

LUCAS CUTRI

**O AROMA DAS FLORES DE *Passiflora* spp NA ATRAÇÃO DE
POLINIZADORES: UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA E
MOLECULAR**

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LUCAS CUTRI

**O AROMA DAS FLORES DE *Passiflora* spp NA ATRAÇÃO DE
POLINIZADORES: UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA E
MOLECULAR**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lucas Cutri
e aprovada pela Comissão Julgadora.

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM BIOLOGIA VEGETAL.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO CARNIER DORNELAS

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C979a Cutri, Lucas, 1983-
O aroma das flores de *Passiflora spp* na atração de polinizadores: uma abordagem bioquímica e molecular / Lucas Cutri. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. *Passiflora edulis*. 2. *Passiflora coccinea*. 3. *Passiflora mucronata*. 4. Headspace floral. 5. Polinização. I. Dornelas, Marcelo Carnier, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: A biochemistry and molecular view of flower scents in *Passiflora spp* correlated with pollinators attraction

Palavras-chave em Inglês:

Passiflora edulis

Passiflora coccinea

Passiflora mucronata

Floral headspace

Pollination

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marcelo Carnier Dornelas [Orientador]

Marcos José Salvador

Claudia Regina Baptista Haddad

Maria Helena de Souza Goldman

Marcio Alves Ferreira

Data da defesa: 18-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 18 de Fevereiro de 2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas



Prof. Dr. Marcos Jose Salvador



Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad



Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman



Prof. Dr. Marcio Alves Ferreira



Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo C. Dornelas, pela orientação.

À CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador, pelas análises bioquímicas

Ao Prof. Dr. Rogério Margis, pelas análises de expressão por qRT-PCR

A todos os integrantes, sem distinção, do departamento de Biologia Vegetal.

Aos amigos e colegas que me acompanharam ao longo destes anos.

Aos meus pais e à minha irmã.

Em memória do meu avô Mario Cutri

Índice

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1 Introdução.....	1
1.1 A Natureza química do “headspace” floral na atração de polinizadores.....	1
1.1.1 Voláteis responsáveis pela atração de insetos.....	3
1.1.2 Componentes químicos voláteis atuando na atração de pássaros.....	7
1.1.3 Componentes químicos voláteis atuando na atração de morcegos.....	8
1.2 Biossíntese dos componentes presentes no “headspace” floral.....	10
1.2.1 Biossíntese de voláteis provenientes da via dos terpenóides.....	11
1.2.2 Biossíntese de voláteis provenientes da via dos fenilpropanóides.....	12
1.2.2 Biossíntese de voláteis provenientes da via dos ácidos graxos.....	15
1.2.2 Biossíntese de voláteis: reações de modificação.....	15
1.3 Implicações evolutivas das vias de biossíntese de voláteis.....	16
1.4. A relação entre as características florais do gênero <i>Passiflora</i> e a atração de diferentes polinizadores.....	17
2. Objetivos.....	22
3 Material e Métodos.....	23
3.1 Material Vegetal.....	23
3.2 Coleta de constituintes voláteis presentes no “headspace” floral empregando a micro extração em fase sólida (SPME).....	23
3.3 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/MS.....	24
3.4. Busca de genes envolvidos na biossíntese de compostos voláteis (<i>Data Mining</i>).....	25
3.5 Quantificação de transcritos por qRT-PCR (PCR em tempo Real).....	26
3.6 Detecção de transcritos por RT-PCR não-quantitativa.....	29
3.7 Hibridizações <i>in situ</i>	30
4 Resultados.....	31

4.1 Coleta e caracterização dos constituintes do “headspace” em <i>Passiflora</i>	31
4.2 Data-Mining de seqüências de genes envolvidos na biossíntese de compostos voláteis	
4.2.1 Isoprenos	36
4.2.2 Fenilpropanóides	37
4.2.3 Metiltransferases	39
4.3 Análise da expressão de genes da via de biossíntese de fenilpropanóides em <i>P. edulis</i>	
4.3.2 Análise da expressão de <i>PePAL</i> por RT-PCR	41
4.3.2 Análise quantitativa da expressão de <i>PePAL</i> por qRT-PCR	42
4.3.2 Análise da expressão de <i>PePAL</i> por hibridização <i>in situ</i>	43
4.3.3 Análise quantitativa da expressão de <i>PeOMT</i> por qRT-PCR.....	43
4.3.4 Análise da expressão de <i>PeOMT</i> por hibridização <i>in situ</i>	45
5 Discussão.....	47
5.1 Componentes voláteis presentes no “headspace” de <i>P. edulis</i>	47
5.2 Componentes voláteis presentes no “headspace” de <i>P. coccinea</i>	48
5.3 Componentes voláteis presentes no “headspace” de <i>P. mucronata</i>	49
5.4 Genes envolvidos na biossíntese de voláteis do “headspace” floral de <i>Passiflora</i>	50
5.5 Genes envolvidos na biossíntese de voláteis do “headspace” floral de <i>P. edulis</i>	52
5.6 Expressão dos genes envolvidos na biossíntese de voláteis do “headspace” floral de <i>Passiflora edulis</i>	57
6 Conclusões	60
7 Referências	61

Resumo

O gênero *Passiflora* é representado por lianas e pequenos arbustos que totalizam cerca de 600 espécies. As flores deste gênero possuem uma série de inovações fisiológicas e morfológicas, que possibilitam a adaptação a diferentes tipos de polinizadores. Os compostos voláteis que compõem o aroma destas flores contribuem para o sucesso reprodutivo destas espécies, uma vez que atuam na atração de polinizadores específicos. Os constituintes voláteis emitidos pelas flores são em sua grande maioria lipofílicos com baixo peso molecular e pertencem a diferentes classes de metabólitos vegetais.

O objetivo deste trabalho foi analisar os componentes voláteis presentes no aroma de três espécies de *Passiflora* com diferentes síndromes de polinização: melitofilia, ornitofilia e quiropterofilia (*Passiflora edulis*, *P. coccinea* e *P. mucronata*, respectivamente). As análises foram realizadas utilizando técnicas de micro extração em fase sólida (SPME) associada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS). Os resultados sugerem diferenças no padrão de substâncias voláteis detectadas no “headspace” floral das espécies *P. edulis* e *P. coccinea* e *P. mucronata*. *P. edulis* possui como componentes voláteis majoritários os benzenóides metoxilados provenientes da via dos fenilpropanóides; *P. coccinea* possui principalmente terpenóides e *P. mucronata* possui terpenóides, alcanos, derivado de ácido graxo e substância contendo enxofre.

No banco de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) de tecidos reprodutivos de *P. edulis* (PASSIOMA) foram encontradas seqüências similares a genes relacionados à via de biossíntese de componentes voláteis. Destes, *PePAL* e *PeOMT*, potencialmente envolvidos na produção de benzenóides metoxilados, que também são encontrados em outras espécies vegetais polinizadas por insetos, tiveram seus padrões de expressão analisados em tecidos de flores de *P. edulis* por RT-PCR quantitativa ou semi-quantitativa e por hibridização *in situ*.

Os resultados sugerem que a via de fenilpropanóides está ativa em tecidos florais de *P. edulis* potencialmente envolvidos na emissão de voláteis, especialmente no tecido epitelial da coroa, o qual apresenta características ultraestruturais de células secretoras.

O trabalho corrobora com a observação de diferença no padrão de componentes voláteis em flores de *Passiflora*, e apresenta dois genes candidatos envolvidos na produção de uma classe de metabólitos especializados em *P. edulis*.

Abstract

The genus *Passiflora* comprises more than 600 species of lianas and small shrubs. The typical flowers of *Passiflora* congregate a series of morphological and physiologic innovations that allow adaptation to a number of pollinating agents. The volatile compounds present in the flower scent (“headspace”) are important features to the effective reproduction of plant species since they act in the attraction of the correct pollinating agent. These compounds emitted by flowers are basically of low-molecular weight, mostly lipophilic and are represented by very different chemical classes.

The aim of this work was the analysis of the volatile compounds present in the floral “headspace” of three different *Passiflora* species pollinated by bees, hummingbirds and bats (*Passiflora edulis*, *P. coccinea* and *P. mucronata*, respectively). Solid phase micro extraction (SPME) coupled to GC-MS analysis was the analytical tool in that study. The results showed different patterns of volatile compounds in the floral “headspace” of *P. edulis*, *P. coccinea* and *P. mucronata*. The “headspace” of *P. edulis* contained phenylpropanoids mostly represented by methylated benzenes, *P. coccinea* terpenes and *P. mucronata* terpenes, alkanes, fatty acid derivative, and sulphur-containing compounds.

Genes potentially involved with the synthesis of key enzymes of volatile compounds pathways were identified in a Expressed Sequence Tag (EST) database obtained from reproductive tissues of *P. edulis* (PASSIOMA). Among these *PePAL* and *PeOMT* possibly involved with the production of methylated benzenes that acting in the insect attraction in different plant species. *PePAL* and *PeOMT* had their expression patterns analyzed by quantitative and semi-quantitative RT-PCR as well as by *in situ* hybridization. This approach confirmed that the phenylpropanoid pathway is active in flowers of *P. edulis*, especially in the epithelial tissue in corona filaments, that has ultra-structural features of secretory cells.

This work emphasizes the chemical differences in scent flower among *Passiflora* species, and shows two genes potentially involved in scent flowers production in *P. edulis*

1 Introdução

1.1 A Natureza química do “headspace” floral na atração de polinizadores

Em uma perspectiva evolutiva, as plantas emergiram para um ambiente seco na era Devoniana, no qual passaram a apresentar o processo de fecundação, para a formação dos zigotos, de forma cada vez mais independente da presença de água para o transporte dos gametas masculinos (COWEN, 2004).

Durante o Mesozóico as coníferas dominavam os ambientes terrestres e produziam grãos de pólen que eram dispersos pelo vento. A anemofilia (polinização pelo vento) se mostra eficaz quando existe um grande número de indivíduos da mesma espécie vivendo relativamente próximos. Porém, não é isto que se encontra atualmente em uma floresta tropical, por exemplo, onde a biodiversidade é imensa (COWEN, 2004).

O sucesso reprodutivo das angiospermas em ambientes secos, é em grande parte devido à habilidade que elas adquiriram na utilização de animais como agentes dispersores de seus gametas masculinos (COWEN, 2004). Para tal, a atração destes animais é de fundamental importância e o aroma das flores desempenha um papel chave na consolidação da fecundação nas angiospermas (GANG, 2005).

Alguns autores acreditam que as plantas começaram a emitir substâncias voláteis a partir de suas estruturas reprodutivas para defender estes tecidos contra a herbivoria. Com isto, alguns animais tornaram-se aptos a reconhecer estes voláteis como um sinal de presença de flores, dando início a um processo adaptativo entre plantas e animais que tende a aumentar a eficiência do processo de polinização (GANG, 2005).

É notável o envolvimento dos insetos como a classe de animais dominante neste processo de atração executado pelas plantas (RAGUSO, 2008a). Os insetos são atraídos primariamente pelo odor de flores que possuem recompensas de caráter energético ou não. Na maioria das vezes esta recompensa é o néctar ou o próprio pólen, mas existem plantas que atraem os insetos sem que haja uma recompensa metabólica (RAGUSO, 2008b).

Outros animais que também participam desta relação ecológica são as aves. Estas parecem não ser tão sensíveis ao aroma, e as flores relacionadas com estes animais são em sua grande maioria de cores vibrantes e possuem um néctar rico em substâncias energéticas (KNUDSEN et al., 2004; VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2001).

Os morcegos são um dos poucos mamíferos atraídos pelo aroma das flores. Delas retiram recursos energéticos e atuam na dispersão do pólen de algumas espécies. Geralmente são atraídos por flores de cheiro que remete ao mofo (FLEMING; GEISELMAN; KRESS, 2009). Este tipo de odor em sua grande maioria é devido à presença de substâncias sulfurosas, pouco encontradas nos aromas florais, porém aparecem várias vezes durante a evolução, principalmente em espécies vegetais das regiões neo-tropicais (FLEMING; GEISELMAN; KRESS, 2009).

As substâncias voláteis emitidas pelas flores são em sua grande maioria líquidos lipofílicos com altas pressões de vapor (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Quando estes se encontram livremente difundidos no citoplasma (não conjugados) e sem barreiras para se difundir, podem atravessar as membranas celulares e volatilizar-se na atmosfera circundante da flor, criando o que se denomina: “headspace” floral (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006).

Estes voláteis produzidos pelas flores são originados a partir de vias do metabolismo secundário (especializado) de plantas. Existem voláteis nas diferentes classes químicas

produzidas por estas vias: terpenóides, fenilpropanóides e derivados de ácidos graxos. Em sua grande maioria são espécie-específicos e desempenham uma função ecológica (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006).

A caracterização destes voláteis em plantas cuja síndrome de polinização é conhecida, traz a oportunidade do aprendizado de como estes constituintes químicos são potencialmente selecionados pelo polinizador daquela determinada espécie.

1.1.1 Voláteis responsáveis pela atração de insetos

A entomofilia é a síndrome de polinização mais amplamente difundida entre as espécies vegetais. Este é o tipo de polinização realizado por insetos que inclui as mariposas, abelhas, borboletas, besouros e moscas (KNUDSEN, 2006). Levando-se em consideração todos estes tipos de insetos, a entomofilia não apresenta uma classe particular de compostos voláteis responsáveis pela atração dos insetos polinizadores. Há a participação dos três grupos de constituintes (derivados dos ácidos graxos, terpenóides e fenilpropanóides). A grande maioria das substâncias presentes no “headspace” de flores polinizadas por insetos, potencialmente pode atrair não somente um tipo específico de inseto, mas sim uma gama de espécies diferentes (DOBSON, 2006; TOLLSTEN; KNUDSEN; BERGSTRÖM, 1994).

As substâncias mais comumente encontradas em flores polinizadas por insetos são os terpenóides: trans- β -ocimeno, linalol, trans-farneseno, trans- β -farneseno, β -cariofileno, limoneno, α -pineno, sabineno, 8-heptadecano cariofileno, β -pineno, mirceno; e os fenilpropanóides: 1,4-dimetoxi benzeno, 2-feniletanol, 2-hidróxi-benzaldeído, fenilacetaldéido, benzaldéido e álcool benzílico (DOBSON, 2006).

Para DOBSON (2006) a polinização feita por insetos da ordem *Lepidoptera* pode ser dividida em um grupo que contém mariposas da família Micropterigidae, mariposas da *Yucca* e um grupo de outros lepidópteros que se alimentam de néctar como as borboletas. Membros da família Micropterigidae polinizam principalmente plantas da família Winteraceae, especialmente *Zygogynum baillonii*, *Z. bicolor*, e *Z. viellardii*. Flores destas plantas são polinizadas por mariposas micropterogídeas do gênero *Sabatinca* e possuem em seu “headspace” uma mistura de ésteres derivados do ácido graxo (acetato de etila, acetato de isobutila, 6-metil-5-hepten-2-ona) acompanhados de álcoois e alguns monoterpenos. O gênero de plantas *Ranunculus* (família Ranunculaceae) produz flores que também são polinizadas por mariposas da família Micropterigidae e o aroma de suas flores possui principalmente β -trans-ocimeno (BERGSTRÖM; DOBSON; GROTH, 1995; DOBSON, 2006; JÜRGENS, 2004).

Mariposas da *Yucca* apresentam uma relação ecológica mais estreita com plantas da família Agavaceae, demonstrando o papel dos voláteis em outras relações ecológicas além da polinização, uma vez que depositam seus ovos nestas plantas (herbivoria). Nesta relação os produtos voláteis envolvidos são sesquiterpenóides e hidrocarbonetos alifáticos (DOBSON, 2006; PELLMYR et al., 1990).

As borboletas coletoras de néctar são atraídas principalmente por produtos indóis combinados normalmente com ésteres benzenóides, linalol e trans- β -ocimeno (DOBSON, 2006).

ANDERSSON et al., (2002) estudaram 22 espécies de plantas polinizadas por borboletas. Neste estudo foram identificadas 217 substâncias voláteis que incluem principalmente voláteis como fenilacetaldéidos, benzaldeídos, álcool fenetílico e monoterpenos. Com esta análise foi possível distinguir entre espécies de borboletas

originadas na América, que tendem a preferir monoterpenóides como o linalol, enquanto espécies de regiões temperadas da Europa parecem ser mais atraídas por benzenóides. *Clarkia breweri* é uma espécie vegetal polinizada por mariposas, e possui “headspace” floral bastante pronunciado e alvo de várias investigações científicas. O aroma de suas flores é devido à presença de compostos como fenilpropeno e metil-eugenol (RAGUSO; PICHERSKY, 1995; WANG et al., 1997).

Na atração de besouros (Coleoptera), os aromas florais são frequentemente caracterizados como fortes e adocicados. A maioria das substâncias presentes neste tipo de aroma são benzenóides metoxilados, derivados esterificados do ácido graxo, pirazinas metoxiladas e terpenoides oxigenados. Formas ésteres dos derivados dos ácidos graxos e fenilpropanóides benzênicos são amplamente difundidas em espécies polinizadas por besouros. No entanto, aromas impregnados por terpenóides também são encontrados, tornando a generalização quanto à composição química destes aromas atrativos para besouros uma tarefa difícil (DOBSON, 2006; STEENHUISEN; RAGUSO; JOHNSON, 2012).

A maioria das plantas tropicais polinizadas por besouros produz uma ampla variedade de constituintes voláteis. Amostras de aroma floral de espécies da família Clusiaceae polinizadas por diferentes espécies de besouros contêm benzenóides e hidrocarbonetos derivados do ácido graxo ou ainda podem conter substâncias nitrogenadas (NOGUEIRA et al., 2001). Em gimnospermas, uma espécie de cica (Cycadaceae) do gênero *Macrozamia* produz em seus estróbilos um aroma impregnado por monoterpenos que atraem besouros da família Tenebrionidae (TERRY et al., 2004). Em contrapartida, espécies de regiões temperadas polinizadas por besouros não possuem um aroma pronunciado e os constituintes voláteis variam muito entre as diferentes espécies (LEWIS et al., 1988; DOBSON, 2006).

Outra característica interessante na atração de besouros é a capacidade de algumas espécies vegetais elevarem a temperatura de seus tecidos reprodutivos. Este processo de aquecimento acontece durante a antese ou devido a algum estímulo mecânico, exercido pelo polinizador sobre as flores. Nestas plantas é notada a presença de um forte aroma, como no caso da espécie *Cyclanthus bipartitus*, que produz um terpeno até então só encontrado nesta espécie e nomeado (E)-ciclantone (SCHULTZ; KAISER; KNUDSEN, 1999).

Geralmente os aromas florais que atraem membros da ordem Diptera (moscas) são denominados como "doces", indo do levemente adocicado até aromas extremamente doces, podendo ter traços que nos remete à urina devido a presença de vários ácidos nitrogenados. Sirfídeos (família Syrphidae) são moscas que participam da polinização de palmeiras (Arecaceae), que possuem principalmente monoterpenos em seu aroma floral, em especial o linalol e seus derivados (ARMBRUSTER; FENSTER; DUDASH, 2000).

Enquanto as moscas são os polinizadores dominantes em regiões temperadas, a ordem Himenoptera (abelhas) atua como os polinizadores entre os trópicos. As abelhas são atraídas por uma ampla variedade de compostos voláteis (PROCTOR; YEO; LACK, 1996; DOBSON, 2006). A única distinção possível a ser feita é entre os aromas produzidos por flores polinizadas por abelhas procurando alimento e os aromas produzidos por flores polinizadas por machos de abelhas procurando fêmeas para a cópula. Um exemplo do primeiro caso são as espécies do gênero *Rosa*. O aroma exalado pelas rosas possui mais de trezentas diferentes substâncias com naturezas químicas distintas (GUTERMAN et al., 2002; SHALIT et al., 2003). No segundo caso, as abelhas são atraídas por flores que mimetizam tanto anatomicamente como quimicamente fêmeas de suas espécies e a polinização é realizada por pseudocopulação.

Exemplos documentados de polinização por pseudocopulação foram descritos em orquídeas (Orchidaceae), em interações com abelhas da tribo *Euglossini*. Os machos deste tipo de abelhas possuem uma estrutura nas tíbias do terceiro par de pernas, onde armazenam fragrâncias (em sua maioria terpenóides) coletadas especialmente (mas não exclusivamente) nas flores de orquídeas. Estes machos utilizam estes componentes químicos para propósitos sexuais, na atração de fêmeas de sua espécie (ELTZ; ROUBIK; WHITTEN, 2003). Esta interação ecológica entre abelhas *Euglossini* e orquídeas foi caracterizada como um caso de coevolução. Entretanto dados coletados por RAMÍREZ et al., (2011) demonstraram que a pré-existência deste comportamento em linhagens basais de abelhas direcionou a adaptação de algumas angiospermas, que então se especializaram na atração destes insetos (RAMÍREZ et al., 2011).

1.1.2 Componentes químicos voláteis atuando na atração de pássaros

Quando a polinização de espécies vegetais se dá pela ação de aves, existe a um consenso de que as flores destas espécies não possuem fragrâncias detectáveis pelo olfato humano e as investigações científicas neste campo apontam o néctar como o principal atrativo (JOHNSON; NICOLSON, 2008; NICOLSON, 2002). Observou-se uma tendência de néctar mais volumoso e com menos concentração de açúcar em espécies polinizadas por diferentes espécies de aves (generalistas), enquanto em espécies com um polinizador específico observou-se a produção de néctar em menor volume, porém com maior concentração de açúcares (JOHNSON; NICOLSON, 2008; NICOLSON, 2002).

Em algumas espécies de *Nicotiana* (Solanaceae) polinizadas por aves é perceptível a presença de voláteis, especialmente durante a noite. Entretanto os componentes voláteis presentes neste aroma são comumente encontrados em outras espécies de *Nicotiana* polinizadas por mariposas (linalol, isômeros de nerolidol/farnesol, aldoximas e ésteres de

benzenóides), sugerindo que as espécies em questão estão em processo de transição para este tipo de síndrome (RAGUSO et al., 2003).

Beija-flores são os polinizadores mais frequentemente relatados na polinização efetuada por aves. KNUDSEN et al., (2004) concluíram que existem poucos componentes voláteis no aroma nas flores polinizadas por beija-flores. Estes autores mostraram que foram encontrados traços de componentes voláteis em oito das dezessete espécies analisadas. A maioria destes voláteis são terpenóides ou derivados dos ácidos graxos, cuja emissão também foi encontrada em tecidos vegetativos. Neste contexto, os autores argumentaram que tais substâncias não atuam diretamente na atração das aves, mas possivelmente estão envolvidas em outros processos como controle da herbivoria ou podem ser resquícios evolutivos de antepassados polinizados por insetos (KNUDSEN et al., 2004).

1.1.3 Componentes químicos voláteis atuando na atração de morcegos

Observa-se que a polinização efetuada por mamíferos alados evoluiu independentemente em diferentes momentos a partir de uma vasta gama de situações ancestrais (insetos, aves e mamíferos terrestres). FLEMING; GEISELMAN; KRESS, (2009) propuseram que a polinização por morcegos (quiropterofilia) provê dois principais benefícios para as plantas: estes mamíferos permitem depositar grandes quantidades de pólen sobre os estigmas, o que aumenta a eficiência da polinização e a capacidade destes voarem longas distâncias, aumenta o raio de dispersão de pólen.

O aroma floral típico de flores polinizadas por morcegos inclui odores caracterizados como fétido, pungido e fermentado (DOBSON, 2006; KNUDSEN; MORI, 1996; WINTER; LOPEZ; VON HELVERSEN, 2003). De cerca de trinta e duas espécies, de dezessete famílias de plantas potencialmente polinizadas por morcegos, vinte e três espécies são nativas do continente americano e as outras nove do continente europeu. Nem todas tiveram

a composição química de seu "headspace" floral analisado, mas substâncias contendo enxofre apareceram como uma característica típica para este tipo de polinização (AZUMA et al., 2002; DOBSON, 2006; KAISER; TOLLSTEN, 1995).

Em outro estudo, a análise de onze espécies diferentes de plantas polinizadas por morcegos revelou a presença de substâncias contendo enxofre, além de compostos alifáticos e terpenóides nos aromas florais destas plantas (BESTMANN; WINKLER; HELVERSEN, 1997). Foi demonstrado que a espécie de morcego *Glosophaga commissaris* é diretamente atraída por dimetil dissulfeto e 2,4-dithiapentano (VON HELVERSEN; WINKLER; BESTMANN, 2000).

Componentes não sulfurados também foram detectados em algumas flores polinizadas por morcegos. A identidade destas substâncias varia bastante entre as espécies, mas terpenóides são os mais frequentemente detectados, incluindo o limoneno, pineno, mirceno e sabineno. Uma larga variedade de componentes derivados de ácido graxo também é encontrada, em porções quase indetectáveis ou em altas concentrações, com a predominância de cetonas de cadeia curta. Benzenóides são encontrados geralmente em baixas concentrações, sendo os benzaldeídos os mais encontrados. Substâncias nitrogenadas são encontradas em poucas espécies (AZUMA et al., 2002; DOBSON, 2006; KAISER; TOLLSTEN, 1995; PETTERSSON; ERVIK; KNUDSEN, 2004; WINTER; LOPEZ; VON HELVERSEN, 2003).

Assim pode-se dizer que não é possível definir um padrão de constituintes voláteis para cada uma das síndromes de polinização existentes. O conteúdo químico amplamente variado e difuso do "headspace" floral entre as espécies com diferentes síndromes de polinização, mostra que os polinizadores tornam-se aptos no reconhecimento de voláteis florais devido à existência de um contexto ecológico. A Figura 1 exemplifica que diferentes

polinizadores podem ser atraídos por voláteis pertencentes a uma mesma classe química. Portanto, a utilização somente do aroma para prever o tipo de polinizador para uma determinada espécie vegetal não é recomendada (DOBSON, 2006). Outras características como a morfologia e fenologia são necessárias para que se afirme com segurança a síndrome de polinização de uma planta.

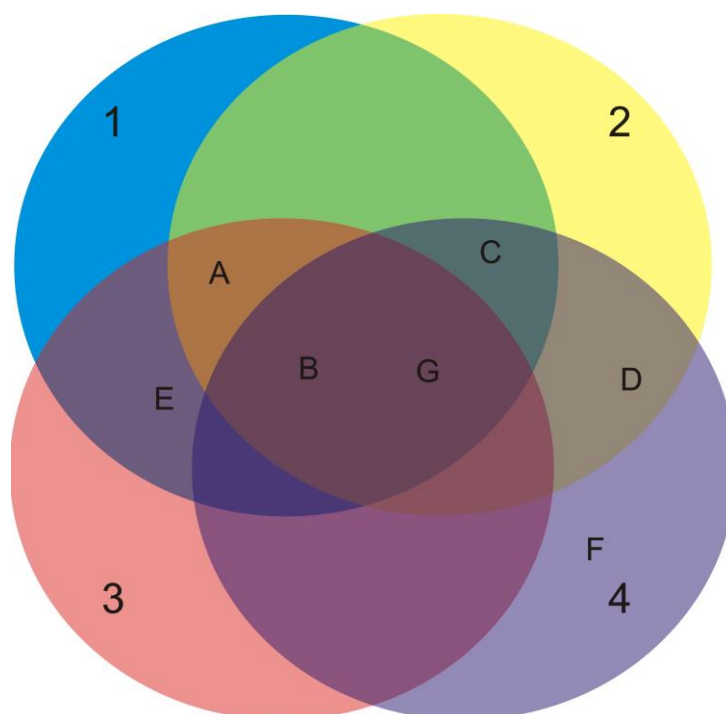


Figura 1: Diagrama de intersecção mostrando que diferentes polinizadores são atraídos pelas mesmas classes de voláteis. 1= Terpenóides; 2= Derivados do Ácido Graxo; 3= Fenilpropanóides; 4= Substâncias Nitrogenadas. A= Generalistas (insetos diversos); B= Coleoptera; C= Diptera; D= Insetos associados com matéria em decomposição; E= Himenoptera; F= Morcegos; G= Lepidoptera.

1.2 Biossíntese dos componentes presentes no “headspace” floral

Atualmente há um grande esforço de pesquisa para a compreensão das vias metabólicas responsáveis pela biossíntese de substâncias voláteis, destacando-se a

caracterização das enzimas envolvidas no processo biossintético, bem como dos genes envolvidos neste processo. Isto sugere que estudos mais aprofundados sejam realizados do ponto de vista molecular e genético na tentativa de se entender melhor estes processos e suas relações com a biologia da polinização.

Como visto no tópico anterior, os compostos voláteis florais produzidos pelas plantas são tipicamente líquidos lipofílicos com uma alta pressão de vapor (DUDAREVA; PICHERSKY, 2006). As vias de biossíntese destas substâncias voláteis são divididas em três grandes grupos: via dos terpenóides, via dos fenilpropanóides e via dos derivados de ácidos graxos.

1.2.1 Biossíntese de voláteis provenientes da via dos terpenóides

Terpenoides são substâncias derivadas do isopreno (C_5H_8) e originadas a partir da condensação de moléculas contendo cinco carbonos como isopentenil-difosfato (IPP) e dimetilalil-difosfato (DMAPP). Esta condensação é feita pelas pirofosfatases. Nos plastídeos estas pirofosfatases são as preniltransferases geranyl difosfato sintases (GPPS), gerando os monoterpenóides, e as geranylgeranyl difosfato sintase (GGPPS), gerando os diterpenos. Já no citosol a condensação de duas moléculas de IPP com uma de DMAPP pela ação da farnesil difosfato sintase (FPPS) gera o farnesil-difosfato (FPP), uma molécula com 15 carbonos que é a precursora da biossíntese de todos os sesquiterpenóides (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; POULTER; RILLING, 1981).

Foi nesta via do metabolismo especializado de plantas que se iniciaram os primeiros esforços para a caracterização molecular da biossíntese de terpenóides presentes no aroma de flores, em especial na espécie *Clarkia breweri* (Onagraceae), uma planta anual nativa da Califórnia-EUA (WANG et al., 1997). O aroma de suas flores é bastante adocicado, composto majoritariamente por terpenóides e pela primeira vez foi isolado e caracterizado

um gene envolvido na biossíntese destas substâncias: (S)-*LINALOL SINTASE (LIS)* (DUDAREVA et al., 1996; RAGUSO; PICHERSKY, 1995).

Além de *C. breweri* outras plantas também serviram de modelo para o estudo da biossíntese molecular de terpenóides. Apesar das flores da planta-modelo *Arabidopsis thaliana* não possuírem um aroma floral proeminente, foi constatada a presença de alguns terpenóides no mesmo (CHEN et al., 2003). No genoma de *Arabidopsis* foram identificados cerca de trinta e dois genes denominados *TERPENO SINTASES (TPS)*(ROHLOFF; BONES, 2005). THOLL e LEE, (2011) mostraram com detalhes a formação de terpenos em *A. thaliana* (Figura 2), incluindo a regulação destas vias por fatores exógenos e endógenos.

1.2.2 Biossíntese de voláteis provenientes da via dos fenilpropanóides

A maioria dos fenilpropanóides não é volátil e constitui a mais ampla classe de metabólitos secundários originados da fenilalanina por uma complexa série de reações e vias que se ramificam. Os fenilpropanóides voláteis possuem o carbono de posição nove reduzido (para aldeídos, álcoois, ou alcanos/alquenos) ou contêm um grupo alquil como substituinte na hidroxila do anel fenólico, ou um grupo carboxil formado, por exemplo, de éteres e ésteres. Além destes, muitos benzenóides que não possuem a cadeia de três carbonos e derivam do ácido trans-cinâmico por uma ramificação da via geral dos fenilpropanóides (figura 2) também são voláteis e estão muito presentes nos aromas florais (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; KNUDSEN; TOLLSTEN; BERGSTRÅM, 1993).

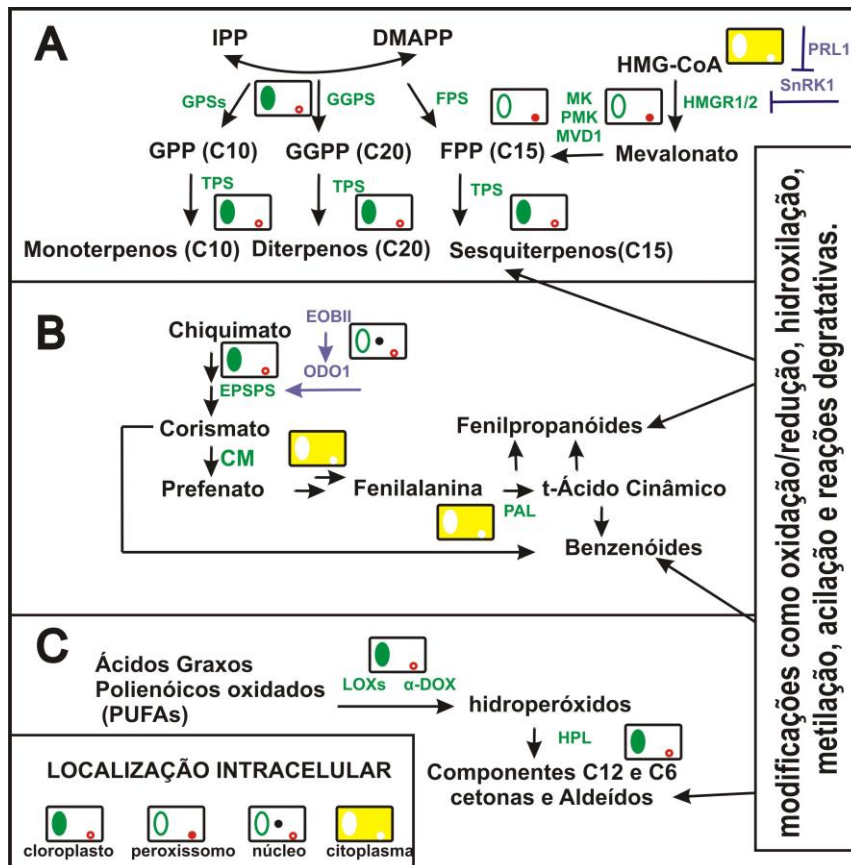


Figura 2: Vias metabólicas responsáveis pela produção de componentes voláteis em plantas. (A) Biossíntese de terpenóides em *A. thaliana* (THOLL E LEE, 2011; PICHERSKY ET AL., 2006). Em preto os compostos: IPP= difosfato de isopentenil, DMAPP= difosfato de dimetilalil, GPP= difosfato de geranil, GGPP= difosfato de geranilgeranil, FPP= difosfato de farnesil, HMG-CoA= hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A. Em verde as enzimas GPPSs= difosfato de geranil sintase, GGPPS= difosfato de geranilgeranil sintase, FPPS= difosfato de farnesil sintase, MK= mevalonato quinase, PMK= fosfomevalonato quinase, MVD1= mevalonato difosfato descarboxilase 1, TPS= terpeno sintases. Em azul algumas vias regulatórias que incluem *PRL1*= *pleiotropic regulatory locus 1*, SnRK1=proteína quinase relacionada a SNF1. (B) Biossíntese de fenilpropanóides/benzenóides em *P. hybrida* (VERDONK ET AL.,2005; MOERKERCKE ET AL., 2012). Em verde as enzimas EPSPS= 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, CM= corismato mutase, PAL= fenilalanina amônia liase. Em azul algumas vias regulatórias: ODO1= odorant 1 e EOBII= emissão de benzenóides 2. (C) Biossíntese de derivados dos ácidos graxos (FEUSSNER E WASTERNAK, 2002). Em verde as LOXs= lipoxigenases, α-DOX= α-dioxigenase e HPL= hidroxiperóxido liase.

O primeiro passo para a biossíntese dos fenilpropanóides e benzenóides é catalisado pela L-fenilalanina amônia liase (PAL), que transforma a L-fenilalanina em ácido cinâmico (GANG et al., 2002). A formação dos benzenóides a partir do ácido cinâmico requer um encurtamento da cadeia lateral para uma unidade C₂, que pode acontecer por um processo dependente da CoA ou independente de vias β-oxidativas (BOATRIGT et al., 2004).

O “headspace” floral de *Petunia hybrida* contém majoritariamente benzenóides. Nesta espécie descobriu-se que a biossíntese de fenilpropanóides é controlada por um fator de transcrição da família MYB (ODORANT1; VERDONK et al., 2005). Foi averiguado que o número de transcritos de *ODO1* acompanhou de forma linear a quantidade de voláteis produzidos pela planta ao longo do dia e, em linhagens transgênica com baixa expressão deste gene, foi observada uma diminuição na quantidade de voláteis, mostrando-se claramente a participação de *ODO1* na produção de benzenóides em *P. hybrida* (VERDONK et al., 2005).

Mais recentemente foi descoberto que um dos genes ativados por *ODO1* em *P. hybrida* é um gene que leva à formação de um importante precursor da fenilalanina (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase – *EPSPS*) (SPITZER-RIMON et al., 2010; VERDONK et al., 2005). A ativação de *ODO1* é efetuada por um fator de transcrição denominado EMISSION OF BENZENOIDS II (*EOBII*) (SPITZER-RIMON et al., 2010). A expressão de *EOBII* e *ODO1* ocorre principalmente em células epidérmicas. Outro achado, é que *ODO1* pode ativar a transcrição de um transportador da família ABC, o qual atua diretamente no transporte de metabólitos especializados (VAN MOERKERCKE et al., 2012).

1.2.2 Biossíntese de voláteis provenientes da via dos ácidos graxos

Voláteis derivados dos ácidos graxos representam a segunda maior classe de voláteis emitidos por tecidos de plantas e incluem cadeias curtas saturadas e insaturadas de álcoois, aldeídos e ésteres, que são originados da membrana lipídica (DUDAREVA; PICHERSKY, 2006; D'AURIA; CHEN; PICHERSKY, 2002).

A formação de voláteis derivados dos ácidos graxos (figura 2), inicia-se com a biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados hidroperoxados pela ação de uma série de formas altamente especializadas de lipoxigenases (LOXs). Estes ácidos graxos poliinsaturados são o substrato da hidroxiperóxido liase que leva à formação de alguns compostos sinalizadores como, por exemplo, o jasmonato, alguns compostos antimicrobianos e uma série de álcoois, divinil ésteres e uma série de voláteis encontrados no “headspace” foliar (FEUSSNER; WASTERACK, 1998). A clonagem de muitas lipoxigenases e outras enzimas chaves na via da lipoxigenase vem sendo realizada, mas, por enquanto, a expressão destes genes não foi identificada em tecidos florais (FEUSSNER; WASTERACK, 2002; PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006).

1.2.2 Biossíntese de voláteis: reações de modificação

A grande diversidade encontrada no universo de componentes voláteis também se deve a reações de modificação dos produtos oriundos das três vias citadas anteriormente. Estas reações incluem modificações enzimáticas como oxidação/redução, hidroxilação, metilação, acilação e reações degradativas (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; DUDAREVA; PICHERSKY, 2006). Alguns dos genes que codificam estas enzimas foram caracterizados em diferentes espécies de plantas. Orcinol O-Metiltransferases (OOMT1 e OOMT2) foram identificadas em *Rosa hybrida* (LAVID et al., 2002; SCALLIET et al., 2006),

metil transferase de ácido benzoico (BAMT) em *Antirrhinum majus* (NEGRE et al., 2002), e as benzil álcool acetiltransferases de *Clarkia breweri* (WANG et al., 1997).

1.3 Implicações evolutivas das vias de biossíntese de voláteis

GANG (2005), argumenta que os compostos voláteis além da atração de polinizadores também atuam em outras relações ecológicas, como na atração de inimigos de herbívoros e na defesa contra microrganismos. Assumindo este cenário de múltiplas funções, processos como duplicação e divergência gênica, evolução convergente e alterações da expressão gênica provavelmente alteraram as especificidades das enzimas envolvidas nas diferentes vias de biossíntese. Todos estes processos contribuíram então para a diversificação dos voláteis vegetais encontrados atualmente (GANG, 2005).

O conhecimento atual dos processos da biossíntese de voláteis florais indica o quão complexo é este orquestramento bioquímico em plantas. A participação de inúmeras substâncias oriundas de diferentes vias metabólicas, cada uma com sua série de enzimas sob constante regulação em *cis* ou em *trans*, bem como o papel desempenhado por estes voláteis na estratégia de sobrevivência das plantas torna o conhecimento detalhado e profundo destes processos uma tarefa árdua (PICHERSKY; DUDAREVA, 2007). Assim, a espécie vegetal adotada para este tipo de estudo tem uma grande importância. Esta espécie deve apresentar características ecológicas já conhecidas como no caso de *Clarkia spp.* e *Petunia spp.* (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006; VERDONK et al., 2003) ou dispor de uma série de ferramentas moleculares já desenvolvidas, que possam ser aplicadas ao estudo da biossíntese de voláteis, como no caso de *A. thaliana* (CHEN et al., 2003; THOLL; LEE, 2011).

Neste trabalho, sugerimos o gênero *Passiflora* como um novo modelo a ser utilizado no estudo dos constituintes voláteis presentes no “headspace” floral responsáveis pela

atração de polinizadores. As espécies do gênero *Passiflora* apresentam diferentes síndromes de polinização, cada uma com características florais peculiares para a atração e adequação a polinizadores específicos (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Isto as torna um grupo interessante de plantas para um estudo que caracterize os compostos voláteis emitidos por espécies com diferentes síndromes de polinização. Este tipo de abordagem pode oferecer subsídios que permitirão futuramente entender os mecanismos evolutivos envolvidos na modulação gênica da biossíntese de compostos voláteis e suas relações com a evolução das interações entre as plantas e seus polinizadores.

1.4. A relação entre as características florais do gênero *Passiflora* e a atração de diferentes polinizadores

Existem quase 600 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* (fam. Passifloraceae), a maioria originária de regiões tropicais. As flores desse gênero geralmente são pentâmeras (KILLIP, 1938; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Na totalidade das espécies de *Passiflora* os estames e os carpelos estão situados na parte superior do androginóforo (Figuras 3 e 4). Os estames são sempre em número de cinco e estão unidos por suas bases formando uma membrana aderente ao androginóforo junto à inserção do ovário, que está acima dos estames. Os estiletes no gênero *Passiflora* iniciam-se no centro da região superior do ovário, que é sempre unilocular com três placentas parietais (CERVI; RODRIGUES, 2010; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

A característica mais marcante da família é a presença de um ou mais verticilos de estruturas filamentosas em suas flores, entre o perianto e o androginóforo, cujo conjunto é denominado "corona", que se originou como uma emergência, ou seja, um produto do desenvolvimento tardio de sépalas e pétalas que compõem o tubo floral (AIZZA, 2010) (Figuras 3 e 4). As estruturas da corona podem ser desde uma fina membrana lancinada, como encontrado no segundo maior gênero da família, *Adenia*, até uma série de membranas

dobradas ou de estruturas filamentosas, como no gênero *Passiflora*. Entre esses dois extremos, encontram-se diversos graus de complexidade. A presença da corona parece estar relacionada com a atração de insetos e pássaros estimulando, dessa maneira, a polinização de suas flores (CERVI; RODRIGUES, 2010).

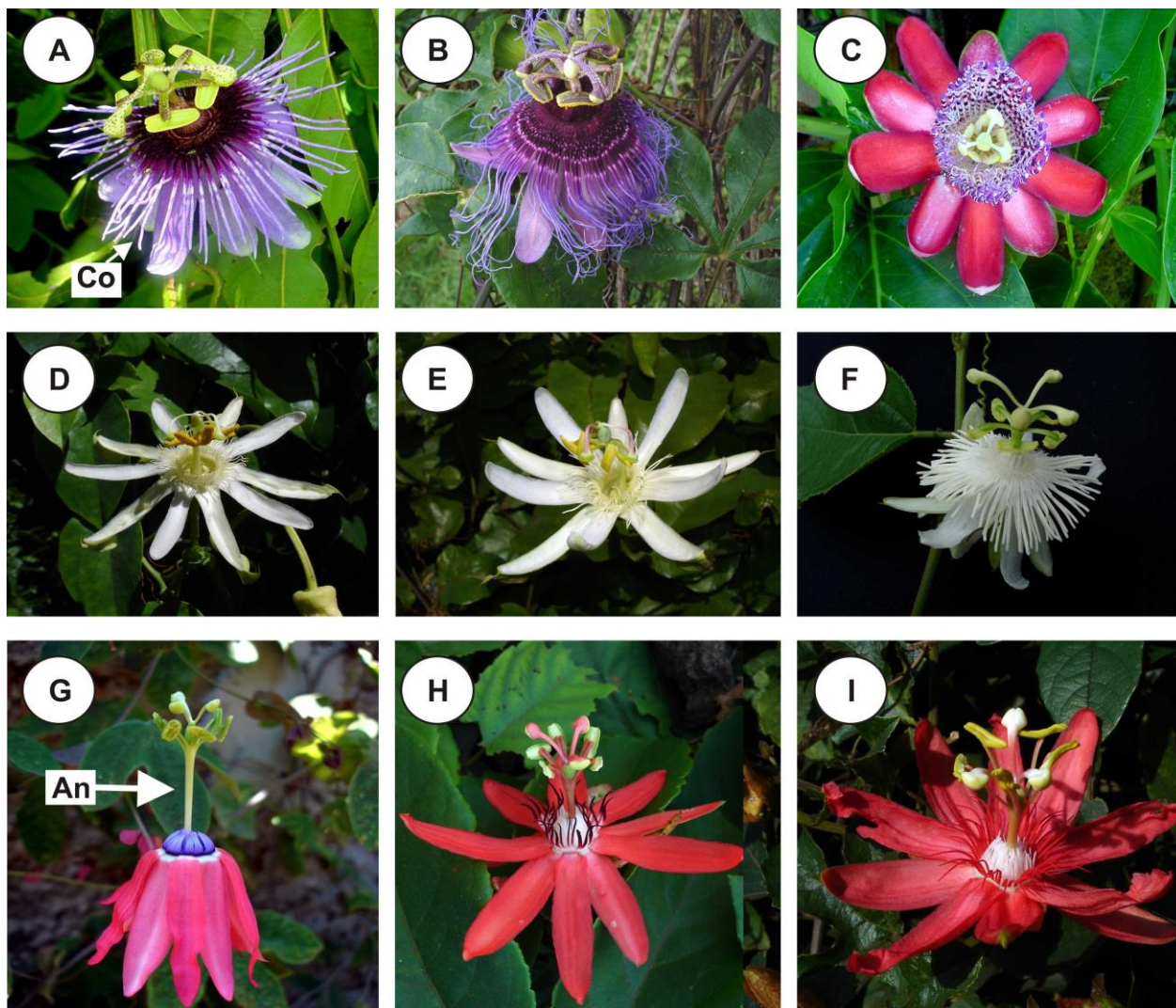


Figura 3: Diferentes espécies de *Passiflora* com diferentes síndromes de polinização. (A) *P. amethystina*, (B) *P. cincinnata*, (C) *P. alata* e (F) *P. malacophylla* polinizadas por abelhas. (D) *P. mucronata* e (E) *P. galbana* polinizadas por morcegos e (G) *P. edmundoi*, (H) *P.*

coccinea e (l) *P. vitifolia* polinizadas por beija-flores. Co=corona, An= androginóforo. Autoria das fotos: Prof. Dr. Marcelo C. Dornelas.

Outras características igualmente importantes na estrutura floral do gênero *Passiflora* são: presença do opérculo, situado no interior do tubo formado pelo perianto, um pouco abaixo da corona (Figura 4), sendo de grande importância para a identificação de subgêneros; anel nectarífero, situado abaixo do opérculo; e o límen, que é uma estrutura em forma anel ou uma membrana que circunda a base do androginóforo (Figura 4).

Geralmente as flores de espécies do subgênero *Passiflora* são grandes (5-10cm) e estas espécies, quando polinizadas por insetos, geralmente são polinizadas por abelhas de grande porte como espécies de *Xylocopa* (Anthophoridae). Já as flores de espécies do subgênero *Decaloba* são geralmente pequenas (1 a 4cm) e são polinizadas preferencialmente por insetos de porte médio ou pequeno como *Ptiloglossa* spp. (Colletidae) e *Thygater analis* (Apidae) (AMELA GARCIA; GALATI; HOC, 2007).

As diferentes características como forma cor e odor, encontradas nas flores do gênero *Passiflora* estão relacionadas com as necessidades dos polinizadores de cada uma das espécies. Flores como as encontradas em *P. edulis* (Figura 4A) são brancas ou de coloração clara; permanecem abertas durante o dia; possuem corona com filamentos longos, geralmente com marcas ou cores que contrastam com a coloração do resto da flor, anteras relativamente próximas à corona (devido à altura da base do androginóforo) e um odor adocicado forte. Estas características florais são indicativas de uma adaptação à polinização por insetos (MALERBO-SOUZA; RIBEIRO, 2010).

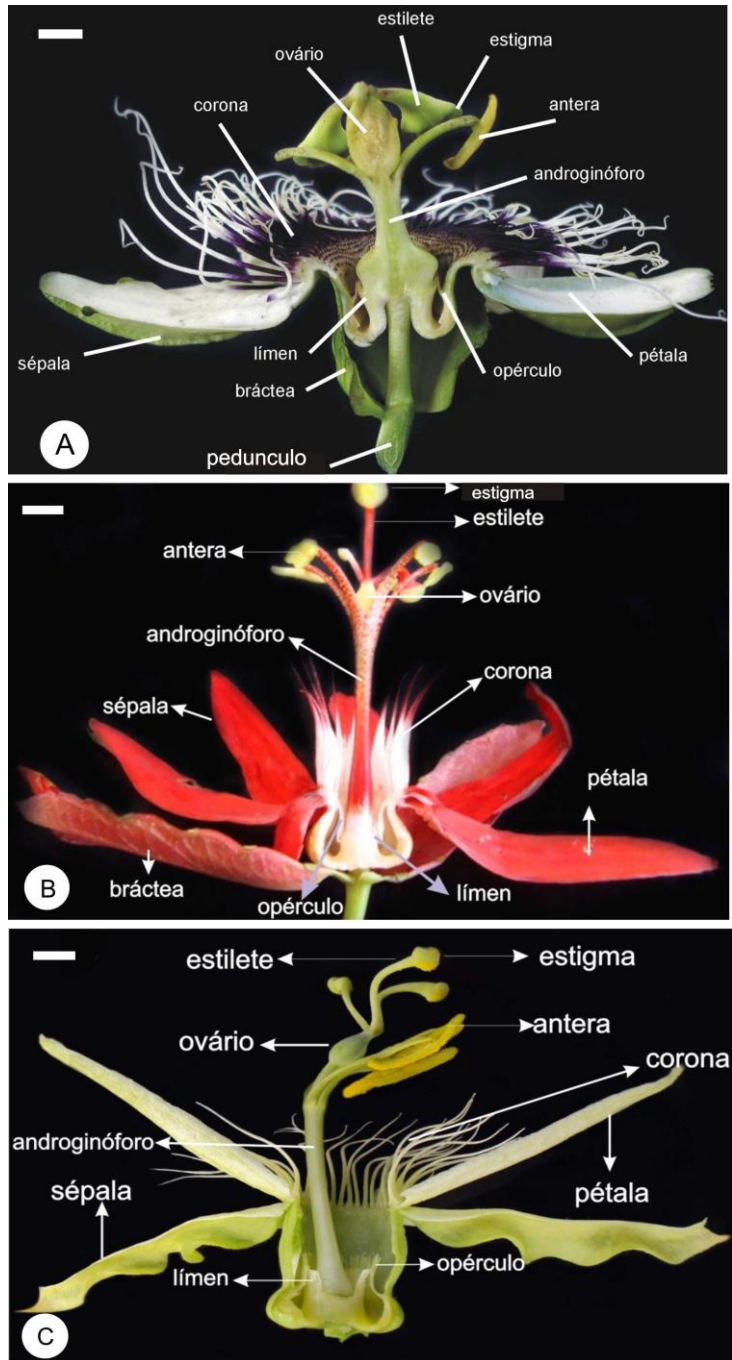


Figura 4: Corte longitudinal de uma flor de *Passiflora edulis*, polinizada por insetos com a designação das diferentes estruturas florais (A). *Passiflora coccinea*, polinizada por beija-flor, note os filamentos curtos da corona e a coloração vermelha do perianto (B). *Passiflora setacea*, polinizada por morcegos, note a coloração branca do perianto e a curvatura da coluna do androginóforo (C). Barra=0,5cm. Autoria das fotos: Prof. Dr. Marcelo C. Dornelas.

Como exemplo de espécie de *Passiflora* cujas flores são polinizadas por beija-flores (ornitofilia), temos *P. coccinea*, que possui flores geralmente vermelhas ou alaranjadas com corona de filamentos curtos e uma longa coluna do androginóforo (Figura 4B), características que sugerem a polinização por beija-flores (SNOW, 1982; VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2001). Outros exemplos de espécies de *Passiflora* polinizadas por beija-flores são: *P. mixta*, *P. molíssima*, *P. amoena*, *P. pyrrhantha*, *P. spinosa*, *P. balbis*, *P. membranacea*, *P. aimae*, *P. glandulosa*, *P. kermesina* e *P. speciosa* (ULMER; MACDOUGAL, 2004; LINDBERG, OLESEN 2001).

Já as flores de espécies polinizadas por morcegos (quiropterofilia) como *P. mucronata* ou *P. setacea* geralmente são brancas e entram em antese após o entardecer. Suas formas estão adaptadas para o comprimento e formato do focinho e língua dos morcegos (SAZIMA; SAZIMA, 1978; VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2001; SAZIMA; SAZIMA, 1987). Nestas flores, a corona não oferece resistência até o néctar, a coluna do androginóforo é curva e o androceu é zigomórfico, com as anteras voltadas para o lado em que o morcego acessa as flores (Figura 4C). *P. penduliflora* e *P. recurva* são outros exemplos de espécies de *Passiflora* polinizadas por morcegos (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Outro ponto a se considerar na importância do estudo sobre a polinização em espécies de *Passiflora* é que somente com uma adequada e eficiente dispersão do pólen, em que as plantas atinjam uma máxima transferência de pólen para flores co-específicas é que estas conseguem aumentar a taxa de fertilização e diminuir a energia gasta necessária para esta finalidade. Então é de fundamental importância que a planta atraia os polinizadores que cumpram estes requisitos de uma polinização eficiente, tendo os compostos voláteis grande participação nesta atração. Em plantas como as do gênero *Passiflora*, que inclui espécies de maracujá de interesse comercial, é imprescindível a ocorrência da fertilização de forma

eficiente, para que frutos produzidos possuam características desejáveis para fins comerciais. Há uma relação direta entre a eficiência de polinização e o tamanho final do fruto e a produção de suco por fruto (SNOW, 1982; BRUCKNER, 2001). Sendo assim, a compreensão da relação entre a especificidade de padrões de compostos voláteis e a atração de polinizadores únicos, bem como a compreensão dos mecanismos gênicos que os originam, são de extrema utilização para o melhoramento genético direcionado destas espécies.

Apresentadas estas características, e levando-se em consideração a complexidade das bases bioquímicas de componentes envolvidos na atração de polinizadores, as plantas do gênero *Passiflora* são um alvo em potencial para estudos que visam a compreensão das bases moleculares e bioquímicas das diferentes síndromes de polinização.

2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivo geral o estudo dos compostos voláteis que compõem o “headspace” floral em espécies gênero *Passiflora* com diferentes síndromes de polinização. Ênfase foi dada aos aspectos micro-analíticos e moleculares. Foram objetivos específicos:

- a.** Caracterizar o “headspace” floral em *P. edulis*, *P. coccinea* e *P. mucronata*
- b.** Proceder o Data Mining do banco de dados do Projeto PASSIOMA para a identificação de membros das famílias gênicas codificadores de enzimas envolvidas na produção de terpenos, fenilpropanóides e na modificação (metilação) de alguns componentes voláteis.
- c.** Estudar a expressão gênica de um homólogo de fenilalanina amônia liase (*PePAL*) e de um homólogo de uma orto metil transferase de *P. edulis* (*PeOMT*), potencialmente envolvidos no metabolismo da formação do “headspace” floral de *P. edulis*.

3 Material e Métodos

3.1 Material Vegetal

As espécies escolhidas para este estudo foram: *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora coccinea* Aubl e *Passiflora mucronata* Mast que são polinizadas por mamangavas, beija-flores e morcegos respectivamente. Estas plantas foram cultivadas em substrato apropriado (uma parte de solo vegetal comercial para duas partes de areia) em casa de vegetação e no campo experimental do Instituto de Biologia da UNICAMP em Campinas, SP (22° 49' 9.82", 47° 4' 16.02"). Foram coletadas amostras em quantidades suficientes para que se obtivesse três repetições biológicas.

3.2 Coleta de constituintes voláteis presentes no “headspace” floral empregando a micro extração em fase sólida (SPME).

Para a coleta dos constituintes que compõem o “headspace” floral das espécies estudadas, foi utilizado método adaptado de GOODRICH et al.(2006). Na qual uma fibra comercial encapada com polidimetilsiloxano (PDMS, 100 µm; Supelco), foi pré-acondicionada de acordo com as instruções do fabricante. No campo, flores das três espécies de *Passiflora* estudadas foram ensacadas logo após a antese utilizando-se um saco de poliéster para assados (14 x 20cm). Para o equilíbrio dos voláteis dentro deste sistema fechado, as flores permaneceram ensacadas por 3h (tempo de equilíbrio dos componentes voláteis). Para a espécie *P. mucronata*, polinizada por morcegos, uma segunda abordagem na qual o tempo de equilíbrio foi ampliado para um período de 12h foi utilizada, como uma tentativa para concentrar as substâncias. Embalaram-se também ramos vegetativos, utilizados como controle. Por um orifício feito no saco com a própria agulha do aparato contendo a fibra SPME, efetuou-se a exposição da fibra ao “headspace”, com os

voláteis já em equilíbrio, por um período de uma hora (tempo de exposição da fibra, Figura 5). O número de repetições biológicas foi o suficiente para se obter no mínimo três cromatogramas com alto grau de similaridade, denominadas de repetições biológicas.



Figura 5. Exemplo do aparato montado para a extração dos voláteis em espécies de *Passiflora* com o dispositivo já acionado (a seta indica a fibra exposta) e posicionado com o auxílio de um agarrador universal. Neste exemplo, a flor devidamente isolada por um saco de poliéster é de *P. coccinea*.

3.3 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/MS.

As fibras SPME foram transportadas para o laboratório e injetadas diretamente na porta de injeção de um cromatógrafo a gás CG/MS-QP2010 Plus equipado com uma coluna DB-5 capilar (30m x 0,25 milímetros, de espessura com revestimento de 25 μ m) e acoplado com um espectrômetro de massa Varian Saturno 2000. As condições de análise foram: temperatura do injetor e linha de transmissão em 250°C; temperatura do forno programada para ir de 60°C a 240°C a 3°C min⁻¹; gás hélio como gás de arraste em 1 ml min⁻¹. Os constituintes foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e pela

análise do perfil de fragmentação do espectro de massa e comparação com dados da livreria NIST 2005 e dados encontrados na literatura (ADAMS, 2007). Para verificar o desempenho do sistema CG/MS foi utilizada uma mistura padrão de n-alcenos (Sigma-Aldrich, C8-C20, 5 mg/l em hexano) que, após eliminação do solvente, foi exposta à fibra de SPME por 5 minutos a 37°C e analisada conforme descrito anteriormente (SPME-CG/MS). O cromatograma obtido para este teste se encontra Figura 6. Para cada uma das espécies vegetais foram estabelecidos limiares de detecção, como visto na figura S1.

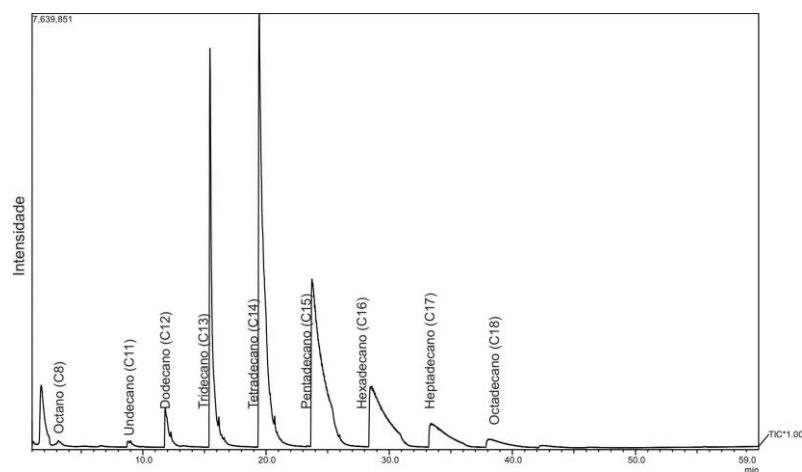


Figura 6: Cromatograma da análise do “headspace” de amostra padrão de n-alcenos C8-C20 obtida por SPME-CG/MS.

3.4. Busca de genes envolvidos na biossíntese de compostos voláteis (*Data Mining*)

Para a procura de homólogos em *Passiflora* de genes relacionados com a biossíntese de voláteis, foi utilizada a interface do banco de dados do projeto PASSIOMA (CUTRI; DORNELAS, 2012). Neste banco de dados é possível procurar sequências alvo por intermédio de palavras chave, neste caso com base no trabalho de DOBSON (2006), foram escolhidas enzimas chaves para a produção das três principais vias de produção de metabolitos especializados voláteis, sendo elas: PIRIFOSFATASE, TERPENOSINTASE,

PAL, O METILTRANSFERASE. Sequências dessas famílias gênicas obtidas em bancos de dados públicos também foram utilizadas e com o emprego do algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) buscou-se sequências homólogas no PASSIOMA.

Após encontradas as sequências obtidas no PASSIOMA tiveram sua homologia conferida com a construção de árvores filogenéticas. Para tal as seqüências de aminoácidos de homólogos destes genes de angiospermas e gimnospermas (com base no trabalho de GANG, (2005) para as árvores de TERPENO SINTASES e O METILTRANSFERASE; KUMAR e ELLIS (2001) para a árvore de PAL; e AMENT et al. (2006) para as PIROFOSFATASES) foram obtidas dos bancos de dados públicos (NCBI; www.ncbi.gov) e foram alinhadas com as seqüências de *Passiflora* com a utilização do programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). O alinhamento obtido foi utilizado para a obtenção de uma matriz de distâncias (método de parsimônia) pelo programa Mega 5.0 (TAMURA et al., 2011). A solidez das árvores obtidas foi testada com cálculos de Bootstrap com 1000 repetições.

3.5 Quantificação de transcritos por qRT-PCR (PCR em tempo Real)

Para a realização da qRT-PCR (Reação Cíclica da Polimerase de produtos oriundos da Transcriptase Reversa de forma Quantitativa), RNAs totais foram extraídos dos seguintes tecidos de *P. edulis*:

- raiz,
- caule,
- folhas juvenis,
- folhas adultas,
- gavinhas,
- botões florais I (com um centímetro de diâmetro)
- botões florais II (com cinco centímetros de diâmetro)

- meristema juvenil (ápice com folíolos unilobados),
- meristema adulto (ápice com folíolos trilobados),
- meristema reprodutivo (ápice com meristema da inflorescência em desenvolvimento),
- perianto (sépala e pétalas de flores abertas),
- corona (filamentos de flores abertas),
- pistilo (estigma + ovário)
- antera+filete
- coluna do androginóforo

Utilizou-se três replicatas biológicas para cada tecido. As amostras de RNAs totais foram isoladas pelo método do Trizol (Invitrogen) e tiveram sua concentração e pureza checados pelo kit Qubit®, com posterior tratamento com DNase turbo® e biossíntese do cDNA utilizando-se o kit “Super Script First Strand Synthase” (Invitrogen). Estas fitas de cDNA foram utilizadas como molde nas reações de PCR .

Primers (Indicadores) foram desenhados para genes normalizadores putativos, bem como para os genes candidatos selecionados (veja Tabela 1). O desenho desses indicadores foi executado utilizando-se a ferramenta “on line” Primer 3 (ROZEN; SKALETSKY, 1998). Os parâmetros para o melhor desempenho destes indicadores foram aqueles indicados por UDVARDI, (1998) e todos amplificam um fragmento menor que 200pb (aproximadamente 160 pb).

A eficiência dos indicadores para a qRT-PCR foram testadas com a verificação da amplificação do produto designado para cada par de indicadores em uma série de diluição (quatro pontos) a partir um mix de cDNA dos tecidos analisados. Para todos os indicadores a eficiência foi considerada como tendo valor absoluto igual a dois.

Os genes normalizadores escolhidos para as análises de expressão por qRT-PCR foram os homólogos de *P. edulis* para os genes CLATHRINA e α -TUBULINA de *A. thaliana*. A escolha se deu com o uso do algoritmo contido no programa GeNorm (PATTYN et al., 2003). Este programa, com base em valores de Ct (número de ciclos na qRT-PCR) para a expressão de diferentes genes normalizadores em diferentes tecidos (descritos anteriormente), elabora um “ranking” com os genes mais estáveis, para serem utilizados em um determinado grupo de tecidos, neste caso, tecidos reprodutivos de *P. edulis* (PATTYN et al., 2003- Figura 7; Tabela S1).

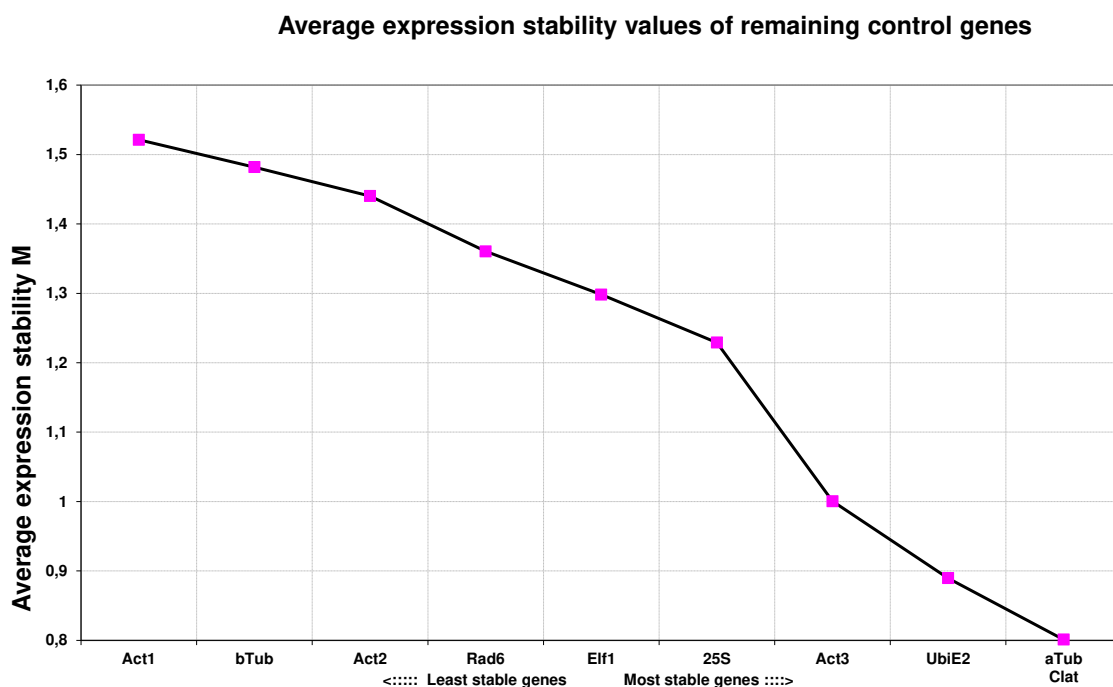


Figura 7: Gráfico gerado pelo programa GeNorm (PATTYN et al., 2003), indicando os genes normalizadores mais estáveis para serem utilizados nas análises de expressão gênica por qRT-PCR. Na esquerda os genes menos estáveis, na direita os genes mais estáveis.

A reação de qRT-PCR foi feita em um volume final de 20 μ L, utilizando 1/15 volume de cDNA fita simples (6,7 ng RNA total). Para cada reação foi utilizado Tampão PCR (Invitrogen™) 1X concentrado ($MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP's 0,1 mM), 0,25 U Taq Platinum

(Invitrogen™), SYBR Green (Amersham™) 0,1X Concentrado, 0,2 µM de cada primer (Tabela1). As reações foram feitas sob as seguintes condições, usando Chromo 4 Real Time PCR Detector (BioRad™): 5 minutos a 94°C; 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60°C, 15 segundos a 72°C, 35 segundos a 60°C. Para verificar a especificidade de amplificação dos genes com seus respectivos indicadores construiu-se uma curva de dissociação após a reação, de 30°C a 100°C, com leitura a cada 1°C. Esta etapa do trabalho foi realizada no centro de Biotecnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob supervisão do Prof. Dr. Rogério Margis. Todos os resultados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e tiveram a calculadas a média entre as replicatas biológicas (três) e experimentais (três), bem como os desvios padrões.

3.6 Detecção de transcritos por RT-PCR não-quantitativa

Amostras de cDNA sintetizados como no tópico anterior foram utilizadas como molde em reações de RT-PCR, com utilização dos primers indicados na Tabela 1 nas seguintes condições: extensão inicial por 3min a 94°C, 35 ciclos de 45seg a 94°C; 1min a 50°C e 1min a 72°C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e os resultados obtidos foram documentados fotograficamente e analisados.

Tabela 1: Genes escolhidos para a análise de expressão de genes envolvidos na biossíntese de fenilpropanóides em *P. edulis*, e seus respectivos primers.

<i>Genes Normalizadores</i>		
	“Primer Forward”	“Primer Reverse”
<i>PeACT1</i> ¹	CCAGGCATTGCTGATAGGAT	ATTCTGCCTTTGCAATCCAC
<i>PeCLAT</i> ³	CCATGTTTACAGCATCTGGTTTAC	TGCTTTAGTTATATACCGAACCCACT
<i>PeA_TUB</i> ⁴	ATGGCATGCTGCTTGATGTA	CACCTTGGCAAGATCACCTC
<i>Gene Alvo</i>		
<i>PeOMT</i> ⁵	GCTCGTTGGCTACTGGAAAG	GGTCATAGGTTTGCCATGCT
<i>PePALRT</i> ⁶	CAGGATATCGGAGTGCAGGT	TCCCATTCTTTCAGGCAATC
<i>PePAL</i> ⁷	CAGGATATCGGAGTGCAGGT	TCCCATTCTTTCAGGCAATC

1. Homólogo de ACTINA1 usado na PCR não quantitativa , 3. Homólogo de CLATHRINA, 4. Homólogo de α -TUBULINA, 5. Homólogo de uma O-METILTRANSFERASE, 6. Homólogo de FENIL ALANINA AMÔNIA LIASE para RT-PCR não quantitativa 7. Homólogo de FENIL ALANINA AMÔNIA LIASE para RT-PCR quantitativa

3.7 Hibridizações *in situ*

As hibridizações *in situ* foram realizadas utilizando-se sondas não-radioativas, segundo as técnicas já descritas na literatura (DORNELAS; VAN LAMMEREN; KREIS, 2000; DORNELAS et al., 1999). As sondas foram obtidas a partir dos clones encontrado no banco de cDNAs do Projeto PASSIOMA. Para tal, os plasmídeos contendo os fragmentos foram linearizados com a enzima Eco RI (a 37°C por 1h). Sondas antisense foram obtidas por transcrição *in vitro* pela enzima T7, em reação contendo uracila marcada com digoxigenina (DIG-UTP), segundo as instruções do fabricante do kit de marcação (Roche).

Botões florais de *P. edulis* foram fixados a vácuo em paraformaldeído a 4% (p/v) por 16h a 4°C. A seguir as amostras foram desidratadas em série etílica, emblocadas em

parafina, seccionadas seriadamente (8 μm) e montadas em lâminas de microscopia silanadas. A hibridização foi conduzida sob condições de estringência apropriadas. Os cortes de material embocado foram desparafinados em baterias de xilol:álcool (3:1, 1:1, 1:3, álcool absoluto) e submetidos ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em 0,05M Tris HCl pH:7,5). A visualização do sinal de hibridização foi obtida através de reação colorimétrica, utilizando-se anticorpos anti-DIG (1:1000) conjugados à fosfatase alcalina empregando um solução comercial de substrato mais supressor de fosfatase alcalina endógena (Levamisole 1mM; Pierce). Como controle negativo, sondas não complementares aos RNAs mensageiros (“sense”) foram obtidas da mesma maneira que as sondas “antisense”, e também foram utilizadas como já descrito para as sondas “antisense”. O material hibridizado e o controle negativo foram observadas em microscópio ZEISS modelo AXIOSKOPE ou lupa binocular Leica MDG30 e fotografado para documentação e posterior análise.

4 Resultados

4.1 Coleta e caracterização dos constituintes do “headspace” em *Passiflora*.

Após a exposição da fibra ao “headspace” floral das espécies *P. edulis*, *P. coccinea* e *P. mucronata* e a injeção direta no GCMS, foram gerados três cromatogramas para cada espécie. Os cromatogramas representativos dos constituintes voláteis detectados no “headspace” das flores destas espécies podem ser visualizados nas Figuras 8A; 8B; 8C. Os picos representados por letras (E= *P. edulis*, C= *P.coccinea* e M= *P. mucronata*) e números sequências seguindo a ordem da separação cromatográfica, foram observados consistentemente em todas as três replicatas biológicas.

Para amostras de “headspace” floral de *P. edulis* notou-se a presença majoritária de dois picos (Figura 8A). Um com o tempo de retenção de 10,25min e outro de 19,81min, cujos

espectros de fragmentação, quando comparados com o banco de dados NIST05, apresentam grande similaridade com as substâncias 1,4-dimetoxi-benzeno e 1,3,5-trimetoxi-benzeno. Um terceiro e um quarto constituinte também foram observados, porém com menor intensidade: cinamato de metila e 1,2,4-trimetoxi-benzeno (Tabela 2). Portanto, os resultados sugerem que no “headspace” floral de *P. edulis* há a predominância de substâncias fenólicas metoxiladas. No ramo vegetativo não foram encontrados espectros de substâncias com intensidade suficiente para considera-los (Tabela S2; Figura S1).

Na espécie polinizada por beija-flores (*P. coccinea*, figura 8B), observou-se uma gama maior de substâncias de natureza terpênica em seu “headspace” floral. As substâncias identificadas foram: cariofileno (19,99min), alpha-bergamoteno (23,23min.), alpha-farneseno (23,73min.), dendrolasin (26,41min.) e um constituinte que não pode ser identificado, pois seu espectro de massas gera dúvidas em relação ao correspondente no banco de dados NIST05. No ramo vegetativo não foram encontrados espectros de substâncias com intensidade suficiente para considera-los (Tabela S2; Figura S1).

Para *P. mucronata* foram realizadas duas abordagens na tentativa de se identificar as substâncias voláteis presentes nas suas flores. Na abordagem também adotada para as outras duas espécies (*P. edulis* e *P. coccinea*) os cromatogramas gerados não apresentavam substâncias detectáveis pelos meios aqui utilizados .

Na segunda abordagem, com a tentativa de concentração de voláteis na fibra, obteve-se o cromatograma como visto na figura 8C. Nas flores de *P. mucronata* foi encontrado um terpenóide representado pelo beta-pineno (23,16min.), alguns alcanos como o pentadecano (23,25min.) e o hexadecano (27,27min.), e um derivado de ácido graxo denominado heptil formiato (29,07min). Substância contendo enxofre também foi encontrada, porém a identificação com a comparação de seus espectros com substâncias da livreria

NIST indicaram com baixo grau de similaridade substâncias que ainda não foram relatadas na literatura como presentes no “headspace” floral (KNUDSEN; LARS TOLLSTEN, 1995; VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2008) e, portanto, foi identificada como “SS” (27,07min). No ramo vegetativo (tabela S2; figura S1) foram detectados constituintes também presentes no “headspace” floral, porém com uma intensidade abaixo do limiar considerado como pertinente para a afirmação da presença do volátil.

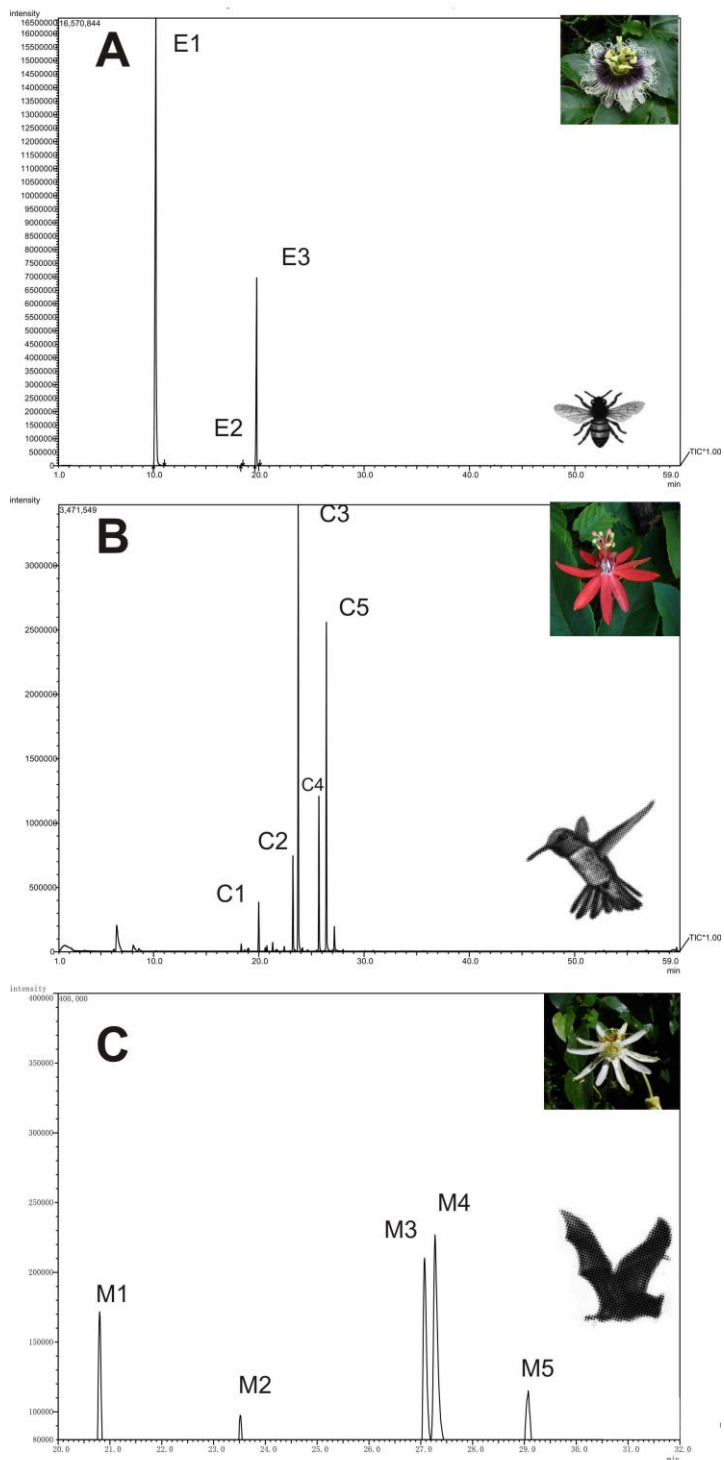




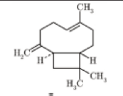
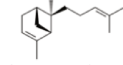
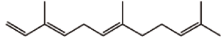



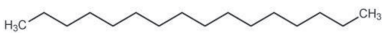



Figura 8: Cromatogramas obtidos após a coleta, separação e detecção de componentes voláteis do headspace floral em *P. edulis* (A), *P. coccínea* (B) e *P. mucronata* (C), cujos aromas atraem abelha, beija-flore e morcego respectivamente.

Tabela 2: Constituintes¹ voláteis identificados no “headspace” floral de *P. edulis*; *P. coccinea* e *P. mucronata* após análise por SPME-CG/MS.

Pico	TR(min) ²	Area (%)	Constituinte	Estrutura ⁵
<i>P. edulis</i> (flor)				
E1	10,25	78,79	1,4-dimetóxi-benzeno	
E2	18,35	00,24	1,2,4-trimetóxi-benzeno	
E3	18,70	00,04	Cinamato de metila	
E4	19,80	20,93	1,3,5-trimetóxi-benzeno	
<i>P. coccinea</i> (flor)				
C1	19,99	02,22	Cariofileno	
C2	23,23	11,78	α -bergamoteno	
C3	23,73	31,57	α -farneseno	
C4	25,70	18,95	NI ³	
C5	26,41	33,29	Dendrolasina	
<i>P. mucronata</i> (flor)				
M1	20,80	23,16	beta pineno	
M2	23,51	07,06	Pentadecano	
M3	27,07	19,21	SS ⁴	
M4	27,27	24,31	Hexadecano	
M5	29,07	16,26	Heptil formiato	

1. Os componentes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção e pela análise do perfil de fragmentação do espectro de massas dos picos com os dados da livreria NIST 2005 e dados encontrados na literatura (Adams, 2007) e listados de acordo com a ordem de eluição em coluna DB5.

2. TR = Tempo de retenção em min.

3. NI = Não identificado

4. Substâncias que contém enxofre na composição mas cujo grau de semelhança de fragmentação de espectro não possibilitou a identificação com os dados da livreria NIST 2005

5. Estrutura sugerida pela livreria NIST 2005

4.2 Data-Mining de seqüências de genes envolvidos na biossíntese de compostos voláteis

4.2.1 Isoprenos

No banco de dados do Projeto PASSIOMA foram encontradas duas seqüências de cDNAs de *P. edulis* (PACEPE3014E09.g e PACEPE3020D10.g), oriundos de botões florais em estágio final de desenvolvimento, que apresentaram similaridade com genes codificadores de pirofosfato sintases. Análises filogenéticas destas e outras 14 seqüências de pirofosfato sintases vegetais, mostraram que PACEPE3014E09.g é semelhante a um gene codificador de GPP de cadeia curta de outras duas espécies: *Antirrhinum majus* e *Mentha x piperita* (Figura 12). Esta semelhança é suportada por um alto valor de teste de significância (Bootstrap). Já PACEPE3020D10.g foi posicionada no clado das farnesil pirofosfato sintases (Figura 12).

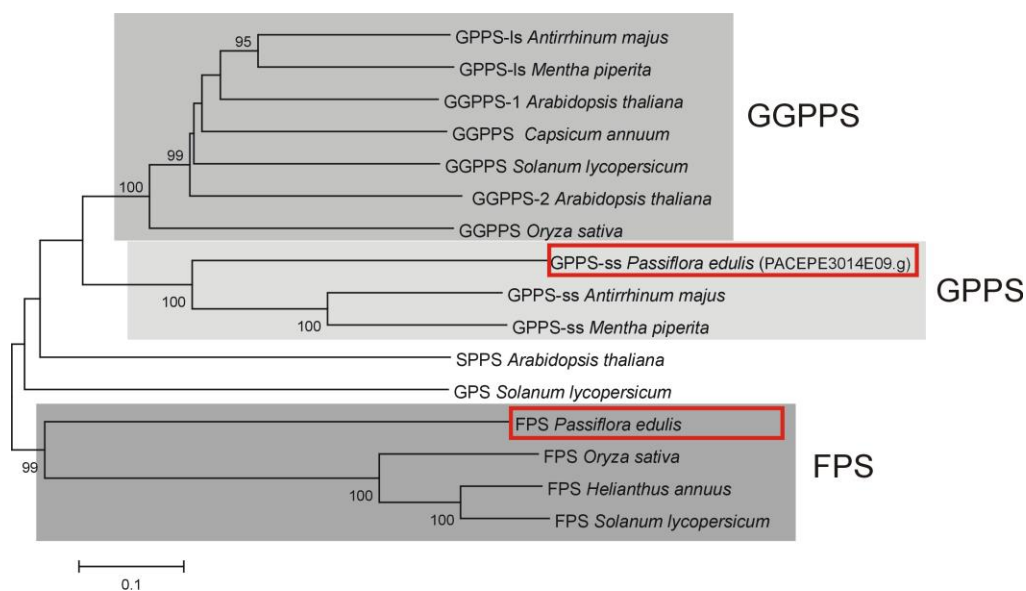


Figura 12: Análise filogenética de algumas pirofosfato sintases de angiospermas. O cladograma é baseado em uma árvore de parsimônia. As seqüências de *P. edulis* estão

destacadas em vermelho e os cladogramas com Bootstrap significativo estão destacados em cinza. Barra indica taxa de substituição.

Para as terpeno-sintases, um amplo grupo de seqüências foi utilizado para as análises baseadas nas semelhanças entre seus aminoácidos, totalizando 110 seqüências, incluindo 3 seqüências retiradas do PASSIOMA: PACEPS7022E05.g, PACEPS7022E05.g e PACEPE5007E08.g. Tais seqüências foram encontradas primeiramente pelo uso das palavras chave: terpeno-sintase, terpenoide ciclases, e preniltransferase. Duas delas são oriundas de bibliotecas de cDNA de tecidos reprodutivos de *P. suberosa*, e a terceira seqüência é proveniente de tecidos reprodutivos de *P. edulis*. Estas seqüências apresentaram similaridades com dois grupos de terpeno-sintases: as relacionadas com a biossíntese de monoterpenos e as relacionadas com a biossíntese de caureno (Figura 13).

4.2.2 Fenilpropanóides

Utilizando-se a busca por enzimas envolvidas na via de fenilpropanóides utilizando como palavra chave "fenilalanina amônia liase", foram encontradas duas seqüências, sendo uma de *P. edulis* (PACEPE3027D12.g) e outra de *P. suberosa* (PACEPS7025G07.g). Como neste caso o fragmento das seqüências encontradas correspondeu a porções distintas da proteína PAL com as quais se relacionavam, foram construídas duas árvores, uma para cada espécie (Figura 14). Nas duas seqüências de *Passiflora*, observou-se uma maior semelhança com seqüências de PAL de *Populus* e de *Citrus*, o que reflete a relação filogenética entre estes táxons e *Passiflora*.

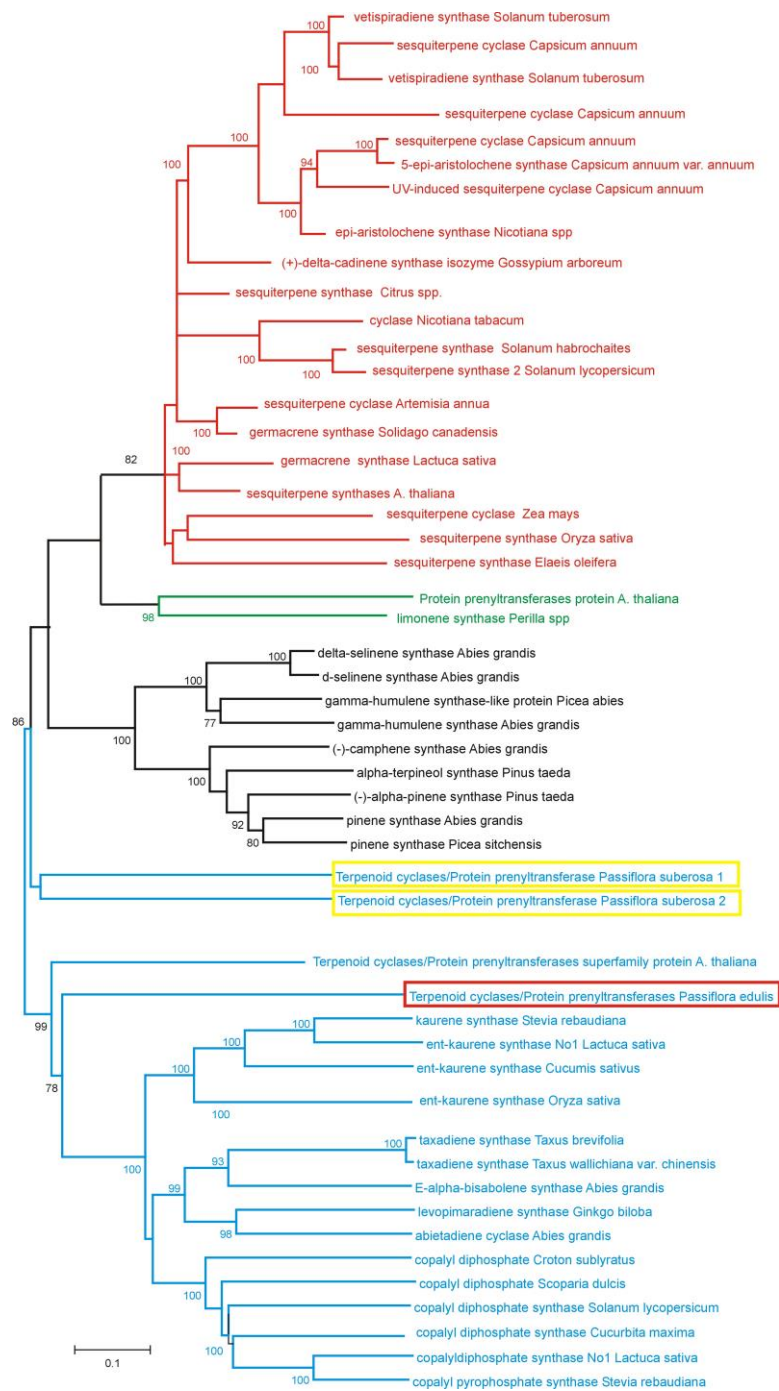


Figura 13: Análise filogenética de algumas terpeno sintases vegetais. Mantivemos os nomes como constam no Genbank. O cladograma foi baseado em uma árvore de parsimônia. A sequência de *P. edulis* está destacada em vermelho e as de *P. suberosa* em amarelo. O clado em vermelho corresponde às TPS-a; o clado verde às TPS-b; o clado em preto às TPS-d e o clado em azul às TPS-f, de acordo com Gang (2005). Barra indica taxa de substituição.

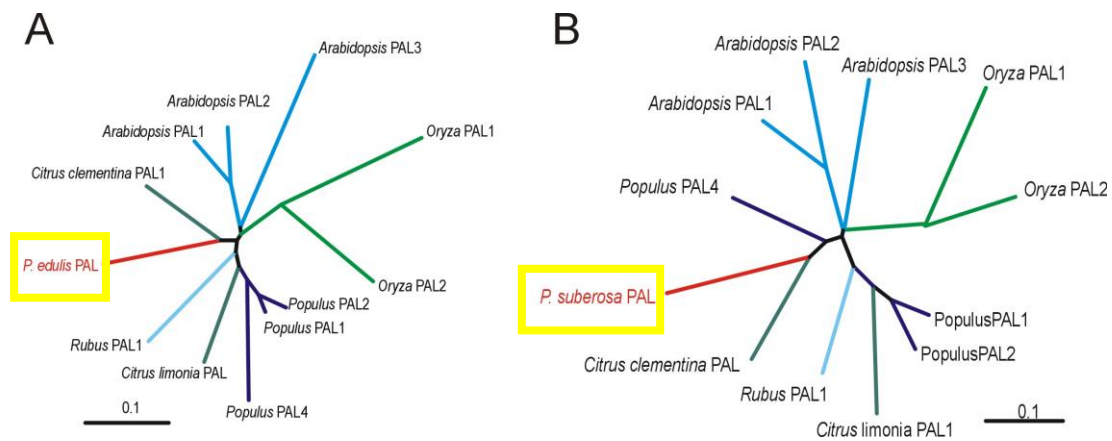


Figura 14: Análise de comparações de seqüências de algumas fenilalanina amônia liases de angiospermas. Os cladogramas são baseados em uma árvore de parsimônia. As seqüências de *Passiflora* estão destacadas em vermelho. Barras indicam taxas de substituição.

4.2.3 Metiltransferases

A análise das metiltransferases incluiu 56 proteínas. A seqüência encontrada no PASSIOMA (PACEPE3010E02.g) apresenta semelhanças com seqüências de O-metiltransferases de moléculas pequenas (SMOMT) sendo assim, podemos predizer que a mesma se encontra no grupo das metiltransferases envolvidas na formação de grupos metóxi funcionais em moléculas pequenas. Na referida análise filogenética esta PeOMT (*P. edulis* O-Metiltransferase, Figura 15) foi incluída no grupo de SMOMTs de espécies como *Rosa hybrida* e homólogos de outras espécies amplamente usadas em estudos de genes relacionados à biossíntese de voláteis florais (Gang, 2005).

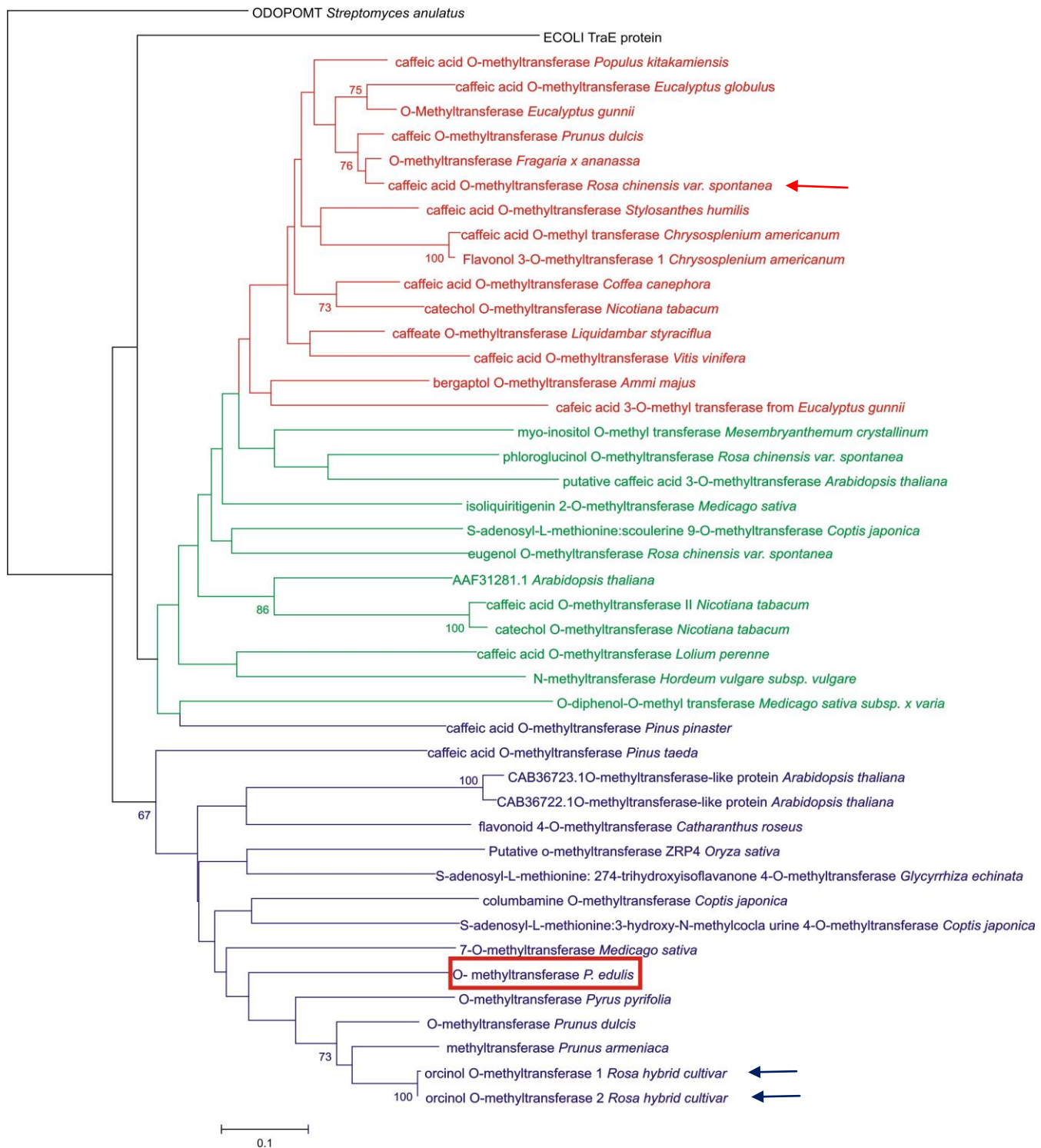


Figura 15: Análise de comparações de seqüências de algumas SMOMT. O cladograma foi baseado em uma árvore de parsimônia. O clado vermelho inclui enzimas relacionadas com a formação de grupos metóxi funcionais em uma ampla gama de substratos. O clado azul inclui enzimas que tipicamente catalisam substratos mais específicos e é nesta que a

PeOMT se enquadra. Os ramos em verde representam uma série de enzimas que são distintas dos outros dois grupos. Na raiz da árvore temos uma metiltransferase de *Streptomyces anulatus* e outra de *E. coli*. As nomenclaturas foram mantidas de acordo com GANG, (2005). Barra indica taxa de substituição. As setas são para melhor entendimento durante o texto.

4.3 Análise da expressão de genes da via de biossíntese de fenilpropanóides em *P. edulis*

Uma vez que os resultados sugerem que o “headspace” floral de *P. edulis* é impregnado por substâncias oriundas da via de fenilpropanóides e que para esta via foram encontrados alguns genes homólogos a genes relacionados com a transcrição de enzimas desta via biossintética, estudou-se a expressão de um homólogo de *PAL* e outro de *OMT* em diferentes tecidos de *P. edulis*

4.3.2 Análise da expressão de *PePAL* por RT-PCR

Com o propósito de elucidar a participação de *PePAL* na biossíntese de voláteis responsáveis pela atração de polinizadores em *P. edulis* procedeu-se à análise por RT-PCR em amostras de tecidos florais (Figura 16). Neste caso, foi observada a expressão em todos os tecidos analisados, o que levou a realização de outras técnicas mais refinadas para a quantificação e localização da expressão deste gene.

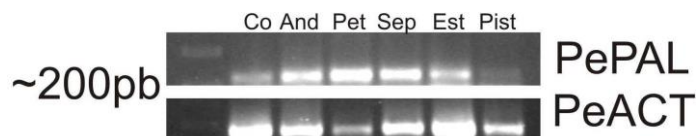


Figura 16: Padrão de expressão de *PePAL* em diferentes tecidos florais de *P. edulis* obtido por RT-PCR. Co=corona, And=coluna do androginóforo, Pet=pétala, Sep=sépala, Est=estame, Pist=pistilo.

4.3.2 Análise quantitativa da expressão de *PePAL* por qRT-PCR

Com o propósito de quantificar a expressão de *PePAL* nos diferentes tecidos em que observou-se expressão pela análise qualitativa, executou-se a técnica qRT-PCR ou também denominada PCR em tempo real. Com a mensuração da quantidade de cópias ampliadas a cada ciclo do gene em questão e de genes denominados endógenos ou normalizadores, foi possível estabelecer um valor indicativo da expressão de *PePAL*. Como esperado houve detecção da expressão em todos tecidos, a quantidade variou bastante entre os tecidos, tendo sido encontrado o valor mais alto no tecido correspondente à coluna do androginóforo. Houve um aumento gradativo da expressão nas sépala, estames e pistilos, respectivamente. Entre pétalas e corona, foi a corona que apresentou maior quantidade de transcritos deste gene (Figura 17).

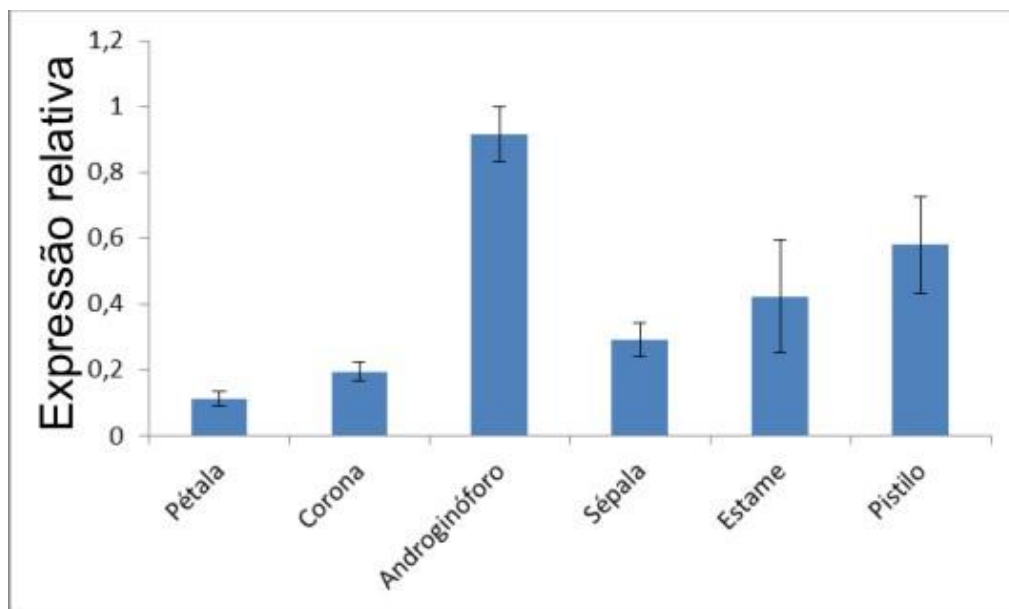


Figura 17: Padrão de expressão de *PePAL* obtido por RT-PCR em tempo real, em diferentes órgãos florais de *P. edulis*. A expressão foi normalizada com três genes constitutivos (veja Material e Métodos). As barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias das replicatas biológicas e experimentais.

4.3.2 Análise da expressão de *PePAL* por hibridização *in situ*

Com a finalidade de se averiguar em quais dos tecidos florais a via dos fenilpropanóides encontrava-se ativa foi realizada a hibridização *in situ* para o gene *PePAL*. Transcritos deste gene foram predominantemente encontrados nos tecidos da coroa (Figuras 18 A-C). Além disso, o sinal de hibridização também foi detectado nos tecidos de pétala e sépala, principalmente nas regiões epidérmicas e subepidérmicas (Figura 18D). Dentre os filamentos da coroa, foi possível observar que a expressão é maior nos filamentos mais externos que são mais alongados e provavelmente mais relacionados com a atração de polinizadores que os filamentos internos.

4.3.3 Análise quantitativa da expressão de *PeOMT* por qRT-PCR

O gene relacionado com a transferência de grupos metila, aqui representado por uma possível OMT encontrada no banco de dados de cDNA de tecidos reprodutivos de *P. edulis*, teve sua expressão investigada pela técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real. Como pode ser visto na Figura 19, a expressão da *PeOMT* (*P. edulis* OMT) foi observada em tecidos como ápice juvenil, gavinhas, ápice reprodutivo, botões florais (coletados com 1cm e outro com 5cm), bem como na coroa e no perianto. Foi possível observar que os tecidos do perianto apresentaram maior concentração de transcritos do que a coroa (Figura 19). Adicionalmente, a expressão deste gene parece aumentar durante o desenvolvimento do botão, uma vez que se observou uma expressão maior em tecidos dos botões florais em estágio de desenvolvimento mais avançado (Botão II, Figura 19).

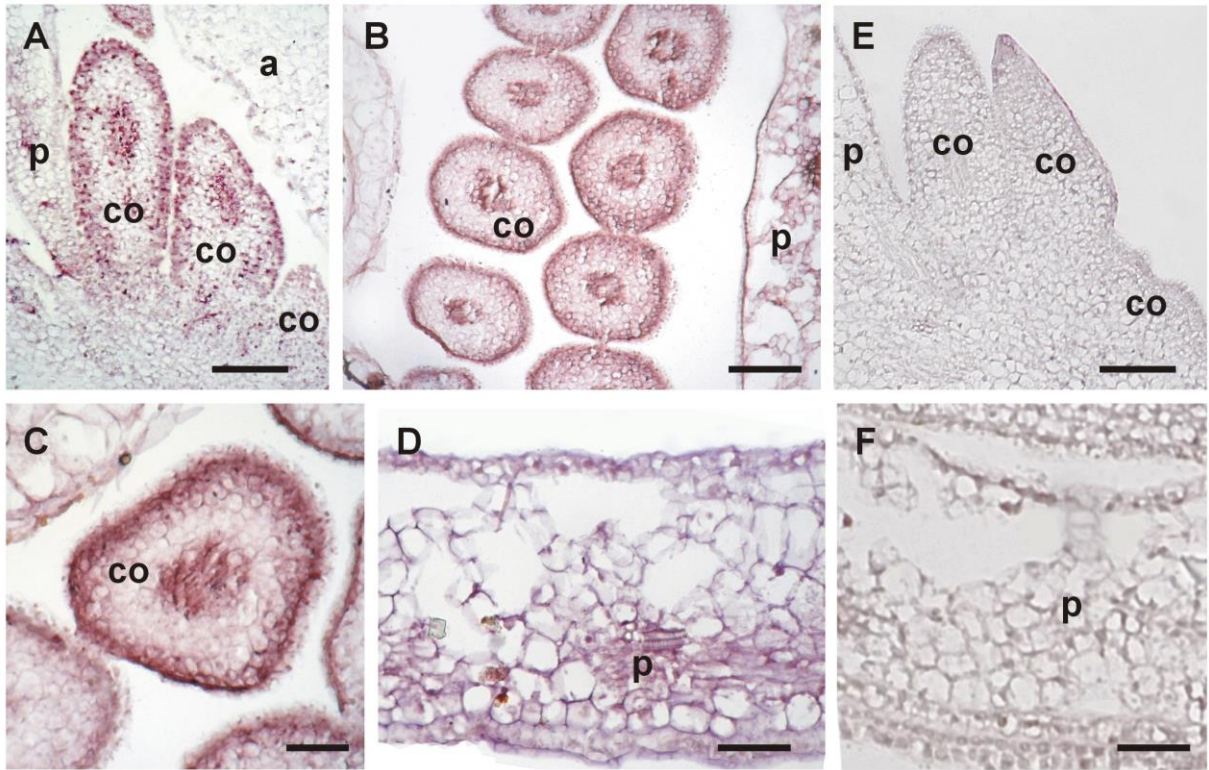


Figura 18: Padrão de expressão de *PePAL* por hibridização *in situ* em cortes longitudinais (A e E) e transversais (B-D e F) de botões florais de *P. edulis* de 2-3cm de comprimento. A-D: sonda antisense; E e F: sonda senso. A-C: Sinal de hibridização nos filamentos da coroa; D: Sinal de hibridização na pétala. E,F: Não há sinal de hibridização acima do background quando a sonda senso foi utilizada. a: androginóforo; co: filamentos da coroa; p: pétala. Barras: A, B e E 500 μ m; C, D e F: 250 μ m. A expressão é caracterizada pela pigmentação roxo-avermelhada.

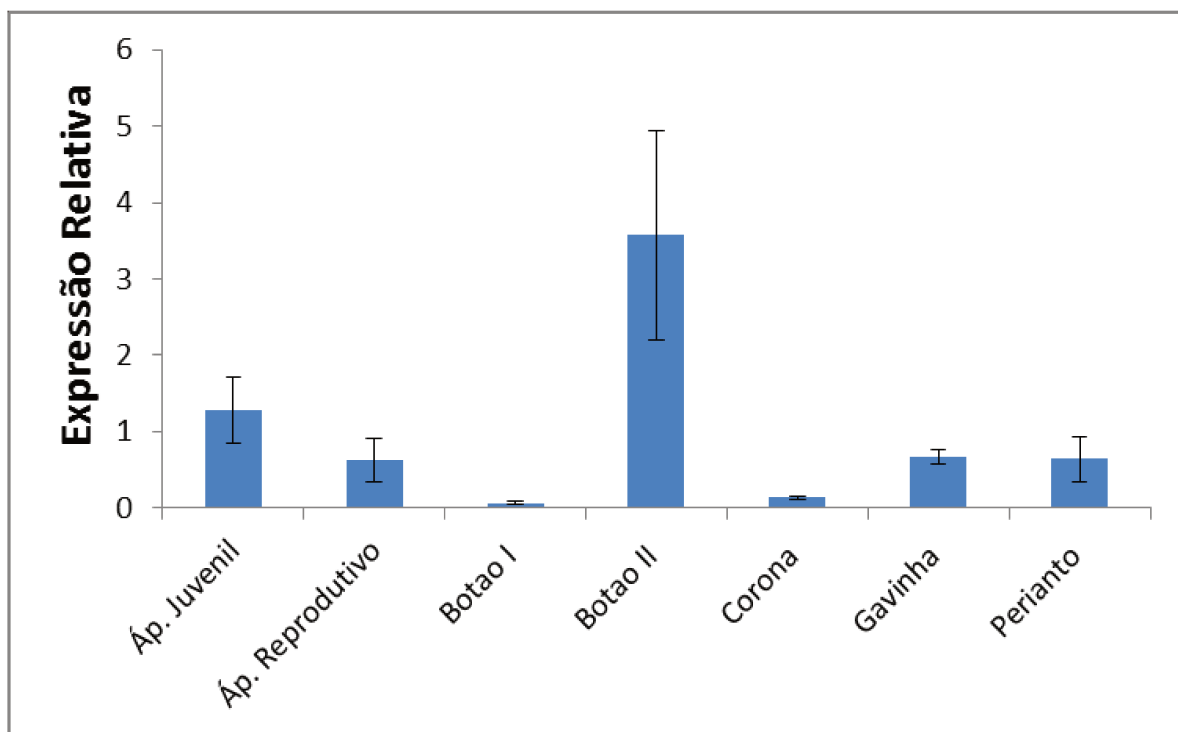


Figura 19: Padrão de expressão de *PeOMT* obtido por RT-PCR em tempo real. A expressão foi normalizada com três genes constitutivos (veja Material e Métodos). Ap= tecido de ápice do caule. Botão I e Botão II correspondem a amostras de botão floral em estágios consecutivos de desenvolvimento. As barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias das replicatas biológicas e experimentais.

4.3.4 Análise da expressão de *PeOMT* por hibridização *in situ*

Transcritos de *PeOMT*, foram detectados preferencialmente nos filamentos da coroa (Figura 20 A e B), principalmente naqueles localizados mais externamente, como notado também para a expressão de *PePAL*, o que denota um possível compartilhamento de função para estes dois genes. Adicionalmente, foi observado sinal de hibridização na região basal do botão floral, que corresponde ao nectário em desenvolvimento. Observou-se ainda a expressão de *PEOMT* em grupos de células da região adaxial das pétalas, possivelmente em associação a osmóforos (Figura 20 C e D). É importante ressaltar que as diferenças observadas no padrão de expressão revelado por qRT-PCR e hibridização *in situ* se deve ao fato de que os tecidos usados na qRT-PCR foram coletados da já flor aberta (após a antese)

e na hibridização *in situ* foram utilizados botões florais, devido limitações impostas pela técnica.

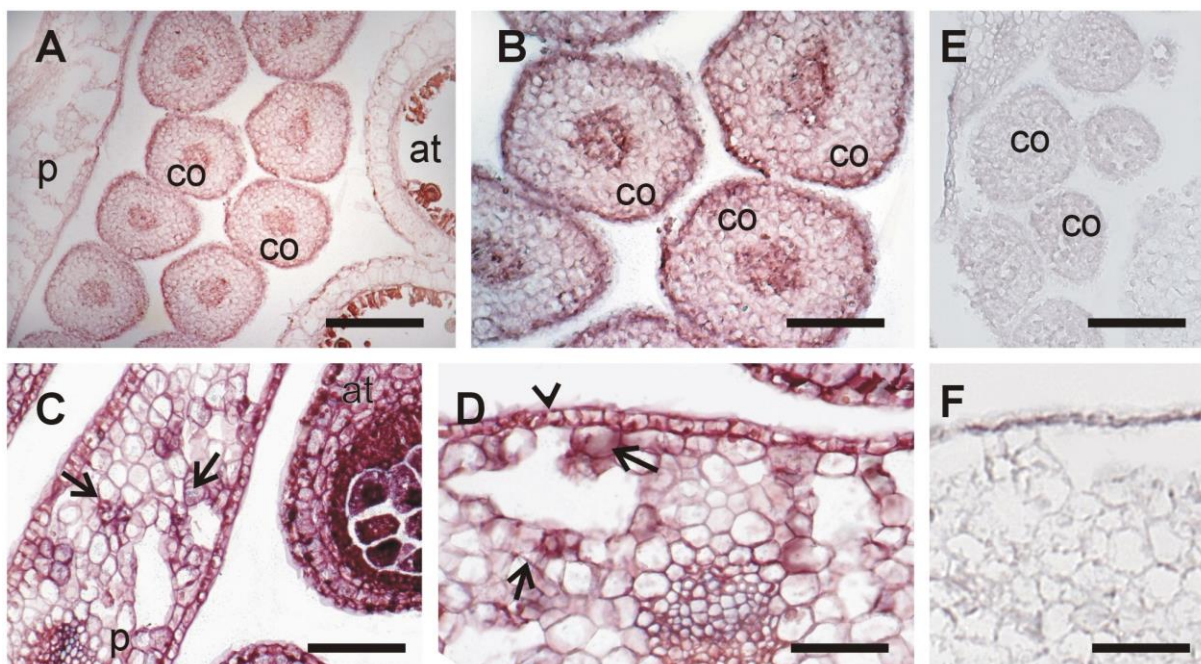


Figura 20: Padrão de expressão de *PeOMT* por hibridização *in situ* em cortes transversais de botões florais de *P. edulis* de 2-3cm de comprimento. A-D: sonda antisenso; E e F: sonda senso. A e B: Sinal de hibridização (coloração avermelhada) nos filamentos da corona; C e D: Sinal de hibridização na pétala. Note também em C o forte sinal de hibridização na antera. Em C e D as setas apontam a concentração do sinal de hibridização em grupos de células próximos ao aerênquima da pétala. A ponta de seta aponta um estômato de um possível osmóforo. E, F: Não há sinal de hibridização acima do background quando a sonda senso foi utilizada. at: antera; co: filamentos da corona; p: pétala. Barras: A e E: 600 μ m; B e C: 300 μ m; D e F: 150 μ m.

5 Discussão

5.1 Componentes voláteis presentes no “headspace” de *P. edulis*.

P. edulis (Figura 4 A), possui flores brancas ou de coloração clara que permanecem abertas durante o dia; possuem também coroa com filamentos longos e pigmentados na base, anteras relativamente próximas à coroa (devido à altura da base do androginóforo) e um odor adocicado forte. Estas características florais são indicativas de uma adaptação à polinização por insetos (MALERBO-SOUZA; RIBEIRO, 2010). O constituinte majoritário do seu aroma floral é o 1,4-dimetoxibenzeno (Figura 8A; Tabela 2). Esta substância parece exercer forte atração em abelhas. Em um trabalho com bioensaios em campo envolvendo duas espécies de *Salix* foi constatado que esta substância era a que mais atraía as abelhas responsáveis pela polinização destas espécies (DÖTTERL et al., 2005).

O segundo constituinte de maior intensidade observado nos cromatogramas do “headspace” floral de *P. edulis* foi o 1,3,5-trimetóxi-benzeno (Figura 8A; Tabela 2). Esta substância também foi encontrada em variedades de *Rosa chinensis* como, por exemplo, na variedade *spontanea* na qual este constituinte corresponde a sessenta por cento do total de componentes voláteis encontrados em seu “headspace” floral, tendo um pico de emissão no estágio em que as flores estão em antese. Esta substância também foi encontrada em outros tecidos como estames e sépalas, porém em menor quantidade (WU et al., 2003; YOMOGIDA, 1992).

Outros gêneros que também possuem substâncias fenólicas metoxiladas presentes no aroma floral são: *Curcubita* (Curcubitaceae) e *Pyrola* (Pirolaceae), ambas polinizadas por abelhas forrageadoras de néctar (DOBSON, 2006). Estas observações indicam que tais componentes podem estar estritamente relacionados com a atração de abelhas. No gênero *Passiflora* a melitofilia, polinização por abelhas, foi descrita para várias espécies, entre elas

P. edulis (HOFFMANN et al., 2000; VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2001). Nossos resultados indicam, portanto, que na espécie *P. edulis*, a atração de seus polinizadores é modulada pela emissão de benzenóides metoxilados.

5.2 Componentes voláteis presentes no “headspace” de *P. coccinea*.

A polinização de *P. coccinea* é realizada por beija-flores (VARASSIN, 1996). Nesta síndrome de polinização é relatado que o aroma possui um papel menos importante na atração dos polinizadores, sendo a pigmentação e a composição do néctar características determinantes para a especificação do polinizador. Em *P. speciosa*, uma espécie muito próxima de *P. coccinea* e também polinizada por beija-flores, foi reportada a presença de um único composto volátil no “headspace” floral: 2-metil propil-1,2-benzenodicarboxila (VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2001).

Em nossas análises foram detectados componentes de natureza terpênica (Figura 8B; Tabela 2), dados que condizem com os achados de KNUDSEN et al., (2004) que investigaram dezessete espécies de plantas polinizadas por beija-flores e em oito foram detectados alguns traços de terpenóides presentes no “headspace” floral. Os autores reforçam que é necessário um estudo mais profundo para saber se tais componentes estão relacionados com a atração de polinizadores alternativos, com a proteção contra a herbivoria ou se são remanescentes de um ancestral no qual o aroma seria mais proeminente (PETTERSSON; ERVIK; KNUDSEN, 2004).

Em duas espécies de *Nicotiana* (Solanaceae) polinizadas por beija-flores, foi encontrada uma considerável emissão de voláteis, principalmente durante a noite. Porém, a maioria destes voláteis está presente em outras espécies do mesmo gênero, polinizadas por mariposas, reforçando a ideia de que os componentes encontrados nas duas espécies

polinizadas por beija-flores sejam remanescentes destes ancestrais polinizados por mariposas (LEVIN; RAGUSO; MCDADE, 2001; RAGUSO et al., 2003).

É importante esclarecer que para *P. coccinea*, inclusive no indivíduo do qual foram coletadas as amostras, a visitação de beija-flores foi documentada, portanto as substâncias detectadas parecem não atrapalhar a atração dos mesmos. Fato semelhante acontece com outras espécies, nas quais uma forte fragrância não inibe a visitação de beija-flores (AIGNER; SCOTT, 2002; SAHLEY, 1996; SAZIMA; SAZIMA, 1989; WOLFF; BRAUN; LIEDE, 2003).

5.3 Componentes voláteis presentes no “headspace” de *P. mucronata*.

Com base na literatura, os componentes voláteis mais proeminentes no “headspace” de espécies cujas flores são polinizadas por morcegos, são aqueles que possuem enxofre na sua composição química (sulfurados), e em todas as plantas polinizadas por morcegos o aroma parece ser o principal atraente, uma vez que o senso olfativo destes animais é bem aguçado (DOBSON, 2006).

Flores de *P. mucronata* compartilham muitas características morfológicas com outras espécies polinizadas por morcegos, e foi registrada em campo a visitação de suas flores por duas espécies de morcego (*Glossophaga soricina* e *Carollia perspicillata* – (SAZIMA; SAZIMA, 1978)). Varassin; Trigo; Sazima, (2001) estudaram os constituintes voláteis de *P. mucronata* e relataram a presença de componentes voláteis variados incluindo produtos alifáticos, álcoois benzênicos e monoterpenos, e não foram detectados componentes sulfurados.

Empregando-se a técnica com a qual se obteve a identificação de substâncias voláteis nas outras duas espécies (*P. edulis* e *P. coccinea*) não se registrou a presença de nenhuma substância volátil. Porém com o aumento do tempo de equilíbrio (na qual a flor

ficava isolada pelo saco plástico) verificou-se a presença de um terpeno, o beta-pineno (Figura 8C; Tabela 2) também encontrado em espécies polinizadas por morcegos, como *Parmentiera alata*, *Crescentia cujete*, *Cleome anomala*, *Ceiba trischistandra* (KNUDSEN; TOLLSTEN, 1995). A presença de substâncias com enxofre na sua composição química parece ser algo intrínseco da composição do “headspace” de flores polinizadas por morcegos (DOBSOM,2006).

5.4 Genes envolvidos na biossíntese de voláteis do “headspace” floral de *Passiflora*.

Devido à disponibilidade de uma ferramenta para a procura de genes envolvidos no desenvolvimento reprodutivo em espécies de *Passiflora* (Banco de Dados PASSIOMA- (CUTRI; DORNELAS, 2012), foi possível a busca por genes possivelmente envolvidos na biossíntese de voláteis neste banco de dados.

A Geranilgeranil pirofostato sintase (GGPPs) pertence ao grupo das prenilttransferases de cadeia pequena que também inclui as farnesis pirofosfato sintases (FPPs) e as geranil pirofosfato sintases (GPPs). Estas enzimas estão na biossíntese dos isoprenóides e são muito similares (JOLY; EDWARDS, 1993). A análise filogenética (Figura 12) indicou que a sequência de *P. edulis* foi similar às seqüências de geranilgeranil pirofosfato sintases e, portanto, está provavelmente envolvida na formação de GGPP (C20) pela condensação de uma molécula de DMAPP com três de isopentenil pirofosfato (IPP) ou pela condensação de GPP com duas moléculas de (BURKE; WILDUNG; CROTEAU, 1999). A molécula de GGPP é precursora de diversos metabólitos vegetais, como os diterpenóides, giberilinas, carotenoides e as cadeias de isopreno presentes na clorofila e é usada para prenilação protéica. O genoma de *Arabidopsis* contém 12 genes codificadores de GGPPs (LANGE; GHASSEMIAN, 2003). Estes genes apresentam um padrão de expressão e localização subcelular das proteínas codificadas pelos mesmos bastante diversos,

demonstrando que cada GGPPs provavelmente possui funções bastante específicas (OKADA et al., 2000).

Os terpenóides compõem a classe mais ampla de substâncias voláteis, tendo os monoterpenos e sesquiterpenos grande representação neste grupo. Muitos compostos presentes em aromas florais são sesquiterpenóides (germacreno D, δ -cadineno e β -cubebeno) (BACK; CHAPPELL, 1995). Estes constituintes são biosintetizados no citosol a partir de moléculas de FPP pela ação das sesquiterpeno sintases, as quais pertencem ao extenso grupo das terpeno sintases (TPS). Estas enzimas podem ser classificadas em 3 diferentes grupos, de acordo com o substrato que utilizam. O primeiro é o grupo das sesquiterpeno sintases que utilizam como substrato o FPP. As enzimas do segundo grupo utilizam o GPP para produzir monoterpenos. O terceiro grupo contém as proteínas que usam como substrato moléculas de GGPP para a produção de diterpenos (GANG, 2005; TRAPP; CROTEAU, 2001).

Nossas análises (Figura 13) indicaram duas possíveis terpeno sintases de *P. suberosa* pertencentes ao segundo grupo e uma TPS de *P. edulis* pertencente a um grupo intermediário entre terpeno sintases envolvidas na biossíntese de caureno e terpeno sintases envolvidas na biossíntese de monoterpenos. Esta mesma relação foi encontrada em linalól sintases (LIS) de *C. breweri* por Gang (2005), que menciona que estas são formas não usuais de terpeno sintases, derivadas de um evento de recombinação entre uma diterpeno sintase, similar com as entcaureno sintases e uma monoterpeno sintase (CSEKE; DUDAREVA; PICHERSKY, 1998; GANG, 2005).

5.5 Genes envolvidos na biossíntese de voláteis do “headspace” floral de *Passiflora edulis*.

Uma vez determinada a composição majoritária dos componentes voláteis do “headspace” floral de *P. edulis*, genes que participam a biossíntese destes compostos foram encontrados no banco de dados PASSIOMA (CUTRI; DORNELAS, 2012) e tiveram seus padrões de expressão analisados.

Os componentes voláteis majoritários do aroma das flores de *P. edulis* são benzenóides metoxilados, que são oriundos da via metabólica relacionada com a biossíntese de fenilpropanóides. Portanto, o primeiro gene analisado foi um homólogo à fenilalanina amônia liase (PAL).

A enzima PAL catalisa a deaminação não oxidativa da l-Phe para gerar o ácido cinâmico. Tal reação é geralmente considerada como um ponto crucial no qual o fluxo de carbonos desta via é controlado, gerando os diversos fenilpropanóides, bem como seus derivados benzênicos (KUMAR; ELLIS, 2001). PAL parece existir universalmente em plantas superiores como uma família gênica e a presença de isoformas é bastante comum (BOREJSZA-WYSOCKI; HRAZDINA, 1994; RASMUSSEN; DIXON, 1999). Porém, apenas uma sequência codificadora de PAL foi identificada em nosso banco de dados para *P. edulis* e outra para *P. suberosa* (Figura 14). A análise da expressão do homólogo de *P. edulis* forneceu fortes evidências de que este gene codificador de PAL é expresso em tecidos florais, indicando a atividade da via de fenilpropanóides em tecidos relacionados com a emissão de voláteis.

Observando-se o cladograma da figura 14, as sequências da proteína PAL se separam-se em dois clados, um deles contendo apenas sequências de dicotiledôneas e outro com a monocotiledônea do gênero *Oryza*. Em *Arabidopsis thaliana* a expressão dos

genes codificadores de enzimas PAL pode ser demonstrada em tecidos reprodutivos pela representação gráfica gerada “*in silico*” por dados de experimentos de microarranjo (Figura 21- WINTER et al., 2007). Apesar da expressão ser considerada baixa em termos de expressão absoluta nestes experimentos de microarranjo, é clara a participação generalizada de transcritos do gene *PAL1* e seu parálogo *PAL2* nos tecidos reprodutivos em *A. thaliana*. Sendo que a expressão mais acentuada é visualizada no caule, denotando a participação em processos de lignificação (WINTER et al., 2007).

Sequências de PAL em outras espécies, como por exemplo em *Citrus* estão centralizadas em estudos que visam os mecanismos de defesa contra patógenos. Nos frutos de *Citrus* quando se inoculou patógenos como *Pichia membranefaciens* houve um aumento na produção de flavonoides, iniciada pela PAL (LUO; ZENG; MING, 2012). Outra funcionalidade para os flavonoides está no desenvolvimento da cor e sabor de frutos, como os de *Rubus idaeus* (framboesa), na qual os fenilpropanóides estão intimamente ligados à qualidade dos frutos (KUMAR; ELLIS, 2001).

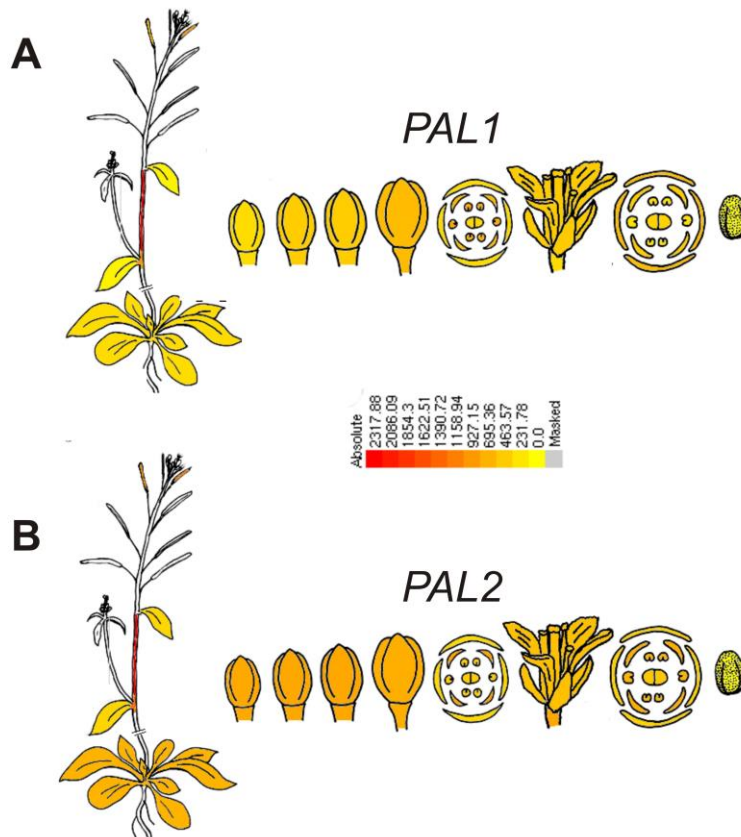


Figura 21: “Electronic Fluorescent Pictograph” gerado para os genes *PAL1* (AT2G37040) e *PAL2* (AT3G53260) de *A. thaliana*. A expressão de *PAL1* pode ser considerada generalizada em todos os tecidos reprodutivos apresentados (botões florais em desenvolvimento e nos verticilos florais), porém um alto valor de expressão absoluta é vobservado no caule (A). A expressão de *PAL2* mostra-se um pouco mais elevada que *PAL1* nos botões em estágios iniciais, bem como nas folhas maduras, e também mostra alta expressão em tecido caulinar. No centro a escala de cores representa os valores de expressão absoluta.

Em *Petunia hybrida* o “headspace” floral é composto por flavonoides, como o benzoato de benzila, cuja emissão é mais proeminente ao entardecer. Nesta espécie, análises de expressão gênica confirmaram que os níveis de transcritos de *PAL* aumentavam ao entardecer, sugerindo a participação desta enzima na produção de voláteis florais em *Petunia* (VERDONK et al., 2003).

Portanto, a enzima PAL sendo a precursora na biossíntese de fenilpropanóides em plantas, está relacionada a uma série de funções como lignificação, defesa e pigmentação de tecidos vegetais, e também na biossíntese de voláteis. Uma vez sintetizados, estes fenilpropanóides podem passar por reações de modificação, as quais são comumente encontradas na biossíntese de voláteis em plantas (DOBSON, 2006). Uma vez que os componentes voláteis de *P. edulis* são fenilpropanóides metilados (apresentam a adição de um grupo metoxi), há interesse nos genes relacionados com esta reação.

Devido a sua importância no metabolismo das plantas, a caracterização de seqüências de genes codificadores de metiltransferases está crescendo rapidamente (JOSHI; CHIANG, 1998). As metiltransferases participam da biossíntese de uma série de compostos envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo a biossíntese de substâncias voláteis florais. Muitas O-metiltransferases (OMT) participam da via de biossíntese dos fenilpropanóides e estão envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários como a lignina, flavonoides, fitoalexinas e inclusive os benzenóides voláteis. Outras metiltransferases estão envolvidas na biossíntese de esteróides, e um outro grupo está envolvido na metilação da enzima rubisco (YING; JANNEY; HOUTZ, 1996).

A seqüência de *P. edulis* assemelha-se à O-metiltransferase de moléculas pequenas e possivelmente está envolvida na adição de grupos metóxi funcionais em compostos advindos da via dos fenilpropanóides. Uma análise mais detalhada desta seqüência indicou que a mesma possui uma seqüência conservada (Figura 22) responsável pela dimerização, que corresponde a um domínio de amino ácidos localizados na região N-terminal de OMTs (ZUBIETA et al., 2002).



Figura 22: Alinhamento de diferentes OMTs, incluindo a sequência de *P. edulis*, mostrando a semelhança entre seus aminoácidos, que correspondem à região (N-terminal) conservada responsável pela dimerização de proteínas. As barras inferiores representam a similaridade entre os aminoácidos encontrados nesta região nas diferentes proteínas analisadas.

Um dos compostos majoritários no “headspace” floral de *P. edulis* é o 1,3,5-trimetóxi-benzeno TMB. Este composto também ocorre no “headspace” floral de *Rosa* (GANG, 2005; LAVID et al., 2002; WU et al., 2003). Em *Rosa hybrida* demonstrou-se que os estágios finais (Figura 23) da biossíntese de TMB acontecem pela ação de duas OMT (OOMT1 e OOMT2, Figura 15- seta azul). Sendo que OOMT1 tem maior afinidade por di-hidróxidos enquanto OOMT2 utiliza preferencialmente como substrato os mono-hidróxidos.

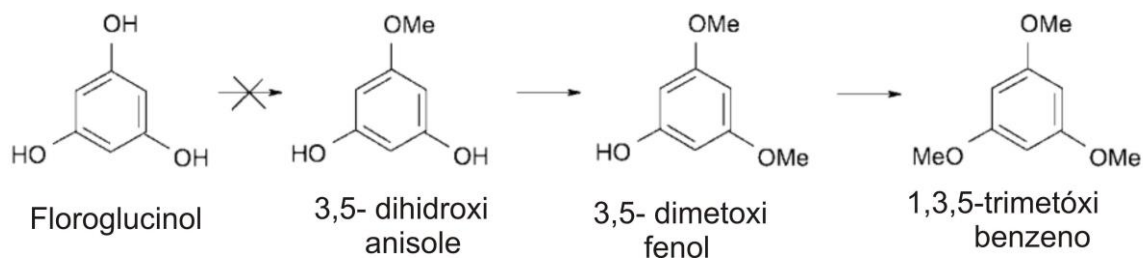


Figura 23: Via biossintética de 1,3,5 – trimetóxi-benzeno proposta por Lavid et al., (2002), a seta com o “x” indica aonde houve baixa especificidade do precursor (floroglucinol) com as OMTs clonadas em *Rosa spp.*

Adicionalmente estas enzimas também não utilizam outros metabólitos como substratos, por exemplo, o floroglucinol (GANG, 2005; LAVID et al., 2002). O gene PeOMT

de *P. edulis*, descrito neste estudo, codifica uma proteína que está contida no mesmo grupo destas OMT de *Rosa hybrida*, indicando assim que o mesmo pode estar diretamente envolvido na biossíntese de TMB, sendo sua ação possivelmente restrita a substratos específicos.

Em *Rosa chinensis* var. *spontanea*, o composto majoritário também é o 1,3,5-trimetóxi-benzeno, porém das três OMT clonadas nesta espécie (RcOMT1, RcOMT2, RcOMT3) somente a segunda apresenta afinidade com precursores de TMB, as outras duas estão relacionadas com a produção de metileugenol e metilisoegenol (WU et al., 2003). Apesar de filogeneticamente distante (figura 15- seta vermelha) RcOMT2 também contribui para a formação de um mesmo componente catabolizado em suas últimas etapas biossintéticas pelas OOMT1 e 2 em *R. hybrida*, as quais se assemelham mais com a sequência de *P. edulis*.

5.6 Expressão dos genes envolvidos na biossíntese de voláteis do “headspace” floral de *Passiflora edulis*.

Há indicações na literatura de que os tecidos da coroa são os responsáveis pela emissão do aroma encontrado em flores de *Passiflora* (AMELA GARCÍA; GALATI; HOC, 2007; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Além disso, foram descritas diferenças ultra-estruturais nas células deste tecido floral que corroboram que é a coroa a grande responsável pela emissão de aromas em flores de *Passiflora* (AMELA GARCÍA; GALATI; HOC, 2007). Com estas observações é possível sugerir que a expressão de genes relacionados com a biossíntese de voláteis é esperada em tecidos da coroa.

Como descrito nos Resultados, um dos compostos majoritários no “headspace” de flores de *P. edulis* é o 1,3,5-trimetóxi-benzeno. Este composto é um derivado metoxilado da via dos fenilpropanóides. Desta forma, procurou-se descobrir em qual verticilo floral tal via se

encontrava ativa através da expressão da enzima PAL. Assim, transcritos para um potencial ortólogo da PAL em *P. edulis*, denominado *PePAL* foram detectados por RT-PCR, qRT-PCR e por hibridização *in situ* em todos os tecidos florais, uma vez que constituintes fenólicos estão presentes e exercem diferentes funções nos tecidos vegetais, como a lignificação, pigmentação e conferindo proteção (KUMAR; ELLIS, 2001; LUO; ZENG; MING, 2012).

Em *Rosa chinensis* var. *spontanea*, a expressão de mRNA de *RcOMT1* foi detectada somente em tecidos florais e não houve detecção de transcritos para este gene nas folhas. Entre os tecidos florais de rosa (pétalas, estames e sépalas), foi no estame que este gene apresentou uma maior expressão, e foi observada uma maior expressão em botões em estágio final de desenvolvimento. Já transcritos para *RcOMT2* foram detectados em todos os tecidos analisados e nenhuma expressão específica foi observada, o mesmo ocorreu para transcritos de *RcOMT3* (WU et al., 2003).

Considerando este padrão de expressão de homólogos de OMT em *Rosa chinensis*, nossos resultados apontam uma maior similaridade de *PeOMT* com *RcOMT1*, uma vez que transcritos de *PeOMT*, foram encontrados principalmente em tecidos florais, com exceção do ápice juvenil, o qual não foi abordado por WU et al., (2003) e gavinha, porém esta última está ontogeneticamente relacionada com as flores (CUTRI et al., 2012).

Em outras plantas, estudos de expressão de genes relacionados à biossíntese de voláteis como S-adenosil-L-metionina transferase (*SAM*), (iso)eugenol O-metil-transferase (*IEMT*), acetil-coenzima A benzil álcool acetiltransferase (*BEAT*) e ácido salicílico carboxil metiltransferase (*SAMT*) foram detectados por hibridização *in situ* nas camadas epidérmicas dos tecidos florais. Este padrão de expressão indica o mecanismo pelo qual há emissão e propagação para a atmosfera dos compostos voláteis florais, uma vez que as enzimas que os sintetizam são produzidas nas regiões periféricas dos órgãos (DUDAREVA; PICHERSKY,

2000; DUDAREVA et al., 1996; NEGRE et al., 2002). Em nossas análises também foi observada a ocorrência da expressão desta enzima chave para a via dos fenilpropanóides em células epidérmicas da própria corona, e no perianto (Figuras 17 e 18).

Uma vez detectada a atividade da via dos fenilpropanóides na corona, foi analisada também a expressão de uma OMT que possivelmente está envolvida na metilação do composto majoritário detectado no "headspace" floral de *P. edulis*. A análise da expressão do gene *PeOMT* por qRT-PCR detectou primariamente altas concentrações deste transcrito no perianto. Concentrações menores foram encontradas na corona, gavinhas, ápices juvenis, ápices reprodutivos e botões florais. Como descrito anteriormente, OMTs participam na formação de outros metabólitos importantes para a manutenção da vida da planta (YING; JANNEY; HOUTZ, 1996).

Porém a expressão de genes relacionados com a produção de voláteis florais não ocorre exclusivamente em tecidos da epiderme. Em *Petunia hybrida*, por exemplo, benzenóides metoxilados também são comumente encontrados em seu "headspace" floral. Para esta planta foram identificados genes que regulam a biossíntese destes compostos como o *ODOTANT 1* que controla a produção de um precursor da fenilalanina e *EMISSION OF BENZENOIDS II (EOBII)* que por sua vez ativa o promotor de *ODO1*. Para estes genes, a análise de expressão mostrou que a mesma não é exclusivamente detectada em tecidos epidérmicos, indicando que a liberação dos voláteis depende de proteínas transportadoras especializadas, as quais são traduzidas sob a influência de outros fatores genéticos, como o próprio *ODO1* (SPITZER-RIMON et al., 2010; VAN MOERKERCKE et al., 2012).

6 Conclusões

- *P. edulis* (polinizadas por abelhas) possui “headspace” floral constituído por substâncias fenólicas contendo um grupo metoxi.
- *P. coccinea* (polinizada por beija flores) possui “headspace” floral constituído por terpenos, porém a função destes na atração de beija-flores ainda não foi esclarecida.
- *P. mucronata* (polinizada por morcegos) possui “headspace” floral constituído por beta pineno (terpeno), alcanos, derivado de ácido graxo, e substâncias com enxofre.
- No banco de dados PASSIOMA é possível encontrar ESTs relacionados com a síntese de terpenos e fenilpropanóides.
- Em *P. edulis* a análise da expressão de *PePAL* e *PeOMT* presume a identificação e participação destes genes na síntese dos compostos fenólicos metoxilados presentes no seu aroma floral.

7 Referências

- AIGNER, P. A.; SCOTT, P. E. Use and pollination of a hawkmoth plant, *Nicotiana attenuata*, by migrant hummingbirds. **The Southwestern Naturalist**, v. 47, p. 1-11, 2002.
- AIZZA, L.C.B. **Desenvolvimento da corona em flores do gênero *Passiflora* (passifloraceae)**. Universidade Estadual de Campinas, 2010
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMELA GARCIA, M. T.; GALATI, B. G.; HOC, P. S. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 202, p. 302-315, 2007.
- AMENT, K. et al. Induction of a leaf specific GERANYLGERANYL PYROPHOSPHATE SYNTHASE and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. **Planta**, v. 224 p. 1197-1208, 2006.
- ANDERSSON, S. et al. Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 129-153, 2002.
- ARMBRUSTER, S.; FENSTER, C.; DUDASH, M. Pollination “principles” revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers. **The Scandinavian Association for Pollination Ecology Honours Knut Faegri**, v. 39, p. 179-200, 2000.
- AZUMA, H. et al. Floral scent chemistry of mangrove plants. **Journal of Plant Research**, v. 115, p. 47-53, 2002.
- BACK, K.; CHAPPELL, J. Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to related terpene cyclases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 7375-7381, 1995.
- BERGSTRÖM, G.; DOBSON, H. E. M.; GROTH, I. Spatial fragrance patterns within the flowers of *Ranunculus acris* (Ranunculaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 195, p. 221-242, 1995.
- BESTMANN, H. J.; WINKLER, L.; HELVERSEN, O. VON. Headspace analysis of volatile flower scent constituents of bat-pollinated plants. **Phytochemistry**, v. 46, p. 1169-1172, 1997.
- BOATRIGHT, J. et al. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1993-2011, 2004.
- BOREJSZA-WYSOCKI, W.; HRAZDINA, G. Biosynthesis of p-hydroxyphenylbutan-2-one in raspberry fruits and tissue cultures. **Phytochemistry**, v. 35, p. 623-628, 1994.

BURKE, C. C.; WILDUNG, M. R.; CROTEAU, R. Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 13062-13067, 1999.

BRUCKNER, CH. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. ed. Cinco Continentes, 471pp, 2001.

CERVI, A. C.; RODRIGUES, W. A. Nomenclatural and taxonomic review of Passifloraceae species illustrated and described by Vellozo in Flora Fluminensis. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 1109-1111, 2010.

CHEN, F. et al. Biosynthesis and Emission of Terpenoid Volatiles from Arabidopsis Flowers. **The Plant Cell Online**, v. 15, p. 481-494, 2003.

COWEN, R. **History of Life**. 4th. ed. Malden: Blackwell Publishing, 2004. p. 324

CSEKE, L.; DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Structure and evolution of linalool synthase. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1491-1498, 1998.

CUTRI, L. et al. Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. **Mechanisms of Development**, "In Press", 2012.

CUTRI, L.; DORNELAS, M. C. PASSIOMA: Exploring Expressed Sequence Tags during Flower Development in *Passiflora* spp. **Comparative and functional genomics**, v. 2012, p. 11, 2012.

NOGUEIRA, P. C. et al. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry**, v. 56, p. 443-452, 2001.

DOBSON, H. Relationship between Floral Fragrance Composition and Type of Pollinator. In: **Biology of Floral Scent**. CRC Press, 2006. p. 147-198.

DORNELAS, M. C. et al. Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 137-147, 1999.

DORNELAS, M. C.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; KREIS, M. *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. **The Plant Journal**, v. 21, p. 419-429, 2000.

DUDAREVA, N. et al. Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-LINALOOL SYNTHASE gene expression in the *C. Breweri* Flower. **The Plant Cell Online**, v. 8, p. 1137-1148, 1996.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemistry biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiology**, v. 122, p. 627-633, 2000.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Floral Scent metabolic pathways: their regulation and evolution. In: **Biology of Floral Scent**. ed. CRC Press, 2006. p. 55-78.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

DÖTTERL, S. et al. 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 2993-2998, 2005.

D'AURIA, J. C.; CHEN, F.; PICHERSKY, E. Characterization of an ACYLTRANSFERASE capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. **Plant Physiology**, v. 130, p. 466-476, 2002.

ELTZ, T.; ROUBIK, D. W.; WHITTEN, M. W. Fragrances, male display and mating behaviour of *Euglossa hemichlora*: a flight cage experiment. **Physiological Entomology**, v. 28, p. 251-260, 2003.

FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 100, p. 146, 1998.

FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 275-297, 2002.

FLEMING, T. H.; GEISELMAN, C.; KRESS, W. J. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. **Annals of botany**, v. 104, p. 1017-1043, 2009.

GANG, D. R. et al. Characterization of phenylpropene O -METHYLTRANSFERASES from Sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O -METHYLTRANSFERASE family. **The Plant Cell** v. 14, p. 505-519, 2002.

GANG, D. R. Evolution of flavors and scents. **Annual review of plant biology**, v. 56, p. 301-325, 2005.

GOODRICH K. R. et al. When flowers smell fermented: the chemistry and ontogeny of yeasty floral scent in pawpaw (*Asimina triloba*: annonaceae). **International Journal of Plant Sciences**. V. 167, p.33-46, 2006

GUTERMAN, I. et al. Rose Scent: Genomics Approach to Discovering Novel Floral Fragrance – Related Genes. **The Plant Cell**, v. 14, p. 2325-2338, 2002.

HOFFMANN, M. et al. Polinização de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passiflorales, Passifloraceae), por abelhas (Hymenoptera, Anthophoridae) em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Iheringia Série Zoologia**, v.89, p.149-152, 2000.

JOHNSON, S. D.; NICOLSON, S. W. Evolutionary associations between nectar properties and specificity in bird pollination systems. **Biology Letters**, v. 4, p. 49-52, 2008.

- JOLY, A.; EDWARDS, P. A. Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. **Journal of Biology Chemistry**, v. 268, p. 26983-26989, 1993.
- JOSHI, C. P.; CHIANG, V. L. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 663-674, 1998.
- JÜRGENS, A. Flower scent composition in diurnal *Silene* species (Caryophyllaceae): phylogenetic constraints or adaption to flower visitors? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 841-859, 2004.
- KAISER, R.; TOLLSTEN, L. An introduction to the scent of cacti. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 10, p. 153-164, 1995.
- KILLIP, E. P. **The American species of Passifloraceae**. v. 19, ed. Chicago: Field Museum of Natural History, 1938. 613pp.
- KNUDSEN, J. T. et al. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.146, p. 191-199, 2004.
- KNUDSEN, J. T. Diversity and distribution of floral scent. **The Botanical Review**, v. 72, p.01-120, 2006.
- KNUDSEN, J. T.; MORI, S. A. Floral scents and pollination in neotropical lecythidaceae. **Biotropica**, v. 28, p. 42-60, 1996.
- KUMAR, A.; ELLIS, B. E. The *PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE* gene family in raspberry. Structure, Expression, and Evolution. **Plant Physiology**, v. 127, p. 230-239, 2001.
- LANGE, B. M.; GHASSEMIAN, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana* a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 925-948, 2003.
- LAVID, N. et al. O-Methyltransferases Involved in the Biosynthesis of Volatile Phenolic Derivatives in Rose Petals. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1899-1907, 2002.
- LEVIN, R. A.; RAGUSO, R. A.; MCDADE, L. A. Fragrance chemistry and pollinator affinities in Nyctaginaceae. **Phytochemistry**, v. 58, p. 429-440, 2001.
- LEWIS, J. A. et al. Volatile compounds from the flowers of *Spathiphyllum cannaefolium*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2755-2757, 1988.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LUO, Y.; ZENG, K.; MING, J. Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 120-127, 2012.

MALERBO-SOUZA, D. T.; RIBEIRO, M. F. Polinização do maracujá doce. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, p. 37-46, 2010.

NEGRE, F. et al. Novel S-ADENOSYL-L-METHIONINE:SALICYLIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE, an enzyme responsible for biosynthesis of methyl salicylate and methyl benzoate, is not involved in floral scent production in snapdragon flowers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 406, p. 261-270, 2002.

NICOLSON, S. W. Pollination by passerine birds: why are the nectars so dilute? Comparative biochemistry and physiology. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, p. 645-52, 2002.

OKADA, K. et al. Five *GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE SYNTHASES* expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1045-1056, 2000.

PATTYN, F.; SPELEMAN, F.; DE PAEPE, A.; VANDESOMPELE, J. RTPPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. **Nucleic Acids Research**, v.1, p.122-123, 2003.

PELLMYR, O. et al. Pollination of new caledonian Winteraceae: Opportunistic shifts or parallel radiation with their pollinators? **Plant Systematics and Evolution**, v. 173, p. 143-157, 1990.

PETTERSSON, S.; ERVIK, F.; KNUDSEN, J. T. Floral scent of bat-pollinated species: West Africa vs. the New World. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 82, p. 161-168, 2004.

PICHERSKY, E.; DUDAREVA, N. Scent engineering: toward the goal of controlling how flowers smell. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 105-110, 2007.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808-811, 2006.

POULTER, C. D.; RILLING, H. C. Prenyl transferases and isomerase. In: PORTER, J. W.; SPURGEON, S. L. **Biosynthesis of Isoprenoid Compounds**, John Wiley & Sons, Ltd., 1981. p. 161.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. **The Natural History of Pollination**. Timber Press, 1996. 479 pp.

RAGUSO, R. A. et al. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination "syndromes" in *Nicotiana*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 265-284, 2003.

RAGUSO, R. A. The "invisible hand" of floral chemistry. **Science**, v. 321, p. 1163-1164, 2008a.

RAGUSO, R. A. Wake Up and Smell the Roses: The ecology and evolution of floral scent. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p. 549-569, 2008b.

- RAGUSO, R. A.; PICHERSKY, E. Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): Recent evolution of floral scent and moth pollination. **Plant Systematics and Evolution**, v. 140, p. 55-67, 1995.
- RAMÍREZ, S. R. et al. Asynchronous diversification in a mutualism, specialized plant-pollinator. **Science**, v.333, p. 1742-1746, 2011.
- RASMUSSEN, S.; DIXON, R. A. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. **The Plant Cell Online**, v. 11, p. 1537-1552, 1999.
- ROHLOFF, J.; BONES, A. M. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* - putative olfactory compounds in plant communication. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1941-55, 2005.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers Bioinformatics. **Bioinformatics Methods and Protocols**, v.132, p. 365-386, 1999
- SAHLEY, C. T. Bat and hummingbird pollination of an autotetraploid columnar Cactus, *Weberbauerocereus weberbaueri* (cactaceae). **American Journal of Botany**, v. 83, p. 1329-1336, 1996.
- SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Bat Pollination of the Passion Flower , *Passiflora mucronata* , in Southeastern Brazil. **Biotropica**, v. 10, p. 100-109, 1978.
- SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Mamangavas e irapuás (Hymenoptera, Apoidea): visitas, interações e consequências para a polinização do maracujá (Passifloraceae). **Revista Brasileira Entomologia**, v. 33, p. 108-118, 1989.
- SCALLIET, G. et al. Role of petal-Specific orcinol O-methyltransferases in the evolution of rose scent. **Plant Physiology**, v. 140, p. 18-29, 2006.
- SCHULTZ, K.; KAISER, R.; KNUDSEN, J. T. Cyclanthon and derivatives, new natural products in the flower scent of *Cyclanthus bipartitus* Poit. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 185-190, 1999.
- SHALIT, M. et al. Volatile ester formation in roses. Identification of an ACETYL-COENZYME A GERANIOL/CITRONELLOL ACETYLTRANSFERASE in developing rose petals . **Plant Physiology** , v. 131, p. 1868-1876, 2003.
- SNOW, A. A. Pollination intensity and potencial seed set in *Passiflora vitifolia*. **Oecologia**, v. 55, p. 231-237, 1982.
- SPITZER-RIMON, B. et al. *EOBII*, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia .**The Plant Cell Online**, v. 22, p. 1961-1976, 2010.

- STEENHUISEN, S.-L.; RAGUSO, R. A; JOHNSON, S. D. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. **Phytochemistry**, v.84, p.78-87, 2012.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html, 1998.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TERRY, I. et al. Pollination ecology of the genus *Macrozamia*: cone volatiles and pollinator specificity. **Nong Nooch Tropical Botanical Garden**, v.1, p155-169, 2004.
- THOLL, D.; LEE, S. Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis book**, v. 9, p.143-171 2011.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. *CLUSTAL W*: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TOLLSTEN, L.; KNUDSEN, J. T.; BERGSTRÖM, L. G. Floral scent in generalistic *Angelica* (Apiaceae)—an adaptive character? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, p. 161-169, 1994.
- TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 158, p. 811-832, 2001.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **PASSIFLORA Passionflowers of the World**. Cambridge: Timber Press, 2004. 430 pp.
- VAN MOERKERCKE, A. et al. Regulators of floral fragrance production and their target genes in petunia are not exclusively active in the epidermal cells of petals. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3157-71, 2012.
- VARASSIN, I. G. **Néctar e Voláteis na polinização de quatro espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. 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**, v. 136, p. 139-152, 2001.
- VERDONK, J. C. et al. Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. **Phytochemistry**, v. 62, p. 997-1008, 2003.
- VERDONK, J. C. et al. ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in *Petunia* flowers. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1612-1624, 2005.

VON HELVERSEN, O.; WINKLER, L.; BESTMANN, H. J. Sulphur-containing “perfumes” attract flower-visiting bats. **Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 186, p. 143-153, 2000.

WANG, J. et al. Floral scent production in *Clarkia breweri* (onagraceae) (ii. localization and developmental modulation of the enzyme S-ADENOSYL-L-METHIONINE:(ISO)EUGENOL O-METHYLTRANSFERASE and phenylpropanoid emission). **Plant Physiology**, v. 114, p. 213-221, 1997.

WINTER, D. et al. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. **PloS one**, v. 2, p.718, 2007.

WINTER, Y.; LOPEZ, J.; VON HELVERSEN, O. Ultraviolet vision in a bat. **Nature**, v. 425, p. 612-614, 2003.

WOLFF, D.; BRAUN, M.; LIEDE, S. Nocturnal versus diurnal pollination success in *Isertia laevis* (rubiaceae): a sphingophilous plant visited by hummingbirds. **Plant Biology**, v. 5, p. 71-78, 2003.

WU, S. et al. Two O-methyltransferases isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. spontanea involved in scent biosynthesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 119-28, 2003.

YING, Z.; JANNEY, N.; HOUTZ, R. L. Organization and characterization of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit methyltransferase gene in tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 663-671, 1996.

YOMOGIDA, K. Scent of modern roses. **Koryo**, v. 175, p. 65-89, 1992.

ZUBIETA, C. et al. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. **The Plant Cell Online**, v. 14, p. 1265-1277, 2002.

Material Suplementar

Tabela S1: Primers (inicializadores) para o teste da escolha do melhor normalizador para a RT-PCR quantitativa, utilizando-se o algoritmo contido no software *Gnorm* (PATTYN et al., 2003).

Gene ¹	Primer Forward	Primer Reverse
GADPH	AACGACACTGGTGGTGTCAA	ACCCCGGTTTCCTTCTATGAC
25S	ATCCAATGGCACCAAAGAAG	ACGGATGGAGTGATGAGCTT
ACTINA 3	AGAGCATCCAGTCCTCCTCA	TATGGGAAGTGTGTGGCTCA
SAND	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
PTP	AAGACAGTGAAGGTGCAACCTTACT	AGTTTTTGAGTTGTATTTGTCAGAGAAAG
F-BOX	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA
UBIQUITINA	ATCGATCGAATCAAGGAACG	CACCCTCAATGTTGTAGTCACG
RAD6	TGGAAGCATTGTTGGACA	TCCGAGCAGCTTCTGAGTTT
E2	TCCATTTAAGCCACCAAAG	CGTCAAGAGGGAACATATGGA
FOSFATASE2A	GTGGCAACCCTGTCATTCTT	TAGGAAGCCTCTGACCGATG
ACTINA2	TTGCAGACCGTATGAGCAAG	AAGCACTTCCTATGGACAATAGATG
αTUBULINA	ATGGCATGCTGCTTGATGTA	CACCTTGGAAGATCACCTC
FA1B	GCAGTTCGGAGCATTGAGAT	GTCGTCCACAATGGTCATCA
FA1A	CTGGTGGTTTTGAAGCTGGT	GTCGGGGTTATATCCCACCT
CICLOFILINA	GGGATTTTGTTCGATGGCTAA	ACGACTCTCCCGAACACAAC

¹ Homólogos de genes constitutivos de *A. thaliana* encontrados no banco de ESTs Passioma, encontrados pela ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

Tabela S2: Constituintes¹ voláteis identificados no “headspace” de partes vegetativas de *P. edulis*; *P. coccinea* e *P. mucronata* após análise por SPME-CG/MS. A intensidade da detecção destes constituintes foi considerada abaixo do limiar estabelecido para a afirmação da presença do volátil.

TR(min) ²	Área (%)	Constituinte
<i>P. edulis</i> (ramo vegetativo)		
23,46	11,72	Pentadecano
25,73	33,94	NI ³
26,44	54,34	NI
<i>P. coccinea</i> (ramo vegetativo)		
23,44	10,00	Pentadecano
<i>P. mucronata</i> (ramo vegetativo)		
27,09	23,44	SS ⁴
27,29	16,42	Hexadecano
29,07	14,78	Heptil formiato

1. Os componentes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção e pela análise do perfil de fragmentação do espectro de massas dos picos com os dados da livreria NIST 2005 e dados encontrados na literatura (Adams, 2007) e listados de acordo com a ordem de eluição em coluna DB5.

2. TR = Tempo de retenção em min.

3. NI = Não identificado

4. Substâncias que contém enxofre na composição mas cujo grau de semelhança de fragmentação

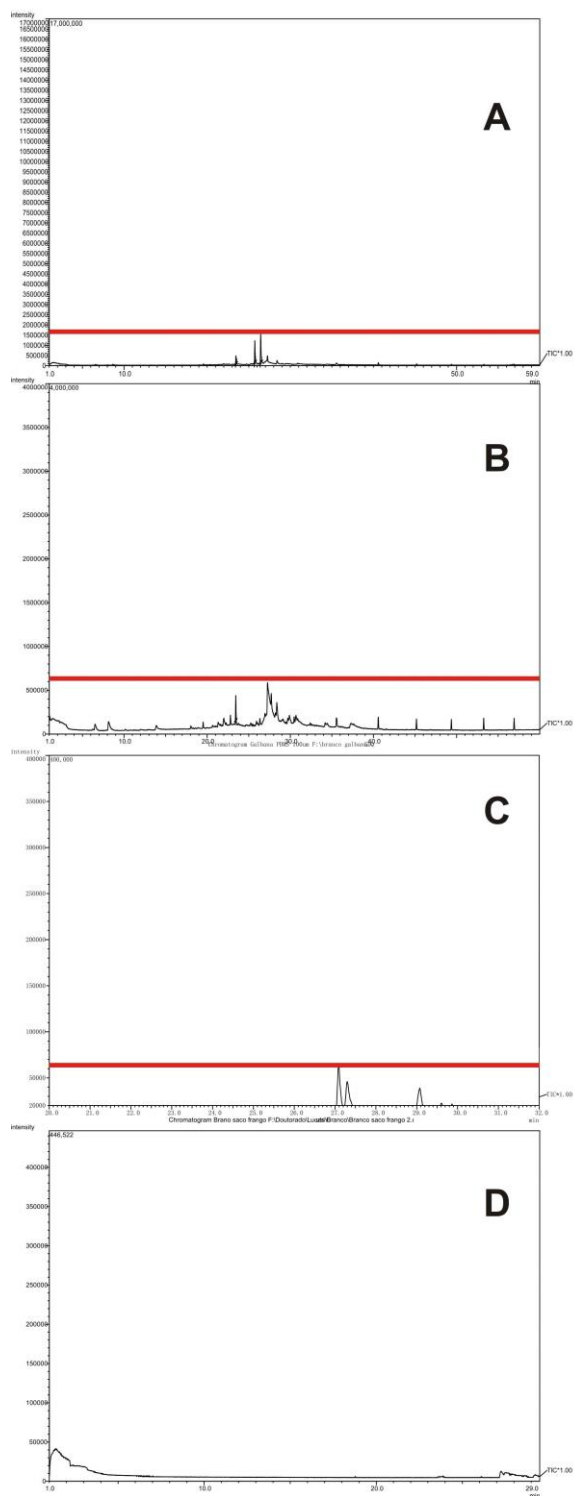


Figura S1: Cromatogramas gerados com o “headspace” amostrado de partes vegetativas de *P. edulis* (A), *P. coccinea* (B) e *P. mucronata* (C). A linha vermelha indica o limiar considerado detectável para cada uma das amostras. O cromatograma do “headspace” do saco vazio é mostrado em D.