García et al. 2007; Aizza e Dornelas 2011; Hemingway et al. 2011). Essa estrutura é reconhecida como o principal órgão emissor de aroma em flores de *Passiflora*, embora essa função também tenha sido sugerida, em menores proporções, em peças do perianto (MacDougal 1994). Os filamentos da corona, em geral, são constituídos por células cônicas, especialmente na região apical dessa estrutura, como observado neste estudo. A presença desse tipo celular com elevado grau de especialização é comum em pétalas (Miller et al. 2011). Considerando que em *Passiflora*, tanto pétalas como a corona atuam de

maneira à atrair visitantes florais sugere-se que as células cônicas exerçam funções similares em ambos os órgãos. As células cônicas proporcionam um aumento na saturação de cor, facilitando a sinalização para possíveis visitantes, bem como aumentam a superfície de produção de aroma, temperatura e, conseqüentemente, a emissão de voláteis. Possíveis correlações entre os aspectos morfométricos e tipos celulares da corona e a taxa de emissão de compostos voláteis florais poderão ser realizados a fim de compreender melhor a função dessas células especializadas nos filamentos da corona.

### **Composição do aroma floral de *P. coccinea* e *P. setacea* e a relação com os seus sistemas de polinização**

As espécies parentais, *P. coccinea* e *P. setacea*, apresentaram aromas com composições químicas distintas e que podem representar estratégias que evoluíram em resposta a diferentes pressões de seleção. Em geral, diferenças nas características florais entre espécies relacionadas são explicadas como adaptações aos diferentes grupos de polinizadores (Schemske e Bradshaw 1999; Whittall et al. 2006; Streisfeld and Kohn, 2007; Chen et al. 2012). Contudo, *P. coccinea* e *P. setacea* não apresentaram as características típicas relacionadas ao odor, descritas para espécies ornitófilas e quiropterófilas, respectivamente.

Na descrição clássica de sistemas de polinização, flores polinizadas por beija-flores refletem comprimentos de onda mais longos (especialmente vermelho), e geralmente não apresentam odores aparente (Vogel 1990; Altshuler 2003; Knudsen et al. 2004). Os dados apresentados no presente estudo sobre o aroma das flores vermelhas de *P. coccinea*, não suportam esse conceito. Nossas análises evidenciaram que essa espécie apresenta aroma e

esse, é majoritariamente constituído por componentes de natureza terpênica (95%). A detecção e caracterização de aromas em espécies polinizadas por beija-flores, mas não apresentavam perfume aparente ao nariz humano foram anteriormente reportadas por Knudsen et al. 2004, no qual também identificou-se a presença de terpenos na constituição do aroma dessas espécies. Os terpenos são compostos voláteis comuns no aroma floral de espécies vegetais (Knudsen et al. 2006) e suas emissões têm sido associadas tanto na atração de visitantes quanto a função de defesa química (Dobson 2006; Dudareva e Pichersky 2006; Junker e Blüthgen 2010). O *trans*- $\beta$ -Ocimeno,  $\alpha$ -Farneseno e  $\beta$ -Cariofileno, componentes majoritários do aroma de *P. coccinea*, têm sido frequentemente identificados como possíveis sinalizadores para a atração de insetos polinizadores (Dobson 2006; Chen et al. 2012; Hao et al. 2014). Apesar dessas evidências, a presença desses compostos no aroma de *P. coccinea* não necessariamente implica que esses compostos exerçam a mesma função, nessa espécie. Considerando a atividade forrageira dos beija-flores, que tendem a usar pistas visuais ao invés de olfativos para encontrar recompensas florais, acredita-se que a presença desses compostos, em *P. coccinea*, possa ser remanescente de uma espécie ancestral.

O aroma floral de *P. setacea* também apresentou *trans*- $\beta$ -Ocimeno sendo esse, o único composto comum entre *P. coccinea* e *P. setacea*, correspondendo a 25% e 60% da composição química total dos aromas dessas espécies, respectivamente. Esse monoterpeneo, que contribui para a formação de odores frutados e adocicados, é um composto onipresente em aromas florais (Knudsen et al. 2006) sendo, inclusive, descrito no aroma de outras espécies do gênero (Christensen et al. 1998). Compostos aromáticos benzênicos também ocorreram em abundância no aroma de *P. setacea*. Essa é uma das principais classes de

voláteis e é frequentemente relatada em espécies que apresentam antese noturna, especialmente, polinizadas por mariposas (Raguso et al. 2003). Assim, podemos afirmar que o aroma de *P. setacea* é constituído por uma gama de compostos comumente reportados em aromas florais. Esses resultados contradizem a hipótese de que compostos de enxofre, cuja ocorrência é incomum em aromas florais (Knudsen et al. 1993), são substâncias fundamentais na co-evolução entre plantas e morcegos (Kaiser e Tollsten 1995; Pettersson et al. 2004). A ausência de compostos de enxofre, como o dimetil disulfeto, tem sido reportada em diversas espécies quiropterófilas (Tschapka et al. 1999; Piechowski et al. 2009; Aguilar-Rodríguez et al. 2014), inclusive em outra espécie de *Passiflora*, *P. galbana* (Varassin et al. 2011). Em contrapartida, a maior parte dos compostos identificados no aroma de *P. setacea* foi descrita em outras espécies polinizadas por morcegos (Bestmann et al. 1997; Tschapka et al. 1999; Piechowski et al. 2009; Aguilar-Rodríguez et al. 2014). A falta de compostos de enxofre no aroma floral de plantas polinizadas por morcegos pode ser devido a restrições filogenéticas (von Helversen et al. 2000).

### **Comparação da composição do aroma floral entre os híbridos interespecíficos e as possíveis relações entre cor e aroma**

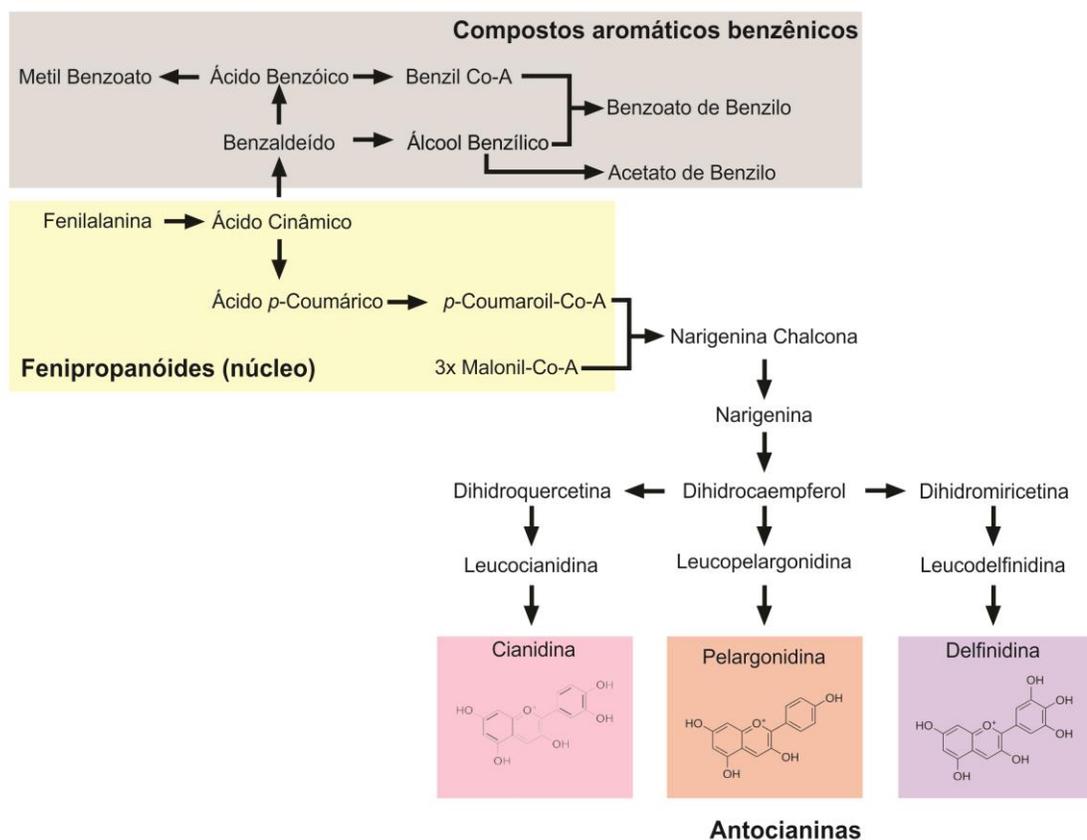
Como reportado acima, dois perfis químicos foram observados a partir da caracterização da composição de voláteis dos aromas das espécies parentais. O primeiro perfil, observado nas flores vermelhas de *P. coccinea*, envolvia a via de mono- e sesquiterpenos que juntos constituíam 95% do aroma floral. O segundo envolvia uma mistura de compostos comuns da via dos benzenoides e um monoterpene majoritário, descrito nas flores brancas de *P. setacea*. Ao analisar o aroma dos híbridos interespecíficos

evidenciou-se que tanto o híbrido F1, como os híbridos provenientes dos retrocruzamentos possuíam aromas com composição química qualitativamente similar ao de *P. coccinea*. Esse resultado indica que o perfil de compostos voláteis apresentou uma herança dominante nos cruzamentos genéticos de *Passiflora*.

A análise multivariada evidenciou uma clara separação dos genótipos coloridos em relação às amostras brancas de *P. setacea* indicando um possível efeito da cor no perfil de compostos voláteis. A composição química do aroma floral pode variar consistentemente com a composição de antocianinas dado ao compartilhamento de rotas biossintéticas entre essas duas características florais (Odell et al 1999; Flamini et al. 2002; Majetic et al. 2007; Dormont et al. 2014). Isso implica que qualquer mutação em um gene que codifica uma enzima ou um fator de transcrição regulador pode ter um impacto tanto na cor quanto no aroma emitido. Zucker et al. (2002) mostraram, por exemplo, que a supressão de uma única enzima chave levou à formação de mutantes com flores brancas com maiores quantidades de compostos aromáticos.

A presença de compostos benzênicos em *P. setacea* é uma característica comum em flores brancas, ocorrendo em grandes quantidades nesses morfotipos (Zucker et al. 2002; Majetic et al. 2007). Foi demonstrado que tais compostos interagem com a via de produção de pigmentos derivados de antocianinas devido a uma regulação pleiotrópica ou à concorrência por um precursor metabólico comum, a fenilalanina (Sheehan et al. 2012, Figura 8). Interessantemente, foi observado no presente estudo que a maior parte dos íons ( $m/z$ ) detectados nos extratos de antocianinas dos genótipos avaliados apresentou correlação negativa com os compostos voláteis aromáticos benzênicos. Em flores brancas, em que as vias biossintéticas de antocianinas estão inativas, precursores de antocianinas podem ser

redirecionados do fluxo metabólico e convertidos em compostos voláteis benzênicos, levando a uma ligação biossintética entre cor e odor (Zuker et al. 2002; Sheehan et al. 2012; Figura 8). Essas evidências sugerem uma correlação inversa entre benzenoides e antocianinas em que a presença de pigmentação vermelha (pelargonidina) resultaria em uma redução, ou mesmo, supressão de compostos benzênicos no aroma floral. Isso explicaria, em parte, a ausência de compostos benzênicos no aroma floral de BRS Estrela do Cerrado e BRS Roseflora, híbridos que possuem herança direta com *P. setacea*.



**Figura 8:** Vias biossintéticas de antocianinas e de compostos voláteis aromáticos benzênicos. Note que o aminoácido fenilalanina é um precursor comum de ambas as vias de biossíntese.

A interação entre as vias biossintéticas de compostos aromáticos e flavonoides sugere que diferenças nas fragrâncias florais podem ser resultantes de regulações transcricionais produzindo combinações específicas de cor-aroma. Como relatado no tópico anterior, esses dados questionam se a seleção de cor e aroma, ao longo do processo evolutivo, pode ser somente atribuída a co-evolução com os agentes polinizadores. Apesar dos poucos exemplos reportados na literatura, é possível que para cor e aroma, as interações entre genes regulatórios e estruturais tenham contribuído significativamente na formação de parte da diversidade fenotípica desses caracteres florais (Sheehan et al. 2012).

### **Considerações finais**

No presente estudo, caracterizou-se as diferenças na composição das antocianinas presentes nas pétalas e dos compostos voláteis emitidos no aroma de *P. coccinea* (flor vermelha), *P. setacea* (flor branca) e dos seus híbridos interespecíficos. A análise multivariada apresentou uma distinção evidente do genótipo branco, em relação aos demais, evidenciando uma possível relação entre esses caracteres. As flores vermelhas de *P. coccinea*, bem como, os híbridos interespecíficos, que também apresentavam flores com diferentes tonalidades de vermelho, apresentaram aromas com uma composição química similar. Porém, essa composição foi completamente diferente das flores brancas de *P. setacea* que apresentaram intimamente associadas à determinada classes de compostos voláteis (benzenoides). Futuros estudos a nível molecular são necessários para compreender o grau de associação entre esses dois importantes caracteres associados na atração de polinizadores.

## Referências Bibliográficas

Aguilar-Rodríguez PA, MacSwiney GMC, Krömer T, García-Franco JG, Knauer A, Kessler M (2014) First record of bat-pollination in the species-rich genus *Tillandsia* (Bromeliaceae). **Annals of Botany** 113: 1047-1055

Aizza LCB, Dornelas MC (2011) A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in passionflowers. **Journal of Nucleic Acids** 2011: 1-17

Aizza LCB (2013) **Caracterização molecular da pigmentação dos filamentos da coroa no gênero Passiflora (Passifloraceae)**. Universidade Estadual de Campinas

Altshuler DL (2003) Flower color, hummingbird pollination, and habitat irradiance in four Neotropical forests. **Biotropica** 35: 344-355

Amela García MT, Galati BG, Hoc PS (2007) Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). **Flora** 202: 302-315

Andersson S, Dobson HEM (2003) Behavioral foraging responses by the butterfly *Heliconus melpomeno* Lantana camara. **Journal of Chemical Ecology** 29: 2303-2318

Armbruster WS (2002) Can indirect selection and genetic context contribute to trait diversification? A transition-probability study of blossom-color evolution in two genera. **Journal of Evolutionary Biology** 15: 468-486

Bestmann H J, Winkler L, von Helversen O (1997) Headspace analysis of volatile flower scent constituents of bat-pollinated plants. **Phytochemistry** 46: 1169-1172

Castellanos MC, Wilson P, Thomson JD (2004) ‘Anti-bee’ and ‘pro-bird’ changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. **Journal of Evolutionary Biology** 17: 876-885

Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** 45: 1-92

Chen G, Gong WC, Ge J, Dunn BL, Sun WB (2012) Floral scents of typical *Buddleja* species with different pollination syndromes. **Biochemical Systematics and Ecology** 44: 173-178

Chittka L, Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. **Current Opinion in Plant Biology** 9: 428-435

Christensen AB, Knudsen JT, Olesen JM (1998) **Independence of floral morphology and scent chemistry as trait groups in a set of Passiflora species**. University of Aarhus

Cronk Q, Ojeda I (2008) Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. **Journal of Experimental Botany** 59: 715-727

Dobson H (2006) Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: Dudareva NA, Pichersky E, eds. **Biology of floral scent**. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 147-198

Dobson HEM (1994) Floral volatiles in insect biology. In: Bernays, E (Ed.), **Insect-Plant Interactions**, vol. 5. CRC, Boca Raton, Fla., pp. 47-81

Dormont L, Delle-Vedove R, Bessièrè JM, Schatz B (2014) Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. **Phytochemistry** 100: 51-59

Dudareva NA, Pichersky E (2006) Floral scent metabolic pathways: their regulation and evolution. In: Dudareva NA, Pichersky E, eds. **Biology of floral scent**. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 55-78

Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD (2004) Pollination syndromes and floral specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 35: 375-403

Fischer E, Leal IR (2006) Effect of nectar secretion rate on pollination success of *Passiflora coccinea* (Passifloraceae) in the central Amazon. **Brazilian Journal of Biology** 66:29-41

Flamini G, Cioni PL, Morelli I (2002) Analysis of the essential oil of the aerial parts of *Viola trusca* from Monte Labbro (South Tuscany, Italy) and in vivo analysis of flower volatiles using SPME. **Flavour and Fragrance Journal** 17: 147-149

Fleming TH, Geiselman C, Kress WJ (2009) The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. **Annals of Botany** 104: 1017-1043

Galizia GC, Kunze J, Gumbert A, Borg-Karlson AK, Sachse S, Markl C, Menzel R (2004) Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system. **Behavioral Ecology** 16: 159-168

Halim MM, Collins RP (1970) Anthocyanins of *Passiflora quadrangularis*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 97: 247-248

Hao RJ, Zhang Q, Yang WR, Wang J, Cheng TR, Pan HT, Zhang QX (2014) Emitted and endogenous floral scent compounds of *Prunus mume* hybrids. **Biochemical Systematics and Ecology** 54: 23-30

- Harborne JB (1984) Phenolic compounds. In: Harborne JB, ed. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 2<sup>nd</sup> ed, 37-99
- He Q, Shen Y, Wang M, Huang M, Yang R, Zhu S, Wang L, Xu Y, Wu R (2011) Natural Variation in Petal Color in *Lycoris longituba* Revealed by Anthocyanin Components. **PLoS ONE** 6: e22098
- Hemingway CA, Christensen AR, Malcomber ST (2011) B- and C-class gene expression during corona development of the blue passionflower (*Passiflora caerulea*, Passifloraceae). **American Journal of Botany** 98: 923-934
- Johnson SD, Hargreaves AL, Brown M (2006) Dark, bitter-tasting nectar functions as a filter of flower visitors in a bird-pollinated plant. **Ecology** 87: 2709-2716
- Junker RR, Blüthgen N (2010) Floral scents repel facultative flower visitors, but attract obligate ones. **Annals of Botany** 105: 777-782
- Kaczorowski RL, Juenger TE, Holtsford TP (2008) Heritability and correlation structure of nectar and floral morphology traits in *Nicotiana glauca*. **Evolution** 62: 1738–1750
- Kaiser R, Tollsten L (1995) An introduction to the scent of cacti. **Flavor and Fragrance Journal** 10: 153-164
- Kingston AB, Mc Quillan PB (2000) Are pollination syndromes useful predictors of floral visitors in Tasmania? **Austral Ecology** 25: 600-609
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Stahl B (2006) Diversity and distribution of floral scent. **The Botanical Review** 72: 1-120
- Knudsen JT, Tollsten L, Bergström LG (1993) Floral scents – a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. **Phytochemistry** 33: 253-280
- Knudsen JT, Tollsten L, Groth I, Bergström G, Raguso RA (2004) Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. **Botanical Journal of the Linnean Society** 146: 191-199
- Kunze J, Gumbert A (2001) The combined effect of color and odor on flower choice behavior of bumble bees in flower mimicry systems. **Behavioral Ecology** 12: 447-456
- MacDougal JM (1994) Revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs** 41:1-146

Majetic CJ, Raguso RA, Tonsor SJ, Ashman TL (2007) Flower color-flower scent associations in polymorphic *Hesperis matronalis* (Brassicaceae). **Phytochemistry** 68: 865-874

Miller R, Owens SJ, Rørslett B (2011) Plants and colour: Flowers and pollination. **Optics & Laser Technology** 43:282–294

Mizuta D, Ban T, Miyajima I, Nakatsuka A, Kobayashi N (2009) Comparison of flower color with anthocyanin composition patterns in evergreen azalea. **Scientia Horticulturae** 122: 594-602

Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM, Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 90: 1229-1238

Odell E, Raguso RA, Jones KN (1999) Bumblebee foraging responses to variation in floral scent and color in snapdragons (*Antirrhinum*: Scrophulariaceae). **American Midland Naturalist** 142: 257-265

Ollerton J, Alarcón R, Waser NM, Price MV, Watts S, Cranmer L, Hingston A, Peter CI, Rotenberry J (2009) A global test of the pollination syndrome hypothesis. **Annals of Botany** 103: 1471-1480

Pettersson S, Ervik F, Knudsen JT (2004) Floral scent of batpollinated species: West Africa vs. the New World. **Biological Journal of the Linnean Society** 82: 161-168

Piechowski P, Dötterl S, Gottsberger G (2009) Pollination biology and floral scent chemistry of the Neotropical chiropterophilous *Parkia pendula*. **Plant Biology** 12: 172-182

Proctor M, Yeo P, Lack A (1996) **The Natural History of Pollination**. Portland: Timber Press

Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, Mcdade LA (2003) Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. **Phytochemistry** 63: 265-284

Raguso RA, Willis MA (2002) Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by naive hawkmoths, *Maduca sexta*. **Animal Behaviour** 64: 685-695

Raguso RA, Willis MA (2005) Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta*. **Animal Behaviour** 69: 407-418

Saito N, Cheng J, Ichimura M, Yokoi M, Abe Y, Honda T (1994) Flavonoids in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. **Phytochemistry** 35:687-691

Sheehan H, Hermann K, Kuhlemeier C (2012) Color and scent: how single genes influence pollinator attraction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** 77: 117-133

Schemske DW, Bradshaw Jr HD (1999) Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences** 96: 11910-11915

Shimada S, Takahashi K, Sato Y, Sakuta M (2004) Dihydroflavonol 4-reductase cDNA from non-anthocyanin-producing species in the Caryophyllales. **Plant And Cell Physiology** 45: 1290-1298

Smith SD, Rausher MD (2011) Gene loss and parallel evolution contribute to species difference in flower color. **Molecular Biology and Evolution** 28: 2799-2810

Steenhuisen SL, Raguso RA, Johnson SD (2012) Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. **Phytochemistry** 84: 78-87

Streisfeld MA, Kohn JR (2007) Environment and pollinator-mediated selection on parapatricfloral races of *Mimulus aurantiacus*. **Journal of Evolutionary Biology** 20: 122-132

Streisfeld MA, Rausher MD (2009) Altered trans-regulatory control of gene expression in multiple anthocyanin genes contributes to adaptive flower color evolution in *Mimulus aurantiacus*. **Molecular Biology and Evolution** 26: 433-444

Tatsuzawa F, Ichihara K, Shinoda K, Miyoshi K (2010) Flower colours and pigments in *Disa hybrid* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany** 76: 49-53

Thomson JD, Wilson P (2008) Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. **International Journal of Molecular Sciences** 169: 23-38

Tschapka M, von Helversen O, Barthlott W (1999) Bat pollination of *Weberocereus tunilla*, an epiphytic rain forest cactus with functional flagelliflory. **Plant Biology** 1: 554-559

Ulmer T, MacDougal JM (2004) **Passiflora: Passionflowers of the world**. Timber Press Portland, USA

van Schie CCN, Haring MA, Schuurink RC (2006) Regulation of terpenoid and benzenoid production in flowers. **Current Opinion in Plant Biology** 9: 203-208

Varassin IG, Trigo JR, Sazima M (2001) The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** 136: 139-152

Vogel S (1990) Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias** 59: 5-30

von Helversen O, Winkler L, Bestmann HJ (2000) Sulphur-containing 'perfumes' attract flower-visiting bats. **Journal of Comparative Physiology A** 186: 143-153

Whittall JB, Hodges SA (2007) Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. **Nature** 447: 706-709

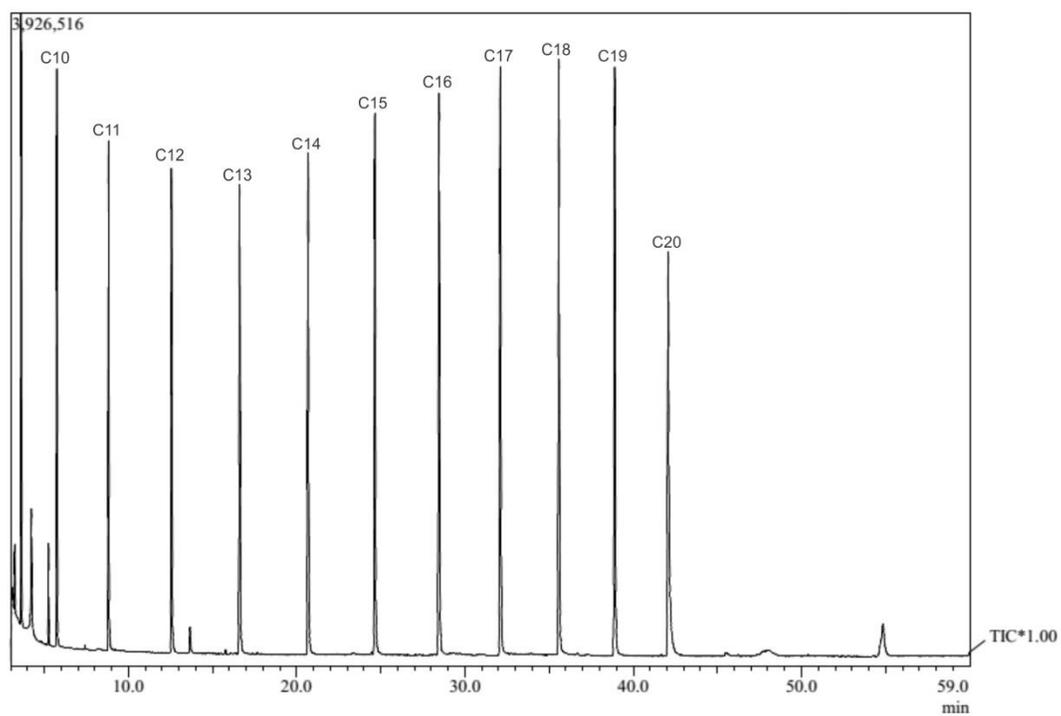
Whittall JB, Voelckel C, Kliebenstein DJ, Hodges SA (2006) Convergence, constraint and the role of gene expression during adaptive radiation: floral anthocyanins in *Aquilegia*. **Molecular Ecology** 15: 4645-4657

Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS, Thomson JD (2007) Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. **New Phytologist** 176: 883-890

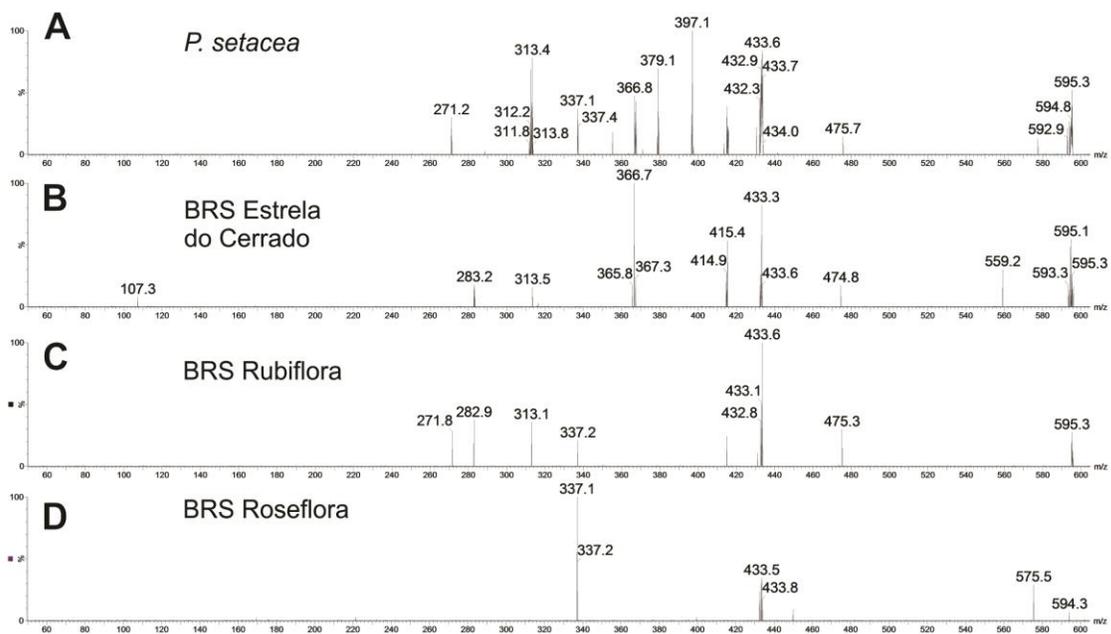
Yamamizo C, Noda N, Ohmiya A (2012) Anthocyanin and carotenoid pigmentation in flowers of section *Mina*, subgenus *Quamoclit*, genus *Ipomoea*. **Euphytica** 184: 429-440

Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Forkmann G, Martens S, Neta-Sharir I, Weiss D, Vainstein A (2002) Modification of flower colour and fragrance by antisense suppression of the flavonone 3-hydroxylase gene. **Molecular Breeding** 9: 33-41

## Material suplementar



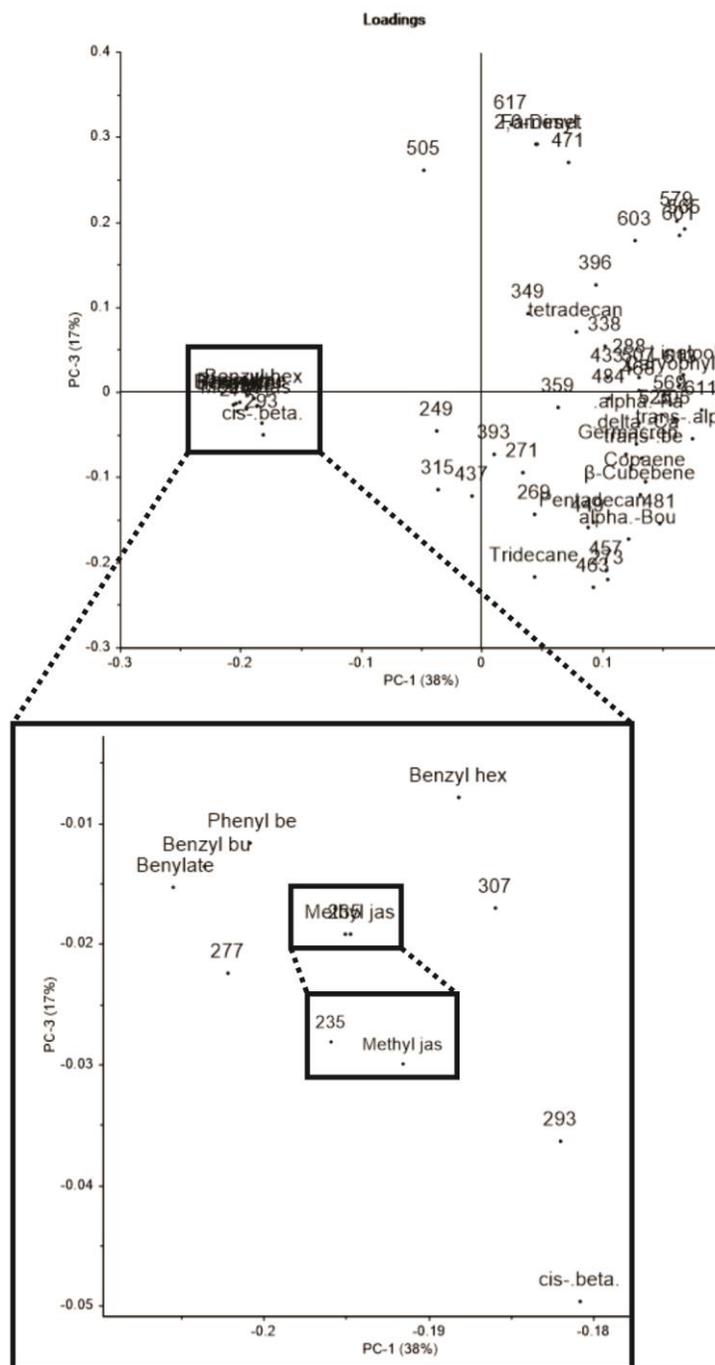
**Material suplementar 1.** Cromatograma de íons totais, obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) a partir da injeção do padrão analítico de n-alcenos (concentração de  $40 \text{ ug.g}^{-1}$  para cada componente, diluído em hexano).



**Material suplementar 2.** Fragmentações ESI(-)-MS/MS extraídas do íon  $m/z$  595 (tempo de retenção = 3.18 min) dos extratos de pétalas dos diferentes genótipos de *Passiflora*. (A-D) Identificação de pelagornidina-3,5-O-diglicosídeo em *Passiflora setacea* (A), BRS Estrela do Cerrado (B), BRS Rubiflora (C) e BRS Roseflora (D).

	<i>P. coccinea</i>	BRS Rubiflora	BRS Estrela do Cerrado	BRS Roseflora	<i>P. setacea</i>	
<b>Número total de compostos</b>	15	14	15	9	6	
<b>Compostos</b>	<b>TR</b>	<b>(%) Percentagem relativa</b>				
<i>Monoterpenos</i>						
<b>01</b> <i>trans</i> -beta-Ocimene	6.992	1,90	2.07	2.08	2.53	----
<b>02</b> <i>cis</i> -beta-Ocimene	7.349	26,59	31.09	25.95	47.27	64.29
<b>03</b> Linalool	9.024	1,34	1.13	2.07	0.42	----
<b>04</b> $\alpha$ -Bourbonene	20.056	0,60	9.72	8.35	----	----
<b>05</b> $\alpha$ -Cubebene	20.305	0,72	4.47	6.60	----	----
<b>06</b> Geraniolene	27.101	9,94	----	1.02	0.99	----
<b>07</b> Methyl jasmonate	30.370	----	----	----	----	4.48
<i>Sesquiterpenos</i>						
<b>08</b> Copaene	19.708	0.58	2.76	3.80	----	----
<b>09</b> Caryophyllene	21.461	4.63	3.41	12.14	7.47	----
<b>10</b> Germacrene D	23.912	0.51	6.13	14.07	----	----
<b>11</b> <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotene	24.611	6.06	6.63	4.76	6.89	----
<b>12</b> $\alpha$ -Farnesene	25.115	19.82	21.71	9.27	20.56	----
<b>13</b> $\Delta$ -Cadinene	25.593	0.43	0.62	0.92	----	----
<b>14</b> Farnesyl cyanide	27.806	22.61	----	2.39	3.76	----
<i>Hidrocarbonetos</i>						
<b>15</b> Tridecane	16.705	----	0.61	----	----	----
<b>16</b> Tetradecane	20.767	0.85	0.81	0.15	----	----
<b>17</b> Pentadecane	24.764	1.83	4.16	0.85	3.98	----
<i>Benzenoides</i>						
<b>18</b> Benzyl butanoate	18.633	----	----	----	----	6.70
<b>19</b> Benzyl hexanoate	26.48	----	----	----	----	2.59
<b>20</b> Phenyl benzyl ether	26.751	----	----	----	----	2.16
<b>21</b> Benylate	34.389	----	----	----	----	14.26

**Material suplementar 3:** Quantidade média relativa (%) dos componentes do aroma floral de *P. coccinea*, BRS Rubiflora, BRS Estrela do Cerrado e *P. setacea*, utilizando GC-MS.



**Material Suplementar 04:** Análise de componentes principais baseado na composição e abundância relativa dos compostos voláteis do aroma floral e íons ( $m/z$ ) identificados no fingerprinting do extrato de pétalas dos genótipos de *Passiflora*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, constatou-se que o crescimento assimétrico do androginóforo, levando à flexão, ocorreu em um estágio avançado de desenvolvimento da flor. A curvatura do androginóforo, comumente observada em espécies de *Passiflora* polinizadas por morcegos, foi significativamente reduzida quando os órgãos do perianto foram parcialmente removidos ou quando os ramos florais foram tratados com um inibidor do transporte polar de auxina (NPA). Além disso, os androginóforos de plantas tratadas com auxina (2,4-D) foram mais curvos quando comparados ao controle. Estes resultados sugerem que a restrição física exercida pelo perianto e a redistribuição de auxina promovem a curvatura do androginóforo em *P. mucronata* e pode estar relacionado com a evolução da quiropterofilia no gênero *Passiflora* (ver capítulo I).

Quanto aos aspectos estruturais e bioquímicos (cor, aroma e néctar) caracterizados em duas espécies com diferentes sistemas de polinização (ornitofilia e quiropterofilia) e nos híbridos interespecíficos obtidos entre as mesmas (Capítulos II e III), nossas análises evidenciaram que a espécie ornitófila (*P. coccinea* - flor vermelha) e a espécie quiropterófila (*P. setacea* - flor branca) apresentaram caracteres morfológicos, bem como, a composição química do néctar e coloração contrastantes, estando essas características florais de acordo com os seus sistemas de polinização. Nos híbridos, nem todas as características foram intermediárias, em relação às espécies parentais, apresentando um padrão de herdabilidade complexo.

A diversidade de pigmentação caracterizada nestes genótipos de *Passiflora* pôde ser explicada pela combinação de moléculas específicas de antocianinas acumuladas em suas pétalas.

Quanto à composição química do aroma, os híbridos apresentaram uma composição qualitativamente similar ao de *P. coccinea*, não sendo observados a herdabilidade de compostos característicos do aroma de *P. setacea* (compostos aromáticos benzênicos). Foi sugerida que a ausência de compostos benzênicos no aroma de híbridos que possuem herança direta de *P. setacea* possa estar associada, em parte, com a via de produção de pigmentos derivados de antocianinas devido a uma regulação pleiotrópica comum entre essas vias biossintéticas.

Os resultados relatados no presente trabalho constituem informações importantes para a caracterização e entendimento dos sistemas de polinização em *Passiflora*, subsidiando investigações que visam à compreensão da evolução da ornitofilia e quiropterofilia dentro desse gênero.