

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LILIAN CRISTINA BALDON AIZZA

DESENVOLVIMENTO DA CORONA EM FLORES DO GÊNERO *Passiflora* (PASSIFLORACEAE)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lilian Cristina Baldon Aizza
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em Biologia
Vegetal**

ORIENTADOR: MARCELO CARNIER DORNELAS

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Ai99d

Aizza, Lílian Cristina Baldon
Desenvolvimento da corona em flores do gênero
Passiflora (Passifloraceae) / Lílian Cristina Baldon Aizza. –
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

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

1. Flores - Desenvolvimento. 2. *Passiflora*. 3. Gene
MADS-box. 4. Corona (Botânica). I. Dornelas, Marcelo
Carnier. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Corona development in flowers of the genus *Passiflora* (Passifloraceae).

Palavras-chave em inglês: Flower development; *Passiflora*; MADS-box genes; Corona (Botany).

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marcelo Carnier Dornelas, Sandra Maria Carmello-Guerreiro, Adriana Pinheiro Martinelli.

Data da defesa: 04/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 04 de Fevereiro de 2010

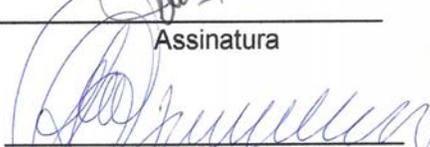
Banca Examinadora

Prof. Marcelo Carnier Dornelas (Orientador)



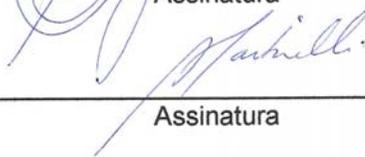
Assinatura

Profª Sandra Maria Carmello Guerreiro



Assinatura

Profª Adriana Pinheiro Martinelli



Assinatura

Profª Marlies Sazima

Assinatura

Profª Tamara Canto Fonseca

Assinatura

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas pela oportunidade e orientação.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), especialmente ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal.

Aos colegas, funcionários e professores do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Aos colaboradores da USP: Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima do NAP/MEPA da ESALQ por permitir o uso do Microscópio Eletrônico de Varredura para realização das análises morfológicas e à Prof^a Dr^a Siu Mui Tsai do CENA pelo sequenciamento dos clones.

À banca examinadora, Prof^a Sandra Maria Carmello-Guerreiro e Prof^a Adriana Pinheiro Martinelli por aceitarem o convite e por terem contribuído para o enriquecimento do trabalho.

Aos colegas do laboratório, pela amizade e pela agradável convivência, em especial Pedro, Lucas, Juliana e Raphael.

Aos meus queridos pais José e Célia pelo apoio, amor e dedicação a mim.

Ao meu esposo Edson pelo incentivo, paciência e principalmente compreensão por alguns momentos de ausência.

ÍNDICE

RESUMO	vi
SUMMARY	vii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Desenvolvimento reprodutivo em <i>Passiflora</i>	1
1.2. Controle genético do desenvolvimento floral	3
1.3. Coevolução entre plantas e animais	6
II. OBJETIVOS.....	10
III. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Material vegetal.....	11
3.2. Metodologia.....	11
3.2.1. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.....	11
3.2.2. Clonagem, sequenciamento e análise de genes MADS-box homólogos em <i>Passiflora</i> envolvidos no desenvolvimento floral.....	12
3.2.3. RT-PCR dos genes MADS-box homólogos em <i>P. edulis</i>	14
3.2.4. Expressão dos genes MADS-box homólogos em <i>Passiflora</i> por hibridização <i>in situ</i>	15
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Análises morfo-anatômicas do desenvolvimento da corona em espécies de <i>Passiflora</i> ..	19
4.1.1. <i>P. edulis</i>	19
4.1.2. <i>P. coccinea</i>	22
4.1.3. <i>P. 'Lady Margaret'</i>	26
4.1.4. <i>P. suberosa</i>	30
4.1.5. <i>P. tulae</i>	33
4.2. Análise filogenética das sequências dos genes MADS-box homólogos em <i>P. edulis</i>	39
4.3. Análises de expressão dos genes MADS-box homólogos em <i>P. edulis</i> via RT-PCR	43
4.4. Análises de expressão dos genes <i>PeAP1</i> , <i>PePI</i> e <i>PeAG</i> durante o desenvolvimento da corona por hibridização <i>in situ</i>	46
V. CONCLUSÕES	55
VI. LITERATURA CITADA.....	56

RESUMO

Algumas estruturas relacionadas à atração de agentes polinizadores foram incorporadas aos órgãos reprodutivos, resultando em inovações florais que aperfeiçoaram a reprodução durante a evolução das angiospermas. *Passiflora* é um exemplo de diversidade e complexidade floral. A característica mais marcante do gênero é a presença de uma corona de filamentos entre o perianto e o androginóforo, cuja principal função parece ser a atração de polinizadores. Neste estudo, a ontogenia da corona foi investigada em quatro espécies e um híbrido interespecífico artificial, representando os dois maiores subgêneros: *P. edulis* var *flavicarpa* Deg, *P. coccinea* Aubl., *P. 'Lady Margaret'* (híbrido *P. edulis* x *P. coccinea*) pertencentes ao subgênero *Passiflora*, *P. tulae* Urban e *P. suberosa* L. do subgênero *Decaloba*. A descrição morfo-anatômica comparativa do desenvolvimento da corona foi obtida com a utilização de microscopia de luz e eletrônica de varredura. Fragmentos correspondentes a homólogos dos genes MADS-box foram clonados de *P. edulis* e usados em análises filogenéticas. Estes fragmentos compartilharam similaridade com as sequências dos fatores de transcrição MADS-box em *Arabidopsis*: *APETALA1*, *PISTILLATA* e *AGAMOUS*. Estas sequências foram nomeados *PeAPETALA1*, *PePISTILLATA* e *PeAGAMOUS*, respectivamente. Os padrões de expressão destes genes foram investigados em diferentes tecidos vegetais por RT-PCR e em botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento por hibridização *in situ*.

SUMMARY

Some structures related to the attraction of pollinators were incorporated into the reproductive organs, resulting in floral innovations that have improved plant reproduction during the evolution of angiosperms. *Passiflora* is an example of floral diversity and complexity. The most striking feature of the genus is the presence of corona filaments between the perianth and androgynophore, whose main function seems to be the attraction of pollinators. In this study, the ontogeny of the corona was investigated in four *Passiflora* species representing the two major subgenera. Belonging to the subgenus *Passiflora* are *P. edulis* var *flavicarpa*, *P. coccinea* Aubl. and the artificial interspecific hybrid *P. 'Lady Margaret'* (*P. edulis* x *P. coccinea*). *P. tulae* Urban and *P. suberosa* L. belong to subgenus *Decaloba*. The comparative morpho-anatomical description of the corona development was obtained with the use of light microscopy and scanning electron microscopy. Fragments corresponding to homologs of the MADS-box genes were cloned from *P. edulis* and used in filogenetic analyzes. These fragments showed similarity with the sequences of the *Arabidopsis* MADS-box transcription factors: *APETALA1*, *PISTILLATA* and *AGAMOUS*. Thus, these *Passiflora* sequences were named *PeAPETALA1*, *PePISTILLATA* and *PeAGAMOUS*, respectively. The expression patterns of these genes were investigated in different plant tissues by RT-PCR and in flower buds with different stages of corona development by *in situ* hybridization.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento reprodutivo em *Passiflora*

Passiflora, o maior gênero da família Passifloraceae, compreendendo cerca de 600 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, exibe uma ampla variabilidade morfológica tanto vegetativa como reprodutiva. As flores desse gênero são actinomorfas, bissexuais e pentâmeras (Killip, 1938) com dois distintos verticilos de perianto. Os estames e o ovário encontram-se localizados sobre um cilindrico central, o androginóforo (Figura 1). O androceu apresenta cinco estames unidos na base, formando uma membrana que adere ao androginóforo junto com a inserção do ovário; o gineceu é composto de três carpelos fundidos e o ovário é unilocular com placentação parietal (Cervi, 1997; Ulmer & MacDougal, 2004).

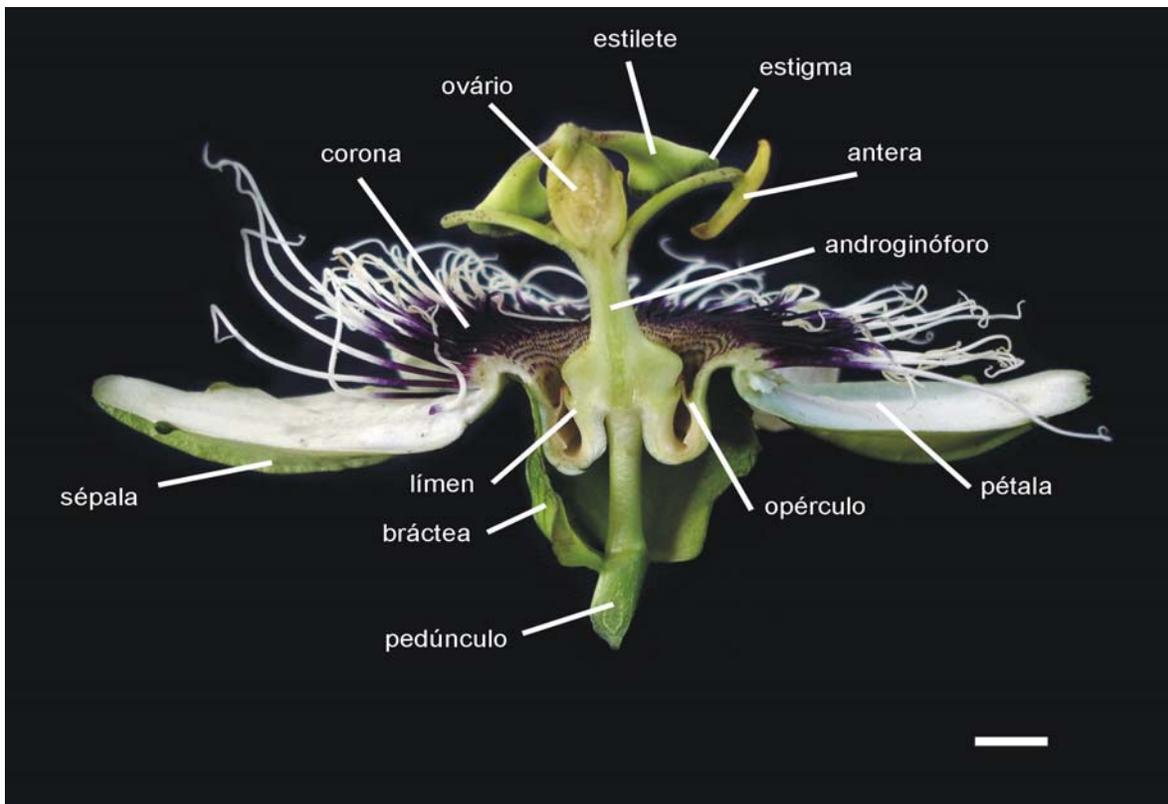


Figura 1: Detalhes da estrutura floral do gênero *Passiflora*. Barra=0,5cm.

As flores de *Passiflora* são exemplos de complexidade e diversidade entre as angiospermas, exibindo características peculiares em sua morfologia floral. A presença de uma corona de filamentos, seguindo a terminologia de Harms (1925) e Killip (1938), entre o androginóforo e o perianto representa uma marcante característica do gênero *Passiflora*; é a estrutura mais altamente desenvolvida e diferenciada de todos os gêneros da família Passifloraceae (Ulmer & MacDougal, 2004). A complexidade desta estrutura pode variar desde uma fina membrana até uma a algumas séries de simples filamentos, habitualmente bandeados horizontalmente com diversas cores (Cervi, 1997). Entre esses dois extremos podem-se encontrar diversos graus de diversificação em tamanho, cor e fusão.

Diferentes hipóteses sobre a origem evolutiva da corona em Passifloraceae têm sido propostas. Puri (1948) do ponto de vista anatômico-comparativo e Wilde (1974) sob uma visão sistemática consideram os filamentos externos como emergências do perianto e as internas como estaminodiais. Segundo Endress (1994) numa interpretação evolutiva, todos os filamentos da corona podem representar estaminódios de um androceu originalmente poliandro com desenvolvimento centrífugo. Porém, o aparecimento dos estaminódios é correspondente à sequência do desenvolvimento do androceu, assim como o surgimento dos estames férteis. Bernhard (1999) estudou o desenvolvimento floral de algumas espécies da família Passifloraceae e não concorda com a origem estaminodal da corona, porque o desenvolvimento da corona é posterior ao dos estames férteis. Uma hipótese alternativa sugerida por Masters (1871) é que a corona seja um órgão *sui generis*, desenvolvido para promover uma adaptação especial na flor associada à polinização.

Na morfologia floral destacam-se outras características: a presença do opérculo, situado no interior do tubo floral e acima da câmara nectarífera, utilizado para a identificação de subgêneros; o anel nectarífero, situado abaixo do opérculo e o limen, que é uma estrutura em forma de anel ou uma membrana em forma de taça que circunda a base do androginóforo (Figura 1; Cervi, 1997; Ulmer & MacDougal, 2004).

1.2. Controle genético do desenvolvimento floral

As flores são, sem dúvida, um dos mais bem sucedidos produtos da evolução das angiospermas. O primeiro passo no desenvolvimento floral é a transição do meristema vegetativo em meristema da inflorescência, que por sua vez converte-se em meristema floral. Na maioria das angiospermas, cada meristema floral finalmente produz quatro tipos de órgãos definidos espacialmente em verticilos específicos com desenvolvimento centrípeto: sépalas, pétalas, estames e carpelos.

O atual conhecimento das bases genéticas do desenvolvimento floral é resultado de estudos baseados em mutações homeóticas em *Arabidopsis thaliana* que geralmente alteram a identidade de dois verticilos adjacentes. A partir dessas observações, o modelo molecular ABC foi proposto por Coen e Meyerowitz (1991) para a especificação da identidade dos órgãos florais (Figura 2). De acordo com este modelo, o desenvolvimento dos quatro tipos de órgãos florais é controlado pela atividade de três classes de genes regulatórios: A, B e C, agindo sozinha ou em combinação. Em *Arabidopsis*, *APETALA1* (*AP1*) e *APETALA2* (*AP2*) representam os genes da classe A, *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*) são os genes da classe B e *AGAMOUS* (*AG*) representa o gene da classe C. Os genes da classe A sozinhos levam à formação das sépalas no primeiro verticilo, enquanto a combinação dos genes das classes A e B especificam a identidade de pétalas no segundo verticilo. Os genes das

classes B e C juntos são responsáveis pelo desenvolvimento de estames no terceiro verticilo, enquanto somente o gene da classe C especifica a identidade do carpelo no quarto verticilo. Os genes da classe B são restritos aos segundo e terceiros verticilos, independentemente das classes A e C, enquanto os genes destas classes são mutuamente exclusivos, por exemplo, a expressão do gene *AP1* é restrita aos verticilos florais externos como resultado da regulação negativa pelo gene *AG* (Theissen *et al.*, 2000).

Devido à complexidade do desenvolvimento floral e da variabilidade morfológica das angiospermas, estudos em diversas plantas determinaram a adição de duas novas classes no modelo original ABC: as classes D e E, renomeando o modelo em ABCDE (Figura 2; Theissen & Saedler, 2001; Theissen, 2001). A classe de genes D foi adicionada como resultado de estudos relacionados ao desenvolvimento dos óvulos em *Petunia* (Angenent & Colombo, 1996). A classe referida como E, surgiu após a descoberta dos genes *SEPALLATA*, também necessários para especificar a identidade de pétalas, estames e carpelos (Pelaz *et al.*, 2000).

Todos os genes envolvidos no modelo ABCDE, exceto *AP2*, pertencem à família gênica MADS-box, que atuam como fatores de transcrição. Os genes MADS são conservados entre as angiospermas e têm importante papel na origem e evolução do desenvolvimento floral (Baum, 1998; Theissen *et al.*, 2000).

Baseado em análises filogenéticas, Alvarez-Buylla *et al.*, (2000) demonstraram a existência de uma duplicação dos genes MADS-box anterior a divergência de plantas, animais e fungos, originando duas linhagens caracterizadas como tipo I e tipo II.

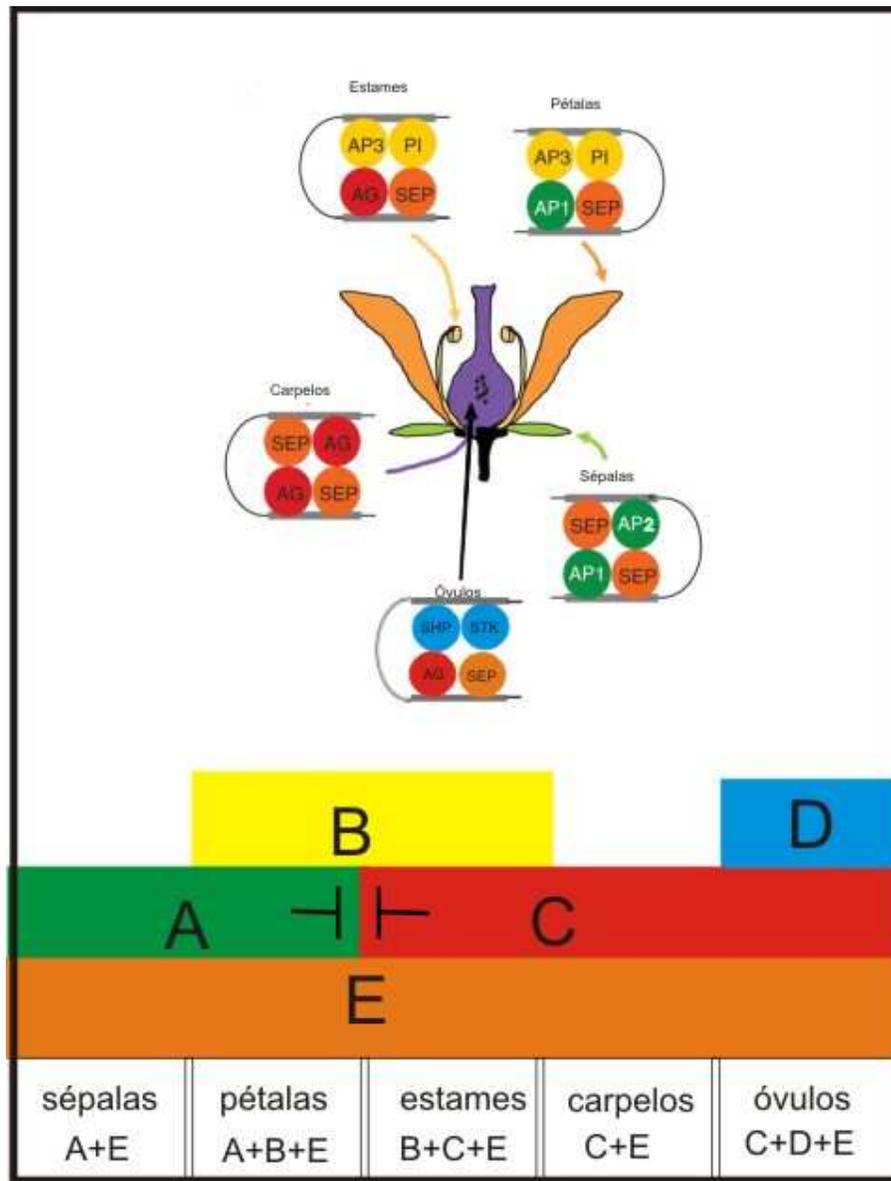


Figura 2: Modelo “ABCDE” de identidade dos órgãos florais (adaptação de Soltis et al., 2007).

As proteínas MADS-box de plantas mais estudadas fazem parte da linhagem II, também denominada de MIKC devido aos quatro domínios identificados na proteína desde a região N-terminal a C-terminal: MADS (M), intermediário (I), queratina-like (K), e carboxi terminal (C) (Parenicova *et al.*, 2003). Entre os domínios, MADS é considerado o mais conservado entre as espécies e codifica um domínio de ligação ao DNA, importante na regulação de diferentes proteínas (Riechmann & Meyerowitz,

1997). A região mais variável é o domínio C-terminal, considerado o mais divergente entre os genes, apresentando inúmeras alterações na sequência protéica (Purugganan *et al.*, 1995).

1.3. Coevolução entre plantas e animais

As angiospermas exibem espetacular diversidade na arquitetura floral e muito desta variabilidade morfológica está associada à evolução dos sistemas de polinização, um exemplo notável de coevolução entre as flores e seus polinizadores (Lindberg & Olesen, 2001). Com a evolução das angiospermas, diversos caracteres reprodutivos relacionados à atração dos polinizadores foram incorporados às estruturas florais, aperfeiçoando a reprodução e possibilitando a diversificação das espécies. As várias relações mutualísticas entre animais e plantas atraíram a atenção de naturalistas, especialmente pelo grande número de ajustamentos entre plantas e polinizadores (Faegri & Pijl, 1971; Crepet, 1983). Os detalhes morfológicos como a variação na cor, tamanho, forma e padrões de fusão das partes florais com o tubo floral são extremamente variáveis, bem como a quantidade e composição do néctar, permitindo diferentes tipos de polinizadores. Esse conjunto de caracteres florais para atrair polinizadores adequados é conhecido como síndrome de polinização (Faegri & Pijl, 1971; Thomson & Wilson, 2008).

De acordo com a definição de Faegri & Pijl (1971), as flores de *Passiflora* apresentam morfologias desde o tipo aberto até o tubular e esta diversidade morfológica é atribuída principalmente à estrutura da corona, atraindo diferentes polinizadores. A maioria das espécies de *Passiflora* é adaptada à síndrome de polinização melitófila (insetos), no entanto há registro de outras síndromes, como

ornitófilas (beija-flores) e quiropterófilas (morcegos; Knuth, 1904; Janzen, 1968; Semir & Brown, 1975; Benson *et al.*, 1975; Sazima & Sazima, 1978, 1989; Ulmer & MacDougal, 2004).

As espécies de *Passiflora* polinizadas por insetos como as mamangavas possuem corona com longos filamentos bandeados de cor púrpura ao violeta que contrasta com as demais partes florais, funcionando como uma plataforma de pouso, um atrativo visual e/ou olfativo, exalando um odor adocicado (Janzen, 1968; Cobert & Wilmer, 1980; Sazima & Sazima, 1989; Ulmer & MacDougal, 1994; Koschnitzke & Sazima, 1997; Varassin *et al.*, 2001), direcionando o polinizador à câmara nectarífera, protegida por um opérculo anelar justaposto ao androginóforo (Koschnitzke & Sazima, 1997). O posicionamento das anteras relativamente próximas à corona (devido à altura do androginóforo) permite que o inseto explore a flor em busca do néctar. Desta forma, grãos de pólen aderem às suas costas e são transportados para as flores próximas (Koschnitzke & Sazima, 1997).

Outro grupo de polinizadores importantes são os beija-flores que são atraídos por cores vistosas do perianto, abundância de néctar, ausência de odor e corolas tubulares nas diferentes espécies de angiospermas (Faegri & Pijl, 1971; Endress, 1994). Em espécies de *Passiflora* adaptadas à polinização ornitófila, as flores apresentam uma corona de filamentos curtos como nas espécies *P. coccinea*, *P. vitifolia* (Janzen, 1968; Snow, 1982) e *P. speciosa* (Longo & Fischer, 2006), uma vez que as aves não precisam de apoio de pouso e nem de superfície geradora de odor (Ulmer & MacDougal, 1994). Nas espécies *P. tulae* e *P. murucuja*, o perianto de coloração rosada ou avermelhada contrasta com a corona tubular alaranjada que circunda o androginóforo (Krosnick & Freudenstein, 2005). A única recompensa floral oferecida a

estes polinizadores é o néctar com alta concentração de açúcares (Varassin et al., 2001). Em todas essas espécies o tubo floral e o androginóforo longo distanciam o nectário das anteras e estigmas, permitindo somente o acesso de aves de bico longo como os beija-flores. Algumas espécies de plantas têm coevoluído com os polinizadores, tendo grande importância na manutenção dos ecossistemas (Lindberg & Olesen, 2001). Um exemplo de coevolução é *P. mixta* e seu polinizador *Ensifera ensifera*: o tubo floral longo de aproximadamente 15cm e a única espécie com o comprimento de bico adequado à morfologia floral desta espécie (Lindberg & Olesen, 2001). Desse modo, certas flores estão especializadas em menor ou maior grau para a polinização por estas aves, assim como espécies diferentes de beija-flores também estão adaptadas a determinados tipos de flores (Snow & Snow, 1980).

O primeiro relato de polinização por morcegos em *Passiflora* foi na espécie *P. mucronata* que apresenta flores com perianto de cor branca, antese noturna, emissão de odor característico às preferências do mamífero e androginóforo curvado (Sazima & Sazima, 1978). A morfologia da corona não constitui obstáculo, apresentando curtos filamentos adaptados ao comprimento e anatomia do focinho e língua dos morcegos.

Portanto, caracteres florais como morfologia, cor, odor e a oferta de recompensas delimitam as síndromes de polinização, pois podem restringir ou orientar a acessibilidade do visitante aos recursos florais. Igualmente, as diferenças no tamanho do corpo e comportamento de visita são fatores determinantes para a eficiência das diferentes espécies de polinizadores (Faegri & Pijl, 1979; Endress, 1994).

Segundo Koschnitzke & Sazima (1997), as espécies de *Passiflora* polinizadas por abelhas provavelmente representam o grupo ancestral, enquanto as espécies

ornitófilas, isto é, polinizadas por beija-flores e morcegos podem ser consideradas condições derivadas de espécies melitófilas.

Na literatura são encontrados alguns estudos envolvendo a biologia floral e polinização das espécies de *Passiflora*, porém há poucas informações sobre a origem e o desenvolvimento da coroa diante da grande diversidade morfológica relacionada às diferentes síndromes de polinização.

II. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi elucidar a ontogenia da corona diante da diversidade morfológica associada aos sistemas de polinização em espécies do gênero *Passiflora*. Tomamos como premissas as diferentes combinações dos genes MADS-box propostas no modelo molecular ABC para determinar a identidade dos órgãos florais em plantas-modelo como *Arabidopsis* e as diferentes hipóteses encontradas na literatura sobre a origem da corona em *Passiflora*, supondo ser pétala modificada ou estame modificado. Para isto, os objetivos específicos estabelecidos foram:

1. Caracterizar morfo-anatomicamente o desenvolvimento da corona e uma análise comparativa em quatro espécies e um híbrido interespecífico artificial, representativos dos diferentes tipos morfológicos de corona e dos diferentes clados filogenéticos do gênero *Passiflora*: *P. edulis* var *flavicarpa* Deg., *P. coccinea* Aubl. e *P. 'Lady Margaret'* (híbrido *P. edulis* x *P. coccinea*) pertencentes ao subgênero *Passiflora*, *P. tulae* Urban e *P. suberosa* L. do subgênero *Decaloba*.

2. Analisar o padrão de expressão de genes homólogos aos fatores de transcrição da família MADS-box, potencialmente envolvidos no desenvolvimento da corona em *P. edulis*, com o emprego de RT-PCR e hibridização *in situ*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram coletados botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento de quatro espécies naturais e de um híbrido interespecífico artificial, representativas dos diferentes tipos morfológicos de coroa e dos diferentes clados filogenéticos do gênero *Passiflora*: *P. edulis* var *flavicarpa* Deg., *P. coccinea* Aubl. e *P. 'Lady Margaret'* (híbrido *P. edulis* x *P. coccinea*) pertencentes ao subgênero *Passiflora*, *P. tulae* Urban e *P. suberosa* L. do subgênero *Decaloba*. Estas plantas foram cultivadas em casa de vegetação e nos campos experimentais do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em Campinas, SP.

3.2. Metodologia

3.2.1. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura

Tanto para microscopia de luz como para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os botões florais foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4% (p/v) em tampão fosfato sob vácuo (aproximadamente 600mmHg) por 20 minutos e mantidos em geladeira (4 a 10°C) “overnight”. Em seguida, o material foi desidratado em série etílica, conservado em álcool absoluto na geladeira.

Para estudo anatômico, as amostras foram incluídas em concentrações crescentes de resina plástica (Historesin, Leica) seguindo as instruções do fabricante. Os botões florais emblocados foram seccionados (5 µm) no micrótomo rotativo 820 Spencer e corados com azul de toluidina a 0,05% (p/v) em tampão de tetraborato de

sódio em pH 4,7 (O'Brien & McCully, 1964). A seguir, procedeu-se a secagem e a montagem permanente das lâminas em resina sintética Entellan. As observações e documentação fotográfica das lâminas permanentes foram realizadas em microscópio ZEISS modelo AxioCam HRc.

O material a ser submetido à MEV já desidratado em série etílica foi seco ao ponto crítico, dissecado sob lupa binocular com auxílio de pinças e agulhas; montado em suporte metálico com fita dupla-face e metalizado com ouro coloidal (Blazers Sputter: camada de 30nm). A observação foi feita em microscópio de varredura LEO 435 VP pertencente ao NAP/MEPA (ESALQ/USP, Piracicaba, SP).

3.2.2. Clonagem, sequenciamento e análise de genes MADS-box homólogos em *Passiflora* envolvidos no desenvolvimento floral

As seqüências de *P. edulis* homólogas às proteínas regulatórias do desenvolvimento floral em *Arabidopsis* e em outras plantas-modelo foram selecionadas e identificadas a partir do banco de dados do Projeto PASSIOMA (Dornelas *et al.*, 2006) com o emprego do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) e/ou com o uso da palavra-chave "MADS" diretamente na página de interface do usuário do banco de dados do Projeto PASSIOMA (Dornelas *et al.*, 2006).

Os clones correspondentes aos homólogos MADS-box *APETALA1* (*AP1*), *PISTILLATA* (*PI*) e *AGAMOUS* (*AG*) em *P. edulis* foram obtidos da biblioteca de cDNAs do projeto PASSIOMA. Os fragmentos obtidos encontram-se clonados em diferentes vetores: *AG* e *PI* no vetor pSPORT1 (Invitrogen) e *AP1* no vetor pGem®T-easy (Promega). Uma vez que as bibliotecas do PASSIOMA são conservadas na forma de DNA plasmidial, houve a necessidade de obtenção de clones bacterianos contendo os plasmídeos em questão, para os experimentos posteriores. Para tal, células

quimiocompetentes de *Escherichia coli* On Shot® Top 10 (Invitrogen) foram transformadas com os plasmídeos resultantes por choque térmico a 42°C por 1 minuto e colocadas imediatamente no gelo. Em seguida, adicionou-se 250 µL de meio SOC líquido (2% Triptona, 0,5% Extrato de Levedura; 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄; 20mM glucose) à suspensão de bactérias e foram mantidas sob agitação a 37°C por 1 hora. Posteriormente, os possíveis transformantes foram espalhados em placas contendo meio LB (Luria-Bertani: triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 5g/L) suplementado com ampicilina (100 mg/L).

Para o isolamento de DNA plasmidial utilizou-se o kit Purelink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para a confirmação da identidade dos clones obtidos, os mesmos foram analisados em um seqüenciador 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) no Laboratório de Gênômica do CENA/USP, em Piracicaba, SP.

Para investigar se as sequências dos três clones de cDNA correspondiam a possíveis genes MADS-box homólogos em *Passiflora*, buscas de similaridade de sequências entre os clones obtidos e as sequências dos bancos de dados públicos foram realizadas com o emprego do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Para a análise filogenética, as sequências de aminoácidos correspondentes à subfamília MIKC de *Arabidopsis* foram obtidas do banco de dados públicos (NCBI: www.ncbi.gov) e alinhadas com as sequências de *Passiflora* com a utilização do software ClustalX (Thompson *et al.*, 1994). O alinhamento final foi corrigido manualmente e utilizado para a construção da árvore filogenética pelo método *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987). Matrizes de similaridade por parsimônia e cálculos de Bootstrap com 1000 repetições

foram obtidos com o uso do software *The Molecular Genetics Analysis* (MEGA) versão 4.0 (Kumar et al., 2000).

3.2.3. RT-PCR dos genes MADS-box homólogos em *P. edulis*

Para a realização da RT-PCR, RNAs totais dos diferentes tecidos de *P. edulis* foram isolados pelo método do Trizol® (Invitrogen), com posterior tratamento com DNase® (AMBION) e a síntese do cDNA utilizando-se o kit “Super Script First Strand Synthase” (Invitrogen). As fitas de cDNA foram utilizadas como molde nas reações de PCR. Como controle da qualidade dos cDNAs sintetizados foram utilizados os primers 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' e 5'-ATCGGGAGGGGCGATACCGTA-3' que amplificaram um fragmento de aproximadamente 750pb do gene constitutivo *ACTINA* em espécies de *Passiflora* sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 33 ciclos a 94°C de 1 min, a 55°C por 1 min, a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Para as análises de RT-PCR dos homólogos MADS-box em *Passiflora* foram utilizados os cDNAs obtidos anteriormente e iniciadores específicos (primers) para cada gene selecionado segundo descrito no item anterior. O programa utilizado para a construção dos primers foi o Primer 3 Input Program (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) (Rozen & Skaletsky, 1998). Os primers 5'GGCTGAAGGCAAAAGTTGAG3' e 3'GCGTTAGGTCAAGCTCGTTC5' geraram um fragmento do gene homólogo *APETALA1* com 399pb; com os primers 5'TACGCTGGTCGATCTGTTG3' e 3'AGATTTGGCTGAATGGGTTG5' foi obtido um fragmento do gene homólogo *PISTILLATA* com 435pb e um fragmento do homólogo *AGAMOUS* com 398pb resultou com os primers 5'ACCATATGGCCCTTCAGTTG3' e 3'CAGGGTTGCATTCCCTGTAT5.

Antes de proceder às reações de RT-PCR, os primers foram testados utilizando-se como molde a sequência de cDNA clonada nos respectivos vetores plasmidiais, com as reações de PCR realizadas no termociclador Mastercycler Personal Eppendorf®.

Em geral, as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos a 94°C de 1 min, a temperatura de anelamento foi específica para o gene, sendo 1 min a 55°C, 53°C e 55°C para os homólogos de *AP1*, *PI* e *AG*, respectivamente; seguindo a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1%, com tampão TAE utilizando-se brometo de etídeo na concentração de 1 µg/ 50mL de gel. As bandas foram visualizadas em trans-iluminador de UV e fotodocumentada pelo Gel Doc 2000 *BioRad*®, com o software Quantity One.

3.2.4. Expressão dos genes MADS-box homólogos em *Passiflora* por hibridização *in situ*

As hibridizações *in situ* foram realizadas utilizando-se sondas não-radioativas, segundo as técnicas descritas na literatura (Dornelas *et al.*, 1999; 2000). Como molde para as sondas de mRNA foram utilizados fragmentos de cDNAs de *PeAP1*, *PePI* e *PeAG* conforme descrito no item 3.2.2. Os fragmentos clonados foram mantidos em bactérias *Escherichia coli* estocadas em glicerol 50% a -80°C. Para a confecção das sondas, as culturas de bactérias contendo os respectivos insertos de cDNA clonados no vetor foram reativadas em meio LB líquido suplementado com ampicilina (100 mg/L). Os plasmídeos pSPORT1 e pGem-T contendo os clones de cDNAs foram linearizados com as enzimas EcoR1 (*PeAG* e *PePI*) e Pst1 (*AP1*), respectivamente, ambas com atividade a 37°C por 2 horas.

Em seguida, houve a precipitação (10% de acetato de sódio 3M e duas vezes e meia o volume de etanol absoluto) por 20 min a 12.000 rpm. Os plasmídeos linearizados foram ressuspensos em 13 µl de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e submetidos à síntese de RNA *in vitro*. As sondas antisense foram sintetizadas por transcrição *in vitro* pela enzima SP6 em reação contendo uracila marcada com digoxigenina (DIG-UTP), utilizando o kit *DIG RNA Labeling* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante.

Os botões florais fixados e desidratados conforme descrito no item 3.2.1 foram embebidos em série crescente de álcool: xilol (3:1, 1:1, 1:3 e xilol puro), substituído por parafina derretida e posteriormente emblocados em parafina, seccionados em série (8 µm) e montados em lâminas de vidro pré-tratadas com solução 2% de 3-Aminopropiltriétoxissilana (Pierce) em acetona. Os cortes de material emblocado foram desparafinados com dois banhos de xilol puro por 15 minutos cada, seguidos por banhos com séries de xilol: etanol nas proporções 3:1; 1:1 e 1:3, também por 15 minutos cada banho, finalizando com duas imersões em etanol absoluto de 10 minutos cada e as lâminas secas ao ar. As amostras foram submetidas ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (1 µg/mL em Tris-HCl 0,05M pH7,5) por 12 minutos a 37°C e lavadas a seguir com água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). Foram adicionados 300 µL de solução de hibridização em cada lâmina (10mM Tris-HCl pH7,5; 300mM NaCl; 50% formamida deionizada; 1mM EDTA; 1 x Denharts; 10% Dextran Sulfato 50% e 600 ng de sonda marcada), cobertas com filme plástico e incubadas em câmara úmida a 42°C “overnight”. Após a hibridização, o excesso de sonda não-hibridizada foi retirado com duas lavagens em solução salina SSC quatro vezes concentrada (0,15M NaCl e 0,015 citrato de sódio) por trinta minutos cada e duas

lavagens em solução salina SSC duas vezes concentrada, também por trinta minutos cada. Todas as lavagens foram realizadas à temperatura de 42°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em água Milli-Q autoclavada. Para o processo de imuno-deteção, as lâminas foram inicialmente mantidas em cubetas em tampão de deteção I (DB1: 1M Tris-HCl e 5M NaCl pH7,5) por 5 minutos. Em seguida, foram submetidas por 30 minutos ao tratamento em tampão de bloqueio DB2 (1% Blocking reagent Roche dissolvido em DB1). As lâminas foram incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Fab-Fragments, Roche) diluído 1:1000 em tampão DB2 a 37°C por uma hora em câmara úmida. Após esse período, foram realizadas duas lavagens seguidas em DB1 de 15 minutos cada e um banho em DB3 (0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,05m MgCl₂. 6H₂O; pH9,5) por 5 minutos. Para finalizar, aplicou-se 300 µL da solução comercial de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) / BCIP(5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphatase p-Toluidine) contendo o supressor (Levamisole 1mM) como substrato (Pierce). A reação de deteção aconteceu em temperatura ambiente em câmara úmida e no escuro "overnight". O material hibridizado foi observado e fotodocumentado em microscópio ZEISS modelo AXIOCAM HRc para posterior análise.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies selecionadas para este estudo estão ilustradas na Figura 3, que mostra a variabilidade morfológica encontrada na coroa: desde uma única membrana tubular e de cor contrastante em relação às pétalas, como encontrada em *P. tulae* (I-J), duas séries de filamentos, sendo os externos mais unidos na base e com extremidades filamentosas em *P. coccinea* (C-D), duas séries de coroa morfologicamente distintas em *P. suberosa* (G-H), até vários filamentos filiformes dispostos radialmente em séries concêntricas como em *P. edulis* (A-B) e em *P. 'Lady Margaret'* (E-F).



Figura 3: Flores das espécies de *Passiflora*. Aspecto geral da flor e corte longitudinal mostrando a morfologia da coroa, respectivamente. (A, B) *P. edulis*, (C, D) *P. coccinea*, (E, F) *P. 'Lady Margaret'* pertencentes ao subgênero *Passiflora*, (G, H) *P. suberosa* e (I, J) *P. tulae* do subgênero *Decaloba*. Barra= 0,5cm.

4.1. Análises morfo-anatômicas do desenvolvimento da corona em espécies de *Passiflora*

4.1.1. *P. edulis*

As figuras 4A e 5A mostram um botão floral de *P. edulis* com a localização da corona e dos órgãos florais. O desenvolvimento da corona iniciou-se como uma emergência do tubo floral (Figuras 4B e 5B). Na porção superior da emergência, pequenas protuberâncias adjacentes à base das sépalas e pétalas deram origem aos filamentos da série mais externa (Figuras 4B e 5C) e na porção inferior desenvolveu-se uma protuberância anular, o opérculo (Figuras 4C e 5C). A segunda série de filamentos da corona formou-se imediatamente abaixo da série mais terminal (Figura 4C). Nas figuras 4D e 5D é possível visualizar a formação da terceira série de filamentos. As diversas séries de filamentos emergiram entre a primeira série de filamentos da corona e o opérculo, observando os primórdios dos filamentos dispostos intercalados entre as distintas séries e progressivamente menores para o interior do tubo floral (Figuras 4E, 5E).

A figura 4E ilustra o botão floral num estágio avançado de desenvolvimento com a corona multisseriada, sendo as séries externas com filamentos filiformes e mais alongados do que as séries internas, que são reduzidas a pequenos processos dentiformes. Para a análise do desenvolvimento da corona em Microscopia Eletrônica de Varredura, foi preciso remover o androginóforo, possibilitando observar o atraso no desenvolvimento das séries intermediárias de filamentos devido à compressão pela antera.

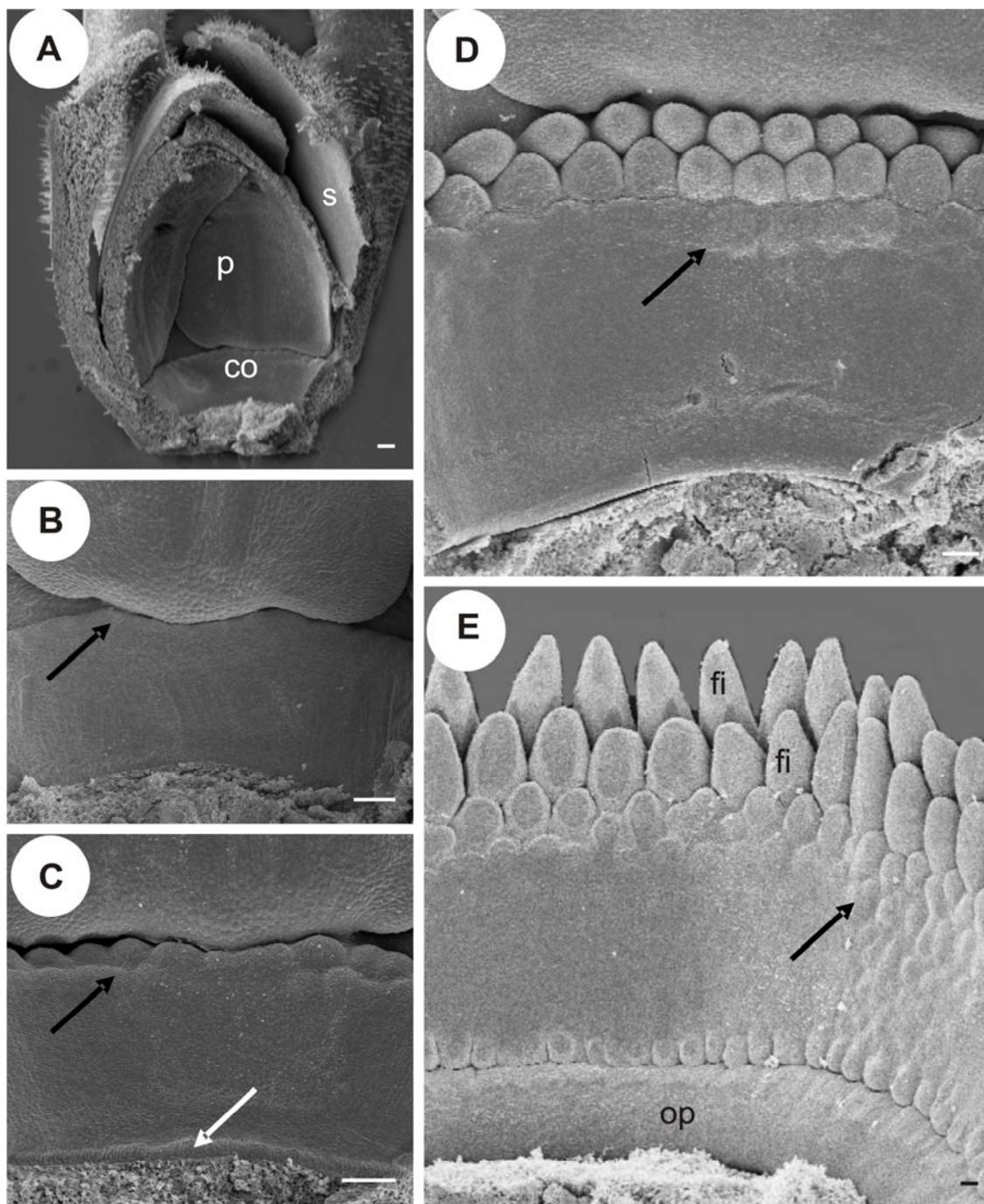


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura de botões florais seccionados longitudinalmente, gineceu e estames removidos, mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da coroa em *P. edulis*. (A) Visão geral do botão floral. (B) Emergência do tubo floral e início do desenvolvimento dos primeiros filamentos na porção superior (seta). (C) Início do desenvolvimento do opérculo na porção inferior da emergência do tubo floral (seta branca) e a segunda série de filamentos logo abaixo da série terminal (seta preta). (D) Terceira série de filamentos (seta). Notar os filamentos intercalados entre uma série e outra. (E) Estágio tardio de desenvolvimento com duas séries externas de filamentos filiformes e várias séries com filamentos reduzidos (dentiformes: seta) e opérculo anelar. **s:** sépala, **p:** pétala, **co:** coroa, **op:** opérculo, **fi:** filamentos filiformes. Barras= 50 μ m.

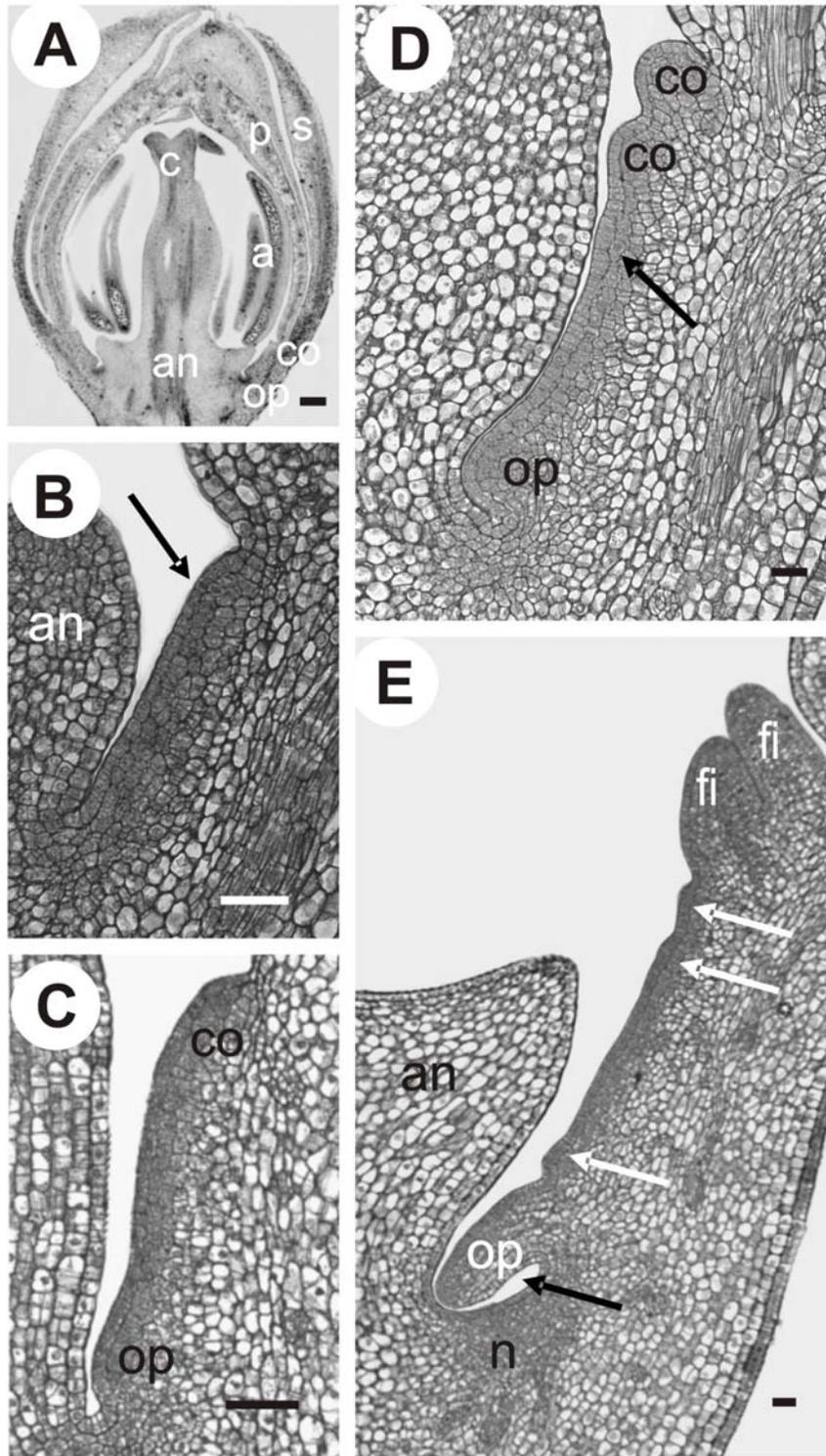


Figura 5: Microscopia de luz de botões florais seccionados longitudinalmente mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da corona em *P. edulis*. (A) Visão geral do botão floral com localização da corona. (B) Emergência da corona no tubo floral (seta). (C) Início da formação dos filamentos da corona na porção superior e do opérculo na porção inferior. (D) Formação da terceira série de filamentos (seta). (E) Estágio tardio de desenvolvimento com duas séries de filamentos filiformes mais externos, a formação de novas séries intermediárias (dentiformes; setas brancas) e o opérculo protegendo a câmara nectarífera (seta preta). **s:** sépala, **p:** pétala, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **co:** corona, **op:** opérculo, **n:** nectário, **fi:** filamentos filiformes. Barras= 50 µm.

O opérculo em *P. edulis* é em forma de anel, curto e justaposto à base do androginóforo (não podendo ser visualizado devido a sua remoção, Figura 4E), protegendo a câmara nectarífera. Aparentemente é capaz de impedir o acesso de beija-flores e morcegos ao néctar (Sazima & Sazima, 1978), no entanto adequado ao aparelho bucal flexível das abelhas (Koschnitzke & Sazima, 1997).

As flores de *P. edulis* necessitam de polinizadores para a formação de frutos. Os principais polinizadores são as abelhas do gênero *Xylocopa* (Varassin *et al.*, 2001), devido ao tamanho do corpo e o comportamento durante a coleta de néctar, contactando os órgãos reprodutivos florais (Sazima & Sazima, 1989), além da morfologia floral que favorece a atração: flores de 8 a 10 cm com odor adocicado, os filamentos externos da coroa funcionando como uma plataforma de pouso, de modo que o inseto explore toda a flor e com auxílio das mandíbulas consegue afastar o opérculo aderido ao androginóforo e com a glossa alcançar o néctar. Adicionalmente, os filamentos externos da coroa desta espécie exibem uma cor que contrasta com as demais partes florais, funcionando como um atrativo visual para os polinizadores conhecido como *guia de néctar*, direcionando-os à câmara nectarífera (Masters, 1871; Lindman, 1906, Endress, 1994).

4.1.2. *P. coccinea*

As figuras 6A e 7A indicam o posicionamento da coroa e dos órgãos florais no botão floral em *P. coccinea*. Por meio de comparações morfo-anatômicas pode-se observar que o desenvolvimento da coroa iniciou-se como uma emergência do tubo floral (Figuras 6B e 7B). Na porção superior da emergência, deu início à formação dos filamentos externos, enquanto na porção inferior o opérculo como um crescimento

anular (Figuras 6C e 7C). Em seguida, o opérculo expandiu-se em direção ao androginóforo e simultaneamente iniciaram-se os primórdios da segunda série de filamentos da corona, logo acima do opérculo (Figuras 6D, 7D-E). Mais tardiamente, o opérculo tornou-se inicialmente depresso, mas após elevou-se em direção ao androginóforo. Nas Figuras 6E-F e 7F-G observa-se as duas séries de filamentos filiformes da corona, onde os filamentos da série externa são mais alongados e unidos na base, enquanto os filamentos da série interna são menores e o opérculo recurvado, unido na base e denticulado na extremidade.

As flores de *P. coccinea* são adequadas à polinização por beija-flores. Apresenta sépalas e pétalas avermelhadas e fletidas para baixo durante a antese, androginóforo longo e uma corona reduzida em número de séries de filamentos, aparentando uma corona tubular devido à série externa de filamentos filiformes que possuem a base unida, conseqüentemente ausência de plataforma de pouso, de modo que a ave paire durante a visita às flores. A morfologia floral descrita anteriormente foi igualmente observada na espécie *P. vitifolia* por Janzen (1968). Adicionalmente, as flores de espécies ornitófilas exibem um opérculo com filamentos curtos na margem superior (Benson et al., 1975), o que foi confirmado durante as análises morfo-anatômicas realizadas na espécie.

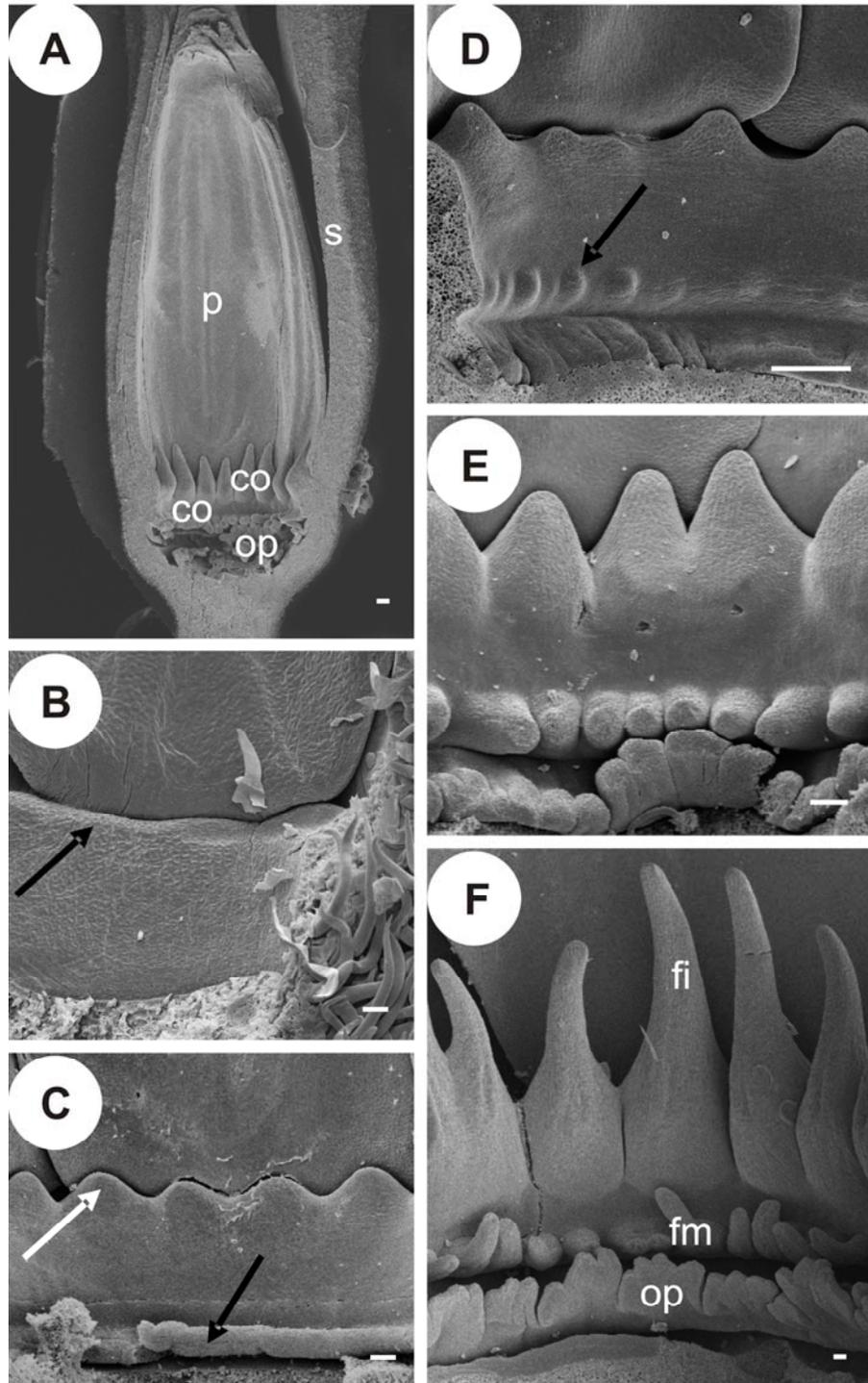


Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura de botões florais seccionados longitudinalmente, gineceu e estames removidos, mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da coroa em *P. coccinea*. (A) Visão geral do botão floral. (B) Início da coroa como pequena emergência do tubo floral (seta). (C) Primeiros filamentos na porção superior (seta branca) e opérculo como um crescimento anular na porção inferior (seta preta). (D) Segunda série de filamentos próxima ao opérculo (seta). (E, F) Filamentos externos com a base unida e as extremidades filiformes, a série de filamentos filiformes menores e o opérculo recurvado e denticulado na extremidade. **s:** sépala, **p:** pétala, **co:** coroa, **op:** opérculo, **fi:** filamentos filiformes, **fm:** filamentos menores. Barras= 50 μm.

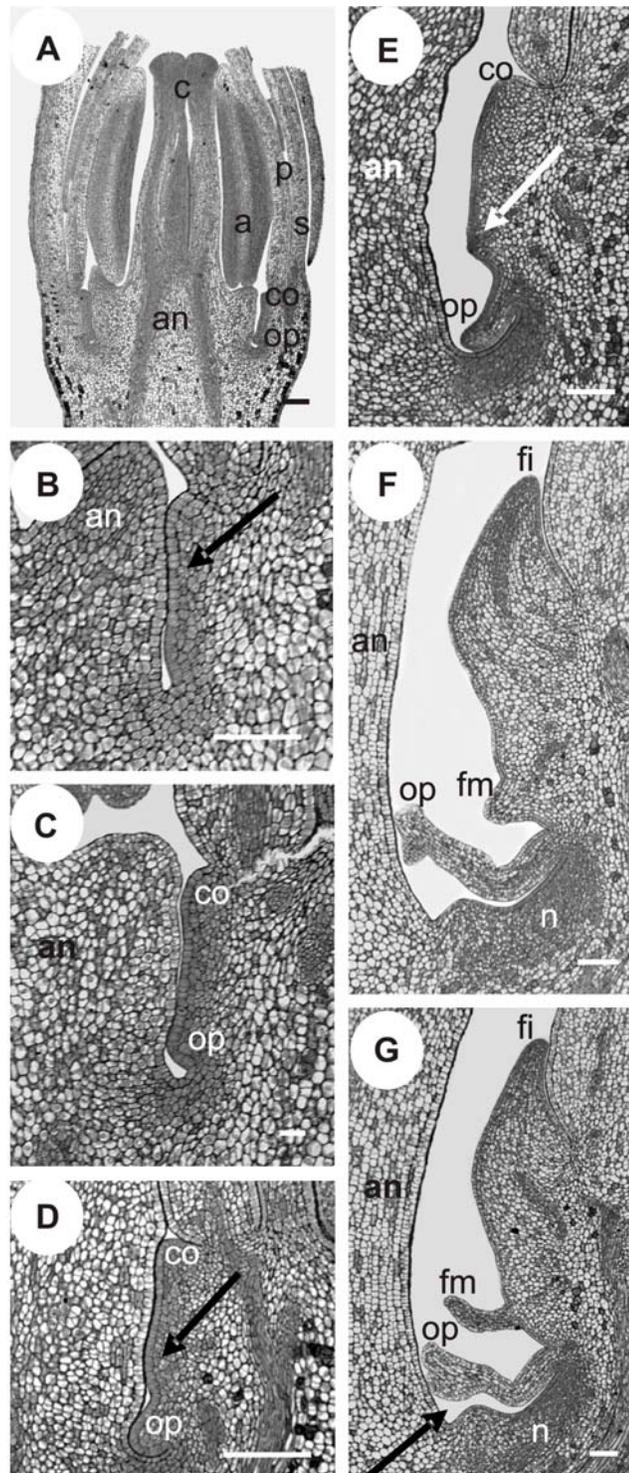


Figura 7: Microscopia de luz de botões florais seccionados longitudinalmente mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da corona em *P. coccinea*. (A) Visão geral do botão floral com localização da corona. (B) Emergência da corona no tubo floral (seta). (C) Formação da primeira série de filamentos na porção superior desta emergência e do opérculo na porção inferior. (D, E) Segunda série da corona mais próxima ao opérculo (seta). (F, G) Duas séries de corona com filamentos filiformes, os filamentos da série externa com uma base unida e a série interna com filamentos filiformes menores e o opérculo recurvado protegendo a câmara nectarífera (seta). **s:** sépalas, **p:** pétalas, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **co:** corona, **op:** opérculo, **n:** nectário. Barras= 50 µm.

4.1.3. *P. 'Lady Margaret'*

Este material foi adicionado ao estudo por se tratar de um híbrido interespecífico artificial entre *P. edulis* e *P. coccinea*, espécies com coronas morfológicamente distintas e polinizadas por diferentes animais. Na Figura 8A é possível observar as várias séries de corona e o opérculo no estágio tardio de desenvolvimento do botão floral. Enquanto na Figura 9A, a localização da corona em relação aos demais órgãos no botão floral. O desenvolvimento da corona em *P. 'Lady Margaret'* teve seu início a partir de uma emergência do tubo floral (Figura 9B). Os primeiros filamentos da corona apareceram na porção superior da emergência (figura 8B) e o opérculo na porção inferior como um anel (Figuras 8C e 9C). Observou-se o opérculo em estágio avançado de desenvolvimento em relação à série externa de filamentos (Figuras 9C-D). A segunda série de filamentos desenvolveu-se mais próxima ao opérculo (Figuras 8C, 9E). Entre a primeira e a segunda série de filamentos da corona, a terceira série iniciou-se na porção inferior acima da segunda série, em seguida a quarta série abaixo da série externa (Figuras 8D e 9F) e entre estas, as duas últimas séries, onde a quinta série desenvolveu-se acima da terceira série (Figura 8E) e a última série de filamentos abaixo da quarta série (Figura 8F). Na figura 9G não foi possível observar a última série de filamentos, no entanto, a Figura 8F ilustra as seis séries de filamentos filiformes e um distinto opérculo, que no início parece plicado, porém em estágio tardio de desenvolvimento tornou-se unido na base com pequenos filamentos filiformes na extremidade (Figura 8G).

As flores deste híbrido apresentam uma corona com seis séries de filamentos filiformes, enquanto seus parentais exibem uma corona multisseriada (*P. edulis*) e uma corona bisseriada (*P. coccinea*). Por meio de comparações morfo-anatômicas entre o

híbrido e as espécies parentais, observou-se que o desenvolvimento das séries da corona em *P.* 'Lady Margaret' ocorreu da extremidade superior e inferior para o centro da emergência no tubo floral de maneira individualizada, como em *P. edulis*.

A relação entre a morfologia floral e o polinizador pode ser exemplificada e elucidada por meio da observação de abelhas e beija-flores visitando flores de *P.* 'Lady Margaret' (Dornelas *et al.*, dados não publicados). Uma vez que as flores desta espécie permitem a atração dos dois tipos de visitantes: flor grande e a corona com várias séries de filamentos filiformes servindo de apoio para pouso representam adaptações às abelhas, como no caso de *P. edulis*, enquanto a cor escarlate e o opérculo unido na base com pequenos filamentos filiformes na extremidade são características relacionadas à atração de beija-flores, possivelmente herdadas de *P. coccinea*. Em algumas espécies de angiospermas, transições entre as síndromes de polinização aconteceram ao longo da evolução, direcionando muitos caracteres florais adaptados à polinização por abelhas para a polinização por beija-flores ou outros agentes. Por exemplo, em *Ipomoea* aparentemente há espécies adaptadas as duas síndromes de polinização: melitofilia e ornitofilia (Thomson & Wilson, 2008).

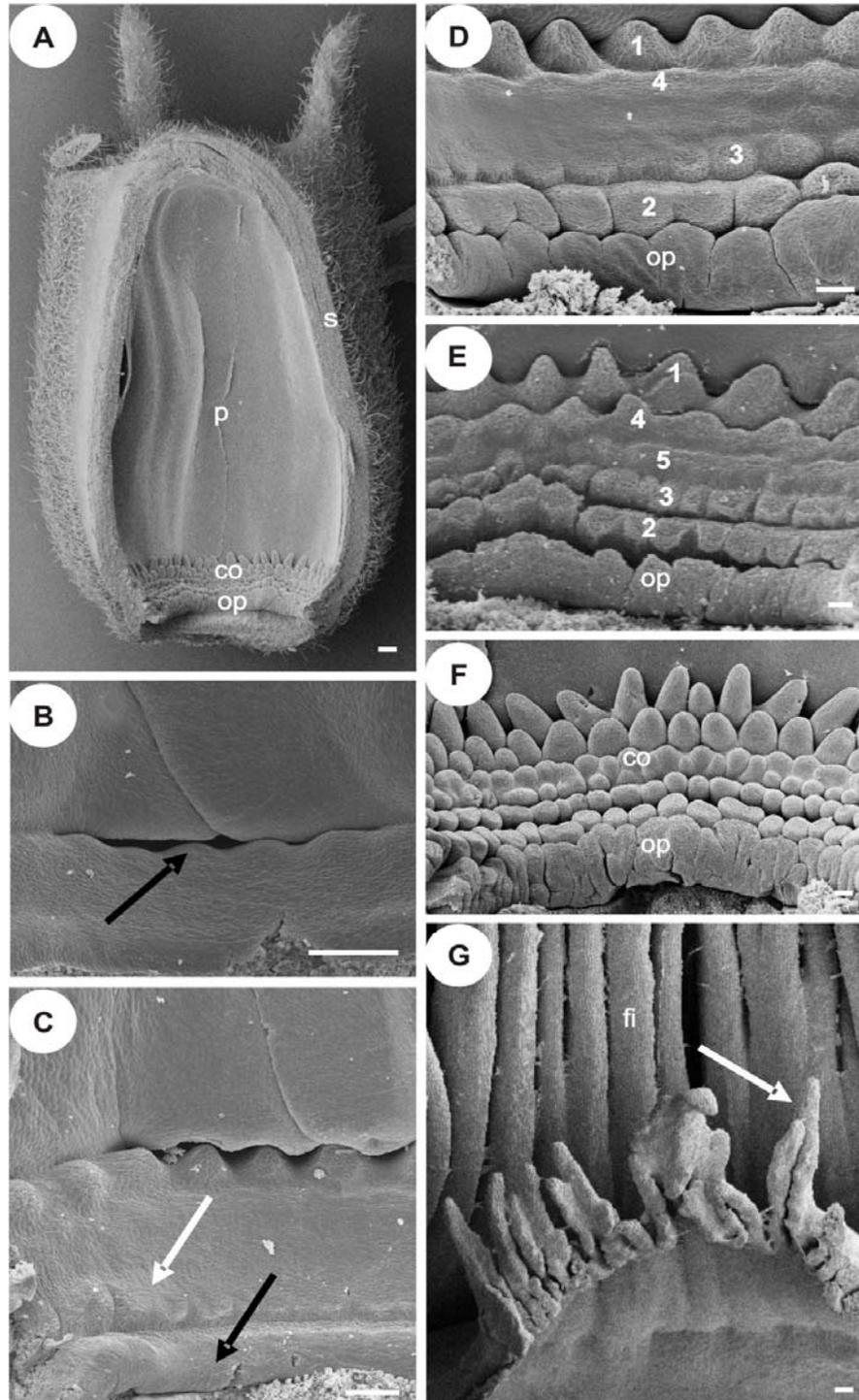


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de botões florais seccionados longitudinalmente, gineceu e estames removidos, mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da coroa em *P.* 'Lady Margaret'. (A) Visão geral do botão floral. (B) Emergência da coroa no tubo floral e início de formação dos filamentos na porção superior da emergência (seta). (C) Opérculo na porção inferior (seta preta) e início de formação da segunda série de filamentos próxima ao opérculo (seta branca). (D, E) Séries de coroa entre a série mais externa e a série próxima ao opérculo. (F) Seis séries de coroa e o opérculo. (G) Opérculo em estágio tardio de desenvolvimento, mostrando pequenos filamentos filiformes na extremidade (seta). **s:** sépala, **p:** pétala, **co:** coroa, **op:** opérculo, **fi:** filamentos filiformes. Números indicam a sequência de desenvolvimento das séries de filamentos filiformes. Barras= 50 μ m.

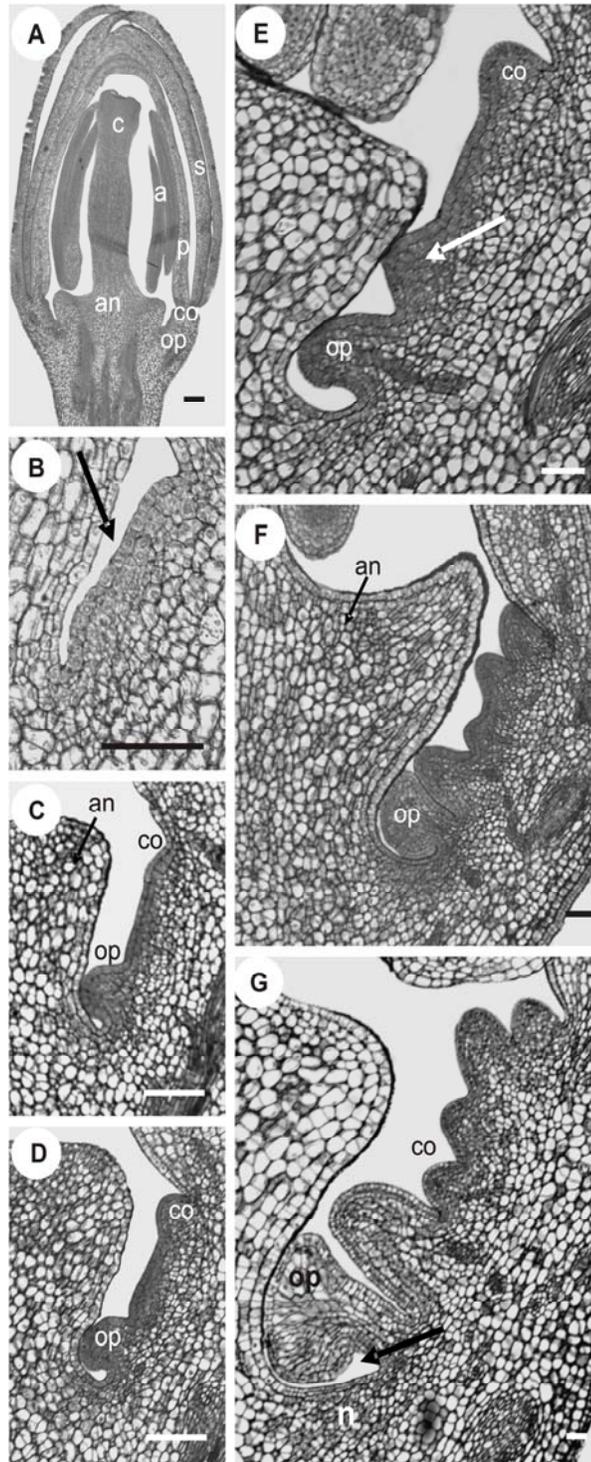


Figura 9: Microscopia de luz de botões florais seccionados longitudinalmente mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da corona em *P.* 'Lady Margaret'. **(A)** Visão geral do botão floral com localização da corona. **(B)** Emergência do tubo floral (seta). **(C, D)** Observar opérculo em estágio mais avançado de desenvolvimento do que a primeira série da corona. **(E)** Segunda série de corona próxima ao opérculo (seta). **(F)** Sequência de desenvolvimento com duas séries de corona entre a primeira formada e a segunda. **(G)** Corona em estágio tardio de desenvolvimento com apenas cinco séries de filamentos e o opérculo sobre a câmara nectarífera (seta). **s:** sépalas, **p:** pétalas, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **co:** corona, **op:** opérculo, **n:** nectário. Barras= 50 µm.

4.1.4. *P. suberosa*

As flores desta espécie do subgênero *Decaloba* apresentam um perianto com um único verticilo de tépalas (Figuras 3G-H). No entanto, o posicionamento da corona no botão floral observado nas Figuras 10A e 11A e o padrão de desenvolvimento da corona em *P. suberosa* foram similares às espécies estudadas do subgênero *Passiflora*, iniciando-se como uma pequena emergência do tubo floral, em seguida os filamentos externos começaram a surgir na porção superior da emergência como pequenas protuberâncias (Figuras 10B, 11B), evidenciando os filamentos externos filiformes, eretos da sua base até a metade e na parte superior encurvados para o exterior da flor. A formação do opérculo na porção inferior (Figura 10C), com destaque da divisão celular periclinal (Figura 11C). A segunda série de filamentos da corona teve início entre a série externa e o opérculo, com os filamentos organizados de forma intercalar entre os filamentos da primeira série (Figuras 10D, 11D-E). Na Figura 10E é possível observar o opérculo plicado e os filamentos filiformes da série externa alongando-se. Em estágio tardio de desenvolvimento, observaram-se as duas séries de filamentos filiformes da corona, onde a série externa apresenta filamentos maiores e a série interna de filamentos menores com o ápice capitado, o opérculo caracterizou-se como plicado verticalmente com extremidade fimbriada (Figuras 10F, 11F).

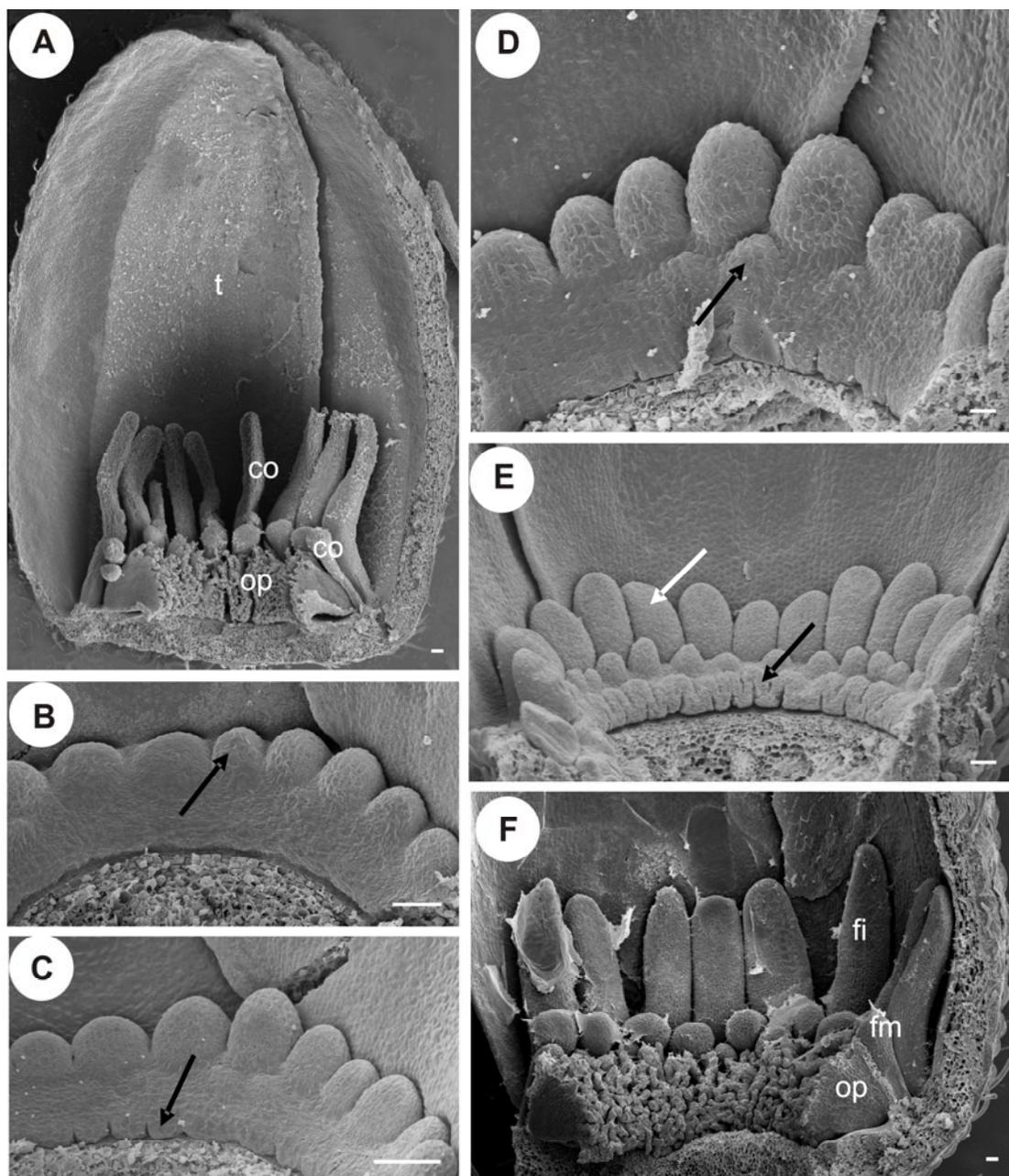


Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura de botões florais seccionados longitudinalmente, gineceu e estames removidos, mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da corona em *P. suberosa*. (A) Visão geral do botão floral. (B) Filamentos filiformes externos na porção superior da emergência do tubo floral (seta). (C) Opérculo na porção inferior (seta). (D) Segunda série de corona entre a série externa e o opérculo (seta). (E) Série externa de filamentos filiformes (seta branca) e opérculo plicado (seta preta). (F) Botão floral em estágio tardio de desenvolvimento com duas séries de corona morfologicamente diferentes (**fi** e **fm**) e opérculo plicado verticalmente com a extremidade fimbriada. **t**: tépalas, **co**: corona, **op**: opérculo, **fi**: filamentos filiformes, **fm**: filamentos menores com ápice capitado. Barras= 50 µm.

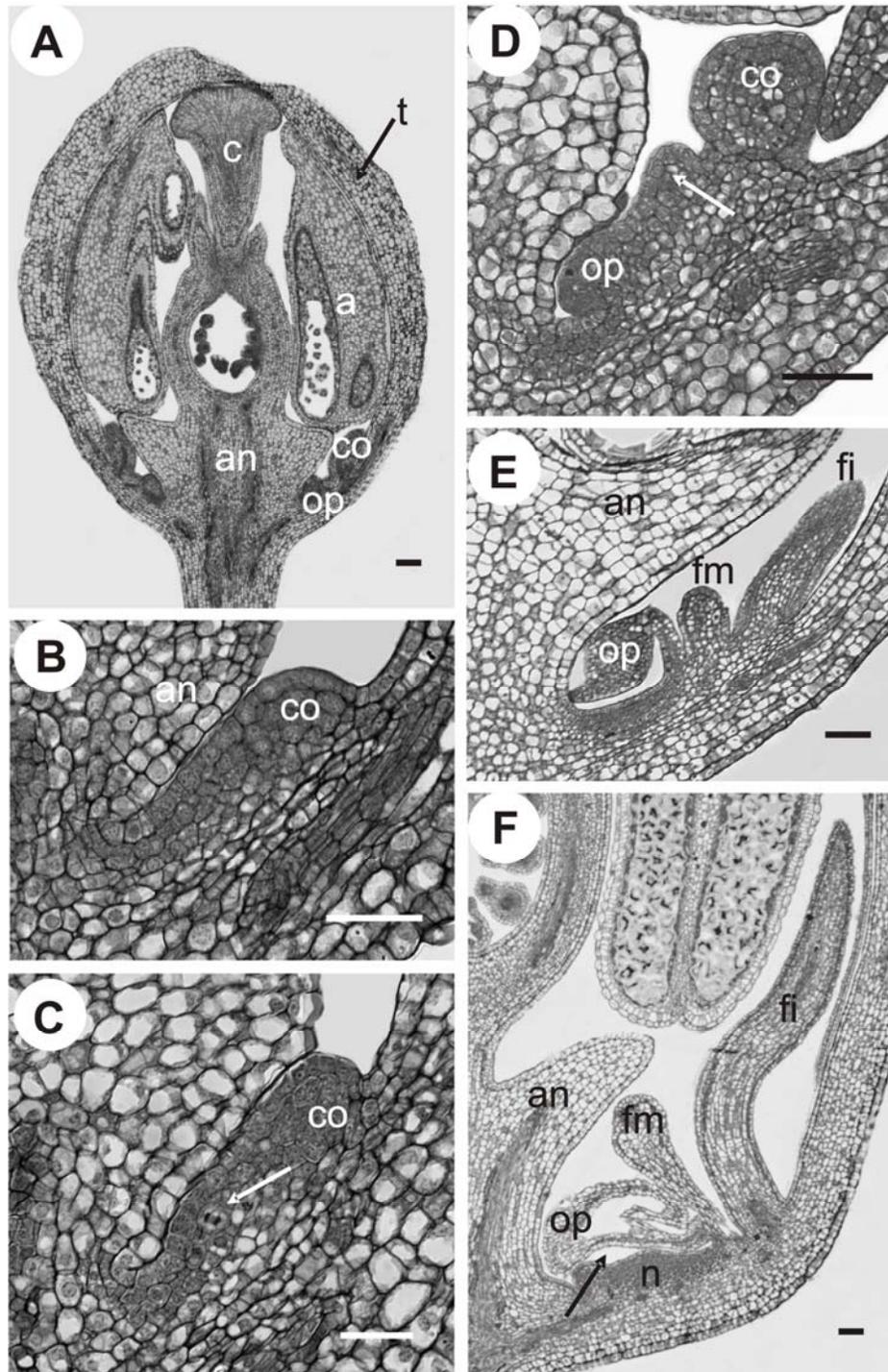


Figura 11: Microscopia de luz de botões florais seccionados longitudinalmente mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da corona em *P. suberosa*. **(A)** Visão geral do botão floral com localização da corona, destaque para o perianto com um verticilo de tépalas. **(B)** Início de formação dos filamentos externos da corona na porção superior da emergência do tubo floral. **(C)** Destaque para a divisão celular periclinal (seta) evidenciando o início da formação do opérculo na porção inferior. **(D)** Segunda série de corona formada entre a primeira e o opérculo (seta). **(E, F)** Duas distintas séries de corona: filamentos filiformes externos e os filamentos filiformes menores com ápice capitado e o opérculo plicado sobre a câmara nectarífera (seta). **t:** tépalas, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **co:** corona, **op:** opérculo, **fi:** filamentos filiformes, **fm:** filamentos menores, **n:** nectário. Barras= 50 µm.

Na espécie *P. suberosa*, as flores são inconspícuas, sem emissão de odor perceptível ao olfato humano (Amela-Garcia et al., 2007). Os principais polinizadores são abelhas de pequeno porte e vespas dos gêneros *Mischocyttarus* e *Eumenidae* (Faegri & Pijl, 1971; Koschnitzke & Sazima, 1997), que utilizam os filamentos da corona como plataforma de pouso. De acordo com as observações de Koschnitzke & Sazima (1997), a presença do tubo floral plano e do opérculo plicado com extremidade fimbriada permite a exposição da câmara nectarífera a visitantes não especializados, que conseguem afastar facilmente as dobras do opérculo, introduzindo o curto aparelho bucal e obtendo o néctar.

4.1.5. *P. tulae*

Uma visão geral do botão floral com localização da única série de corona e dos órgãos florais pode ser observada nas Figuras 12A e 13A. O início do desenvolvimento da corona em *P. tulae* ocorreu como nas demais espécies estudadas, como uma pequena emergência do tubo floral (Figuras 12B, 13B). Na porção superior, iniciou-se a formação da única série de filamentos (Figuras 12C e 13C) e na porção inferior deu início à formação do opérculo (Figuras 12C, 13D) que se tornou plicado verticalmente (Figura 12D). Em estágio tardio de desenvolvimento verificou-se a corona tubular e a presença do opérculo plicado verticalmente na base da corona, que cobre a câmara nectarífera (Figuras 12E, 13E-F).

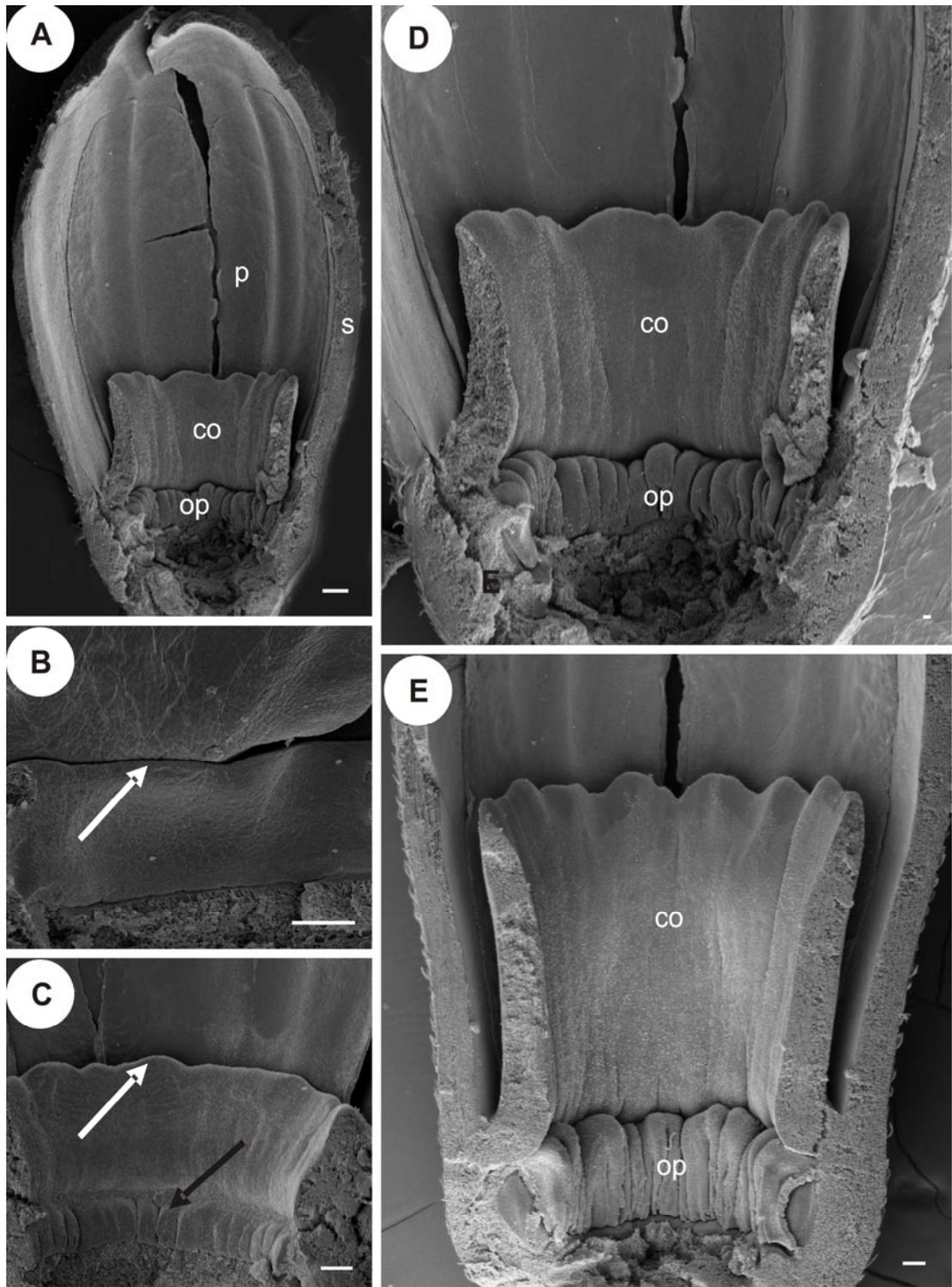


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura de botões florais seccionados longitudinalmente, gineceu e estames removidos, mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da coroa em *P. tulae*. (A) Visão geral do botão floral. (B) Pequena emergência do tubo floral (seta). (C) Série de filamentos unidos na porção superior (seta branca) e opérculo na porção inferior (seta preta). (D, E) Série única de filamentos unidos formando a coroa tubular e opérculo plicado. **s:** sépala, **p:** pétala, **co:** coroa, **op:** opérculo. Barras= 50 μm.

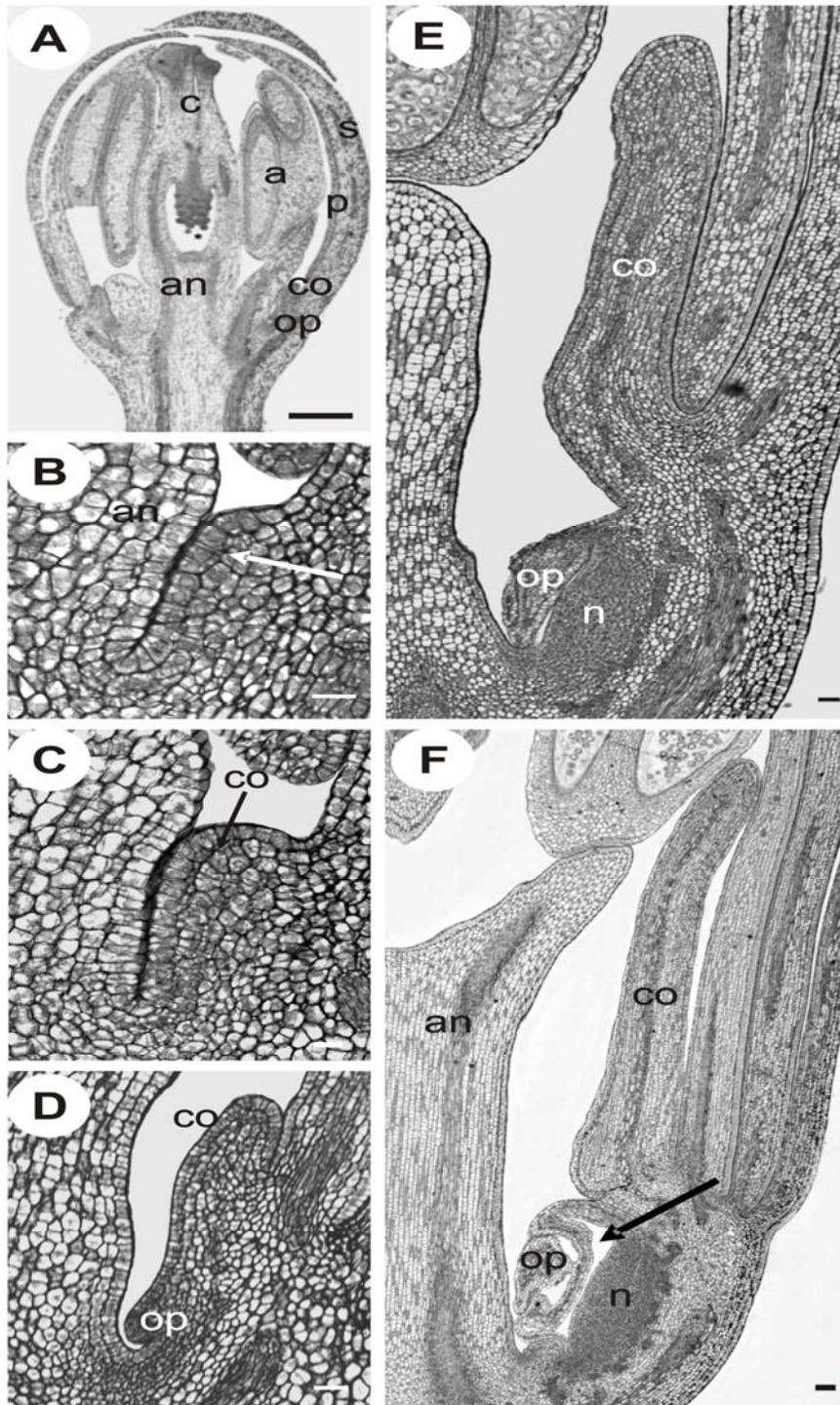


Figura 13: Microscopia de luz de botões florais seccionados longitudinalmente mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da corona em *P. tulae*. (A) Visão geral do botão floral com localização da corona. (B) Emergência do tubo floral (seta). (C) Início do desenvolvimento da corona na porção superior da emergência. (D) Opérculo na porção inferior. (E, F) Série única de corona tubular e opérculo plicado, protegendo a câmara nectarífera (seta). **s:** sépalas, **p:** pétalas, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **co:** corona, **op:** opérculo, **n:** nectário. Barras= 50 µm.

As flores de *P. tulae* diferenciam-se das demais espécies analisadas devido à presença de uma corona tubular de cor alaranjada que contrasta com a cor das sépalas e pétalas. Análises morfo-anatômicas permitiram observar que desde o início do desenvolvimento da corona, os primórdios dos filamentos são soldados, descartando-se, portanto a hipótese de fusão pós-genital. Também se verificou que o opérculo desta espécie é plicado. As características comentadas anteriormente evidenciam uma adaptação à polinização por beija-flores, em especial o tubo floral tubular e as cores do perianto e da corona. Estas observações concordam com o relatado por Kay (2003) a respeito das espécies *P. murucuja*, *P. orbiculata* e *P. maestrensis*, igualmente pertencentes ao subgênero *Decaloba*, que possuem flores vermelhas ou rosas e os filamentos conados, resultando em uma corona tubular.

A diversidade morfológica do opérculo observada nas espécies estudadas parece estar relacionada à morfologia e ao comportamento de determinados polinizadores (Varassin, 1992). Estruturas florais que ocultam o néctar, tornando-o inacessível a determinados visitantes são interpretados como adaptações para prevenir desperdício ou podem ser consideradas como especializações a determinados polinizadores para garantir o sucesso reprodutivo da espécie (Faegri & Pijl, 1971). Geralmente, opérculos aderidos à câmara nectarífera permitem o acesso a determinados polinizadores, enquanto opérculos plicados permitem o acesso ao néctar por visitantes menos especializados (Koschnitzke & Sazima, 1997).

Os resultados morfo-anatômicos apresentados anteriormente das espécies em estudo são mostrados resumidamente na Tabela1:

Espécies	Corona	Filamentos	Opérculo	Origem
	multisseriada	filiformes e dentiformes	anelar	emergência do tubo floral
	bisseriada	filiformes maiores de base alargada e filiformes menores	unido na base e denticulado na extremidade	emergência do tubo floral
	seis séries	filiformes	unido na base e filamentosos na extremidade	emergência do tubo floral
	bisseriada	filiformes maiores e filiformes menores com ápice capitado	plicado e extremidade fimbriada	emergência do tubo floral
	unisseriada	tubular	plicado	emergência do tubo floral

Os órgãos florais em *Passiflora* surgem inicialmente como nas demais angiospermas, de forma centrípeta. No entanto, o desenvolvimento da corona independentemente da espécie observada tem formação tardia e posterior aos demais órgãos florais. Estas observações concordam com as de Kunze (1990), Endress (1994) e Bernhard (1999), de que a corona se desenvolve após a corola e o androceu terem alcançado um estágio avançado de desenvolvimento.

O desenvolvimento inicial da corona foi similar entre as espécies em estudo, iniciando-se como uma emergência do tubo floral. Na porção superior da emergência, pequenas protuberâncias adjacentes à base das sépalas e pétalas originaram a série

de filamentos mais externa. Em seguida, na porção inferior formou-se o opérculo, que mais tarde apresentará morfologias diversas, sendo considerada uma estrutura de grande importância para a definição taxonômica no gênero (Tillett, 1988). A presença de um opérculo plicado é característica em flores do subgênero *Decaloba* (Krosnick & Freudenstein, 2005), o que foi igualmente observado nas duas espécies de *Decaloba* estudadas: *P. suberosa* e *P. tulae*. Diante dos resultados obtidos com as diferentes espécies analisadas e independentemente da morfologia observada, os filamentos da coroa e o opérculo derivam de um mesmo tecido. Observação semelhante foi obtida por Bernhard (1999) em estudos com *P. racemosa* Brot.. Krosnick & Freudenstein (2005) afirmaram que os filamentos da coroa e o opérculo são estruturas altamente conservadas em todo o gênero, porém devem ser consideradas distintas morfológica e funcionalmente, independente da ontogenia. O opérculo tem grande importância em proteger a câmara nectarífera: exclui pequenos insetos e previne a perda do néctar em espécies com flores pendentes ou em dias chuvosos (MacDougal, 1994).

De acordo com os resultados morfo-anatômicos apresentados neste estudo, a coroa não é um órgão sexual especial ou um verticilo *sui generis*, como sugerido anteriormente por Masters (1871), assim como não se pode sustentar a origem estaminal defendida por Endress (1994). A coroa pode ser considerada como uma emergência, sendo um produto tardio das pétalas e sépalas, uma vez que compartilham a mesma origem no tubo floral (MacDougal, 1994) e aparentemente possuem a mesma função em *Passiflora*: atua na interação com polinizadores. Segundo Puri (1947, 1948), a coroa pode ser considerada um apêndice do tubo floral, representada estruturalmente em várias séries de filamentos, membranas e anéis. Ulmer &

MacDougal (2004) e Bernhard (1994, 1999) consideram os filamentos da coroa como um crescimento na base das sépalas e pétalas, com algumas espécies exibindo os filamentos maiores que as pétalas. Payer (1857) ao analisar o desenvolvimento floral do híbrido *P. loudonii* concluiu que os filamentos da coroa e o opérculo são estruturas derivadas de pétalas.

Os resultados apresentados confirmam a separação taxonômica em dois subgêneros de acordo com a morfologia floral. A presença de uma coroa conspícua e com várias séries de filamentos filiformes, um longo tubo floral e a câmara nectarífera bem protegida pelo opérculo correspondem às espécies do subgênero *Passiflora*, enquanto as espécies do subgênero *Decaloba* apresentam flores menores, a coroa com séries reduzidas de filamentos, o opérculo plicado, a câmara nectarífera exposta devido ao tipo floral aberto em *P. suberosa*, com exceção de *P. tulae* que apresenta coroa tubular abrigando a câmara nectarífera.

4.2. Análise filogenética das sequências dos genes MADS-box homólogos em *P. edulis*

Após a clonagem e re-sequenciamento dos prováveis fragmentos correspondentes aos homólogos MADS-box em *Passiflora*, as sequências de nucleotídeos de cada clone foram comparadas com sequências de outras espécies depositadas nos bancos de dados públicos usando a ferramenta BLASTx. Os cDNAs clonados correspondentes aos genes *PeAPETALA1* (*PeAP1*), *PePISTILLATA* (*PePI*) e *PeAGAMOUS* (*PeAG*) apresentaram similaridades significativas de 76, 80 e 62%, respectivamente com as sequências dos genes MADS-box *APETALA1* (*AP1*), *PISTILLATA* (*PI*) e *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis*, envolvidos no desenvolvimento

floral. Além da similaridade, a porcentagem de identidade (61, 63 e 43%, respectivamente) entre as sequências apresentou valores moderados que, aliados aos valores de e-value ($3e-55$, $2e-63$ e $3e-05$, respectivamente) permitiram a confiabilidade nos resultados do BLASTX para as sequências estudadas.

O clone contendo o gene *PeAP1* mostrou possuir 632 pares de bases, codificando uma proteína com 256 aminoácidos. O clone de *PePI* mostrou 946 pares de bases e codificou uma proteína com 211 aminoácidos. Já *PeAG* constituiu 1050 pares de bases, mesmo sendo uma sequência incompleta a 5', porém completa e longa a 3' possuindo inclusive uma cauda poli-A, mostrou um quadro aberto de leitura codificador de 57 aminoácidos.

Somente as sequências protéicas codificadas pelos genes *PePI* e *PeAP1* apresentaram os típicos domínios encontrados nas proteínas MIKC, enquanto a sequência codificada pelo gene *PeAG* apresentou somente o domínio C-terminal, ideal para investigar seu padrão de expressão, por se tratar de uma região divergente entre os membros da família de fatores de transcrição do tipo MADS-box.

Inicialmente, as sequências de aminoácidos deduzidas de *P. edulis* foram alinhadas com as sequências correspondentes à subfamília MIKC das proteínas MADS-box de *Arabidopsis* com utilização do programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1994). Para a construção da árvore filogenética, somente os fragmentos referentes ao domínio C-terminal de *PeAP1*, *PePI* e *PeAG* foram comparados com a mesma região nas diferentes proteínas MIKC de *Arabidopsis*. Embora o domínio carboxi terminal (C-terminal) das proteínas MADS-box é muito variável em tamanho e sequência, este apresenta uma região que permite distinguir as subfamílias das proteínas MADS-box, sendo considerado determinante na formação de complexos protéicos específicos que

garantem a especificidade funcional. Análises detalhadas deste domínio nos genes *PISTILLATA* e *APETALA3* (*AP3*) em *Arabidopsis* revelaram uma importante função desta região em especificar a função das correspondentes proteínas: o domínio C-terminal de *AP3* é suficiente para conferir a função do gene sobre a proteína *PI* no que diz respeito em especificar a identidade de pétalas e estames (Lamb & Irish, 2003). Adicionalmente, as proteínas do grupo MIKC têm importância funcional na regulação da determinação do meristema floral e na especificação da identidade dos órgãos florais, visto que os fatores de transcrição envolvidos no modelo ABC (exceto *APETALA2*) pertencem a este grupo.

A árvore filogenética construída neste trabalho confirma as informações das análises no banco de dados NCBI e demonstra as relações de similaridade entre as sequências de aminoácidos de *Passiflora* e *Arabidopsis* (Figura 14). A sequência do homólogo *AP1* foi incluída no clado referente à classe de genes A; enquanto a sequência do homólogo *PI* foi fortemente suportado no clado da classe B e a sequência do gene homólogo *AG* foi agrupada no clado da classe C. Todas as sequências de *Passiflora* analisadas foram agrupadas com *Arabidopsis* com um alto valor de Bootstrap de 98, 100 e 99%, respectivamente.

Devido ao grau de similaridade e à relação filogenética com os genes de *APETALA1*, *PISTILLATA* e *AGAMOUS* de *Arabidopsis* foi sugerido que os fragmentos clonados em *Passiflora* representam homólogos aos genes MADS-box. Por esta razão, as sequências gênicas identificadas em *P. edulis* foram nomeadas em *PeAPETALA1* (*PeAP1*), *PePISTILLATA* (*PePI*) e *PeAGAMOUS* (*PeAG*).

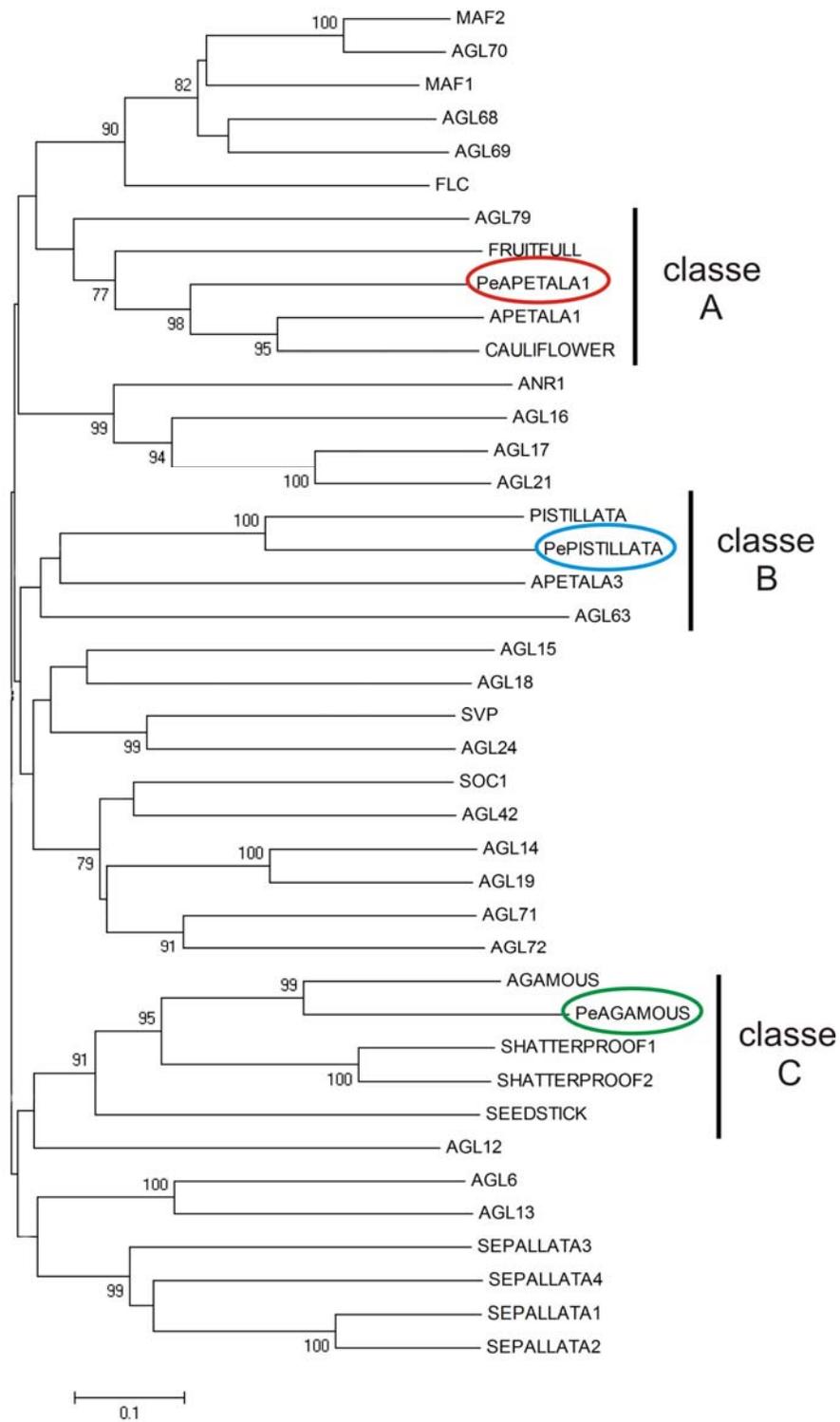


Figura 14: Árvore filogenética com seqüências protéicas de MADS-box do tipo MIKC de *Arabidopsis* e com seqüências protéicas deduzidas de *Passiflora* (domínio C-terminal). Os genes *PeAP1*, *PePI* e *PeAG* aparecem destacados. Os números próximos de cada nó representam os valores bootstrap para 1000 replicações. Apenas os valores superiores a 75% são apresentados.

4.3. Análises de expressão dos genes MADS-box homólogos em *P. edulis* via RT-PCR

Os cDNAs sintetizados a partir de amostras de RNA total de raiz (R), caule (C), folha (F), ápice reprodutivo (AR) e botão floral em início de desenvolvimento (BF) de *P. edulis* foram utilizados em reações de RT-PCR, onde a expressão temporal dos genes *PeAP1*, *PePI* e *PeAG* foi analisada nestes diferentes tecidos. A amplificação foi realizada com pares de primers específicos para cada gene conforme descrito no item 3.2.3 e com o controle interno, o gene *ACTINA* que serviu para a padronização dos dados (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente). Os pares de primers utilizados para cada gene geraram fragmentos específicos, com os tamanhos esperados, demonstrando a eficiência dos primers e das condições empregadas para amplificação dos cDNAs de interesse.

O fragmento de *PeAP1* apresentou amplificação nas amostras de raiz, caule e ápice reprodutivo (Figura 15). A observação de expressão no ápice reprodutivo é consistente com a função proposta por *AP1* na especificação da identidade do meristema floral em *Arabidopsis* (Mandel *et al.*, 1992). Em relação à expressão nos tecidos vegetativos, estudos indicam que em videira dois genes do tipo MIKC homólogos a *AP1* apresentaram expressão na gavinha (Calonje *et al.*, 2004), o que suporta a idéia da expressão também em órgãos vegetativos, sugerindo o recrutamento deste gene para uma nova funcionalidade. Estudos em outras espécies também verificaram a expressão de homólogos de *AP1* tanto em tecidos vegetativos como em reprodutivos (Ma *et al.*, 1991).

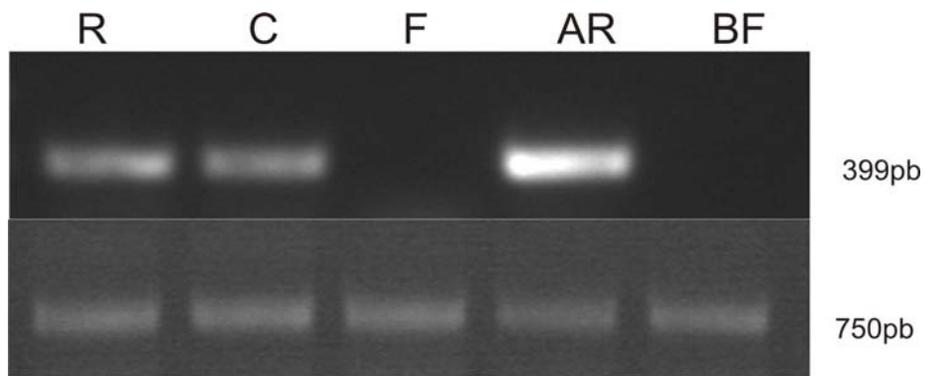


Figura 15: RT-PCR de diferentes tecidos de *P. edulis*. No painel superior, as bandas indicam à amplificação do fragmento de *PeAP1*, enquanto no painel inferior, as bandas correspondem à amplificação do gene constitutivo *ACTINA* como controle positivo. **R:** raiz, **C:** caule, **F:** folha, **AR:** ápice reprodutivo e **BF:** botão floral.

Análises de RT-PCR de *PePI* revelaram um padrão de expressão exclusivo no desenvolvimento floral, sendo expresso nos dois tecidos reprodutivos, porém preferencialmente em botão floral do que no ápice reprodutivo (Figura 16). Estes resultados condizem com uma provável conservação de função entre *PI* e seu ortólogo potencial em *Arabidopsis*, uma vez que a função do gene *PI* é especificar a identidade de pétalas e estames em *Arabidopsis*, sendo o mesmo expresso exclusivamente em flores (Goto & Meyerowitz, 1994).

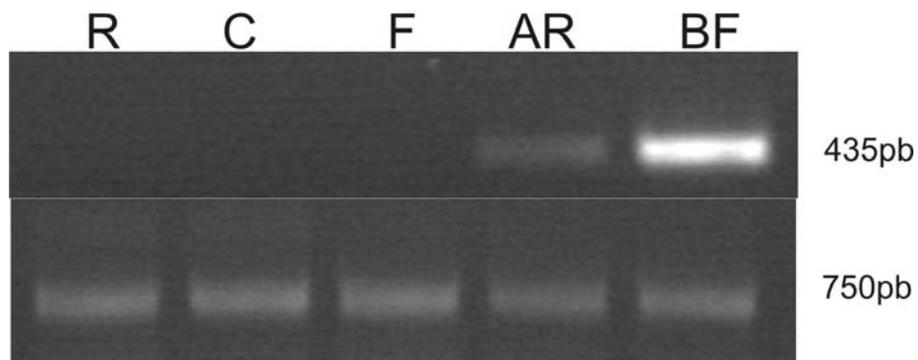


Figura 16: RT-PCR de diferentes tecidos de *P. edulis*, No painel superior, as bandas correspondem à amplificação do fragmento de *PePI*, enquanto no painel inferior, as bandas indicam amplificação do gene constitutivo *ACTINA* como controle positivo. **R:** raiz, **C:** caule, **F:** folha, **AR:** ápice reprodutivo e **BF:** botão floral.

Os resultados de RT-PCR do fragmento de *PeAG* indicaram amplificação em todos os tecidos de *P. edulis* (Figura 17). A sua expressão preferencial na amostra de caule pode ser considerada incomum. Em plantas, os fatores de transcrição da família MADS-box estão envolvidos principalmente no desenvolvimento de flores e dos frutos (Bowman *et al.*, 1999), no entanto podem atuar como reguladores de outros processos do desenvolvimento vegetal (Ma *et al.*, 1991, Rounsley *et al.*, 1995). Uma hipótese alternativa para a expressão de *PeAG* em tecidos vegetativos é a duplicação gênica seguida de neofuncionalização, uma vez que outros parálogos de *PeAG* foram recentemente descobertos por nosso grupo (dados não publicados).

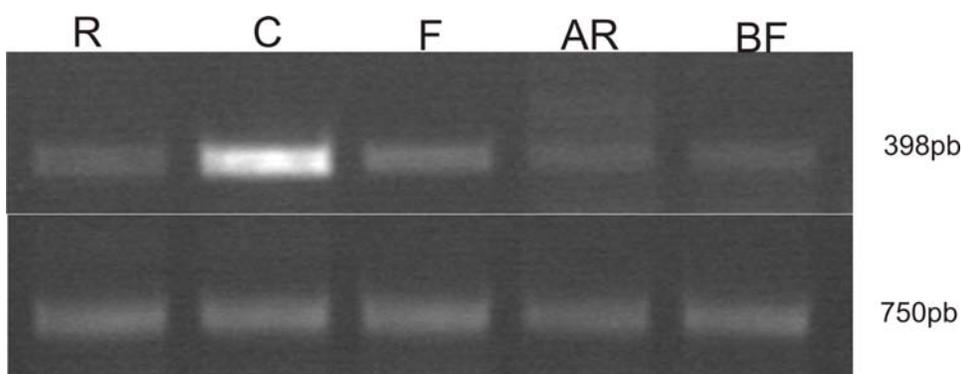


Figura 17: RT-PCR de diferentes tecidos de *P. edulis*. O painel superior mostra as bandas correspondentes à amplificação do fragmento de *PeAG*, enquanto no painel inferior, as bandas indicam amplificação do gene constitutivo *ACTINA* como controle positivo. **R:** raiz, **C:** caule, **F:** folha, **AR:** ápice reprodutivo e **BF:** botão floral.

4.4. Análises de expressão dos genes *PeAP1*, *PePI* e *PeAG* durante o desenvolvimento da corona por hibridização *in situ*

Neste trabalho, houve interesse pela análise da expressão de genes homólogos aos da subfamília MIKC, codificadores dos fatores de transcrição MADS-box, para investigar um possível envolvimento dos mesmos na ontogenia dos filamentos da corona em *Passiflora*. A interação das proteínas desta subfamília é responsável pela identidade de órgãos florais (Theissen *et al.*, 2000, Díaz-Riquelme *et al.*, 2009) e pelo estabelecimento de inovações florais nas angiospermas ao longo da evolução (Theissen *et al.*, 2000).

Para verificar o padrão espacial e temporal dos genes homólogos ao modelo ABC durante o desenvolvimento da corona, o acúmulo de transcritos dos respectivos genes foram analisados por hibridização *in situ* somente na espécie *P. edulis* devido à preocupação em sintetizar sondas específicas (homólogas) a cada gene estudado. Ainda, foi devido a esta preocupação que apenas fragmentos curtos, correspondentes aos codificadores das regiões C-terminais e 3'UTR (região não-traduzida) foram utilizados em cada clone, de modo a garantir a especificidade das sondas e possibilitar a relação da funcionalidade gênica durante os diferentes estágios de desenvolvimento da corona.

Botões florais de *P. edulis* em diferentes estágios de desenvolvimento foram seccionados longitudinalmente e hibridizados com sonda de *PeAP1*. A Figura 18A ilustra o padrão de expressão do gene no botão floral. Desde o início, quando a corona surge como uma emergência no tubo floral, o sinal de hibridização foi uniforme nas células epidérmicas e subepidérmicas (Figura 18B), permanecendo durante a formação do opérculo na porção inferior (Figura 18C), no nectário e na formação da segunda

série de filamentos da corona (Figura 18D). No entanto, com desenvolvimento de mais séries de filamentos, a expressão concentrou-se preferencialmente nas células epidérmicas destes filamentos externos e foi excluída do opérculo (Figura 18E). A Figura 18F ilustra melhor este limite de sinal de hibridização, não se observando a presença de transcritos nas células do primórdio do opérculo.

De acordo com os resultados de RT-PCR, o gene *PeAP1* não apresentou expressão em botão floral, no entanto foi possível verificar seu padrão de expressão durante o desenvolvimento floral, mais precisamente no desenvolvimento da corona por meio de hibridização *in situ*, como um fraco sinal em todos os estágios observados. Portanto, a hipótese sugerida é que a função do homólogo *AP1* é conservada em *Passiflora* no que diz respeito à identidade do meristema floral, uma vez que seu pico de expressão foi no ápice reprodutivo e a ausência de banda no experimento de RT-PCR em botão floral justificou-se pela baixa quantidade de transcritos igualmente observada em hibridização *in situ* (sinal fraco). Talvez, numa reação saturada (40 ciclos) seria possível observar uma banda indicando a amplificação em botão floral, já que a técnica de RT-PCR foi empregada como análise semi-quantitativa.

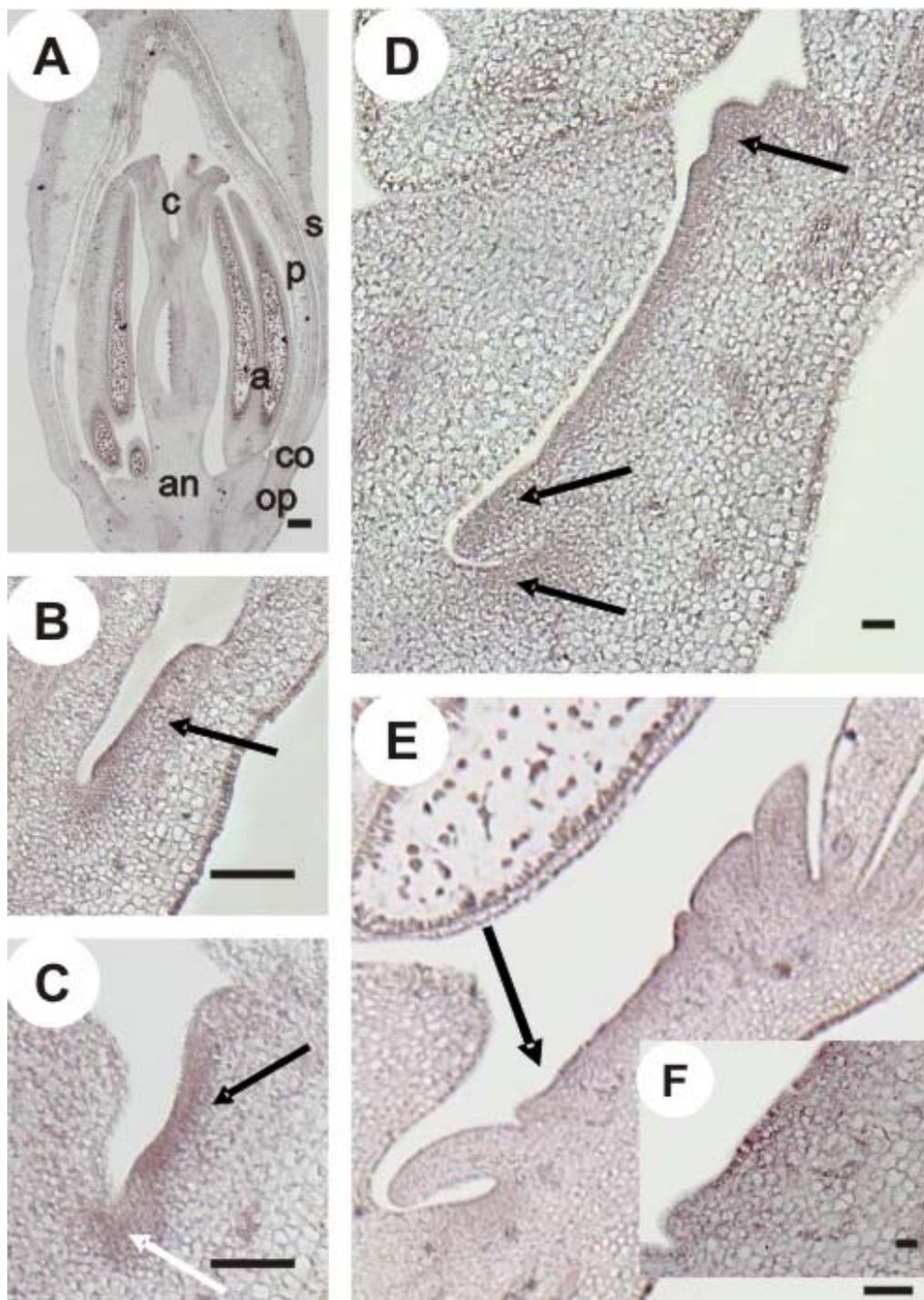


Figura 18: Hibridização *in situ* em botões florais seccionados longitudinalmente, mostrando o padrão de expressão de *PeAP1* durante o desenvolvimento da corona em *P. edulis*. (A) Visão geral do botão floral. (B) Sinal de hibridização uniforme durante emergência da corona no tubo floral (seta). (C) O precipitado rosado indica a presença de transcritos na região dos filamentos da corona ao opérculo (seta preta) e do nectário (seta branca). (D) Sinal fraco e uniforme em células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da corona estendendo-se ao opérculo e ao nectário (setas). (E) No desenvolvimento tardio da corona, sinal de hibridização detectado nas células epidérmicas dos filamentos da corona e ausência no primórdio do opérculo. A seta delimita a expressão gênica. (F) Detalhe da região-limite entre os filamentos da corona hibridizados e o opérculo. s: sépala, p: pétala, a: antera, c: carpelo, an: androginóforo, co: corona, op: opérculo. Barras= 50 μ m.

A Figura 19 apresenta o padrão de expressão do gene *PePI* observado nos diferentes estágios de desenvolvimento da corona em *P. edulis*. Na Figura 19A observa-se o botão floral seccionado longitudinalmente hibridizado com sonda antisense do gene de interesse. Inicialmente, detectou-se um fraco sinal de hibridização uniformemente nas células epidérmicas e subepidérmicas na porção superior da emergência do tubo floral (Figura 19B). Com o desenvolvimento do opérculo na porção inferior, o sinal de hibridização manteve-se mais restrito a esta região, bem como no nectário (Figura 19C). No decorrer da formação da segunda série de filamentos, há um declínio do sinal de expressão, visível apenas na região mais interna dos filamentos da corona (Figura 19D). Durante o desenvolvimento tardio não houve detecção de sinal nos tecidos dos filamentos da corona, porém observou-se um precipitado púrpuro, denotando a presença de transcritos nas células do filamento da antera (Figuras 19D - E).

O padrão de expressão observado para *PePI* confirmou os resultados obtidos por RT-PCR, em que o gene expressou-se preferencialmente em botões florais e por meio da hibridização *in situ* observou-se o envolvimento do gene na especificação da identidade de estames conforme a sua expressão local nos filamentos da antera.

Em *Arabidopsis*, o gene *PI* interage com *AP3* (*APETALA3*) para especificar a identidade de pétalas e estames e sua expressão é restrita a estes órgãos (Riechmann *et al.*, 1996). Padrões similares de expressão têm sido reportados em muitas espécies, entre elas: petúnia (*Petunia hybrida*, Vandenbussche *et al.*, 2004), maçã (*Malus domestica*, Yao *et al.*, 2001) e videira (*Vitis vinifera*, Poupin *et al.*, 2007).

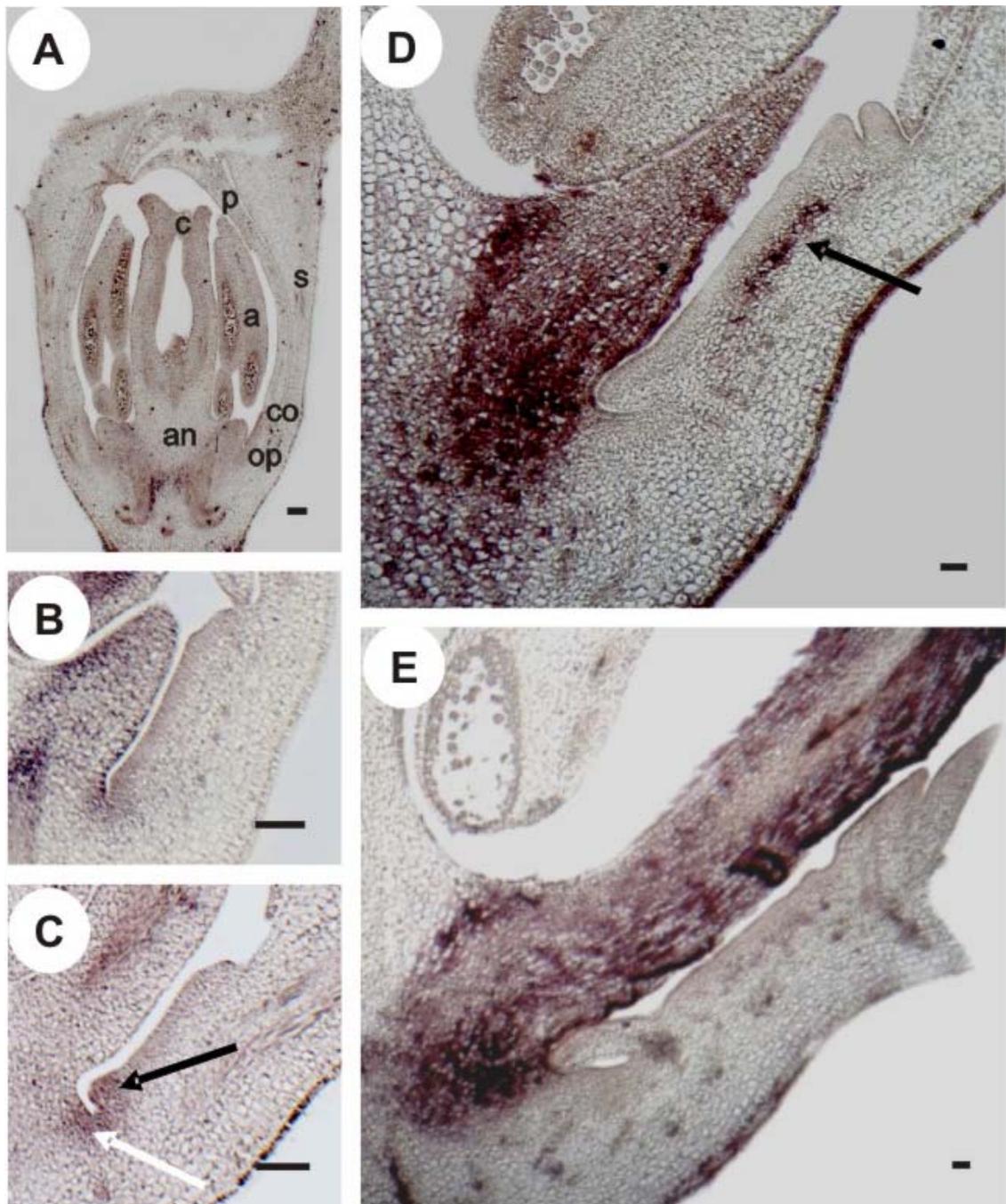


Figura 19: Hibridização *in situ* em botões florais seccionados longitudinalmente, mostrando o padrão de expressão de *PePI* durante o desenvolvimento da corona em *P. edulis*. **(A)** Visão geral do botão floral. **(B)** Início da formação da corona com fraco sinal de hibridização uniforme nas células epidérmicas e subepidérmicas na região superior e um pouco mais evidente no primórdio do opérculo na porção inferior. **(C)** Sinal de hibridização detectado na região correspondente ao opérculo (seta preta) e ao nectário (seta branca). **(D)** Ausência de sinal de hibridização nas células epidérmicas dos filamentos da corona e sinal forte nas células mais internas (seta). **(E)** Corona em estágio tardio de desenvolvimento mostrando sinal de hibridização arroxeado nas células do filamento da antera e ausência de sinal de hibridização na corona e no opérculo. **s:** sépala, **p:** pétala, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **co:** corona, **op:** opérculo. Barras= 50 µm.

O gene *PeAG* também teve seu padrão de expressão investigado em *P. edulis* em diferentes estágios de desenvolvimento da coroa. A Figura 20A apresenta a secção longitudinal do botão floral hibridizado com sonda antisense de *PeAG*. Inicialmente, um sinal de hibridização com maior intensidade na porção inferior da emergência (Figura 20B), em seguida foi detectado também nas células dos filamentos da coroa, do opérculo e do nectário (Figuras 20C) denotando a presença de transcritos de *PeAG*. Com a formação de novas séries de filamentos, o sinal de hibridização tornou-se mais fraco e uniforme nas células epidérmicas e subepidérmicas, estendendo-se desde o filamento da coroa mais externo até ao opérculo e ao nectário (Figura 20D). No estágio tardio de desenvolvimento, o sinal de hibridização permaneceu nos filamentos mais externos da coroa, no opérculo e no nectário (Figura 20E). A Figura 20F destaca as células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da série mais externas da coroa hibridizadas com a sonda antisense de *PeAG*.

Em *Arabidopsis*, o gene *AG* determina a identidade do meristema floral e dos órgãos reprodutivos no início do desenvolvimento floral (Mizukami & Ma, 1997). No entanto, outras funções foram atribuídas ao gene no estágio tardio do desenvolvimento floral correspondente à formação do pólen e de óvulos (Bowman *et al.*, 1991, Wellmer *et al.*, 2004).

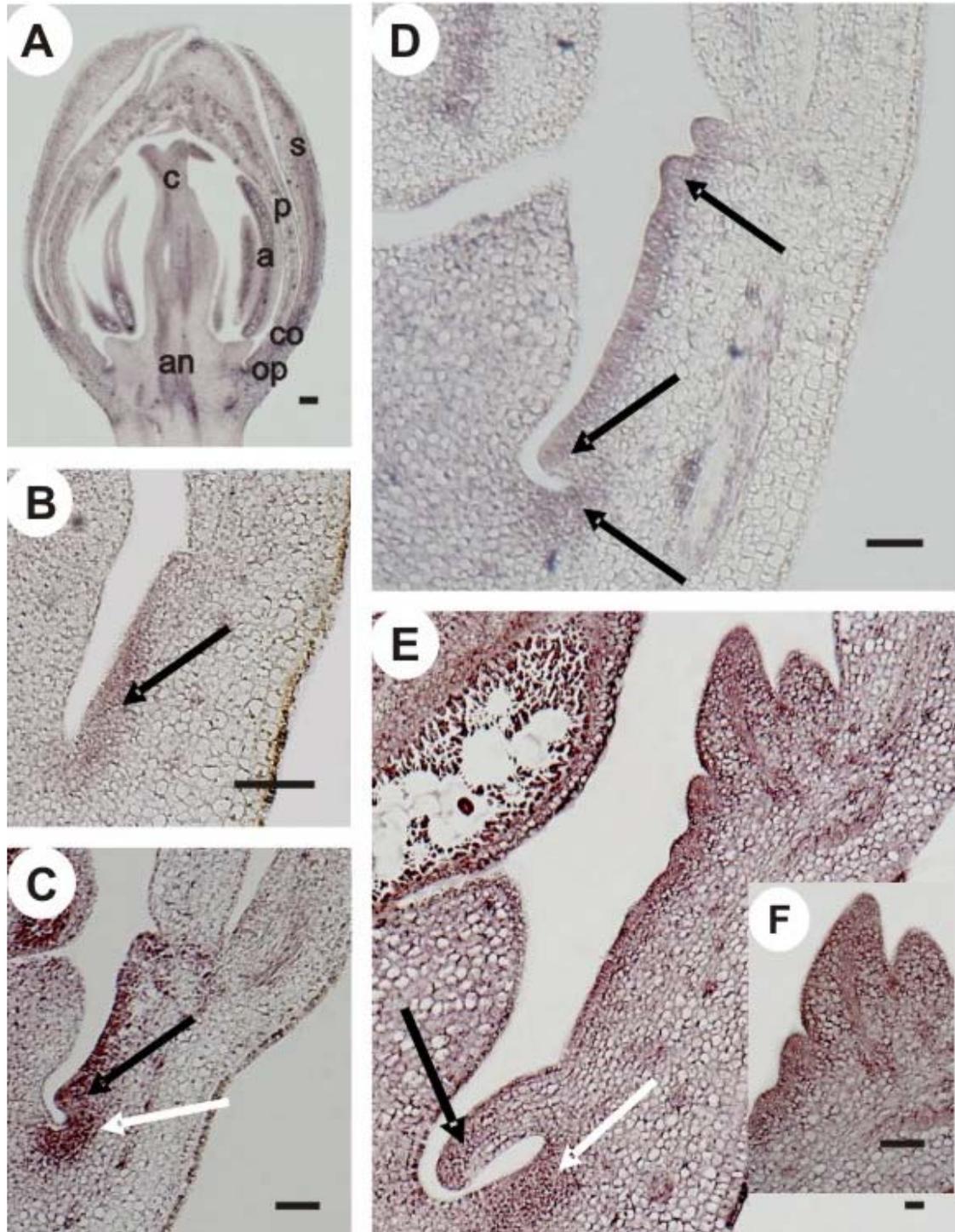


Figura 20: Hibridização *in situ* em botões florais seccionados longitudinalmente, mostrando o padrão de expressão de *PeAG* durante o desenvolvimento da corona em *P. edulis*. (A) Visão geral do botão floral. (B, C) Sinal de hibridização mais intenso na região correspondente aos filamentos da corona, ao opérculo (seta preta) e ao nectário (seta branca). (D) Sinal de hibridização fraco e uniforme desde os filamentos externos da corona até o opérculo e nectário (setas). (E) Corona em desenvolvimento tardio, sinal forte de hibridização nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da corona, do opérculo (seta preta) e do nectário (seta branca). (F) Detalhe das células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da corona mais externos hibridizadas com a sonda *PeAG*. **s:** sépala, **p:** pétala, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **co:** corona, **op:** opérculo. Barras= 50 μ m.

Durante o desenvolvimento floral em *Arabidopsis*, o modelo ABC prediz uma regulação espacial da atividade dos genes A, B e C, consistente com a localização e quantidade de transcritos (Krizek & Fletcher, 2005). Observação semelhante durante o desenvolvimento da corona em *P. edulis*, em que o padrão de expressão dos genes *PeAP1*, *PePI* e *PeAG* foi contextualizado no nível celular, visualizando um precipitado colorido no caso da presença de transcritos. Conforme os resultados obtidos, a expressão dos genes analisados foi similar no início do desenvolvimento da corona, como um sinal uniforme. No entanto, no estágio tardio da corona com as várias séries de filamentos e o opérculo bem desenvolvido, cada gene teve seu padrão único de expressão: os transcritos de *PeAP1* concentraram-se nas células epidérmicas dos filamentos mais externos, *PeAG* expressou-se nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos externos, no opérculo e no nectário, enquanto o gene *PePI* apresentou um intenso sinal de hibridização nas células dos filamentos da antera, não observando sinal nas células dos filamentos da corona e nem do opérculo.

Inicialmente, o modelo molecular ABC foi desenvolvido para as espécies que apresentam claramente um perianto diferenciado em sépalas e pétalas, no entanto, tem sido utilizado em diversos estudos para determinar as bases genéticas para os órgãos indiferenciados do perianto, e assim desvendar o mistério da diversidade na morfologia floral entre as angiospermas. Diversos autores sugerem que a diversidade floral é resultado de mudanças nos domínios de expressão dos genes homeóticos, em especial aos genes da classe B, considerados de grande importância evolutiva (Theissen *et al.*, 2000, Kanno *et al.*, 2003, Ferrario *et al.*, 2004). Diante disso, foi sugerido um “modelo ABC modificado” para as espécies que apresentam órgãos petalóides no primeiro verticilo (Kim *et al.*, 2005, Kramer *et al.*, 2007, Soltis *et al.*, 2007).

Análises comparativas da expressão dos genes MADS-box envolvidos no desenvolvimento floral entre as diferentes espécies indicaram a conservação das funções dos genes. Esta conservação funcional pode ser utilizada para determinar a homologia de órgãos florais entre espécies de angiospermas de táxons distantes, inclusive órgãos representando inovações florais. Portanto, a compreensão da evolução dos genes que controlam o desenvolvimento floral permite a inferência de divergências da origem do órgão floral e de forças seletivas que direcionaram as diferentes morfologias (Lawton-Rauh et al., 2000).

Os diferentes padrões de expressão gênica observados durante o desenvolvimento da coroa na espécie *P. edulis* indicaram que os três genes homólogos aos genes do modelo ABC estão envolvidos no desenvolvimento da coroa em *Passiflora*. Estes genes podem não ser os responsáveis diretos pela ontogenia dos filamentos da coroa, porém podem atuar na regulação de outros genes envolvidos na formação desta estrutura e até mesmo participarem de um “modelo ABC” adaptado para incluir a identidade dos filamentos da coroa.

V. CONCLUSÕES

As análises morfo-anatômicas da corona durante os estágios de desenvolvimento nas diferentes espécies em estudo mostraram evidências de que sua formação ontogenética é tardia, isto é, aparece após a formação de todos os verticilos florais. Este estudo sugeriu que os filamentos da corona podem ser considerados como uma emergência, um produto do desenvolvimento tardio de sépalas e pétalas que compõem o tubo floral. Adicionalmente, os filamentos da corona e o opérculo compartilharam a origem a partir de um mesmo tecido inicial, sendo, porém distintos em estrutura e função.

Os genes *PeAPETALA1*, *PePISTILLATA* e *PeAGAMOUS* homólogos aos fatores de transcrição do modelo ABC apresentaram diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento dos filamentos da corona e do opérculo, indicando uma possível função dos mesmos no desenvolvimento destas estruturas. Os resultados obtidos indicaram uma conservação evolutiva dos elementos moleculares responsáveis pela identidade dos órgãos florais entre *Arabidopsis* e *Passiflora*, incluindo o recrutamento de novos padrões de expressão que poderiam explicar a formação de estruturas consideradas “novidades evolutivas” durante o desenvolvimento floral em angiospermas.

VI. LITERATURA CITADA

- Amela-Garcia, M.T.; Galati, B.G and Hoc, P.S. (2007). Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora* 202: 302-315.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burge, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F. and Yanofsky, M.F. (2000a) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24: 457-466.
- Angenent, G.C. & Colombo, L. (1996). Molecular control of ovule development. *Trends in Plant Science* 7: 228-232.
- Altschul, S.F.; Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* 215: 403-410.
- Baum, D.A. (1998). The evolution of plant development. *Current Opinion Plant Biology* 1: 79-86.
- Bernhard, A. (1994). Coronaentwicklung bei Passifloraceae in evolutiver Sicht. Masters thesis, Universitat Zurich, Zurich, Switzerland.
- Bernhard, A. (1999). Flower structure, development and systematics in Passifloraceae and *Abatia* (Flacourtiaceae). *International Journal of Plant Sciences* 160: 135-150.
- Benson, W.W., Brown Jr., K.S., Gilbert, L. E. (1975). Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29: 659-680.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. & Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1: 37-52.
- Bowman, J.L. Drews, G.N and Meyerowitz, E.M. (1991). Expression of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene AGAMOUS Is Restricted to Specific Cell Types Late in Flower Development. *Plant Cell* 8: 749-758.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. & Meyerowitz, E. M. (1999). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112:1-20.
- Calonje, M., Cubas, P., Martinez-Zapater, J.M. and Carmona, M.J Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiology* 135: 1491-1501.
- Cervi, A.C. (1997). Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. *Fontqueria* 45: 1-92.

- Crepet, W.L. (1983). The role of pollination in the evolution of the angiosperms. In *Pollination biology*. Academic Press, Orlando, p.29-50.
- Coen, E.C. & Meyerowitz, E.M. (1991). The war of the whorls: genetic interaction controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Díaz-Riquelme, J., Lijavetzky, D., Martínez-Zapater, J.M and Carmona M.J. (2009). Genome-wide analysis of MIKC-type MADS-box genes in grapevine. *Plant Physiology* 149: 354–36.
- Dornelas, M.C.; Wittich, P.; Von Recklinghausen, I., Van Lammeren, A.A.M.; Kreis, M. (1999). Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Molecular Biology* 39:137- 147.
- Dornelas, M.C.; Van Lammeren, A.A.M.; Kreis, M. (2000). *Arabidopsis thaliana* SHAGGY related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *Plant Journal* 21:419-429.
- Dornelas MC, Tsai SM, Rodriguez, APM (2006). Expressed sequence tags of genes involved in the flowering process of *Passiflora* spp. In: Teixeira da Silva, JA (ed) *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Global Science Books, Londres, vol 1, pp 483-488.
- Endress, P.K. (1994). *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Faegri, K. & Pijl, L. (1971). *The principles of pollination ecology*. 2 ed., Oxford, Pergamon.
- Ferrario, S., Immink, R.G.H and Angenent, G.C. (2004). Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology* 2004, 7:84–91.
- Gotto, K. & Meyerowitz, E.M. (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Development* 8:1548-1560.
- Harms, H. (1925). *Passifloraceae*. In *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 2 ed. A. Engler, 21: 470-507. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Janzen, D.H. (1968). Reproductive behavior in the *Passifloraceae* and some of its pollinators in the Central America. *Behavior* 32; 33-48.
- Kanno, A., Saeki, H., Kameya, T., Saedler, H and Theissen, Günter. (2003). Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Molecular Biology* 52: 831–841.

- Kay, E. (2003). Floral evolutionary ecology of *Passiflora* (Passifloraceae) subgenera *Murucuia*, *Pseudomurucuja* and *Astephia*. Doctoral Dissertation. Saint Louis University, St. Louis, MO.
- Killip, E.P. (1938). The American species of Passifloraceae. Publications of the Field Museum of Natural History, Botanical Series 19: 1–613.
- Kim, S., Koh, J., Mi-Jeong, Y., Hongzhi, Kong, Hu, Y., Hong, M., Soltis, P.S. and Soltis, D. E (2005). Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: implications for the evolution of floral regulators. *The Plant Journal* 43: 724–744.
- Knuth, P. (1904). *Handbuch der Bluetenbiologie* III. Engelmann, Leipzig.
- Kramer, E.M., Holappa, L., Gould, B., Jaramillo, M.A, Setnikov, D. and Santiago, P.M. Elaboration of B gene function to include the identity of novel floral organs in the lower eudicot *Aquilegia*. *Plant Cell* 19: 750–766.
- Kumar, S., Tamura K.; Jacobsen, I.; Nei N., (2000). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Pennsylvania and Aryzona State University, University Park, Pennsylvania and Tempe, Aryzona. *Systematic Botany* 30:139-152.
- Kunze, H. (1990). Morphology and evolution of the corona in Asclepiadaceae and related families. *Tropische und Subtropische. Pflanzenwelt* 76: 1-49.
- Koschnitzke, C. & Sazima, M. (1997). Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. *Revista Brasileira de Botânica* 20: 119-126.
- Krizek, B.A. & Fletcher, J.C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature* 6: 688-698.
- Krosnick, S.E. & Freudenstein, J.E., (2005). Monophyly and Floral Character Homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection Disemma). *Systematic Botany* 30:139–152.
- Lamb R.S. & Irish V.F. (2003). Functional divergence within the *APETALA3/PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100: 6558-6563.
- Lawton-Rauh, A.L., Alvarez-Buylla, E.R. and Purugganan, M.D. (2000). Molecular evolution of flower development. *Tree Review* vol. 15.
- Lindberg, A.B. & Olesen, J.M. (2001). The fragility of extreme specialization: *Passiflora mixta* and its pollinating hummingbird *Ensifera ensifera*. *Journal of Tropical Ecology* 17: 323- 329.

- Lindman, C.A.M. (1906). Zur Kenntnis der Corona einiger Passifloren. In Botaniska Studier Tillägnade F. R. Kjellman, ed. R. Sernander, N. Svedelius, and C.O. Noren: 55-79.
- Ma, H., Yanofsky, M.F and Meyerowitz, E.M (1991). AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Development*: 5, 484–495.
- MacDougal, J.M. (1994). Revision of *Passiflora* Subgenus *Decaloba* Section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). American Society. Plant Taxonomists Systematic Botany Monographs 41.
- Mandel, M. A., C. Gustafson-Brown, B. Savidge, and M. Yanofsky. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360:273–277.
- Masters, M.T. (1871). Contributions to the natural history of the Passifloraceae. *Transactions of the Linnean Society of London* 27: 593–645.
- Mizukami, Y. & Ma, H. (1997). Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell* 9:393–408.
- O'Brien, T.P. & McCully, M.E. (1964). *The Study of Plant Structure. Principles and Selected Methods*. Termarcarphi, Melbourne.
- Parenicová, L., Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. and Colombo, L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: New openings to the MADS world. *Plant Cell* 15: 1538-1551.
- Payer, J.B. (1857). *Traite´ d'organoge´nie compare´e de la fleur*. Paris: V. Masson.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F. (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.
- Poupin, M.J., Federici, F., Medina, C., Matus, J.T., Timmermann, T and Arce-Johnson, P. (2007). Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box *TM6*, *PISTILLATA* and *APETALA3* genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene* 404: 10-24.
- Puri, V. (1947). Studies in floral anatomy VI. Vascular anatomy of the flower of certain species of the Passifloraceae. *American Journal of Botany* 34: 562-573.

- Puri, V. (1948). Studies in floral anatomy. V. On the structure and nature of the corona in certain species of the Passifloraceae. *Journal Indian Botanical Society* 27: 130-149.
- Purugganan M.D., Rounsley S.D., Schmidt R.J., Yanofsky.M. (1995). Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics* 140: 345-356.
- Riechmann J.L., Krizek B.A., Meyerowitz E.M. (1996). Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA* and *AGAMOUS*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 4793–4798.
- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biology Chemistry* 378: 1079-1101.
- Rounsley, S.D., Ditta, G.S. and Yanofsky, M.F. (1995). Diverse roles for MADS-box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 7: 1259–1269.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. Software: Primer3, 1998. http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.html
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 4: 406-425.
- Sazima, M. & Sazima, I. (1978). Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. *Biotropica* 10: 100-109.
- Sazima, I. & Sazima, M. (1989). Mamangavas e irapuás (Hymenoptera, Apoidea): visitas, interações e consequências para a polinização do maracujá (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 33: 108-118.
- Semir, J. & Brown Jr.K.S. (1975). Maracujá: a flor da paixão. *Revista Geográfica Universal* 2: 40-47.
- Snow, A. A. (1982). Pollination intensity and potential seed set in *Passiflora vitifolia*. *Oecologia* 55: 231-237.
- Snow, D.W. & Snow, B.K. (1980). Relationships between hummingbirds and flowers in the Andes of Colombia. *Bulletin of the British Museum (Natural History: Zoology)*, London 38 : 105-139.
- Soltis, D.E., Chanderbali, A.S., Kim, S. Buzgo, M. & Soltis, P.S. (2007). The ABC Model and its Applicability to Basal Angiosperms. *Annals of Botany* 100: 155–163.

- Theissen, G. (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 75–85.
- Theissen, G. Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.U. and Saedler, H. (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42: 115-149.
- Theissen, G. & Saedler, H. (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature* 409: 469– 471.
- Tillett, S.S. (1988). Passions Passifloras II: terminologia. *Ernstia* 48: 1–40.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Thomson, J.D. & Wilson, P. (2008). Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence and directionality. *International Journal Plant Sciences* 169: 23-38.
- Ulmer, T. & MacDougal, J.M. (2004). *Passiflora*, Passion flowers of the world. Timber Press, Cambridge, UK.
- Vandenbussche, M., Zethof, J., Royaert, S., Weterings, K., Gerats, T. (2004). The duplicated B-class heterodimer model: whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell* 16: 741–754.
- Varassin, I.G. (1992). A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Bioquímica floral e implicações ecológicas). Monografia UFES, Vitória.
- Varassin, I.G., Trigo, J.R. and Sazima, M. (2001). The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 139-152.
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Ferreira-Alves, M. and Meyerowitz, E.M. (2004). Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant cell* 16: 1314-1326.
- Wilde, W.J.J.O. (1974). The genera of tribe Passiflorae (Passifloraceae), with special reference to flower morphology. *Blumea* 22: 37-50.

Yao, J., Dong, Y., Morris, B.A. (2001). Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 3: 1306-1311.