

**Ontogênese do complexo de gemas em *Passiflora* L.
(Passifloraceae) e expressão de *PasAP1*, ortólogo
de *APETALA1***

**Ontogenesis of the bud complex in *Passiflora* L.
(Passifloraceae) and expression of *PasAP1*,
APETALA1 ortholog**



José Hernandes Lopes Filho

Ontogênese do complexo de gemas em
Passiflora L. (Passifloraceae) e expressão de
PasAP1, ortólogo de *APETALA1*

Ontogenesis of the bud complex in *Passiflora* L.
(Passifloraceae) and expression of *PasAP1*,
APETALA1 ortholog

São Paulo

2015

José Hernandes Lopes Filho

Ontogênese do complexo de gemas em
Passiflora L. (Passifloraceae) e expressão de
PasAP1, ortólogo de *APETALA1*

Ontogenesis of the bud complex in *Passiflora* L.
(Passifloraceae) and expression of *PasAP1*,
APETALA1 ortholog

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Gladys
Flávia de Albuquerque Melo-de-
Pinna

São Paulo

2015

Hernandes-Lopes, José

Ontogênese do complexo de gemas
em *Passiflora* L. (Passifloraceae) e
expressão de *PasAPI*, ortólogo de
APETALA1.

153 páginas.

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. gavinha; 2. bráctea; 3. meristema
floral; 4. *API*; 5. meristema axilar

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Gladys Flávia de A. Melo de Pinna
Orientadora

Dedico esta tese à minha
querida avó, Ana Faria Lopes
(*in memoriam*), por todo o
carinho, todas as histórias e
todas as rosquinhas...

“For me, it is far better to grasp the Universe as it really is than to persist in delusion, however satisfying and reassuring”

- Carl Sagan

Agradecimentos

À minha querida orientadora, **Gladys Flávia Melo de Pinna**, por todos esses quase 11 anos de carinho e orientação. Por sempre ter me incentivado a seguir o meu próprio caminho, seja na hora de desenvolver um projeto que abordasse uma nova área para nós, quanto na minha decisão de passar um ano na Holanda trabalhando em projetos paralelos ao projeto principal do doutorado.

Ao **Marcelo Dornelas**, por me cativar com o mundo da biologia molecular, por todos os ensinamentos compartilhados e pela colaboração com o doutorado. Agradeço também pela oportunidade de me deixar participar em sua colaboração com a Wageningen UR.

À **Marie-Anne Van Sluys**, por ter sido sempre muito solícita com o uso da casa de vegetação e também por ter me disponibilizado tão prontamente toda a estrutura do GaTE-lab, onde pude desenvolver grande parte das técnicas moleculares ao longo do doutorado.

Aos docentes do Laboratório de Anatomia Vegetal: **Berta Lange de Morretes**, **Nanuza Luiza de Menezes**, **Verônica Angyalossy**, **Gregório Ceccantini**, **Gladys Flávia Melo de Pinna** e **Diego Demarco**, por todo o apoio e conhecimento cedidos.

Às técnicas do Laboratório de Anatomia Vegetal, **Tassia dos Santos** e **Gisele Costa**, pelo carinho, amizade, e por toda a prestatividade no laboratório (e fora dele também), ao longo de todos esses anos.

A toda equipe do GaTE-lab, por todas as “mãozinhas” e dicas com biomol, especialmente à **Sárah Oliveira**, **Paula Turrini** e **Andrés Cruz**, a quem eu mais recorri nos momentos de desespero. Gostaria de agradecer especialmente à **Tatiana Corrêa**, técnica do GaTE, por ter sido extremamente solícita com toda e qualquer coisa que precisei, e claro, também pela amizade e pelos inúmeros cafés =)

Ao professor **Marcos Buckeridge** por me ceder espaço em sua casa de vegetação, bem como ao **Erismaldo Oliveira** e **Homelhan Barbosa** pelo cuidado com as plantas.

A todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente com a execução do projeto. Em especial à **Renata Lemos** e **Alexandre dos Santos**, que trabalharam como técnicos do projeto e ao **Francisco Aires**, que desenvolveu seu projeto de IC vinculado ao projeto desta tese. Ainda à **Renata Lemos** e **Juliana Brasileiro** por cederem material referente a diversas espécies de *Passiflora* que não estavam originalmente nos planos para o presente trabalho.

À equipe de alunos da professora Gladys: **Aline Siqueira**, **Cristina Zampieri**, **Fernanda Cordeiro**, **Juliana Brasileiro**, **Lígia Keiko**, **Marília Duarte**, **Rafael Cruz**, **Renata Lemos**, “*et al.*”, por todo o apoio na revisão de textos, discussões enriquecedoras, ajudas emergenciais e pela amizade.

À **Renata Lemos**, pela amizade de todos esses anos desde o início da graduação, por todas as inumeráveis ajudas que me deu desde sempre, pelos deliciosos bolos, pelas viagens e por todo o carinho.

À **Aline Siqueira**, minha “contraparte” nesse mundo, sempre feliz, sorridente e otimista. Obrigado pelos momentos de diversão e por toda a ajuda com as hibridizações “*in situ*” e pelos unicórnios felizes... renderam boas risadas =P

À **Fernanda Cordeiro**, por toda a imensa ajuda no laboratório, por todas as vezes que gritou comigo pra me acalmar e me colocar de novo no rumo certo das coisas, e por compreender a minha rabugentice.

A todos os graduandos e pós-graduandos que compartilharam o laboratório comigo durante todo esse tempo (seria impossível citar o nome de todos), especialmente àqueles mais próximos (**Karina Bertechine**, **Keyla Rodrigues**, **Yasmin Hirao**, **Mariana Victorio**, **Thália Gama**, entre tantos outros já citados, ou não).

Ao **Instituto de Biociências** da Universidade de São Paulo, sobretudo ao **Departamento de Botânica**, por fornecer toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela bolsa concedida. Também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de doutorado sanduíche na Holanda.

Ao **Ruud de Maagd**, **Richard Immink** e **Gerco Angenent**, por terem me recebido de maneira tão acolhedora em Wageningen e terem me dado a oportunidade

de trabalhar junto ao grupo PDS, onde aprendi muito sobre uma área na qual eu quase não possuía experiências práticas. Ainda ao **Ruud** não só pela questão profissional, mas por ter “preparado o terreno” para minha viagem a Wageningen.

Ao **Michiel Lammers** e à **Froujke van der Wal**, técnicos do grupo PDS, por toda a paciência que tiveram comigo, por todos os ensinamentos de laboratório, e por todas as risadas que compartilhamos durante um ano.

Também a todo o corpo docente e discente do grupo PDS, pelos bons momentos no laboratório e pelos passeios nos dias ensolarados. Em especial à **Leonie Verhage**, pela amizade, carinho, paciência, e dicas no laboratório.

Ao **Denis Santiago** e **Diego Rocha**, com quem integrei o “The Three Musketeers” de Wageningen. Dividimos uma casa por um ano e, superando todas as minhas expectativas, foi uma convivência muito boa (mesmo com todo o sertanejo que vocês ouvem). Obrigado pelo companheirismo, as boas cervejas, as viagens, e todo o resto. Vocês se tornaram verdadeiros irmãos.

Aos amigos que fiz em Wageningen: **Greice Lubini, Ana Corguinha, Cris Gruimarães, Lilian Abreu, Daniel Ribeiro, Wilson Pereira, Martin Klompaker, Cris Brito, Arno Brichta, Anabele Moura, Jennifer de Jonge, Livia Scorza, Bandan Chakraborty, Suraj Jamge, Desalegn Etalo**, entre tantos outros. Com certeza esse um ano de Holanda não teria sido o mesmo sem vocês. Também à **Barbara Tomotani**, com quem fiz a graduação e que se tornou minha vizinha em Wageningen.

À Turminha Reunida, **Gustavo Burin, Tassia Santos, Renata Lemos e Luiza Teixeira**. Pelos bons momentos que dividimos dentro e (especialmente) fora do laboratório. Obviamente continuaremos “Xatiados” com as mazelas da vida, mas fica aí a nossa Amizade como prêmio de consolação.

Também aos meus queridos amigos de longa data e de fora do laboratório, em especial ao **Thiago de Almeida**, por todas as confusões e por quase me arrancar um dente; ao **Fernando Belmonte**, pelas incontáveis horas de risadas, jogos e AboobA; ao **Rafael Buono**, por sempre me ouvir e (tentar) me por nos trilhos; ao **Thiago Cleto** por ser um pentelho chato sempre pronto pra diversão; à **Joice Savietto e Rodrigo Atique**, grandes amigos com quem vivi por muito tempo, por além de tudo, sempre me cederem um espacinho em sua (e minha ex) casa quando eu precisei.

Ao **Wilson Garcia**, por me aturar e por ter permanecido ao meu lado mesmo após um longo ano de distância.

Às minhas queridas irmãs, **Paula Hernandes** e **Renata Hernandes**, pelo carinho de sempre. Também ao meu cunhado, **Leonardo Pires**, que não deixa de ser uma espécie de irmão.

Aos meus pais, **José Hernandes** e **Nelly Hernandes**, por todo o carinho que têm comigo. Obrigado por terem me dado toda a base e me incentivado em minhas escolhas. Agradeço também pela compreensão dos meus longos períodos de ausência.

Por fim, aos meus avós, **Ana Faria**, **João Hernandes**, **Yolanda Rebelo** e **Joaquim Rebelo**. Pela compreensão, apoio, e por terem sido parte tão importante da minha vida. Embora dois de vocês tenham seguido adiante, guardarei para sempre o carinho.

Resumo

A axila foliar em *Passiflora* L. (Passifloraceae) apresenta uma estrutura complexa: de um mesmo ponto parecem surgir flores e gavinhas, além de uma gema vegetativa também estar presente. A origem da gavinha foi interpretada de diferentes maneiras ao longo da história, sendo considerada desde modificações de um ramo até uma flor. Além disso, a ontogenia dessas estruturas tem início em um único meristema axilar, que geralmente é descrito como capaz de se dividir em dois ou mais meristemas (chamado de “complexo de gemas”), cada qual dando origem a uma estrutura diferente (gavinhas e flores). Estudos de expressão gênica demonstram a presença do ortólogo do gene *LEAFY* de *Arabidopsis*, em meristemas axilares, florais e de gavinhas, em duas espécies de *Passiflora*. Esse gene é tipicamente relacionado à transição de fase vegetativa para reprodutiva em diversas angiospermas. Assim, o presente estudo objetivou descrever em detalhes a ontogenia das diferentes estruturas originadas no meristema axilar de diferentes espécies, focando em diferentes fases de vida da planta, bem como averiguar a expressão de ortólogos de *APETALAI* (*API*), um gene tipicamente relacionado à identidade de meristemas florais e na determinação de sépalas e pétalas. Como resultado, propomos uma nova interpretação para a ontogenia do complexo de gemas, baseada na produção de brácteas e seus meristemas associados. Demonstramos também que o ortólogo de *API* se expressa de maneira mais ampla do que aquela encontrada no modelo *Arabidopsis*, possivelmente desempenhando diversas funções relacionadas à manutenção da indeterminação celular.

Abstract

The leaf axil in *Passiflora* L. (Passifloraceae) bears a complex structure: a tendril and one or more flowers seem to arise from the same growing point. In addition, vegetative bud is also present. There are many different interpretations for the origin of the tendril in this group, ranging from modifications of flowers to side shoots. Also, the ontogeny of these structures is often understood as a single meristem which subdivides into a bud complex, comprising the tendril and flower meristems. Recently, the expression of the *LEAFY* ortholog was demonstrated in the axillary, tendril and floral meristems of two *Passiflora* species. In *Arabidopsis* and many angiosperms, this gene is responsible for the shift between vegetative and reproductive phase. Therefore, the present work aimed to describe, in detail, the ontogeny of the bud complex in *Passiflora* species belonging to different subgenera, including different life stages. The expression of the ortholog of *APETALA1*, a gene typically related to floral meristem identity and sepal/petal specification was also assessed. As results, we propose a different interpretation for the ontogeny of the bud complex, based on the production of bracts and their associated meristems by the original axillary meristem, which then turns into the tendril meristem. We also demonstrate that expression of *API* is much broader than that of the *Arabidopsis* model, and possibly have many other functions related to cell indeterminacy.

Índice

Introdução geral	16
Passifloraceae e o gênero <i>Passiflora</i> L.....	16
Gavinhas: conceito, ocorrência e ontogênese em <i>Passiflora</i>	19
Mecanismos do desenvolvimento reprodutivo e como podem estar relacionados com o desenvolvimento de gavinhas.....	29
Referências bibliográficas.....	39
Capítulo I - Ontogenia do complexo de gemas em <i>Passiflora</i> L.....	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Materiais e métodos.....	51
Resultados.....	54
Discussão.....	76
Conclusões.....	85
Referências bibliográficas.....	85
Capítulo II – Expressão de <i>PasAPI</i>, ortólogo de <i>APETALA1</i>, durante o desenvolvimento do complexo de gemas em <i>Passiflora</i> L.....	89
Resumo.....	90
Abstract.....	91
Introdução.....	92
Materiais e métodos.....	96
Resultados.....	102
Discussão.....	114
Conclusões.....	121
Referências bibliográficas.....	121
Considerações finais	129
Anexo	133



Introdução Geral

Introdução geral

Este capítulo introduz ao leitor o atual cenário do conhecimento acerca do desenvolvimento de gavinhas no gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae). Para tanto, a seguir, faremos a contextualização de três grandes tópicos: Passifloraceae, gavinhas em *Passiflora* e outras angiospermas, e mecanismos moleculares que podem estar relacionados ao desenvolvimento de gavinhas em *Passiflora*.

Passifloraceae e o gênero *Passiflora* L.

Passifloraceae é conhecida por possuir espécies de frutos comestíveis (maracujás) e flores com estrutura altamente complexas (Fig. 1). Desde as primeiras descrições a família foi mergulhada em misticismos, sendo as partes de suas flores associadas a diversos símbolos da crucificação de Jesus Cristo.

De fato, o simbolismo era tão forte que Linnaeus, ao nomear o gênero, utilizou *Passiflora*, ou *flos passionis* (*flos* = flor, *passio* = sofrimento; Vanderplank, 2000; Kugler & King, 2004). Já o nome popular em português, “maracujá”, origina-se do termo indígena “Mara-Cuiá”, que significa “comida preparada em cuiá” (Fumis & Sampaio, 2007), um indicativo de que os frutos de *Passiflora* são utilizados na alimentação desde antes da chegada dos portugueses ao Brasil.

À família pertencem plantas de interesse econômico, tanto ornamental quanto alimentício e medicinal. Espécies como *Passiflora alata* Curtis (maracujá doce) possuem frutos comestíveis, sendo *Passiflora edulis* Sims a espécie mais comumente cultivada em larga escala para fins alimentícios, possuindo mais de cem variedades. Na medicina, *Passiflora incarnata* L., é utilizada como calmante, ansiolítico e no tratamento de hipertensão, e *Passiflora capsularis* L., utilizada por mulheres para regular o fluxo menstrual (Cervi, 1981; Feuillet, 2004; Ulmer & MacDougal, 2004).



Figura 1. Representantes de *Passiflora* exibindo suas flores com estrutura complexa. **A.** *Passiflora suberosa* L.. **B.** *Passiflora morifolia* Mast.. **C.** *Passiflora miersii* Mast.. **D.** *Passiflora edmundoi* Sacco.

O primeiro grande trabalho envolvendo a família foi realizado por Linnaeus, em 1745, no qual descreveu 22 espécies do gênero *Passiflora*. Ao longo da história, diversos pesquisadores renomados trataram da taxonomia do grupo, como Lamarck, de Candolle, von Martius e até mesmo Darwin (Vanderplank, 2000).

Passifloraceae possui distribuição tropical e subtropical, tendo seu centro de origem na América do Sul. Enquanto classificações tradicionais consideram entre 630 e 700 o número de espécies, a classificação mais recente e abrangente reconhece 975 espécies distribuídas em 27 gêneros, dos quais cinco ocorrem no Brasil, representados por cerca de 120 espécies (Vanderplank, 2000; Feuillet, 2004; Feuillet & MacDougal, 2003; Judd *et al.*, 2008; Souza & Lorenzi, 2008; APGIII, 2009; Simpson, 2010).

Essa discrepância no número de espécies ocorre devido à incorporação das antigas famílias Turneraceae e Malesherbiaceae à Passifloraceae, cada uma formando uma subfamília monofilética juntamente com a subfamília Passifloroideae, ou seja, Passifloraceae *stricto sensu* (Tokuoka, 2012). Em Passifloraceae *s.s.*, duas tribos são reconhecidas: Paropsieae, composta por plantas lenhosas de hábito arbóreo e arbustivo; e Passifloreae, composta por lianas e trepadeiras (Bernhard, 1999). Uma das sinapomorfias apontadas para esta última tribo é a presença de gavinhas axilares (Muschner *et al.*, 2003; Hearn, 2006; Tokuoka, 2012).

Passiflora L. (Passifloreae), o gênero mais diversificado da família, compreende mais de 525 espécies classificadas em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* L.. Os dois últimos são considerados monofiléticos e juntos formam um clado bem sustentado por dados moleculares (Feuillet & MacDougal, 2003; Muschner *et al.*, 2003; Ulmer & MacDougal, 2004; Hansen *et al.*, 2006; Yotoko *et al.*, 2011; Milward-de-Azevedo *et al.*, 2014).

O subgênero *Astrophea* é composto por 57 espécies, das quais apenas duas não são nativas da América do Sul e Central. Seus representantes são principalmente lianas, ocorrendo também pequenas árvores, de folhas não lobadas e possuindo pequenas estípulas. Apresentam inflorescências que portam de uma a cinco flores, raramente formadas na base de gavinhas e apresentando brácteas diminutas. Gavinhas podem estar presentes ou ausentes (Ulmer & MacDougal, 2004; Feuillet & MacDougal, 2007).

Deidamioides, o menor subgênero, possui apenas 13 espécies nativas da América Central e do Sul. Apresenta espécies de hábito lianescente, portadoras de gavinhas raramente ramificadas ou com discos apicais. Apresentam folhas não lobadas, raramente compostas, com estípulas reduzidas. Inflorescências portando uma a duas

flores, às vezes produzidas na gavinha, portadoras de brácteas diminutas (Ulmer & MacDougal, 2004; Feuillet & MacDougal, 2007).

Decaloba compreende 220 espécies com distribuição na América do Norte, América do Sul, sudeste da Ásia e Austrália. São geralmente pequenas trepadeiras herbáceas, apresentando folhas muitas vezes bilobadas ou trilobadas, com o lobo central reduzido e com estípulas que podem ser laminares ou filiformes. Suas inflorescências portam de uma a vinte flores, raramente formadas nas gavinhas. Geralmente apresentam três brácteas que podem ser diminutas e/ou filiformes, ou então conspícuas e folhosas (Ulmer & MacDougal, 2004; Feuillet & MacDougal, 2007).

Por fim, o subgênero *Passiflora* é o mais diverso, composto por 240 espécies e ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até a América do Sul. Suas espécies são trepadeiras herbáceas ou lianas, portadoras de folhas não lobadas ou com até sete lobos, sendo geralmente trilobadas. Demonstram grande diversidade de estípulas, que podem se apresentar desde muito reduzidas a folhosas e conspícuas. As espécies são descritas muitas vezes como produzindo apenas flores solitárias, nunca presentes nas gavinhas, e portadoras de três brácteas, geralmente conspícuas e folhosas (Ulmer & MacDougal, 2004; Feuillet & MacDougal, 2007).

É evidente, portanto, que *Passiflora* exibe grande variação morfológica de algumas estruturas, especialmente aquelas relacionadas ao desenvolvimento reprodutivo, como as brácteas e as gavinhas.

Gavinhas: conceito, ocorrência e ontogênese em *Passiflora*

Gavinhas são órgãos longos, delgados, filiformes e sensíveis ao toque, podendo ser derivados de caules, folhas ou pedúnculos florais, ramificados ou não (Darwin, 1865; Isnard & Silk, 2009).

Talvez devido à sua capacidade de responder ao toque ou devido à sua forma incomum de crescimento, as gavinhas despertaram a curiosidade de muitos pesquisadores interessados nas mais diversas áreas de estudo. O próprio Charles Darwin ficou muito intrigado por estas estruturas e dedicou algum tempo a estudá-las. Em seu trabalho de 1865, posteriormente também publicado em formato de livro (1875), Darwin descreve a morfologia e o comportamento de gavinhas em diversas famílias, explorando, sobretudo, estudos sobre seus movimentos e capacidade de se prender a suportes.

Em geral, gavinhas apresentam três tipos de movimento: (1) circunutação, um movimento endógeno no qual a gavinha em crescimento descreve círculos ou elipses, aumentando assim a probabilidade de contato com um suporte; (2) enrolamento de contato, que é o enrolamento da região irritável da gavinha, geralmente sua porção terminal, em resposta a um estímulo mecânico; (3) enrolamento livre, no qual a gavinha desenvolve enrolamentos helicoidais ao longo de seu eixo, não necessariamente como resultado de estímulo mecânico. Este último tipo de movimento muitas vezes pode ocorrer após o enrolamento de contato e acaba por aproximar o caule e seu suporte (Jaffe & Galston, 1968).

Alguns pesquisadores investigaram os mecanismos pelos quais as gavinhas percebem e reagem ao contato, conduzindo, por exemplo, experimentos nos quais estas eram submetidas a diferentes forças mecânicas para avaliar a tensão máxima que eram capazes de suportar, ou averiguar o efeito causado por tais estresses na estrutura e desenvolvimento do órgão (Darwin, 1865; Brush, 1912).

Anatomicamente, o processo responsável pelo enrolamento parece estar diretamente relacionado à formação de fibras gelatinosas (Meloche *et al.*, 2007; Bowling & Vaughn, 2009). Há uma correlação entre o padrão de disposição das fibras

gelatinosas e a direção de enrolamento, de maneira que gavinhas que se enrolam em todas as direções exibem um cilindro oco de fibras próximo à sua periferia, enquanto gavinhas que se enrolam apenas em uma direção apresentam essas fibras sempre na porção côncava do enrolamento (Bowling & Vaughn, 2009).

Jaffe & Galston (1968) fazem uma revisão sobre gavinhas em diversos grupos, abordando diferentes aspectos conhecidos até então e reúnem informações relevantes que demonstram a grande diversidade deste órgão em angiospermas (tabela 1).

Diversos grupos de plantas adquiriram gavinhas independentemente ao longo da evolução, representando assim um caso de convergência evolutiva. Por consequência, gavinhas são definidas por sua forma e função, e não por uma origem ontogenética comum, podendo ser derivadas de diferentes estruturas (Putz & Holbrook, 1991; Gerrath *et al.*, 2008). Neste sentido, gavinhas são alvo muito interessante para estudos evolutivos e de evolução do desenvolvimento.

Em Bignoniaceae, por exemplo, a gavinha surge como modificação de folíolos terminais e exibe grande diversidade, podendo ser simples, bífida, trífida ou multífida (Sousa-Baena *et al.*, 2014). Na tribo Bignonieae, Sousa-Baena *et al.* (2014) demonstram a evolução deste caractere, propondo mecanismos de desenvolvimento que podem explicar a diversidade de formas encontradas. Gavinhas simples parecem perder a capacidade organogenética precocemente ao longo do desenvolvimento, enquanto que gavinhas ramificadas retêm essa capacidade, refletida no atraso na diferenciação de células epidérmicas em relação às gavinhas simples.

Espécie	Origem	Comprimento (mm)	Ramificação	Circunutação		Irritabilidade		Peso mínimo para excitação (mg)	Tempo de Reação
				Gavinha	Internó	Dorsal	Ventral		
Passifloraceae									
<i>Passiflora gracilis</i>	PF	250	?	+	+	?	+	1,0	25 s
<i>P. punclaia</i>	PF	?	?	+	-	-	+	4,6	5-10 min
<i>P. quadrangularis</i>	PF	?	?	+	-	-	+	?	2 h
<i>P. floribunda</i>	PF	?	?	+	-	?	?	?	?
<i>P. coerulea</i>	?	150	?	+	+	+	+	?	20 s
<i>P. alba</i>	?	?	?	+	?	?	?	?	?
<i>Tacsonia manicala</i>	PF	?	?	+	-	?	+	?	7 min
Sapindaceae									
<i>Cardiospermum halicabum</i>	PF	25	Sim	+	+	?	+	?	1,75 h
Vitaceae									
<i>Vitis vinifera</i>	PF	500	Sim	+	+	?	+	?	?
<i>Ampelopsis hederecea</i>	PF	127	Sim	-	-	?	+	?	?
<i>Cissus discolor</i>	PF	127	Sim	+	-	+	+	9,3	35 min
<i>C. antarclicus</i>	PF	?	Sim	+	-	+	+	?	3 h
Bignoniaceae									
<i>Bignonia unguis</i>	F	12	Sim	?	+	+	+	?	?
<i>B. iweedyana</i>	?	?	Sim	+	+	?	?	?	?
<i>B. venusta</i>	F	?	Sim	+	+	+	-	?	?
<i>B. litloralis</i>	F	228	Sim	+	+	+	-	?	4 min
<i>B. aequinoctialis</i>	F	?	Sim	?	?	?	?	?	?
<i>B. speciosa</i>	F	127	Não	+	+	+	+	?	?
<i>B. capreolata</i>	F	64	Sim	+	+	+	+	?	10 min
<i>Eccremocarpus scaber</i>	F	75	Sim	+	+	+	+	?	10 min
Polemoniaceae									
<i>Cabaea scandens</i>	F	279	Sim	+	-	+	+	?	?

Espécie	Origem	Comprimento (mm)	Ramificação	Circunutação		Irritabilidade		Peso mínimo para excitação (mg)	Tempo de Reação
				Gavinha	Internó	Dorsal	Ventral		
Cucurbitaceae									
<i>Echinocystis lobata</i>	F ou PF	?	?	+	+	-	+	?	?
<i>Hanburya mexicana</i>	F ou PF	?	Sim?	+	+	?	+	?	?
<i>Bryonia dioica</i>	F ou PF	?	?	+	?	-	+	?	?
<i>B. alba</i>	F ou PF	?	?	+	?	?	?	?	?
<i>Echinocystis wrightii</i>	F ou PF	?	?	+	?	?	?	4,0	?
<i>Cucurbita ovifera</i>	F ou PF	?	?	+	?	?	+	?	?
<i>Cucumis saliva</i>	F ou PF	?	Não	+	?	?	+	?	?
<i>Anguria warscewiczii</i>	F ou PF	?	?	?	+	?	+	?	?
<i>Zanonia indica</i>	F ou PF	?	?	+	+	?	+	?	?
<i>Bryonopsis laciniosa</i>	F ou PF	?	?	+	+	?	?	?	?
<i>Sicyos angulatus</i>	?	?	?	?	?	-	+	3,5	30 s
<i>Melothria scabra</i>	?	?	?	+	?	?	?	?	?
Fabaceae									
<i>Pisum sativum</i>	F	63	Sim e Não	+	+	-	+	9,3	2 min
<i>Lathyrus aphaca</i>	?	?	Não	-	+	+	+	?	?
<i>L. grandiflora</i>	?	102	Sim	-	-	-	+	?	?
<i>L. latifolius</i>	?	?	Sim	?	?	?	+	?	?
<i>Vicia saliva</i>	?	?	?	+	+	?	?	?	?
Asteraceae									
<i>Mutisia clematis</i>	F	127	Sim	+	+	-	+	?	4 min
Smilacaceae									
<i>Smilax aspera</i>	F	38	Não	-	-	+	+	?	1 h
Fumariaceae									
<i>Corydalis claviculata</i>	F	52	Sim	+	+	?	?	8,1	18 h
<i>Dicentra Thalict trifolia</i>	F	127	Sim	+	+	+	+	8,1	30 min

Tabela 1. Diversos aspectos de gavinhas em diferentes espécies de angiospermas. **F** – Folha, **PF** – pedúnculo floral. Alterado de Jaffe & Galston (1968).

Outra condição de gavinhas derivadas de estruturas foliares bem documentada na literatura é a encontrada em algumas espécies de Fabaceae, como *Pisum sativum* (ervilha), que apresenta gavinhas em posição de folíolos terminais. Contudo, a origem de gavinhas nesta espécie ainda é controversa, podendo representar folíolos modificados ou raques com crescimento determinado (Gourlay *et al.*, 2000; Tattersal *et al.*, 2005).

Embora em Fabaceae e Bignoniaceae a gavinha surja por meio da modificação de uma estrutura vegetativa, em outros táxons esta é formada por estruturas reprodutivas. Em Vitaceae, Millington (1966) já havia notado a estreita relação entre gavinhas e inflorescências, uma vez que alguns meristemas que normalmente se desenvolveriam em gavinhas, acabavam por formar inflorescências. Em *Vitis vinifera* L. (videira) é descrito que gavinhas são apenas formadas pelo meristema axilar após a planta passar pela transição do estágio de vida juvenil para o reprodutivo e o mesmo tipo de meristema passa a formar inflorescências em alguns nós e gavinhas em outros (Carmona *et al.*, 2002). Também são descritas situações intermediárias, onde uma gavinha dá origem a flores e frutos (Boss & Thomas 2002).

Em Passifloraceae as gavinhas são sempre axilares e quase sempre simples. Essas características permitem a rápida distinção da família em relação à Cucurbitaceae ou Vitaceae, que podem apresentar gavinhas saindo das laterais dos nós, geralmente ramificadas (Cusset, 1968; Ulmer & MacDougal, 2004).

Embora seja um caráter importante para a família, a natureza da gavinha não é óbvia e gera controvérsias quanto a sua interpretação. Darwin (1865) é assertivo ao afirmar a origem das gavinhas em Passifloraceae, como fica claro em sua frase “*no one can doubt that they are modified flower-peduncles*”. Contudo, ao longo do

histórico de estudos, diversos pesquisadores sugeriram diferentes possibilidades da origem dessas estruturas.

A confusão quanto à interpretação da gavinha ocorre em parte devido à estrutura complexa presente na região axilar, sobretudo no gênero *Passiflora*, no qual geralmente é encontrada uma gavinha juntamente com uma ou mais flores desenvolvendo-se em suas laterais. Além disso, na região do nó estão presentes duas gemas axilares, a mais próxima à folha dará origem à gavinha e às flores, enquanto que a mais próxima ao eixo caulinar pode, eventualmente, produzir um novo ramo vegetativo (Shah & Dave, 1970; 1971; Ulmer & MacDougal, 2004; Krosnick & Freudenstein, 2005; Cutri *et al.*, 2013). Assim, Gangstad (1938) discute as principais interpretações existentes na época:

- Pedúnculo floral modificado;
- Ramo modificado que possui uma bráctea em sua base, na axila da qual se formam outros ramos que terminam em flores;
- Resultado de uma divisão dicotômica da gema axilar, uma metade dando origem à flor, outra à gavinha;
- Brotamento da gema vegetativa presente na axila foliar;
- Ramo lateral do pedúnculo floral;
- Ramo modificado.

Para que se possa investigar a origem da gavinha em Passifloraceae, é necessário entender a estrutura da inflorescência presente nos representantes da família. Seu tipo básico é interpretado como uma cimeira composta, podendo apresentar vários graus de redução dependendo do grupo em questão (Figs. 2-3). A porção proximal do eixo principal da inflorescência é denominada de pedúnculo, enquanto sua porção terminal pode se diferenciar tanto em uma flor quanto em uma

gavinha. Dentro da inflorescência, as ramificações sempre surgem na axila de brácteas e são designadas ordinalmente conforme divergem sucessivamente a partir do eixo de primeira ordem (Krosnick & Freudenstein, 2005).

Ainda que outros gêneros de Passifloraceae apresentem um pedúnculo alongado, esta condição foi perdida na maioria das espécies de *Passiflora*, sendo que em muitos casos este é totalmente suprimido. Essa situação é caracterizada pela presença de uma gavinha originada diretamente da região da axila foliar, presente entre dois ramos de segunda ordem também originados diretamente da região axilar. Em casos de redução ainda maior, como em *Passiflora edulis*, *P. rubra* L. e *P. aurantia* G. Forst. (Fig. 3E-F), formam-se uma gavinha e um ramo lateral de segunda ordem que porta apenas uma flor (Krosnick & Freudenstein, 2005).

Embora seja um assunto interessante e controverso, poucos trabalhos tratam das estruturas presentes na axila foliar de *Passiflora* do ponto de vista anatômico e ontogenético. Brush (1912), em um experimento para averiguar a influência de diferentes forças mecânicas aplicadas às gavinhas de *Passiflora caerulea* L., descreve brevemente sua anatomia. Da periferia para o centro, a gavinha apresenta epiderme, colênquima, parênquima com paredes pouco espessadas, floema, xilema (formando um cilindro completo quando em crescimento secundário) e medula. Em gavinhas maduras, o parênquima medular preenche completamente a região central, exceto na base, que apresenta uma fistula. Além da lignificação do xilema, ocorre também lignificação do parênquima medular e de células do floema. Na base, a gavinha é cilíndrica, enquanto que na região de contato com o suporte a gavinha assume certa dorsiventralidade, principalmente devido a um maior desenvolvimento do xilema no lado em contato. Contudo, embora descreva a anatomia, o autor não apresenta imagens e não descreve a ontogênese da gavinha.

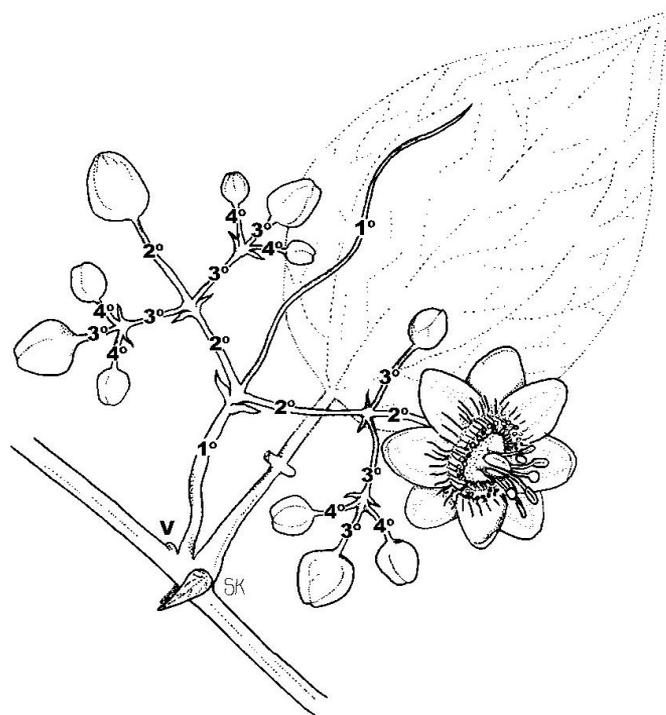


Figura 2. Modelo hipotético de inflorescência em Passifloraceae. O eixo de primeira ordem (porção proximal = pedúnculo) pode terminar tanto em gavinha quanto em flor, seguindo sucessivas ramificações até a quarta ordem. A gema vegetativa (V) situa-se superiormente à inflorescência na axila da folha (Retirado de Krosnick & Freudenstein, 2005).

Um dos poucos relatos dos estágios iniciais de desenvolvimento de gavinhas em Passifloraceae é dado por Shah & Dave (1970). Neste trabalho, os autores descrevem como um único meristema axilar sofre divisões para dar origem à gavinha, a flores e a um meristema vegetativo em *Passiflora foetida* L.. A estrutura que surge após a divisão do meristema axilar em diferentes meristemas é denominada “complexo de gemas” (*bud complex*), termo que adotaremos na presente tese. Finalmente, os autores concluem que a gavinha é uma gema axilar modificada, e não uma flor terminal presente na inflorescência. Em um trabalho posterior, Shah & Dave (1971) investigam mais espécies do gênero *Passiflora*, descrevendo a organogênese de flores e gavinhas. Neste trabalho, os autores corroboram a hipótese de que gavinhas não são homólogas às flores terminais e que representam um ramo de origem complexa.

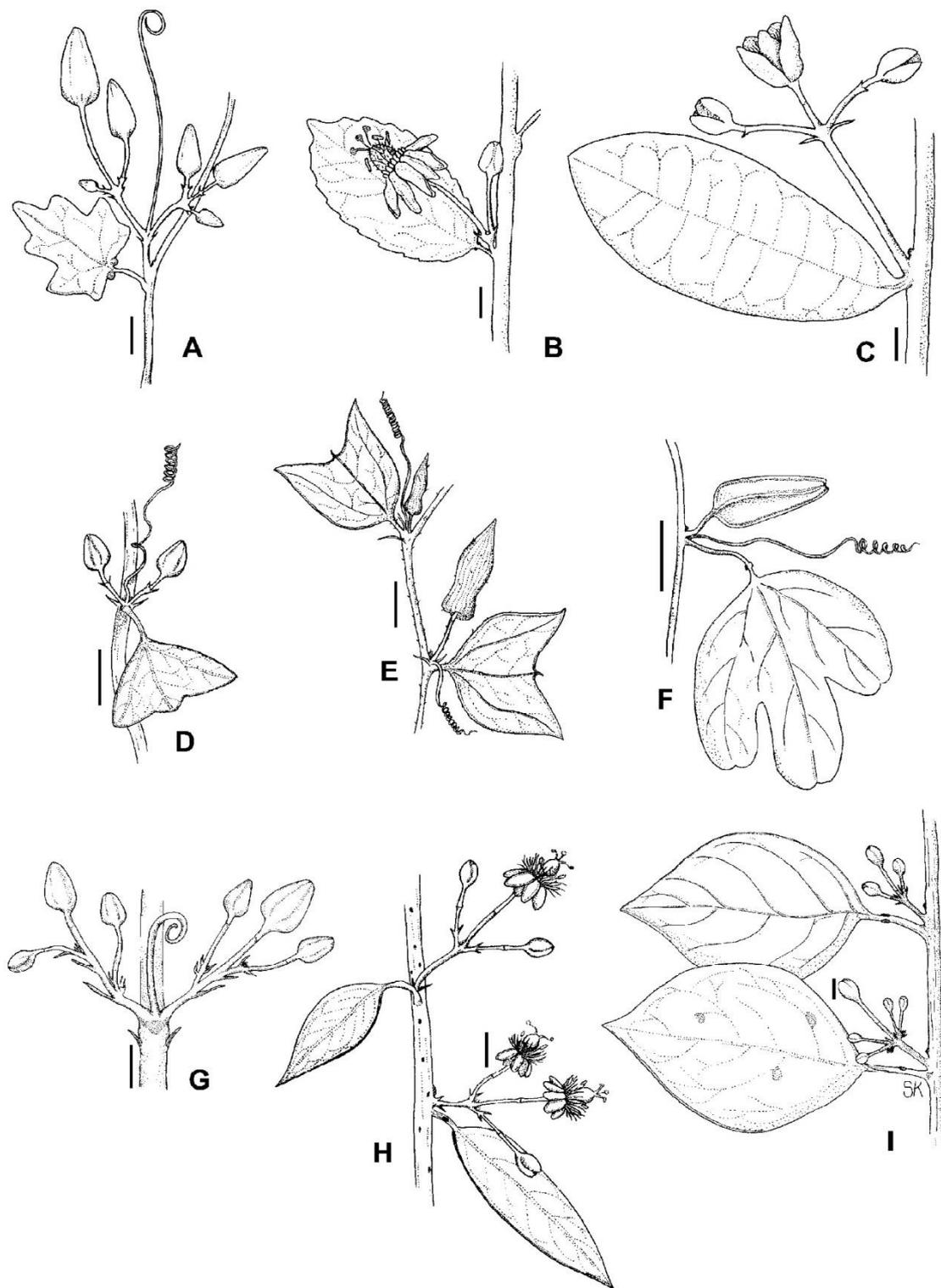


Figura 3. Inflorescência em Passifloraceae. Notar os diferentes níveis de redução do pedúnculo, bem como das ramificações. A, C, H e I apresentam pedúnculo alongado, enquanto as outras espécies apresentam pedúnculo reduzido ou ausente. A. *Adenia lobata* (Jacq.) Engl. B. *Paropsia grewoides* Welw. ex Mast. C. *Mitostemma brevifilis* Gontsch. D. *Passiflora biflora* Lam.. E. *Passiflora rubra* L. F. *Passiflora aurantia* G.Forst. G. *Passiflora albebilobata* Hemsl. H. *Tetrapathea tetrandra* Cheeseman. I. *Hollrungia* sp. Barra = 1cm (Retirado de Krosnick & Freudenstein, 2005).

De fato, nestes trabalhos não são apresentadas evidências anatômicas que sustentem a hipótese de homologia. Se as gavinhas encontradas em espécies de *Passiflora* tratam-se de flores modificadas ao longo da evolução, é de se esperar que vestígios dessa transição estejam presentes, sejam eles anatômicos (como padrões na vascularização, por exemplo) ou ontogenéticos (semelhanças entre o desenvolvimento). Por outro lado, o desenvolvimento de uma gavinha onde, em algumas espécies, ocorre a formação de uma flor, sugere a alteração no programa molecular de desenvolvimento da estrutura original, resultando na formação de um novo órgão. Como mencionado por Shah & Dave (1971), o que contribui para a mudança na diferenciação morfológica (ou seja, o que determina o destino) dos diferentes meristemas do complexo de gemas necessita ser investigado.

Mecanismos do desenvolvimento reprodutivo e como podem estar relacionados com o desenvolvimento de gavinhas

Uma vez que a produção de gavinhas em Passifloraceae é dependente da transição do estágio de vida juvenil para o não juvenil, para fins do presente estudo é importante ressaltar o atual cenário do conhecimento acerca dos mecanismos que controlam o desenvolvimento reprodutivo em angiospermas. Quando esta transição ocorre, as mudanças mais evidentes são notadas nos meristemas, que passam por mudanças de identidade, inicialmente vegetativa (meristema apical caulinar), para reprodutiva (meristema da inflorescência e floral).

Flores são frequentemente produzidas conjuntamente em uma inflorescência e meristemas florais não são os únicos meristemas reprodutivos. Portanto, quando um meristema apical caulinar sofre conversão em um meristema reprodutivo, este pode assumir a identidade de meristema de inflorescência (MI). Como resultado, o MI passa a produzir brácteas e/ou meristemas florais, em vez de folhas (Benlloch *et al.*,

2007). Após a transição para um meristema reprodutivo, o desenvolvimento geralmente segue com o rápido alongamento do eixo que formará a inflorescência, seguido pela ampliação e achatamento dos meristemas que darão origem às flores (Popham & Chan, 1952; Tepfer 1953; Esau, 1960).

A transição para um meristema floral envolve modificações morfoanatômicas conspícuas, mas também mudanças no comportamento, especialmente relacionado à interrupção do crescimento indeterminado, característico do estágio vegetativo, e à produção dos apêndices florais (Esau, 1960). Além disso, durante o crescimento vegetativo, após a formação de cada folha, o meristema cresce de forma a restaurar seu tamanho original antes da formação da próxima folha. No entanto, durante o desenvolvimento da flor, o meristema diminui gradualmente após a formação de cada peça floral até ser completamente diferenciado na formação do último verticilo, embora algumas espécies possam reter um resquício de tecido meristemático que permanece inativo (Esau, 1960).

Com o avanço nos estudos de genética e biologia molecular, sobretudo aqueles conduzidos nas plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) e *Antirrhinum majus* (Plantaginaceae), conhecemos hoje muitos dos mecanismos moleculares que norteiam o desenvolvimento reprodutivo em angiospermas. Neste contexto, um dos principais trabalhos foi o estabelecimento do “modelo ABC” de determinação da identidade dos órgãos florais, baseados em estudos de mutantes homeóticos (mutantes que exibem formação ectópica de estruturas) por Coen & Meyerowitz (1991).

Este modelo descreve como a expressão de três diferentes fatores (A, B e C), em um padrão específico dentro do meristema floral, determina a identidade dos órgãos formados. O modelo propõe que A determina a formação de sépalas; a

atividade conjunta de A e B especifica a formação de pétalas; B e C combinados determinam estames e a atividade de apenas C resulta na formação de carpelos. O modelo também propõe uma regulação negativa entre A e C, e a expressão de B nos verticilos 2 e 3 independentemente dos outros fatores.

Em *Arabidopsis*, os genes *APETALA1* (*AP1*) e *APETALA2* (*AP2*) correspondem à função de A; *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*) à função de B; *AGAMOUS* (*AG*) para a função de C (veja Irish, 2010 e Bowman *et al.*, 2012 para revisões sobre o tema).

Posteriormente, foram incorporadas ao modelo as funções D, relacionada à identidade de óvulos (Angenent, *et al.*, 1995; Angenent & Colombo, 1996), e E, necessária para a formação de todos os órgãos florais. Em *Arabidopsis* a função D é realizada pelo gene *SEEDSTICK* (*STK*), em redundância com os genes *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHATTERPROOF2* (*SHP2*) e *AG* (Pinyopich *et al.*, 2003). Já função E é realizada pelos genes *SEPALLATA1* (*SEP1*), *SEPALLATA2* (*SEP2*) e *SEPALLATA3* (*SEP3*) (Pelaz, *et al.*, 2000) (Fig. 4).

Além do controle da identidade dos órgãos florais, são também conhecidos alguns dos principais mecanismos envolvidos na transição do meristema vegetativo para os meristemas reprodutivos, bem como na manutenção de suas identidades. Os genes envolvidos neste processo são os chamados de “floral meristem identity genes” (genes da identidade meristemática floral), sendo os principais: *LEAFY* (*LFY*), *AP1*, *CAULIFLOWER* (*CAL*) e *FRUITFULL* (*FUL*) (Schultz & Haughn, 1991; Liljegren *et al.*, 1999).

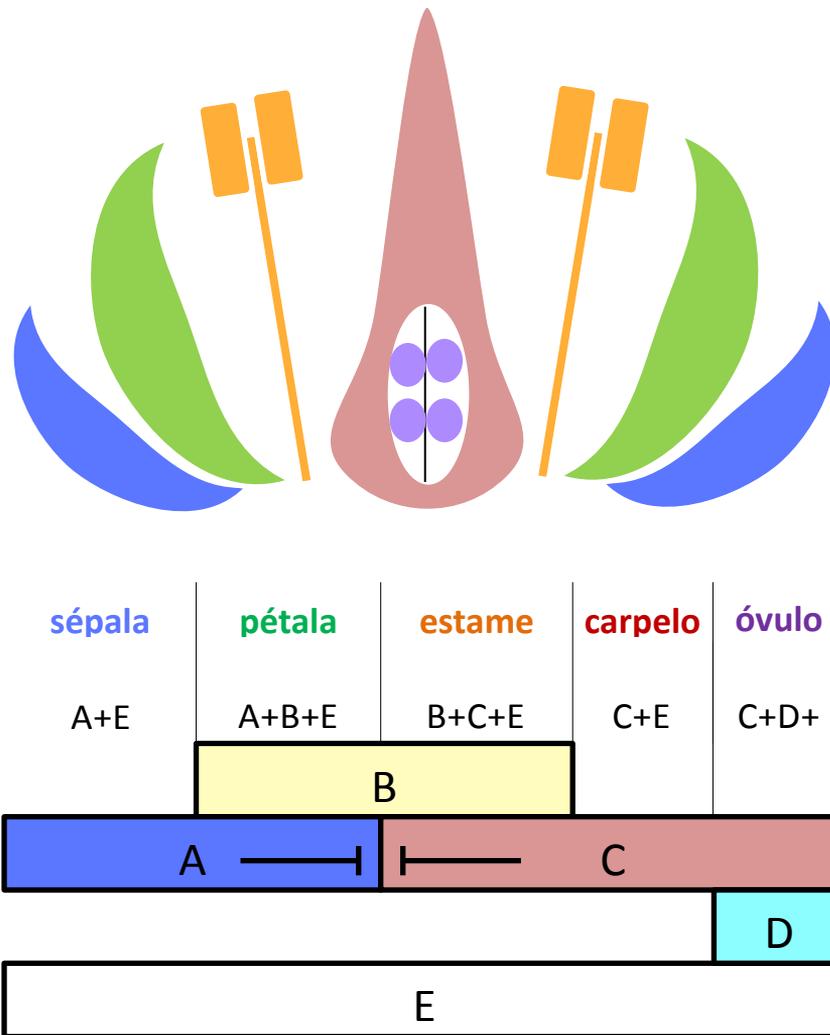


Figura 4. Representação esquemática do modelo ABC. A combinação dos diferentes fatores A, B, C, D e E determinam a identidade de cada órgão floral.

Existem na literatura diversos trabalhos e revisões sobre o tema. A seguir são pontuados alguns dos principais genes envolvidos na determinação e manutenção da identidade do meristema floral e suas funções (Blázquez *et al.*, 2006; Irish, 2010):

- *LFY* é um regulador chave no estabelecimento da identidade do meristema floral. Mutantes *lfy* são incapazes de produzir flores, enquanto a expressão ectópica de *LFY* é suficiente para induzir a floração precoce. Embora também seja expresso em primórdios foliares, este gene é fortemente expresso em resposta a sinais de indução floral, sendo uniformemente expresso em meristemas que se tornarão meristemas florais. Uma vez que

LFY regula o mecanismo de floração através da modulação de uma grande variedade de sinais de indução, ele é descrito como um integrador da via de floração. *LFY* codifica um fator de transcrição que induz fortemente a expressão de genes como *API*, *AP3* e *AG*;

- *API* e *CAL* são genes da família MADS-box derivados de uma duplicação recente ocorrida no ancestral de Brassicaceae, apresentando assim sequência e padrão de expressão muito similares em *A. thaliana*. Ambos são regulados positivamente em meristemas logo após a expressão de *LFY* e restringem suas expressões aos verticilos 1 e 2 (sépalas e pétalas) em estágios posteriores do desenvolvimento. Duplo mutantes *ap1 cal* não são capazes de transformar seus MI em MF, portanto não produzem flores;
- *AG* é um gene MADS-box que desempenha importante papel no estabelecimento do crescimento determinado do meristema floral, ou seja, especifica o fim do tecido meristemático durante a formação dos carpelos. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição da expressão de *WUSCHEL* (*WUS*), um gene responsável pela manutenção de células não diferenciadas no meristema;
- *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, embora não seja um gene de identidade meristemática floral, está diretamente relacionado à definição da arquitetura floral. *TFL1* codifica um fator de transcrição que regula negativamente *LFY* e *API* em meristemas não florais, de maneira a manter o crescimento vegetativo indeterminado, prevenindo que a identidade floral seja assumida. Mutantes *tfl1* apresentam fenótipo oposto àqueles observados em mutantes *lfy* e *ap1*: meristemas de inflorescência tornam-se meristemas florais, sendo que as inflorescências são normalmente

reduzidas, com poucas flores, e produzindo uma flor terminal que cessa o crescimento da estrutura.

Embora a maioria das descobertas destes mecanismos tenha sido realizada nos modelos *Arabidopsis* e *Antirrhinum*, estes parecem não apenas ser relativamente conservados em angiospermas, como também ser a base da diversificação floral (Theissen & Melzer, 2007). Em uma revisão sobre o assunto, Rijpkema *et al.* (2010) discutem as principais variações do modelo. Resumidamente, segundo os autores, as variações encontradas na arquitetura de flores e inflorescências parecem estar mais ligadas ao modo como os genes interagem entre si, do que à mudanças na estrutura das proteínas as quais codificam.

Utilizando o conhecimento acumulado acerca destes mecanismos moleculares do desenvolvimento floral, podemos agora buscar compreender os processos por trás da diferenciação da gema axilar de *Passiflora* em meristemas que darão origem tanto a flores quanto a gavinhas. Para tanto, um bom ponto de partida é o modelo de desenvolvimento em *Vitis vinifera*. Como mencionado previamente, esta espécie, assim como espécies de *Passiflora*, também apresenta gavinhas formadas a partir do mesmo meristema que dá origem a estruturas reprodutivas.

Estudos realizados com *Vitis vinifera* revelaram a expressão, em gavinhas, de genes tipicamente ligados às estruturas florais, como o *VFL*, *VFUL-L* e *VAPI*, possíveis ortólogos de *LFY*, *FRUITFULL (FUL)* e *API*, respectivamente (Carmona *et al.*, 2002; Calonje *et al.*, 2004). Esses dados sugerem duas possibilidades para *Vitis*: (1) existe uma homologia entre gavinhas e inflorescências, e a expressão desses genes ocorre por manutenção, em gavinhas, da indução ocorrida em inflorescências, possivelmente não possuindo relevância para seu desenvolvimento; (2) essa

expressão é independente do processo de floração e possui um papel próprio no desenvolvimento das gavinhas.

Para testar essas ideias, Calonje *et al.* (2004) verificaram a expressão destes genes em plantas germinadas que ainda não haviam entrado em processo de floração. Como resultado, observaram que *VFUL-L* e *VAPI* se expressam mesmo na primeira gavinha formada pela planta, enquanto *VFL* não. Esse fato pode indicar que há uma função real de *VFUL-L* e *VAPI* para a formação da gavinha, independente do processo de floração.

A transição do estágio juvenil para o adulto, em *Vitis vinifera*, é marcada pela ativação de meristemas laterais, que nas plantas em crescimento vegetativo se diferenciam em gavinhas. Contudo, após indução à floração, muitos desses meristemas passam a produzir inflorescências. A base molecular do controle deste mecanismo pode ser a expressão do gene *VFL*, uma vez que em inflorescências este mantém uma alta taxa de expressão (juntamente com *VFUL-L* e *VAPI*), enquanto que em gavinhas, sua expressão logo cessa, permanecendo ativos apenas *VFUL-L* e *VAPI* (Calonje *et al.* 2004).

Além disso, em *Vitis vinifera*, a expressão de *VAPI* difere substancialmente de *API* no que se refere à função de gene homeótico da classe A. Enquanto *API* mantém sua expressão apenas nos verticilos de sépalas e pétalas, *VAPI* cessa sua expressão no verticilo de sépalas logo que este é determinado. Sua expressão se mantém nos ápices de pétalas e estames e no carpelo em desenvolvimento, juntamente com *VFUL-L* (Calonje *et al.* 2004). A co-expressão de *VAPI* e *VFUL-L* contrasta com o que é conhecido para *Arabidopsis*, onde *API* e *FUL* exibem padrões de expressão espaciais mutuamente excludentes. Uma vez que estes genes tiveram sua origem pela

duplicação de um gene ancestral comum, seu padrão de expressão similar pode ser reflexo dessa condição ancestral (Calonje *et al.* 2004).

Outro grupo de genes com expressão observada durante o desenvolvimento de gavinha/inflorescência de *Vitis vinifera* foram os ortólogos de *TFL1*, que nesta espécie possuem três cópias: *VvTFLIA*, *VvTFLIB* e *VvTFLIC*. Estes genes mantêm sua expressão em meristemas da inflorescência e gavinha (neste caso apenas *VvTFLIA*) e cessam quando ocorre a transição para meristema floral. Contudo, estes genes também se expressam no meristema apical caulinar e radicular, sugerindo uma função na manutenção da indeterminação celular. Outra possível função associada seria a do controle da transição da fase juvenil para a adulta (início da produção de gavinhas; Carmona *et al.* 2007).

Como apontam Zhang *et al.* (2008) e Yao *et al.* (2010), genes homólogos exibem variações nos padrões de expressão em diferentes espécies, sendo importante seu estudo não só nas plantas modelos, mas também em plantas filogeneticamente distantes, permitindo assim o entendimento de seu funcionamento, bem como do mecanismo do desenvolvimento vegetal.

Dentro das eudicotiledôneas rosídeas, Vitales é um dos grupos mais basais, grupo irmão do clado formado pelas malvídeas (onde se encontra Brassicales, representada pelo modelo *Arabidopsis*) e fabídeas (onde se encontra Malpighiales, grupo ao qual pertence *Passiflora*), de acordo com a classificação mais recente proposta por APG III (2009). Dessa maneira, é esperada a presença de mecanismos moleculares mais semelhantes entre *Passiflora* e *Arabidopsis*, devido à sua proximidade filogenética, embora mecanismos semelhantes entre *Passiflora* e *Vitis*, que sejam eventualmente diferentes de *Arabidopsis*, possam ser resultado de um

acúmulo de apomorfias ao longo da evolução dos grupos aos quais pertencem *Arabidopsis* (e.g. Brassicaceae, Brassicales, Malvídeas).

Vitis e *Passiflora* assemelham-se em termos de desenvolvimento, possuindo meristemas que dão origem tanto a flores quanto a gavinhas. Além disso, em *Passiflora* também é registrada a transição nas fases de vida. Gangstad (1938) relata que em plântulas de *Passiflora incarnata*, nos primeiros oito nós, ocorre apenas uma gema vegetativa por folha, sendo produzidas gavinhas somente nos próximos nós. Já em *P. caerulea* os primeiros oito a onze nós apresentam unicamente gavinhas e uma gema vegetativa, passando também a produzir flores apenas posteriormente.

Em *Passiflora*, o ortólogo de *LFY* foi clonado em *P. edulis* (*PeLFY*) e em *P. suberosa* (*PsLFY*), tendo seu padrão de expressão analisado por Cutri (2009). Assim como em *Vitis*, *PeLFY* e *PsLFY* se expressam somente após a transição da fase juvenil para a não juvenil, sendo registrada expressão mesmo em ápices caulinares de indivíduos adultos que se encontravam fora do período de floração. Esse é um indicativo de que *PeLFY* e *PsLFY* possam estar participando ativamente da produção de gavinhas. Experimentos de hibridização *in situ* revelaram a expressão desses genes durante o desenvolvimento da gavinha, ocorrendo inicialmente no meristema axilar de maneira uniforme, antes mesmo da formação do complexo de gemas. Em estágios posteriores, a expressão restringe-se apenas à região distal da gavinha Cutri, 2009.

Esses resultados, somados à falta de mais estudos que abordem o desenvolvimento da estrutura complexa presente na axila foliar de *Passiflora*, tanto do ponto de vista anatômico quanto do molecular, nos leva a elaborar algumas questões: 1) Como se dá o desenvolvimento das estruturas derivadas do meristema axilar em *Passiflora*? 2) Estariam outros genes tipicamente relacionados à floração

participando do desenvolvimento da gavinha? 3) Como ocorre a transição do estágio juvenil para o adulto?

Para responder tais questões, estudamos detalhadamente estes processos nas duas espécies de *Passiflora* utilizadas por Cutri (2009), que representam dois morfotipos diferentes, característicos dos subgêneros *Passiflora* (*Passiflora edulis* – desenvolve unicamente uma flor lateralmente à gavinha) e *Decaloba* (*P. suberosa* – desenvolve duas flores lateralmente a uma gavinha central). Considerando a importância de estudos desse tipo para a compreensão da história evolutiva do grupo, neste estudo também são descritos aspectos ontogenéticos da gavinha em 13 outras espécies de *Passiflora*, incluindo representantes de seus quatro subgêneros.

Assim, a presente tese está dividida em dois capítulos. No primeiro, abordamos a ontogenia do complexo de gemas em espécies que possuem diferentes morfologias e aspectos do desenvolvimento, bem como abordamos diferenças encontradas entre os estágios juvenil e adulto. Como conclusão, sugerimos uma diferente interpretação para o desenvolvimento do complexo de gemas.

No segundo capítulo, investigamos a homologia da sequência de *PeAPI*, possível ortólogo de *API*, e sua expressão em diferentes tecidos de *Passiflora edulis* e de *P. suberosa*.

Por fim, em anexo se encontra um relatório de atividades científicas desenvolvidas na Wageningen University & Research centre (WUR), junto ao grupo Plant Developmental System (PDS), coordenado pelo Prof. Gerco Angenent. Esse estágio no exterior foi financiado pela CAPES e faz parte de uma colaboração entre o Professor Marcelo Carnier Dornelas (UNICAMP) e o grupo PDS. Durante a colaboração, diversos experimentos foram realizados, sobretudo relacionados ao papel dos genes MADS-box no desenvolvimento de frutos.

Referências

- Angenent, G. C.; Colombo, L. 1996. Molecular control of ovule development. **Trends in Plant Science** **1**: 228–232.
- Angenent, G. C.; Franken, J.; Busscher, M.; van Dijken, A.; van Went, J. L.; Dons, H. J.; van Tunen, a J. 1995. A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. **The Plant cell** **7**: 1569–82.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** **161**: 105 - 121.
- Benlloch, R.; Berbel, A.; Serrano-Mislata, A.; Madueño, F. 2007. Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. **Annals of botany** **100**: 659–676.
- Bernhard, A. 1999. Flower structure, development, and systematics in Passifloraceae and in *Abatia* (Flacourtiaceae). **International Journal of Plant Sciences** **160**: 135–150.
- Blázquez, M. A.; Ferrándiz, C.; Madueño, F.; Parcy, F. 2006. How floral meristems are built. **Plant molecular biology** **60**: 855–870.
- Boss, P. K.; Thomas, M. R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape “green revolution” mutation. **Nature** **416**: 847–50.
- Bowling, A. J.; Vaughn, K. C. 2009. Gelatinous fibers are widespread in coiling tendrils and twining vines. **American journal of botany** **96**: 719–727.
- Bowman, J. L.; Smyth, D. R.; Meyerowitz, E. M. 2012. The ABC model of flower development: then and now. **Development** **139**: 4095–4098.
- Brush, W. 1912. The formation of mechanical tissue in the tendrils of *Passiflora caerulea* as influenced by tension and contact. **Botanical Gazette** **53**: 453–477.
- Calonje, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J. M.; Carmona, M. J. 2004. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. **Plant** **135**: 1491–1501.

- Carmona, M. J.; Calonje, M.; Martínez-Zapater, J. M. 2007. The FT/TFL1 gene family in grapevine. **Plant molecular biology** **63**: 637–650.
- Carmona, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J. 2002. *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. **Plant Physiology** **130**: 68–77.
- Cervi, A. C.; 1981. Revisão do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) do estado do Paraná, Brasil. Tese de Doutorado. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Coen, E.; Meyerowitz, E. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**: 31–37.
- Cusset, G. 1968. Les vrilles des Passifloracées. **Bulletin de la Société Botanique de France** **115**: 45–61.
- Cutri, L. 2009. Estudo da função do gene *LEAFY* (*LFY*) em duas espécies de *Passiflora*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Cutri, L.; Nave, N.; Ami, M. Ben; Chayut, N.; Samach, A.; Dornelas, M. C. 2013. Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. **Mechanisms of development** **130**: 61–69.
- Darwin, C. R. 1865. On the movements and habits of climbing plants. **Journal of the Linnean Society of London (Botany)** **9**: 1-118
- Darwin, C. R. 1875. **The movements and habits of climbing plants**. 2.ed. John Murray, London
- Esau, K. 1960. **Anatomy of seed plants**. Wiley & Sons, New York.
- Feuillet, C. 2004. Passifloraceae (Passion Flower Family). *In*: Smith, N.; Mori, S. A.; Henderson, A.; Stevenson, D. W.; Heald, S. V. (Eds.) **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton University Press & New York Botanical Garden, Oxford.

- Feuillet, C. P.; Macdougall, J. M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora** 13: 34-38.
- Feuillet, C. P.; Macdougall, J. M. 2007. Passifloraceae. *In*: Kubitzki, K. 2007. **The families and Genera of vascular Plants**. Springer Berlin Heidelberg.
- Fumis, T. F.; Sampaio, A. C. 2007. Aspectos botânicos do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand). *In*: Leonel, S.; Sampaio, A. C. 2007. **Maracujá-doce: aspectos técnicos e econômicos**. Editora UNESP, São Paulo.
- Gangstad, V. 1938. A morphological study of the leaf and tendril of *Passiflora caerulea*. **American Midland Naturalist** 20: 704–708.
- Gerrath, J. M.; Guthrie, T. B.; Zitnak, T. a; Posluszny, U. 2008. Development of the axillary bud complex in *Echinocystis lobata* (Cucurbitaceae): interpreting the cucurbitaceous tendril. **American journal of botany** 95: 773–781.
- Gourlay, C. W.; Hofer, J. M.; Ellis, T. H. 2000. Pea compound leaf architecture is regulated by interactions among the genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, and *TENDRIL-LESSN*. **The Plant cell** 12: 1279–1294.
- Hansen, A. K.; Gilbert, L. E.; Simpson, B. B.; Downie, S. R.; Cervi, A. C.; Jansen, R. K. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31: 138–150.
- Hearn, D. J. 2006. *Adenia* (Passifloraceae) and its Adaptive Radiation: Phylogeny and Growth Form Diversification. **Systematic Botany** 31: 805–821.
- Irish, V. F. 2010. The flowering of *Arabidopsis* flower development. **The Plant journal** 61: 1014–1028.
- Isnard, S.; Silk, W. K. 2009. Moving with climbing plants from Charles Darwin's time into the 21st century. **American journal of botany** 96: 1205–1221.
- Jaffe, M.; Galston, A. 1968. The physiology of tendrils. **Annual Review of Plant Physiology** 19: 417–434.

- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellog, E. A., Stevens, P. F. & Donoghue, M. J. 2008. **Plant Systematics - A phylogenetic approach**. 3.ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Krosnick, S. E.; Freudenstein, J. V. 2005. Monophyly and Floral Character Homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). **Systematic Botany** **30**: 139–152.
- Kugler, E. E. & King, L. A. 2004. A brief history of the Passionflower. *In*: Ulmer, T., & MacDougal, M. J. 2004. **Passiflora: Passionflowers of the world**. Timber Press, Portland.
- Liljegren, S. J.; Gustafson-Brown, C.; Pinyopich, A.; Ditta, G. S.; Yanofsky, M. F. 1999. Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. **The Plant cell** **11**: 1007–1018.
- Meloche, C. G.; Knox, J. P.; Vaughn, K. C. 2007. A cortical band of gelatinous fibers causes the coiling of redvine tendrils: a model based upon cytochemical and immunocytochemical studies. **Planta** **225**: 485–498.
- Millington, W. 1966. The tendril of *Parthenocissus inserta*: determination and development. **American Journal of Botany** **53**: 74–81.
- Milward-de-Azevedo, M. A.; Freitas, L. B. De; Kinoshita, L. S. 2014. Taxonomy and evolutionary relationships of *Passiflora* subg. *Decaloba* supersect. *Decaloba* sect. *Xerogona* (Passifloraceae): contributions of palynological, morphological and molecular studies. **Acta Botanica Brasilica** **28**: 301–308.
- Muschner, V. C.; Lorenz, A. P.; Cervi, A. C.; Bonatto, S. L.; Souza-Chies, T. T.; Salzano, F. M.; Freitas, L. B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American journal of botany** **90**: 1229–1238.
- Pantano, S. C. 2007. Propagação. *In*: Leonel, S.; Sampaio, A. C. 2007. **Maracujá-doce: aspectos técnicos e econômicos**. Editora UNESP, São Paulo.

- 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.
- Pinyopich, A.; Ditta, G. S.; Savidge, B.; Liljegren, S. J.; Baumann, E.; Wisman, E.; Yanofsky, M. F. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. **Nature** **424**: 85–88.
- Popham, R.A. & Chan, A.P. 1952. Origin and development of the receptacle of *Chrysanthemum morifolium*. **American Journal of Botany** **39**: 329-339.
- Putz, F. E. & N. M. Holbrook. 1991. Biomechanical studies of vines. *In*: F. E. Putz & H. A. Mooney (Eds.). **The Biology of Vines**. Cambridge University Press, New York.
- Rijpkema, A.; Vandenbussche, M.; Koes, R.; Heijmans, K.; Gerats, T. 2010. Variations on a theme: changes in the floral ABCs in angiosperms. **Seminars in cell & developmental biology** **21**: 100–107.
- Schultz, E. a.; Haughn, G. W. 1991. *LEAFY*, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in *Arabidopsis*. **The Plant cell** **3**: 771–781.
- Shah, J.; Dave, Y. 1970. Tendrils of *Passiflora foetida*: Histogenesis and Morphology. **American Journal of Botany** **57**: 786–793.
- Shah, J.; Dave, Y. 1971. Morpho-histogenic studies on tendrils of *Passiflora*. **Annals of Botany** **35**: 627–635.
- Simpson, M. G. 2010. **Plant Systematics**. 2.ed. Elsevier.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2.ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Sousa-Baena, M. S.; Sinha, N. R.; Lohmann, L. G. 2014. Evolution and Development of Tendrils in Bignoniaceae (Lamiales, Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **99**: 323–347.

- Tattersall, A. D.; Turner, L.; Knox, M. R.; Ambrose, M. J.; Ellis, T. H. N.; Hofer, J. M. I. 2005. The mutant *crispa* reveals multiple roles for *PHANTASTICA* in pea compound leaf development. **17**: 1046–1060.
- Tepfer, S. S. 1953. Floral anatomy and ontogeny in *Aquilegia formosa* var. *truncate* and *Ranunculus repens*. **University of California Publications in Botany 25**: 513-648.
- Theissen, G.; Melzer, R. 2007. Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. **Annals of botany 100**: 603–19.
- Tokuoka, T. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae *sensu lato* (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of plant research 125**: 489–497.
- Ulmer, T., & MacDougal, M. J. 2004. **Passiflora: Passionflowers of the world**. Timber Press, Inc., Portland.
- Vanderplank, J. 2000. **Passion flowers and passion fruit**. 3.ed. The MIT Press, Cambridge.
- Yao, A.; Yang, Y.; Liao, K.; Zhang, L.; Hu, J. 2010. The expression of *VFL* and *VvTFL1* genes in relation to the effects of gibberellins in different organs of “Xiangfei” grapevine. **Journal of Biotechnology 9**: 2748–2755.
- Yotoko, K. S. C.; Dornelas, M. C.; Togni, P. D.; Fonseca, T. C.; Salzano, F. M.; Bonatto, S. L.; Freitas, L. B. 2011. Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. **PloS one 6**: 1-8.
- Zhang, S.; Yao, A.; Bai, H.; Ren, J.; Jia, W.; Zhang, L.; Hu, J. 2008. The *VAP1* gene expression in relation to GAs effect on tendrils, buds and flowers development in “Xiangfei” grapevine. **Scientia Horticulturae 117**: 225–230.



Capítulo I

Ontogenia do complexo de gemas em *Passiflora* L.

Resumo

A axila foliar em *Passiflora* apresenta uma estrutura complexa, composta por uma gavinha; uma ou mais flores e uma gema vegetativa. A formação da gavinha está ligada ao desenvolvimento reprodutivo, tendo sido interpretada como uma flor ou eixo da inflorescência modificado. O meristema axilar que da origem tanto à gavinha quanto às flores é muitas vezes chamado de complexo de gemas após sua subdivisão em diferentes meristemas. O presente estudo apresenta uma nova proposta quanto a ontogenia das estruturas presentes na axila foliar de espécies de *Passiflora*, demonstrando que a formação do complexo de gemas fundamenta-se na produção de brácteas e meristemas associados a partir do meristema axilar, que então se torna o meristema da gavinha. Não foram encontradas evidências que suportem a proposta de homologia entre flores e gavinhas, sendo esta uma modificação do eixo de primeira ordem da inflorescência.

Palavras-chave: gavinha; inflorescência; meristema floral, meristema acessório vegetativo.

Abstract

The leaf axil in *Passiflora* bears a complex structure, comprising a tendril, one or more flowers and a vegetative bud. There is a link between the reproductive phase and tendril initiation, so that tendrils are often regarded as a modified flower or inflorescence axis. Development of the axillary meristem is usually described as a single meristem that subdivides itself into a tendril and one or more flower meristems, thus composing what is called a “bud complex”. Here we present data that point to a different interpretation for the ontogeny of the bud complex, which is based on the initiation of bracts and their axillary meristems by the original meristem, which then turns into a tendril meristem. We found no evidence of homology between flowers and tendrils, therefore we understand it as the inflorescence axis.

Key words: tendril; inflorescence; floral meristem; accessory vegetative bud.

1. Introdução

Passiflora L. é o gênero mais diversificado de Passifloraceae, sendo composto por mais de 525 espécies distribuídas em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* L.. O gênero é composto por espécies de hábito escandente que se utilizam de gavinhas axilares para escalar suportes (Feuillet & MacDougal, 2003; Ulmer & MacDougal, 2004; Hansen *et al.*, 2006).

A axila foliar em *Passiflora* apresenta uma estrutura complexa, compreendendo uma gavinha, uma ou mais flores e uma gema vegetativa (Cusset, 1968; Shah & Dave, 1970; 1971; Ulmer & MacDougal, 2004; Krosnick & Freudenstein, 2005; Nave *et al.*, 2010; Cutri *et al.*, 2013). Gavinhas estão presentes em diversos grupos de plantas, tendo surgido várias vezes independentemente ao longo da evolução, possuindo diferentes origens ontogenéticas. Enquanto que em certos grupos de plantas as gavinhas muitas vezes aparecem como modificações de estruturas vegetativas, como folhas, folíolos ou estípulas (Darwin, 1865; Gourlay *et al.*, 2000; Isnard & Silk, 2009 Sousa-Baena *et al.*, 2014), em outros a gavinha está claramente ligada ao desenvolvimento reprodutivo, como no caso de *Vitis vinifera* L.. Nessa espécie as gavinhas são formadas apenas após a transição do estágio juvenil para o reprodutivo, sendo que um meristema axilar pode dar origem a uma gavinha ou a uma inflorescência, dependendo do nó em que se encontra (Carmona *et al.*, 2002).

Em espécies de *Passiflora*, a formação de gavinhas também está ligada ao desenvolvimento reprodutivo. Esse fenômeno foi bem caracterizado para algumas espécies nas quais o indivíduo em estágio juvenil não produz gavinhas (Gangstad, 1938; Cutri, 2009; Nave *et al.*, 2010; Cutri *et al.*, 2013). Contudo, há diferenças

marcantes entre o desenvolvimento de gavinhas em *Vitis vinifera* e em *Passiflora*. Enquanto em *V. vinifera* um meristema normalmente é capaz de produzir somente um tipo de estrutura por vez (ou uma inflorescência, ou uma gavinha), em *Passiflora* cada meristema axilar dá origem tanto a uma gavinha quanto a uma ou mais flores (Shah & Dave, 1970; 1971; Nave *et al.*, 2010; Cutri *et al.*, 2013). Somando-se a essas estruturas, também ocorre a formação de um meristema vegetativo, compondo então o que é descrito na literatura como complexo de gemas (*bud complex*) (Shah & Dave, 1970; 1971).

Dado que a formação de gavinhas em *Passiflora* é diretamente relacionada à transição do estágio juvenil para o reprodutivo, e considerando sua posição central em relação às flores, a gavinha é atualmente interpretada como a porção terminal de uma inflorescência reduzida, ou como uma flor terminal modificada (Krosnick & Freudenstein 2005; Nave *et al.*, 2010; Cutri *et al.*, 2013).

Cutri *et al.* (2013) descreveram algumas variações encontradas em espécies de diferentes subgêneros, além de terem registrado a plasticidade de *P. edulis* no que diz respeito ao número de flores produzidas e à capacidade do meristema da gavinha em produzir folhas. Nesse trabalho, embora os autores interpretem a gavinha como um ramo reprodutivo modificado, também especulam a possibilidade de a gavinha representar uma flor modificada.

A maior parte das descrições sobre ontogenia destas estruturas relata como um único meristema axilar que se divide em dois ou três, formando assim o complexo de gemas (*bud complex*). Desse complexo, o meristema central produz uma gavinha enquanto um ou dois meristemas laterais produzem ramos florais. Na maioria das espécies, o meristema que dará origem ao ramo floral forma inicialmente três brácteas antes de se tornar um meristema floral propriamente dito. Portanto, os meristemas dos

ramos florais seriam oriundos do meristema axilar originalmente produzido na axila da folha, enquanto a gavinha se originaria do meristema que permanece central aos meristemas dos ramos florais (Shah & Dave, 1970; 1971; Cutri *et al.*, 2013).

A relação entre gavinhas e flores em *Passiflora* é, portanto, muito clara, tendo em vista sua origem comum a partir de um mesmo meristema. Além disso, Nave *et al.* (2010) demonstraram que em *P. edulis* a iniciação de uma gavinha parece estar sempre ligada à iniciação de um meristema floral, de maneira que quando um novo ramo é formado, uma gavinha está presente no segundo ou terceiro nó formado, enquanto as flores são normalmente observadas no primeiro ou segundo nó que produz uma gavinha. Assim, segundo os autores, o mecanismo que controla a floração em *P. edulis* seria baseado na suspensão ou não do desenvolvimento de um botão floral que é invariavelmente iniciado com o desenvolvimento da gavinha.

Contudo, os autores não descrevem em detalhes o que acontece em um nó no qual uma gavinha, mas nenhuma flor, é produzida. Ademais, todos os experimentos foram realizados utilizando-se indivíduos obtidos através de estaquia a partir de um único indivíduo original (em fase adulta). Essa abordagem, embora muito bem sucedida para suas análises, torna o experimento incapaz de elucidar questões voltadas à transição da fase de juvenil para adulta.

Como apontado por Shah & Dave (1971), é intrigante como um meristema se diferencia em um complexo de gemas mesmo antes da produção de perfis ou folhas. Geralmente, meristemas caulinares (exceto o meristema de origem embrionária) têm origem na axila de algum órgão foliar (Esau, 1960), mas como explicar a origem dos meristemas dos ramos florais em *Passiflora*? (Shah & Dave, 1971).

Dada a falta de conhecimento acerca da transição entre as fases juvenil e adulta, bem como a ainda incerta natureza da gavinha, o presente capítulo tem como objetivo investigar, sob o ponto de vista estrutural, como se dá o desenvolvimento do complexo de gemas em diferentes fases de vida em espécies de *Passiflora*.

2. Material e Métodos

2.1. Material botânico

Quinze espécies, representando os quatro subgêneros de *Passiflora*, foram selecionadas para o presente trabalho (tabela 1).

Tabela 1. Lista de espécies estudadas do gênero *Passiflora*, com respectivo local de coleta e coletor.

Subgênero	Espécie	Local de coleta	Coletor
<i>Deidamioides</i> (Harms) Killip	<i>Passiflora deidamioides</i> Harms	Biritiba Mirim – SP	Lemos, R.C.C., 30
<i>Astrophea</i> (DC.) Mast.	<i>P. haematostigma</i> Mart. ex Mast.	Embrapa Cerrados/Planaltina - DF	Lemos, R.C.C., 07
<i>Decaloba</i> (DC.) Rchb.	<i>P. morifolia</i> Mast. <i>P. suberosa</i> L.	Unicamp/Campinas - SP Unicamp/Campinas - SP	Brasileiro, J.C.B., 119 Brasileiro, J.C.B., 117
<i>Passiflora</i> L.	<i>P. coccinea</i> Aubl. <i>P. edulis</i> Sims <i>P. mucronata</i> Lam. <i>P. edmundoi</i> Sacco <i>P. incarnata</i> L. <i>P. kermesina</i> Link.& Otto <i>P. foetida</i> L. <i>P. caerulea</i> L. <i>P. platyloba</i> Killip <i>P. miersii</i> Mast. <i>P. racemosa</i> Brot.	Unicamp/Campinas - SP Unicamp/Campinas - SP Unicamp/Campinas - SP Biritiba Ussu - SP Unicamp/Campinas - SP Biritiba Ussu - SP Unicamp/Campinas - SP Unicamp/Campinas - SP Unicamp/Campinas - SP Unicamp/Campinas - SP Biritiba Ussu - SP Unicamp/Campinas - SP	Brasileiro, J.C.B., 104 Brasileiro, J.C.B., 116 Brasileiro, J.C.B., 111 Lemos, R.C.C., 31 Brasileiro, J.C.B., 109 Lemos, R.C.C., 34 Brasileiro, J.C.B., 130 Brasileiro, J.C.B., 105 Brasileiro, J.C.B., 112 Lemos, R.C.C., 36 Brasileiro, J.C.B., 114

Passiflora edulis Sims e *Passiflora suberosa* L. foram escolhidas como modelos de estudo para o subgênero *Passiflora* e *Decaloba*, respectivamente. A

escolha se baseou no fato de apresentarem morfologia descrita como característica de seus subgêneros, além de já terem sido alvo de estudos prévios de desenvolvimento e expressão de genes relacionados à gavinha em indivíduos adultos. As demais espécies foram incluídas de modo a aumentar a amostragem do subgênero *Passiflora*, o mais diverso do gênero, compreendendo também espécies dos outros três subgêneros.

Foram consideradas as seguintes fases de desenvolvimento da planta:

- Estágio juvenil = período inicial da vida da planta no qual não produz flores nem gavinhas;
- Estágio de transição = fase em que a planta inicia a produção de gavinhas pela primeira vez;
- Estágio adulto = período no qual o indivíduo já se encontra com diversos nós produzindo gavinhas, muitas vezes apresentando também flores.

Foram coletados ramos de indivíduos adultos em diferentes municípios do estado de São Paulo, sendo apenas *Passiflora haematostigma* coletada no Distrito Federal. Material testemunho de cada espécie foi depositado no Herbário SPF, do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

Para obtenção de indivíduos em estágio juvenil e de transição, foram coletadas sementes de *P. edulis* e *P. suberosa* a partir dos frutos de plantas em fase reprodutiva. As sementes foram germinadas e crescidas em casa de vegetação segundo Pantano (2007).

Para determinação do estágio de transição, plantas juvenis foram acompanhadas diariamente até o surgimento de nós onde gavinhas estavam sendo produzidas.

Amostras do ápice caulinar compreendendo aproximadamente um centímetro de comprimento foram isoladas para análise em microscopia óptica e microscopia

eletrônica de varredura. Regiões nodais apresentando gavinhas e ramos florais em diferentes estágios de desenvolvimento também foram isolados para análise em microscopia eletrônica de varredura.

2.2. Microscopia óptica

As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50% - Johansen, 1940), sendo após 48 horas, armazenadas em etanol 70%. O material foi então desidratado em série etanol/álcool butílico terciário (50-100%), posteriormente incluído em parafina (Ruzin, 1999). Cortes histológicos seriados, transversais e longitudinais, foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo. O material foi desparafinado com o uso de acetato de butila, corado com fucsina básica e azul de Astra (Kraus *et al.*, 1998), e então montado em lâminas permanentes. O registro fotográfico foi realizado utilizando-se o Sistema de Digitalização de Imagem IM50 acoplado ao microscópio Leica DMLB.

2.3. Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material previamente fixado foi desidratado em série etanólica (50-100% EtOH) e submetido ao ponto crítico com gás carbônico para secagem (CPD 030, Balzer). Depois de secas, as amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) e metalizadas com ouro (Silveira, 1989), para então serem analisadas e registradas em Microscópio Zeiss (DSM 940).

2.4. Terminologia adotada

A terminologia utilizada para descrever estruturas da arquitetura de inflorescências é muito variada e pode diferir consideravelmente entre diferentes autores. Para a descrição dos resultados obtidos no presente trabalho, foram adotadas as definições de brácteas e bractéolas sugeridas por Prenner *et al.* (2009), a saber: bráctea – estrutura foliar que subtende uma flor ou um ramo lateral da inflorescência;

bractéola – estrutura foliar que tipicamente flanqueia (i.e. precede topologicamente, em oposição a subtender) uma flor, tipicamente são as primeiras estruturas formadas em um eixo floral.

O termo “complexo de gemas” é utilizado aqui conforme Shah & Dave (1970, 1971), correspondendo à estrutura derivada do meristema axilar e composta pelo meristema da gavinha, meristema dos eixos de segunda ordem da inflorescência e o meristema vegetativo.

Considera-se “eixo de segunda ordem” o eixo contendo bráctea, bractéolas, pedicelo e flor, derivados do meristema axilar original.

3. Resultados

A ontogenia da gema axilar e seus produtos é relatada a seguir para todas as espécies. Dado que apresentam desenvolvimento muito semelhante, os resultados aplicam-se a todas as espécies a menos que especificado o contrário.

3.1. Morfologia geral de indivíduos adultos

Nas espécies estudadas, a gavinha se desenvolve rapidamente, crescendo em comprimento já nos primeiros plastocronos. Concomitantemente, um ou dois ramos de segunda ordem da inflorescência são iniciados lateralmente à gavinha (Figs. 1A-C). O número de flores produzidas por cada espécie é variado, como pode ser visto na tabela 2.

Os eixos de segunda ordem apresentam um total de três brácteas/bractéolas (Figs. 1D-E), sendo *P. suberosa* a única espécie que demonstrou grande plasticidade em relação à formação destas estruturas, podendo apresentar três, duas, uma, ou nenhuma.

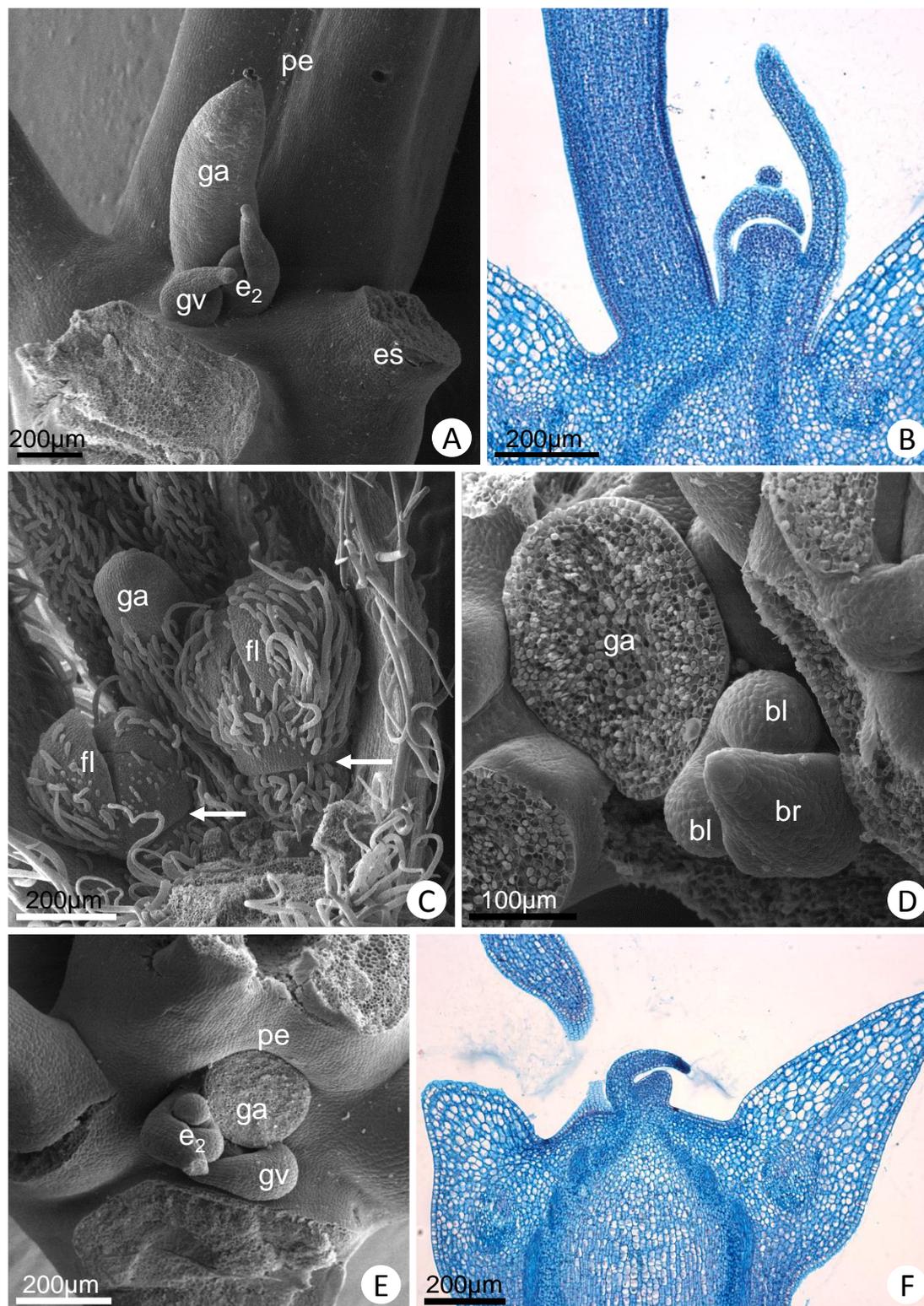


Figura 1. Axila foliar em *Passiflora edulis* (A-B, D-F) e *P. suberosa* (D). **A.** MEV evidenciando gavinha, gema vegetativa (com profilos) e gema do eixo de segunda ordem com sua bráctea associada. **B.** Gavinha e eixo de segunda ordem em secção longitudinal. **C.** MEV mostrando gavinha e dois botões florais. Notar constrição na base de cada botão floral (setas) **D.** MEV da gavinha (removida) e eixo de segunda ordem. Notar a iniciação de bractéolas pelo meristema na axila da bráctea. **E.** Gavinha (removida), gema vegetativa e gema do eixo de segunda ordem. **F.** Gema vegetativa em secção longitudinal. **bl** – bractéola, **br** – bráctea, **es** – estípula, **e₂** – gema do eixo de segunda ordem da inflorescência, **fl** – botão floral, **ga** – gavinha, **gv** – gema vegetativa, **pe** – pecíolo.

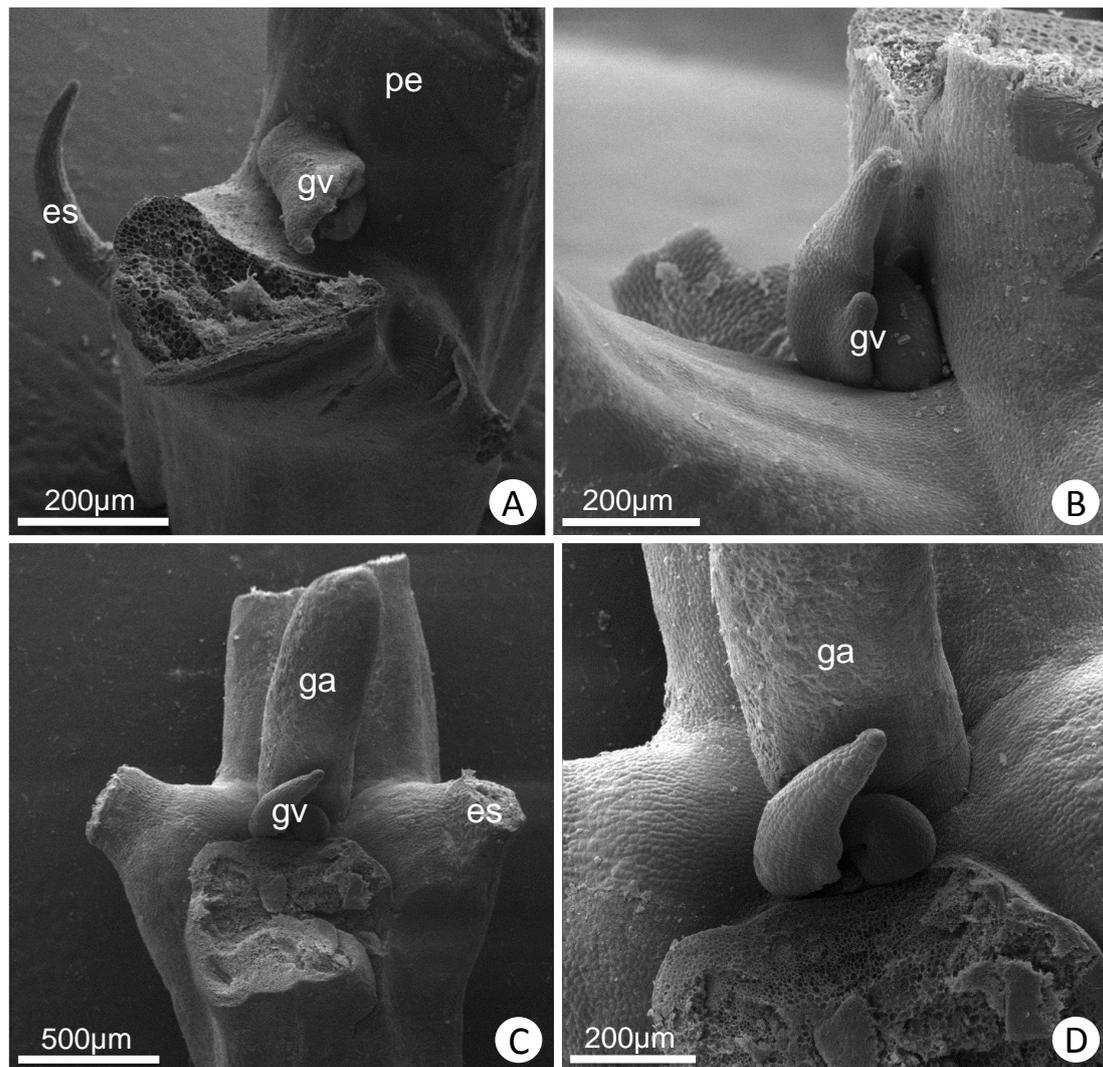


Figura 2. MEV da axila foliar em indivíduos juvenis (A-B) e em fase de transição para o estágio adulto (C-D) de *Passiflora edulis*. A-B. Indivíduos juvenis apresentado apenas uma gema vegetativa protegida por perfis. C-D. Presença de uma gavinha e uma gema vegetativa, mas não de um eixo de segunda ordem da inflorescência, em indivíduos em fase de transição. es – estípula, ga – gavinha, gv – gema vegetativa, pe – pecíolo.

Tabela 2. Caracteres morfológicos observados em 15 espécies de *Passiflora* L., considerando o número de flores produzidas a partir de cada gema axilar, número de brácteas e bractéolas presentes em cada eixo de segunda ordem e características particulares registradas no desenvolvimento do complexo de gemas.

Espécie	Nº de flores	Nº de Brácteas + Bractéolas	Plasticidade
Subgênero <i>Deidamiodes</i>			
<i>Passiflora deidamioides</i>	2	3	-
Subgênero <i>Astrophea</i>			
<i>P. haematostigma</i>	2	3	-
Subgênero <i>Decaloba</i>			
<i>P. morifolia</i>	1	3	Ausência de ramos florais em diversos nós Estruturas vestigiais; meristema axilar na bractéola; variação no número de flores e de brácteas/bractéolas
<i>P. suberosa</i>	1-4	0-3	
Subgênero <i>Passiflora</i>			
<i>P. coccínea</i>	1-2	3	-
<i>P. edulis</i>	1	3	-
<i>P. mucronata</i>	1-2	3	Retenção do desenvolvimento da gavinha
<i>P. edmundoi</i>	1	3	-
<i>P. incarnata</i>	1	3	-
<i>P. kermesina</i>	1-2	3	-
<i>P. foetida</i>	1-2	3	-
<i>P. caerulea</i>	1	3	-
<i>P. platyloba</i>	1	3	Retenção do desenvolvimento da gavinha
<i>P. miersii</i>	2	3	-
<i>P. racemosa</i>	1-2	3	-

Uma gema vegetativa também é formada na axila foliar e produz dois ou três perfis (Fig. 1A, 1E e 1F), entrando em seguida em dormência, que pode ser quebrada por ocasião de ramificação da planta.

Contudo, nem todas essas estruturas podem estar presentes na axila foliar. O seu desenvolvimento está diretamente relacionado ao estágio de vida no qual a planta se encontra. Plântulas e indivíduos juvenis apresentam apenas uma gema axilar vegetativa (Figs. 2A-B), enquanto que indivíduos em estágio de transição de juvenil para adulto produzem uma gavinha, mas às vezes sem a produção de flores (Figs. 2C-D).

3.2. Desenvolvimento do meristema axilar em diferentes fases

Duas espécies foram analisadas em diferentes estágios, sendo elas um do subgênero *Decaloba* (*P. suberosa*) e outra do subgênero *Passiflora* (*P. edulis*).

3.2.1. Estágio adulto

Em *P. edulis*, o estabelecimento do meristema axilar começa muito cedo no desenvolvimento do ramo (Fig. 3A), aproximadamente entre o segundo e o terceiro plastocrono, e ocorre no lado adaxial do primórdio foliar, entre suas estípulas. Enquanto células na região abaxial do primórdio foliar começam a sofrer processo de vacuolação e diferenciação, um grupo de células presente no lado adaxial permanece com características meristemáticas (Fig. 3B).

Por meio de divisões celulares, este grupo de células meristemáticas forma uma protuberância que já é bem distinta na axila do terceiro primórdio foliar. Neste estágio, o meristema axilar não apresenta clara distinção em relação aos tecidos da região adaxial do primórdio foliar, que ainda se encontram em estágio inicial do desenvolvimento (Fig. 3C). Todavia, células do primórdio foliar logo passam por rápido processo de diferenciação em células do mesofilo, restando apenas o meristema axilar em estágio meristemático no quarto plastocrono (Fig. 3D).

A atividade do meristema axilar começa rapidamente, sendo possível distinguir as regiões que darão origem à gavinha e ao eixo de segunda ordem da inflorescência já entre o quarto e o quinto plastocrono. O grupo de células que se tornará a bráctea e o meristema do ramo floral inicia-se como uma projeção lateral do meristema axilar, deslocada em direção ao eixo caulinar (Figs. 3A e 3E). Essa projeção ocorre enquanto a gema axilar ainda se encontra em um estágio meristemático, ou seja, suas células ainda não começaram a se diferenciar em outros

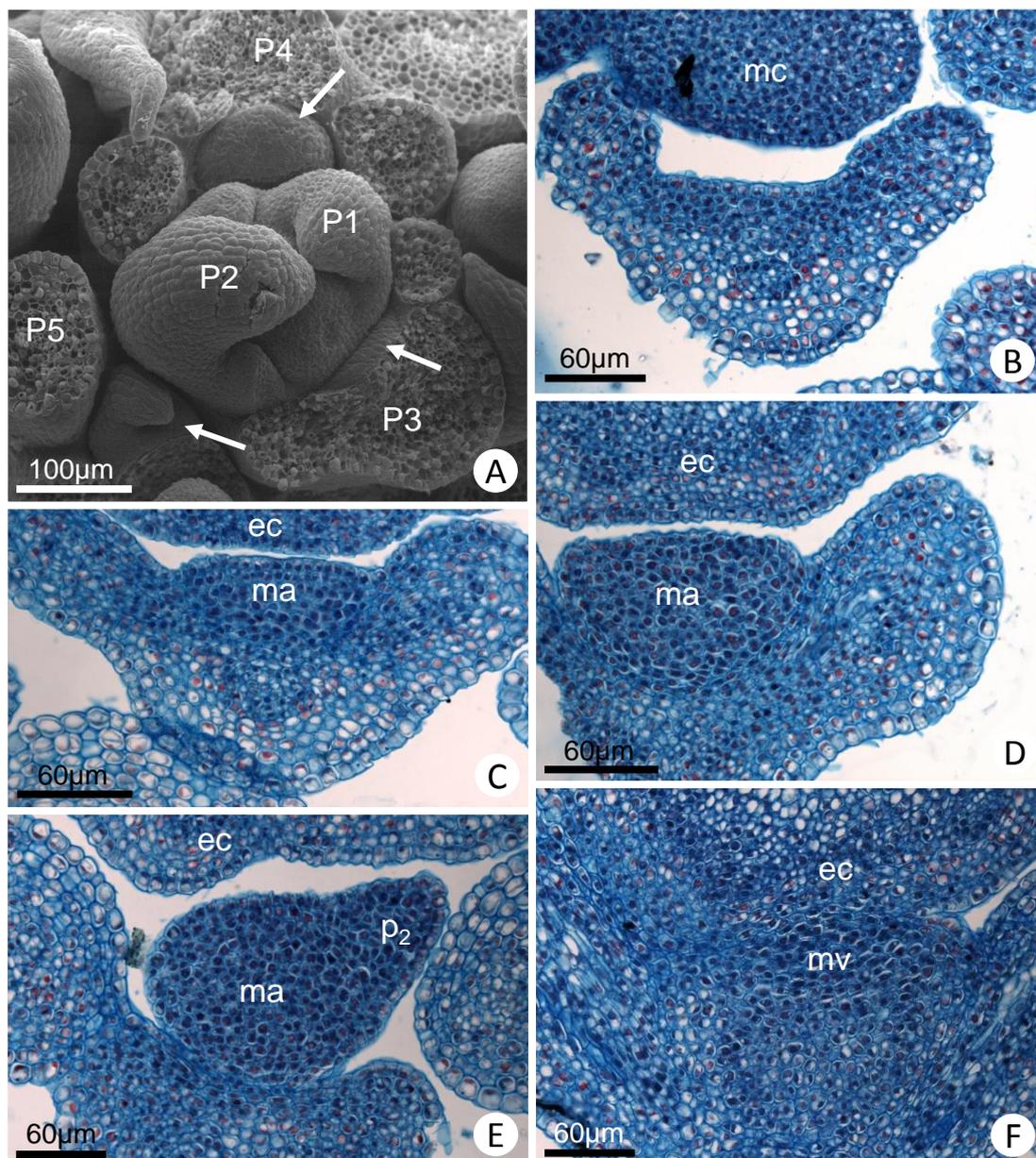


Figura 3. Meristema axilar em *Passiflora edulis*. **A.** MEV do meristema apical caulinar exibindo primórdios foliares em diferentes estágios de desenvolvimento com seus meristemas axilares (setas). **B-E.** Desenvolvimento do meristema axilar no segundo (B), terceiro (C), quarto (D) e quinto (D) plastocronos. Notar a projeção do meristema axilar que corresponde ao primórdio de bráctea e sua gema vegetativa associada. **F.** Base da região do complexo de gemas exibindo células meristemáticas, precursoras da gema vegetativa. **ec** – eixo caulinar, **ma** – meristema axilar, **mv** – meristema vegetativo, **p₂** – primórdio do eixo de segunda ordem da inflorescência, **P1-5** – primórdio foliar em ordem do mais jovem para o mais desenvolvido.

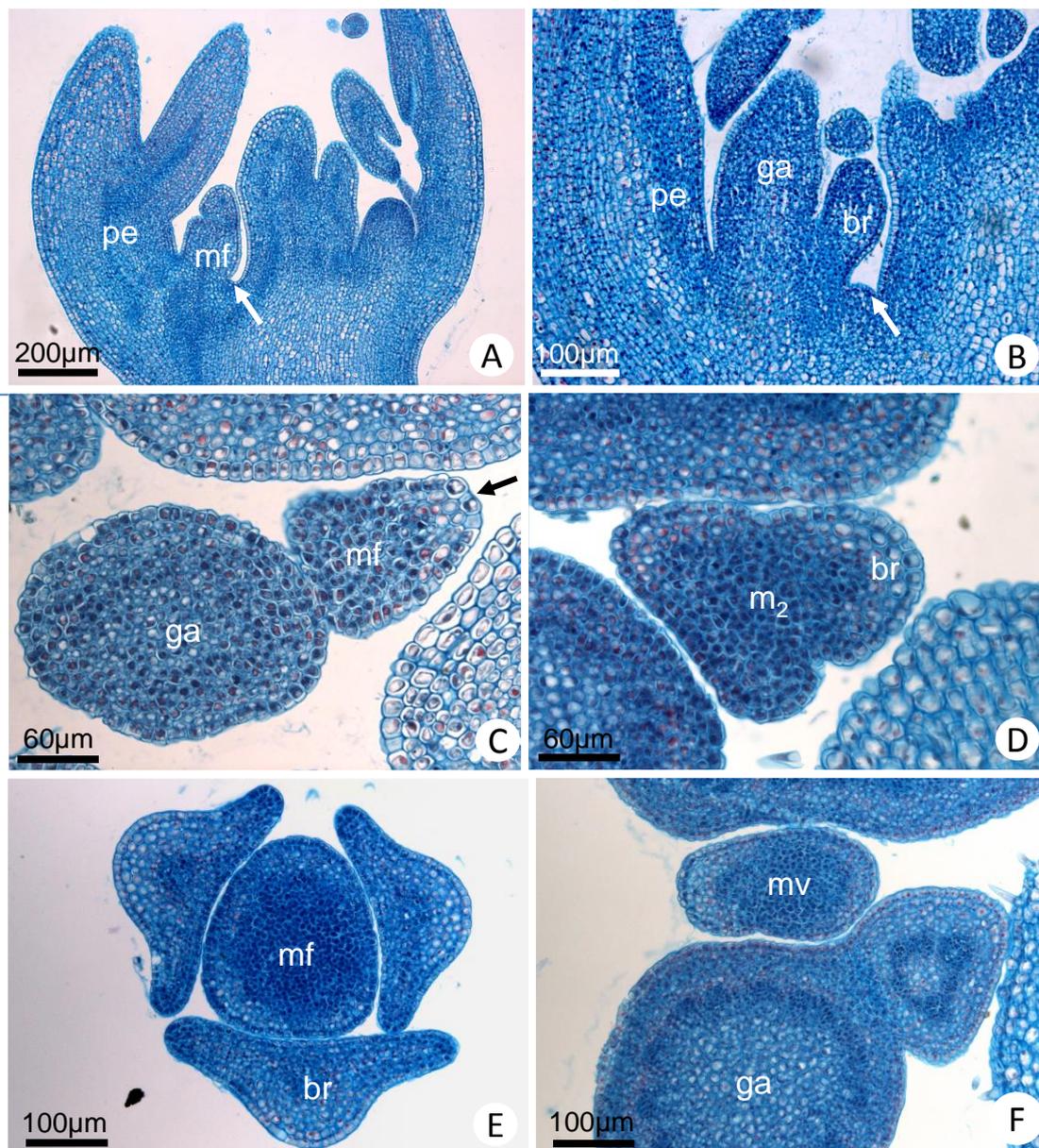


Figura 4. Desenvolvimento do complexo de gemas em *Passiflora edulis*. **A-B.** Secções longitudinais de um primórdio foliar evidenciando estágios iniciais do meristema acessório vegetativo (seta), enquanto o meristema axilar original já formou o eixo da gavinha e o eixo de segunda ordem. **C-E.** Estágios da ontogênese do eixo de segunda ordem. Notar a diferenciação inicial da bráctea e a formação de duas bractéolas. **F.** Gavinha, eixo de segunda ordem e meristema vegetativo após a produção de dois primórdios de perfilo. **br** – bráctea, **fl** – botão floral, **ga** – gavinha, **mf** – meristema floral, **mv** – meristema vegetativo, **m₂** – meristema do eixo de segunda ordem da inflorescência, **pe** – pecíolo.

tecidos (Fig. 3E). Sua formação ocorre por meio de divisões celulares (em sua maioria periclinais) do meristema axilar. É interessante notar que desde o início de sua formação, essa projeção apresenta uma distinta morfologia, representada aqui pelo formato triangular em secção transversal (Fig. 3E).

O desenvolvimento da gema vegetativa ocorre entre o quinto e o sexto plastocronos, como uma proliferação de células na região adaxial do complexo de meristemas (ou seja, entre este e o eixo caulinar). Enquanto o ramo floral é gerado como um primórdio proveniente do meristema axilar, a gema vegetativa segue um padrão diferente, surgindo de divisões celulares entre a base do meristema axilar e o eixo caulinar (Fig 3F). A iniciação da gema vegetativa ocorre após a formação do primórdio do eixo de segunda ordem (Figs. 4A-B), e enquanto se estabelece, as células adjacentes já se encontram em diferenciação formando os tecidos do eixo principal da inflorescência (Figs. 3F).

Como mencionado anteriormente, a região que dará origem ao ramo floral possui um formato triangular em secção transversal (Fig. 3E). No quinto plastocrono ocorre a projeção e separação dessa estrutura do meristema axilar, que por sua vez agora se torna o meristema da gavinha (Fig. 4C). Nessa fase ocorre o início da diferenciação de células em posição oposta à gavinha no primórdio do eixo de segunda ordem, como pode ser observado na figura 4C. Este grupo de células diferencia-se em uma bráctea, enquanto as células meristemáticas do em sua axila iniciam dois primórdios de bractéolas durante o sétimo plastocrono (Fig. 4D). Entre o nono e décimo plastocrono este meristema se estabelece como floral e se inicia a produção das sépalas (Fig. 4E).

O ramo vegetativo forma o primeiro primórdio de perfilo por volta do sétimo plastocrono, enquanto o segundo perfilo é produzido entre o oitavo e o nono (Fig.

4F), e um terceiro perfil é iniciado no décimo plastocrono. Normalmente, após a produção destes primeiros primórdios, o meristema vegetativo entra em um estado dormente e os primórdios não se desenvolvem em folhas, permanecendo como pequenos perfis.

A flor e a gavinha compartilham seu sistema vascular, que está organizado em um eustelo na porção proximal da estrutura formada pelos eixos de primeira e segunda ordem da inflorescência. Essa mesma condição não ocorre em relação à gema vegetativa, que tem a conexão de seu suprimento vascular ocorrendo diretamente com o sistema vascular do caule. (Fig. 5).

De forma geral, o desenvolvimento da gema axilar e seus derivados em *P. suberosa* segue um padrão muito semelhante ao observado para *P. edulis*. O estabelecimento do meristema axilar ocorre mais rapidamente, sendo claramente distinto no segundo plastocrono, e já completamente estabelecido como meristema no terceiro plastocrono (Fig. 6A). Inicialmente, o meristema aparece como um domo único, alongado tangencialmente em relação ao eixo caulinar (Fig. 6A-B).

Entre o terceiro e o quarto plastocrono ocorre a protrusão da região que dará origem ao primeiro ramo floral (Fig. 6C). Esta projeção ocorre em posição semelhante à observada em *P. edulis*, ou seja, lateral ao meristema axilar, mas voltada ligeiramente em direção ao eixo caulinar. Desta forma, no quarto plastocrono um único ramo floral e uma gema vegetativa já podem ser observados (Fig. 6D). Subsequentemente, no quinto plastocrono, ocorre a formação de uma segunda projeção. Esse novo meristema, que dará origem a outro ramo floral, surge em posição oposta ao primeiro, mas também mais próximo ao eixo caulinar (Figs. 6E-F). É interessante notar que ambas as projeções diferem daquela encontrada em *P. edulis*,

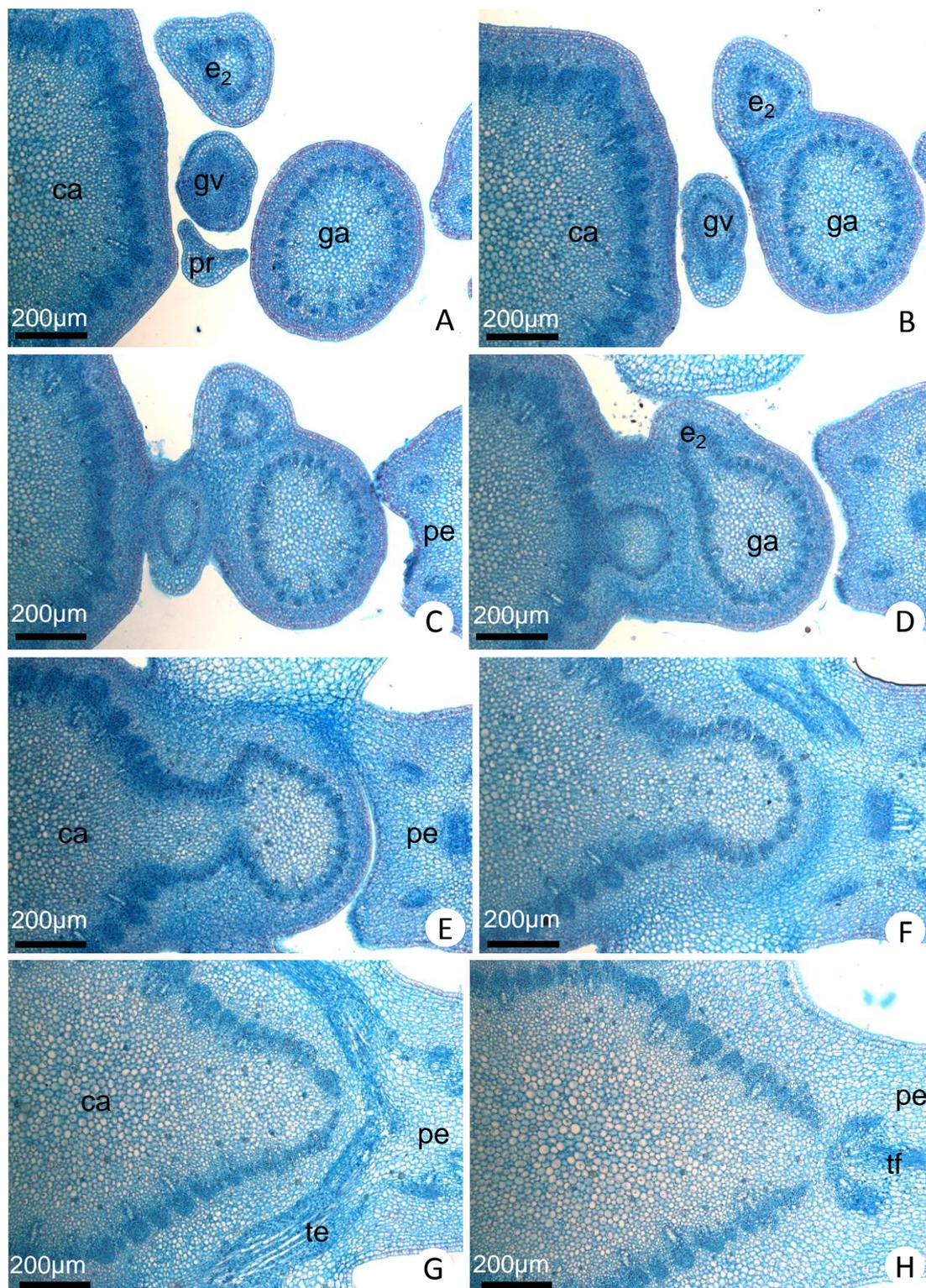


Figura 5. Conexão vascular entre o caule, folha e estruturas derivadas dos meristemas axilares em *Passiflora edulis* em secção transversal. **A-C.** Região distal mostrando sistema vascular individualizado de cada estrutura. **D.** Conexão entre o sistema vascular da gavinha e do eixo de segunda ordem, bem como da gema vegetativa e do caule. **E-F.** Conexão do sistema vascular de todas as estruturas com o do caule. **G.** Sistema vascular das estípulas se conectando com o traço foliar. **H.** Traço foliar unilacunar, composto por três feixes vasculares. **ca** – caule, **e₂** – eixo de segunda ordem da inflorescência, **ga** – gavinha, **gv** – gema vegetativa, **pe** – pecíolo, **pr** – perfilo, **te** – traço da estípula, **tf** – traço foliar.

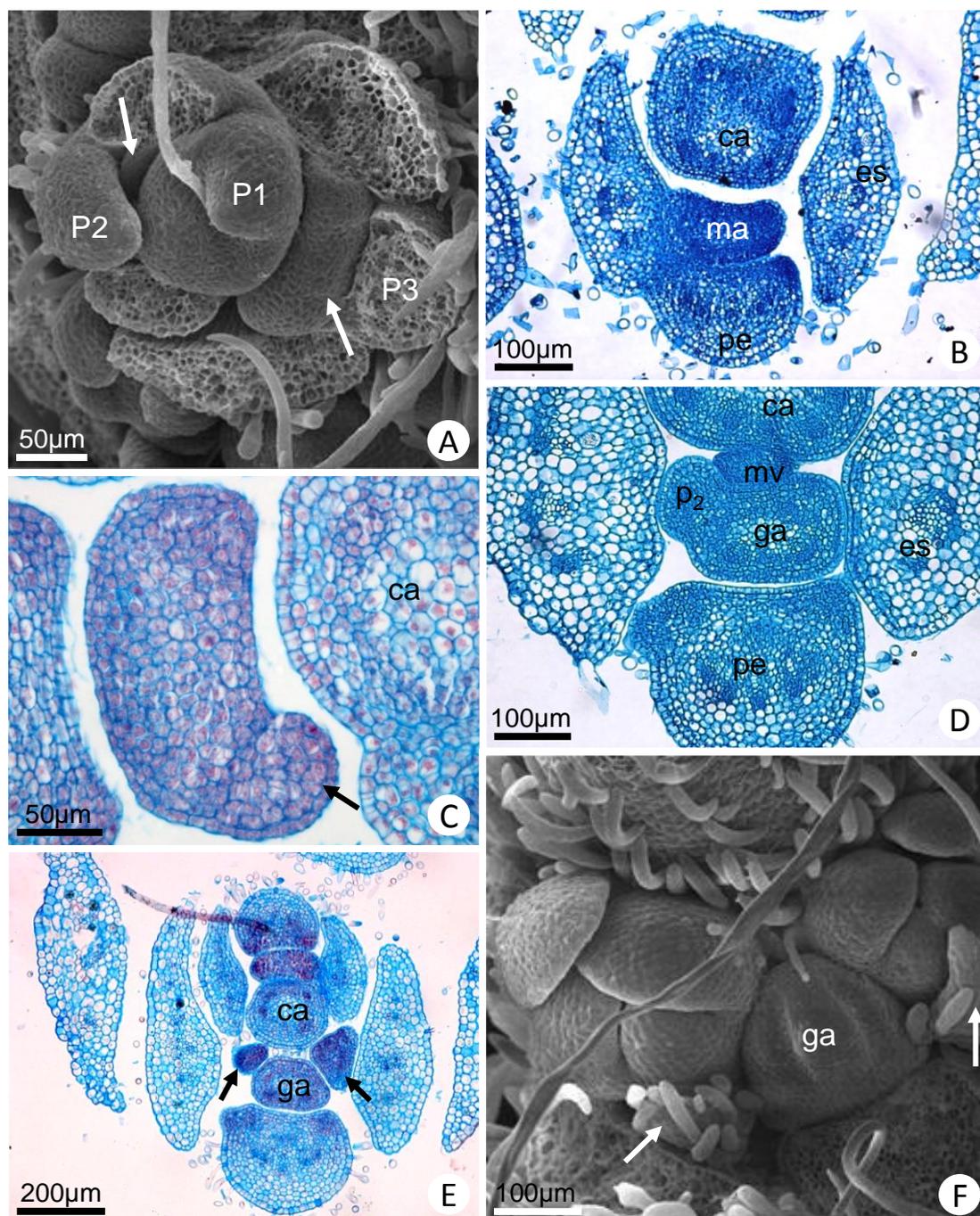


Figura 6. Meristema axilar em *Passiflora suberosa*, visto em MEV (A, F) e em secção transversal (B-E). A. Meristema apical caulinar exibindo primórdios foliares em diferentes estágios de desenvolvimento com seus meristemas axilares (setas). B. Meristema axilar antes da formação dos eixos de segunda ordem. C-D. Iniciação do primeiro eixo de segunda ordem (seta). E. Meristemas dos eixos de segunda ordem (setas), lateralmente à gavinha central. F. Botões florais exibindo uma bractéola reduzida (setas). ca – caule, es – estípula, ga – gavinha, ma – meristema axilar, mv – meristema vegetativo, p₂ – primórdio do eixo de segunda ordem da inflorescência, P1-3 – primórdio foliar em ordem do mais jovem para o mais desenvolvido.

por não apresentarem secção transversal triangular em seus estágios mais iniciais, mas sim um formato arredondado.

Uma das diferenças marcantes encontrada em *P. suberosa* em relação às demais espécies diz respeito ao número de brácteas + bractéolas e seu desenvolvimento. Foram registrados ramos florais portando três (Fig. 7A), duas, uma (Figs. 6F e 7B) ou até mesmo nenhuma destas estruturas (Fig. 7C). Muitas vezes as brácteas e/ou bractéolas apresentam-se extremamente reduzidas, ao ponto de serem apenas identificadas como projeções vestigiais do ramo floral (Fig. 7A).

Em meio a toda essa plasticidade, uma característica constante em todas as amostras observadas é que a estrutura que atinge maior tamanho é sempre a bractéola mais externa em relação ao eixo caulinar, situando-se adjacente à gavinha (Figs. 6F, 7D). Além disso, essa bractéola está sempre presente, a menos que nenhuma bráctea/bractéola seja formada.

Além disso, em alguns raros casos foi possível observar a formação de um meristema na axila dessa bractéola mais externa, que pode dar origem a uma flor adicional (Figs. 7E-G).

Outra característica observada exclusivamente em *P. suberosa* foi a presença de uma constrição nas flores. A constrição é presente em todas as flores e ocorre sempre acima da região onde as brácteas são formadas (Figs. 1C, 7C, 7E).

3.2.2. Estágio juvenil

Como explicado previamente, plântulas e indivíduos em estágio juvenil produzem apenas um meristema vegetativo na axila de suas folhas (Figs. 2A-B). Assim sendo, seu desenvolvimento ocorre de maneira muito simplificada em relação a indivíduos não juvenis.

Em *P. edulis*, o estabelecimento do meristema axilar se inicia no terceiro plastocrono, em um padrão muito semelhante àquele do meristema axilar de plantas em estágio não juvenil, apresentando uma retenção de células meristemáticas na região adaxial do primórdio foliar. Contudo, diferentemente de plantas em estágio não juvenil, a diferenciação dos tecidos da folha ocorre de maneira mais rápida. Desta forma, a gema axilar já é claramente distinta dos tecidos da folha no terceiro plastocrono (Fig. 8A), uma vez que estes últimos já se encontram relativamente diferenciados (células vacuoladas, sistema vascular já em desenvolvimento; Fig. 8B). Assim como no estágio não juvenil, a gema vegetativa inicia sua atividade logo após o seu estabelecimento e no quarto plastocrono já apresenta o desenvolvimento do primeiro primórdio foliar, sendo no quinto plastocrono iniciada a formação do segundo primórdio (Fig. 8C).

De maneira similar, indivíduos juvenis de *P. suberosa* também desenvolvem sua gema axilar mais rapidamente, sendo esta já distinta dos tecidos da folha no segundo plastocrono (Fig. 8D). O desenvolvimento segue então o mesmo padrão observado em *P. edulis*.

A filotaxia apresenta mudanças ao longo da transição de fases, sendo em indivíduos juvenis, produzidos primórdios foliares em posição quase oposta uns aos outros, enquanto plantas adultas têm seus primórdios produzidos de maneira mais distribuída ao longo da circunferência do eixo caulinar (compare as figuras 8A e 8B com as 3A e 6A).

3.2.3. Desenvolvimento durante a fase de transição entre os estágios de vida

Para avaliar como ocorre a transição da fase juvenil para a adulta, amostras foram coletadas de indivíduos que haviam acabado de iniciar a produção de gavinhas. Tanto *P. edulis* como *P. suberosa* demonstram algum grau de plasticidade quanto às

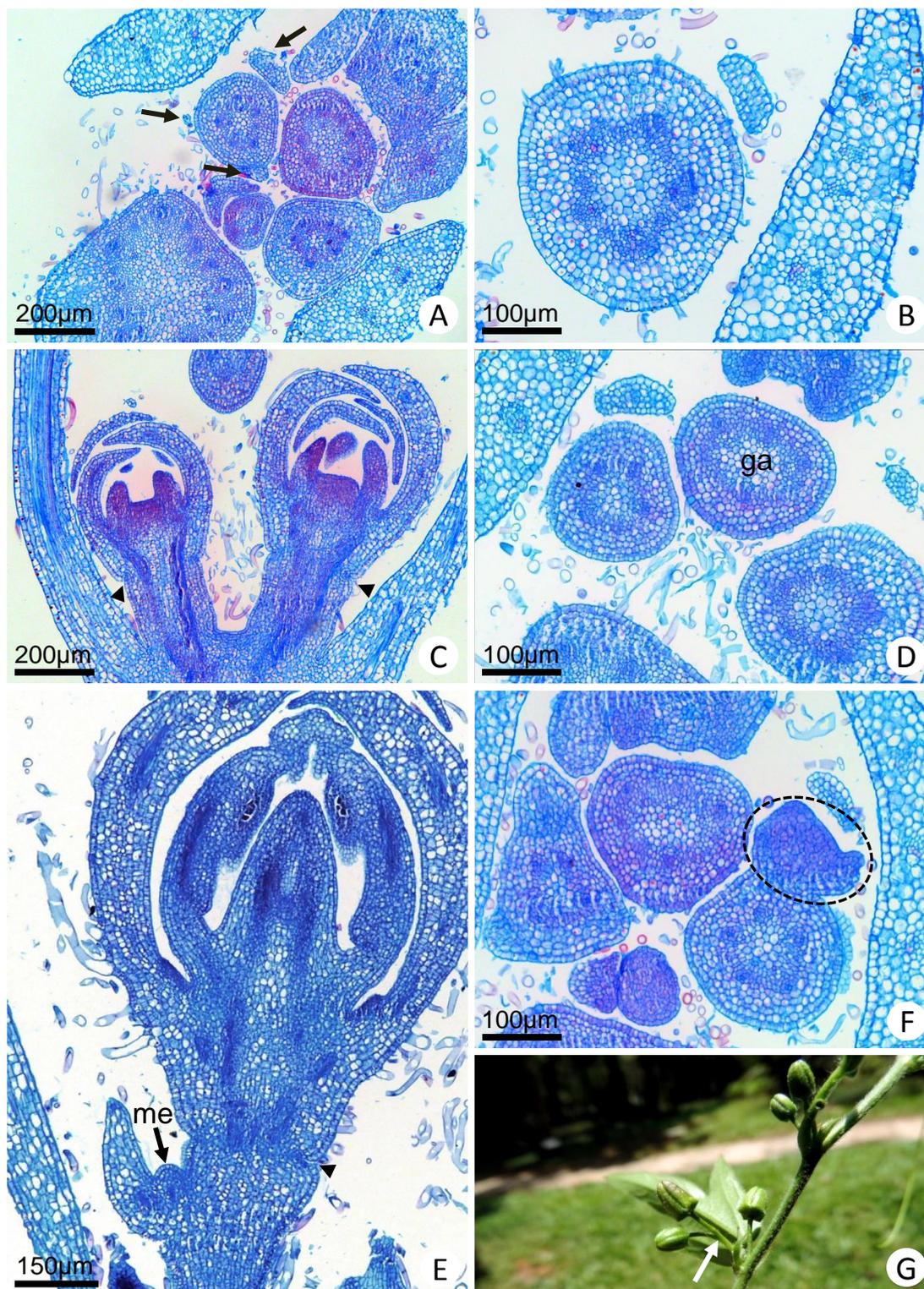


Figura 7. Ramo floral em *Passiflora suberosa*, visto em secção transversal (A-B, D, F) e longitudinal (C, E). **A.** Eixo de segunda ordem exibindo conjunto de três brácteas/bractéolas reduzidas (setas). **B.** Pedicelo portando apenas uma bractéola. **C.** Flores desprovidas de brácteas ou bractéolas. **D.** Pedicelos portando apenas uma bractéola. Notar posição adjacente à gavinha. **E-F.** Meristema se desenvolvendo na axila da bractéola mais externa (seta e região circulada). **G.** Axila foliar de *P. suberosa* portando três flores. Notar a posição de inserção da flor adicional no eixo de segunda ordem (seta). **ga** – gavinha.

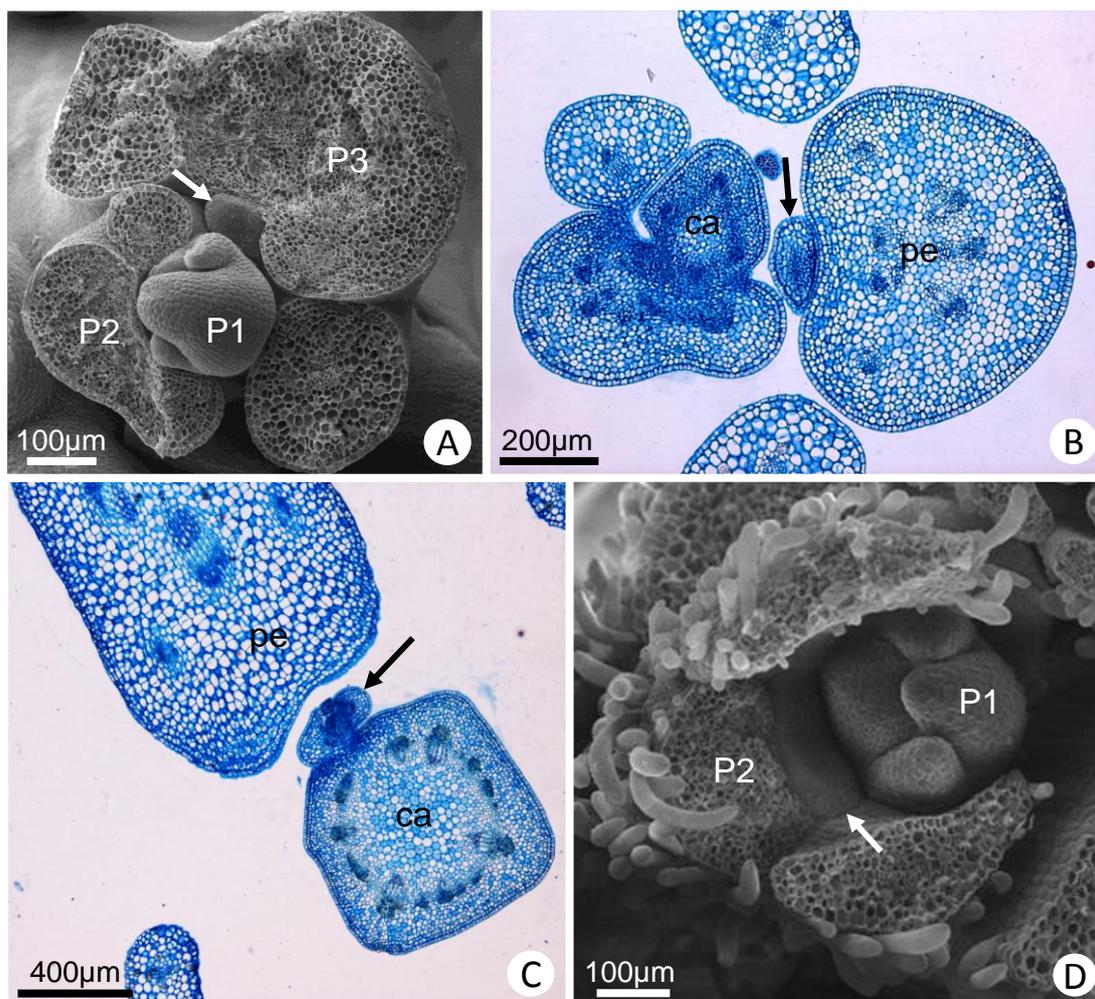


Figura 8. Desenvolvimento do meristema axilar em *Passiflora edulis* (A-C) e em *P. suberosa* (D) em estágio juvenil. A-B. Região do ápice caulinar mostrando o estabelecimento do meristema axilar no terceiro plastocrono (seta). B. Meristema axilar no quinto plastocrono exibindo a formação de dois perfis (seta). D. Estabelecimento do meristema axilar (seta) no segundo plastocrono de *P. suberosa*. ca – caule, pe – pecíolo, P1-3 – primórdio foliar em ordem do mais jovem para o mais desenvolvido.

estruturas produzidas nesse estágio. Elas podem passar por dois tipos de transição: (1) Transição rápida, na qual o primeiro nó portando gavinha já produz um botão floral; (2) transição gradual, onde um ou mais nós produzem gavinhas sem o desenvolvimento dos ramos florais (Figs. 2C-D, 9A-C).

Passiflora suberosa exibiu uma amplitude maior de plasticidade. Além das situações acima descritas, estruturas vestigiais podem ser formadas nos primeiros nós no qual uma gavinha é formada. Foi observada, em alguns indivíduos, a formação de duas dessas estruturas (Fig. 9D) no primeiro nó a produzir uma gavinha, ou seja, no primeiro nó formado após a transição de fase juvenil para a adulta.

Essas estruturas vestigiais são formadas pelo meristema axilar da mesma maneira que os ramos florais, inclusive em relação à sua posição e ordem de formação (Fig. 9E). Todavia, essas estruturas não se desenvolvem em flores e onde normalmente seriam encontrados meristemas florais, são encontradas células já em diferenciação. O tecido vascular nessas estruturas é ausente, sendo formados apenas parênquima e epiderme (Fig. 9F). Com a diferenciação precoce de células do meristema, essas estruturas cessam o crescimento e permanecem como dois primórdios abortados projetando-se das gavinhas (Fig. 9D).

Também foram encontradas situações onde uma flor pode se desenvolver, enquanto a segunda está ausente. Em seu lugar, uma estrutura vestigial é formada (Figs. 10A-B). Sua estrutura é muito similar àquela das estruturas vestigiais descritas acima, sendo não vascularizada e constituída apenas por parênquima e epiderme. Contudo, enquanto apresenta morfologia próxima à cilíndrica em sua base, exhibe achatamento de sua porção distal, tornando-se muito similar às brácteas e bractéolas presentes em algumas flores (Fig. 10C).

Os primórdios abortados podem ser facilmente identificados logo nos primeiros estágios de desenvolvimento de um nó, uma vez que eles rapidamente cessam seu crescimento, enquanto a gavinha e a gema vegetativa prosseguem normalmente com seu desenvolvimento (compare as figuras 10D e 6F). Embora *P. edulis* não produza primórdios abortados, indivíduos não juvenis crescidos em condições que não promovem o florescimento, produzem um ramo floral que não se desenvolve (compare as figuras 10E e 1A).

3.3. Desenvolvimento do complexo de gemas e brácteas na fase adulta de outras espécies

Tendo em vista a plasticidade encontrada em *P. suberosa*, optamos por investigar com mais detalhes o desenvolvimento dos ramos florais e de brácteas nas outras espécies de *Passiflora* abordadas no presente trabalho. No geral, diferenças no desenvolvimento podem ser observadas entre os subgêneros, embora o número de espécies estudadas seja menos representativo para os subgêneros *Deidamiodes*, *Astrophea* e *Decaloba*.

3.3.1. Subgênero *Passiflora*

As espécies do subgênero *Passiflora* apresentam o desenvolvimento semelhante ao descrito para *P. edulis*. Em secção transversal, a projeção que dará origem ao ramo floral tem formato próximo ao triangular, e as células mais diferenciadas encontram-se do lado oposto ao da gavinha (Figs. 11A-D).

Todas as espécies estudadas desse subgênero apresentam uma bráctea e duas bractéolas. Estes três órgãos crescem de maneira parecida, apresentando morfologia e tamanho semelhantes ao final do desenvolvimento, podendo ser reduzidas como em *P. kermesina*, *P. racemosa* e *P. edmundoi* (Figs. 11A, 11E-F), ou então possuindo

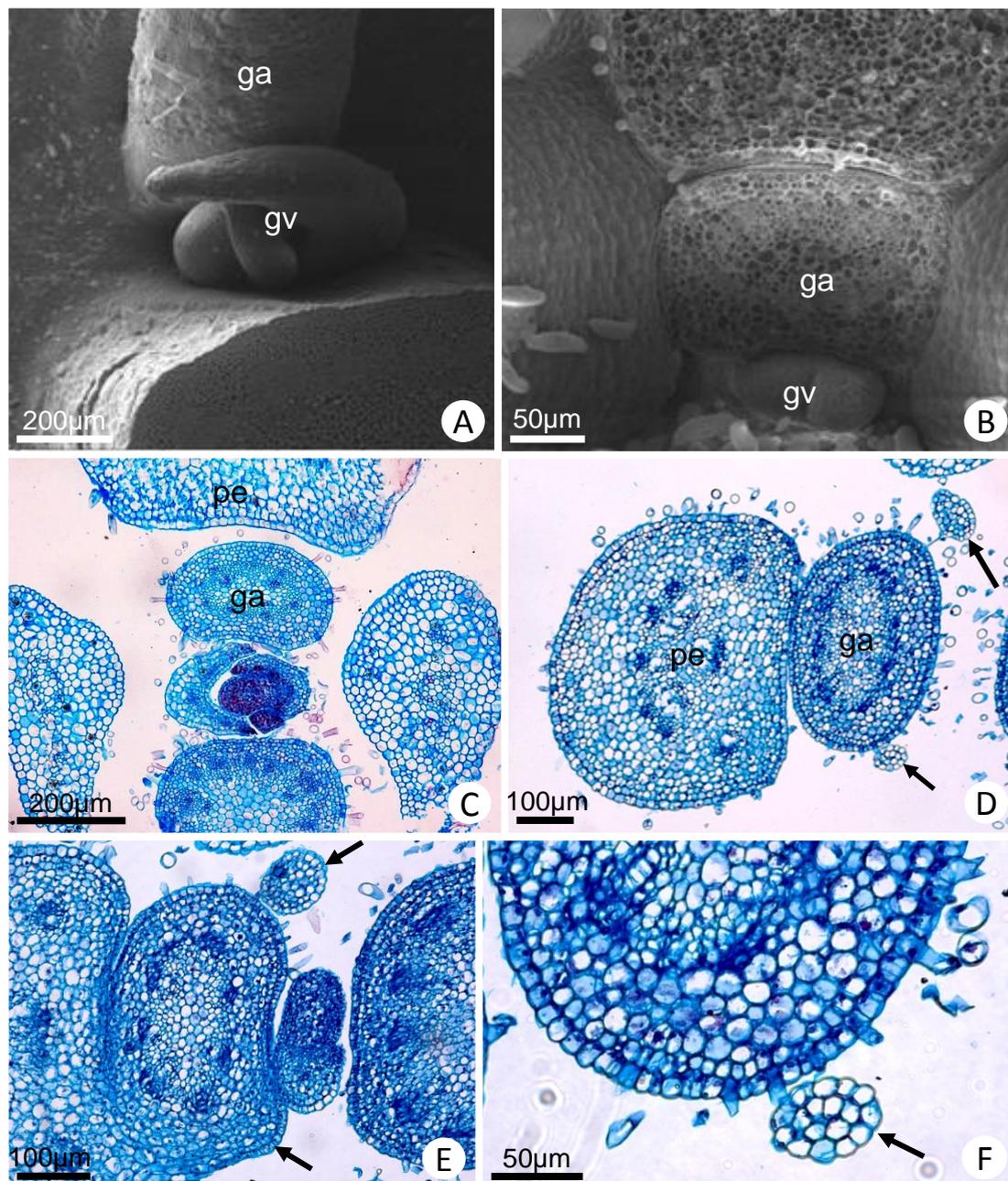


Figura 9. Axila foliar de indivíduos em fase de transição, de *Passiflora edulis* (A) e de *P. suberosa* (B-F). A-C. Axila foliar apresentando desenvolvimento de gavinha sem a produção de eixos de segunda ordem. D-F. Estruturas vestigiais (setas) formadas onde normalmente estaria presente uma flor. Notar a ausência de sistema vascular nessas estruturas. **ga** – gavinha, **gv** – gema vegetativa, **pe** – pecíolo.

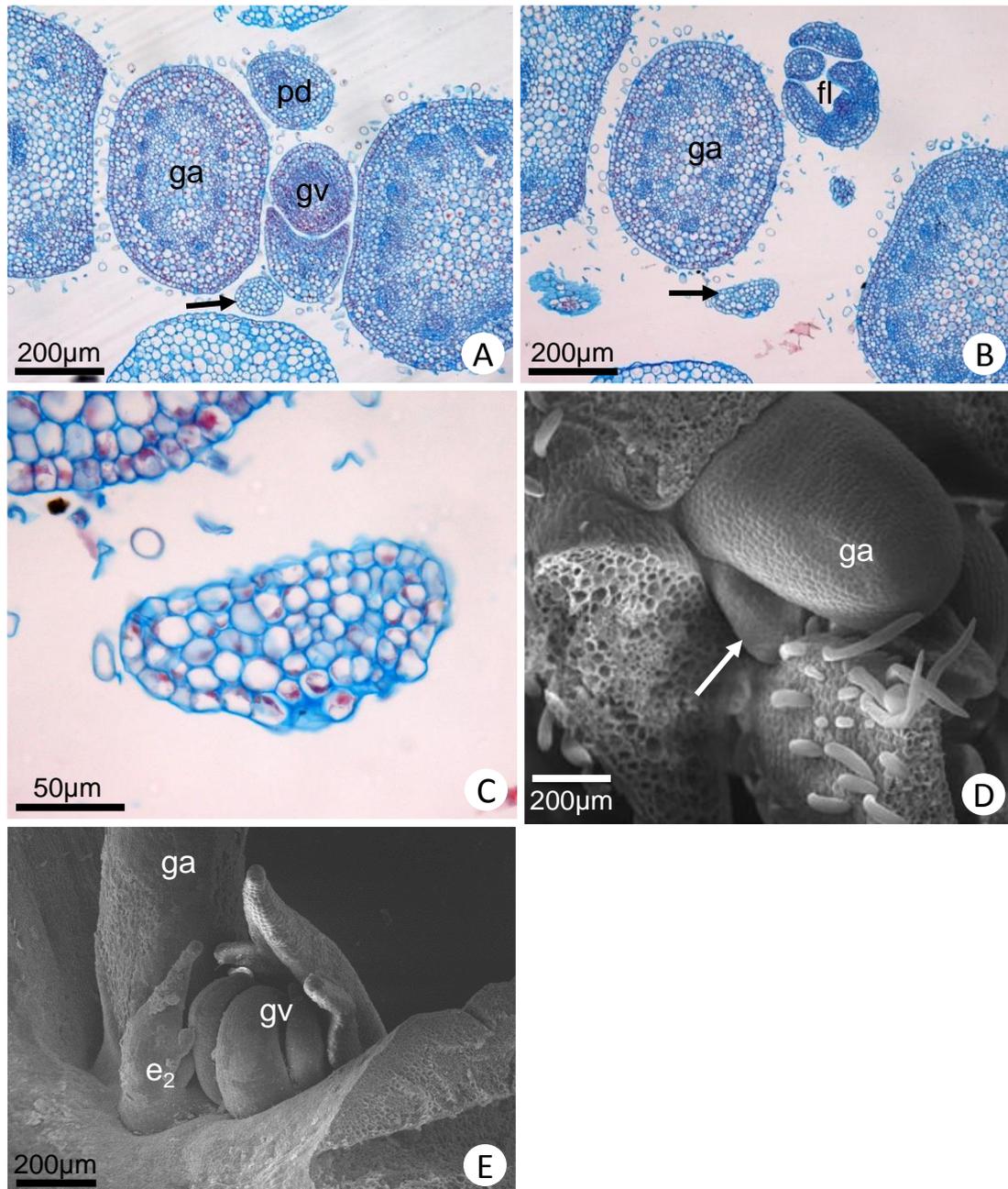


Figure 10. Aspectos do desenvolvimento de *Passiflora suberosa* (A-D) em fase de transição, e de *P. edulis* (E) em fase não floração. **A-B.** Axilar foliar portando apenas uma flor e uma estrutura vestigial (setas). **C.** Detalhe de uma estrutura vestigial com morfologia laminar. Note a ausência de tecido vascular ou células especializadas. **D.** MEV de uma gavinha portando uma estrutura vestigial em sua base (seta). **E.** MEV da axila foliar exibindo perfis da gema vegetativa, mas com o meristema floral com desenvolvimento interrompido. **e₂** – gema do eixo de segunda ordem da inflorescência, **fl** – flor, **ga** – gavinha, **gv** – gema vegetativa, **pd** – pedicelo.

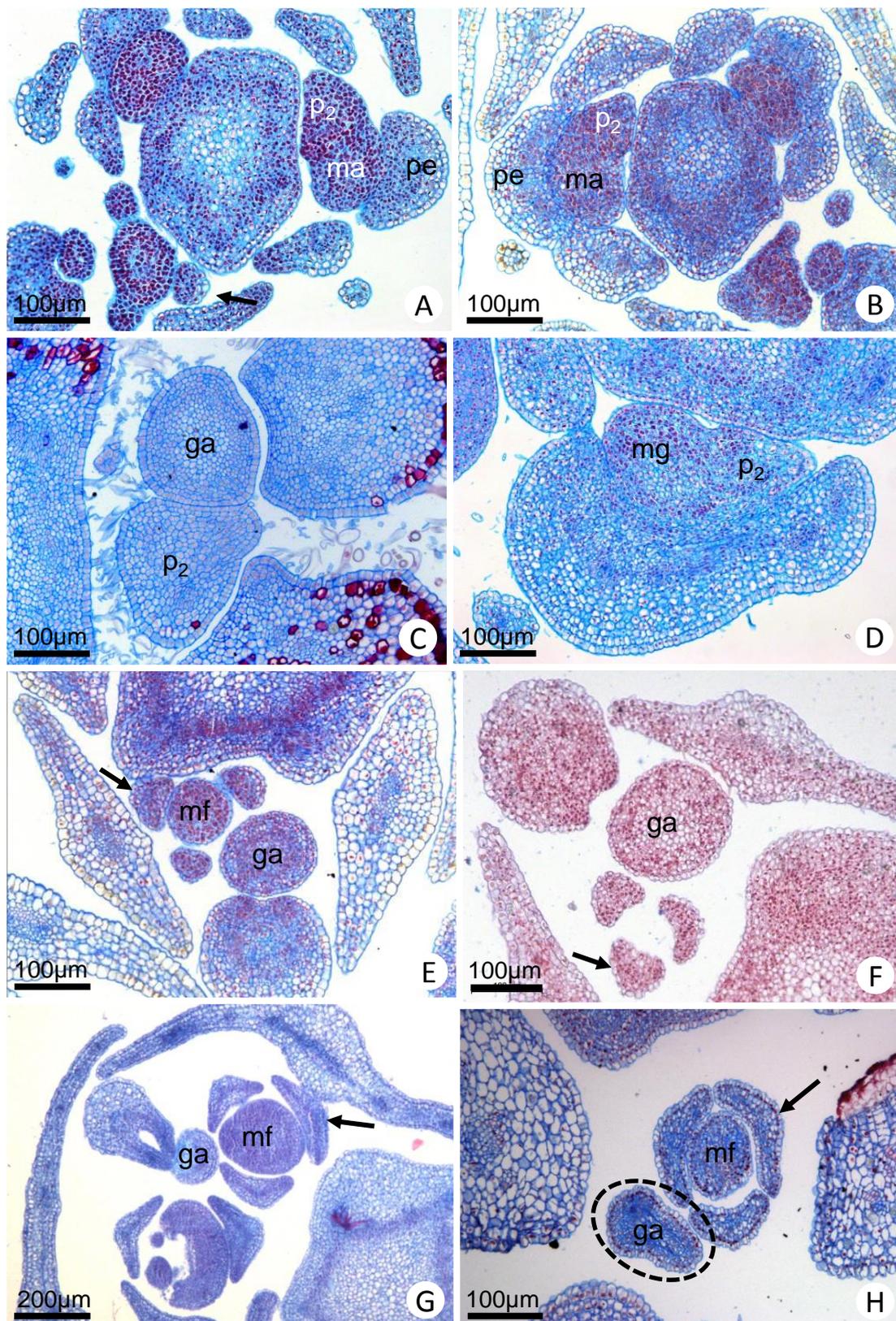


Figura 11. Desenvolvimento do complexo de gemas em *Passiflora* visto em secção transversal. Notar formato próximo ao triangular da projeção do meristema axilar. **A.** *P. kermesina*. **B.** *P. racemosa*. **C.** *P. coccinea*. **D.** *P. incarnata*. **E.** *P. racemosa*. **F.** *P. edmindoi*. **G.** *P. mucronata*. **H.** *P. platyloba*. **ga** – gavinha, **ma** – meristema axilar, **mf** – meristema floral, **pe** – pecíolo, **p₂** – primórdio do eixo de segunda ordem da inflorescência, **circulo** – gavinha com desenvolvimento retido. **setas** – bráctea.

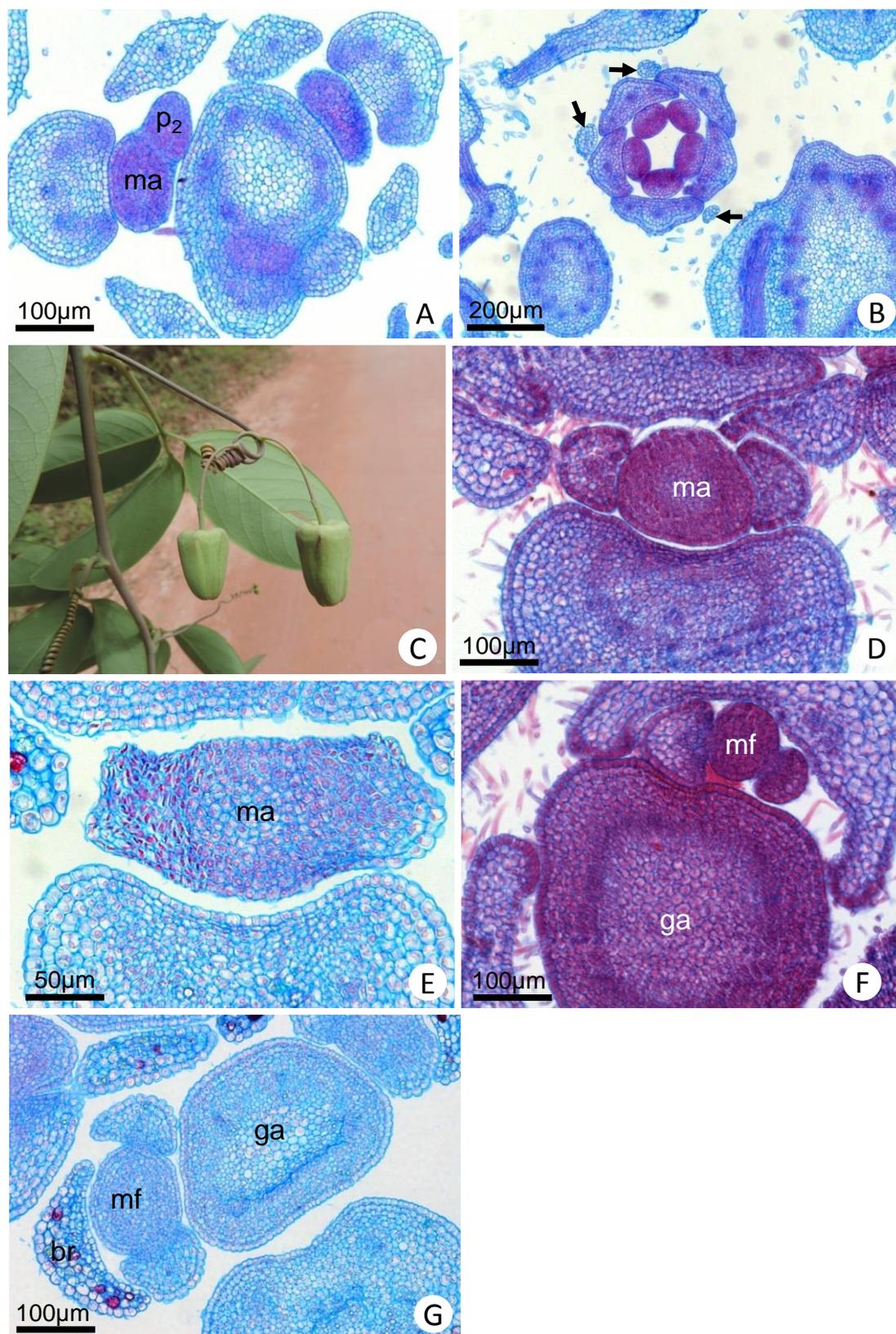


Figura 12. Desenvolvimento do complexo de gemas em *Passiflora morifolia* (A-B), *P. deidamioides* (C, E e G) e *P. haematostigma* (D e F). C. Morfologia da inflorescência de *P. deidamioides*. Notar pedúnculo alongado. D-E. Iniciação de brácteas pelo meristema axilar. F-G. Meristemas florais após a produção de duas bractéolas. br – bráctea, ga – gavinha, ma – meristema axilar, mf – meristema floral, p_2 – primórdio do eixo de segunda ordem da inflorescência, setas – brácteas e bractéolas reduzidas.

uma lâmina mais desenvolvida, como em *P. edulis*, *P. mucronata* e *P. platyloba* (Figs. 4E, 11G-H).

Passiflora mucronata e *P. platyloba* foram as únicas espécies a apresentar situação onde a gavinha retém seu desenvolvimento enquanto os ramos florais prosseguem, produzindo flores. Esta condição foi observada em diversos nós, sendo que em *P. platyloba* o ápice da gavinha encontra-se curvado e em altura abaixo do meristema floral, normalmente sendo observado em secção transversal na mesma altura das brácteas e bractéolas do ramo floral (Figs. 11G-H).

3.3.2. Subgênero *Decaloba*

Assim como em espécies do subgênero *Passiflora*, *P. morifolia* também apresenta o primório que dará origem ao ramo floral com secção transversal em formato próximo ao triangular (Fig. 12A). Da mesma maneira, o vértice exterior dá origem a uma bráctea enquanto o meristema em sua axila produz duas bractéolas.

Diferentemente de *P. suberosa*, em *P. morifolia* não foram observadas variações no número de brácteas ou bractéolas, embora estas também sejam muito reduzidas em comparação com às das espécies do subgênero *Passiflora* (Fig. 12B).

Outra importante observação realizada em ápices de *P. morifolia* diz respeito à existência de diversos nós nos quais uma gavinha é produzida sem a formação de ramos florais ou estruturas vestigiais quaisquer. Essa situação é idêntica à descrita para indivíduos de *P. edulis* em transição de fase, porém ocorrendo aqui em diversos nós consecutivos.

3.3.3. Subgêneros *Deidamioides* e *Astrophea*

Passiflora deidamioides apresenta uma condição única nas espécies analisadas: a presença do pedúnculo alongado (Fig. 12C). Analisando a sequência do

desenvolvimento dos ramos florais em *P. deidamioides* e *P. haematostigma*, notamos que o meristema axilar produz sequencialmente dois primórdios de brácteas lateralmente (Figs. 12D-E), da mesma maneira que as projeções que darão origem aos ramos florais são produzidos em outras espécies. Na axila de tais brácteas se estabelecem meristemas axilares que prontamente entram em atividade produzindo um par de bractéolas, e então tornando-se meristemas florais (Figs. 12F-G).

4. Discussão

4.1. Origem dos ramos florais

Desde os trabalhos de Shah & Dave (1970, 1971), a interpretação do processo ontogenético que dá origem ao complexo de gemas tem sido a de divisão de um meristema axilar inicial em dois ou três meristemas. O meristema central sempre cresce dando origem à gavinha, enquanto os laterais produzem três brácteas, tornando-se então um meristema floral (Shah & Dave, 1970; 1971). Esse mesmo padrão de desenvolvimento é descrito por Cutri *et al.* (2013), para espécies dos subgêneros *Passiflora*, *Decaloba* e *Deidamioides*, embora curiosamente os autores façam a distinção entre brácteas e bractéolas. De fato, observando-se a maioria das espécies dos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*, mesmo do ponto de vista ontogenético, seria possível assumir tal interpretação.

Contudo, é notável a incoerência entre os estudos de desenvolvimento e trabalhos que abordam a morfologia, taxonomia e evolução de inflorescências em *Passiflora*. Desde meados do século XIX, já havia sido proposto que a gavinha seria um ramo que porta uma bráctea em sua base, na axila da qual se desenvolve uma flor (Wylder, 1852). Outra descrição seria a da gavinha portando um perfilo em sua base (Hagerup, 1930).

O modelo básico de inflorescência em Passifloraceae é tido como uma cimeira composta, podendo apresentar vários graus de redução, sendo que suas ramificações são sempre subtendidas por brácteas (Krosnick & Freudenstein, 2005). Muitas espécies de *Passiflora* possuem inflorescências reduzidas, de maneira que seu pedúnculo (i.e., a região do eixo central que fica abaixo da primeira ramificação) é inexistente, deslocando então as brácteas para os pedicelos. Assim, as inflorescências são sésseis e os pedicelos apresentam três brácteas (uma bráctea deslocada e duas bractéolas; Feuillet & MacDougal, 2007).

Ao mesmo tempo, a condição plesiomórfica para o gênero *Passiflora* é a presença de duas pequenas brácteas abaixo de cada flor, situação descrita para alguns representantes de *Deidamioides* (Ulmer & MacDougal, 2004). Assim sendo, a condição de três brácteas surgiria como uma condição derivada, tendo ocorrido reversão em algumas espécies, como em *P.hahnii* e *P. suberosa*, ambas pertencentes ao subgênero *Decaloba* (Ulmer & MacDougal, 2004). A presença de três brácteas no pedúnculo/pedicelo floral em *Passiflora* é considerada como uma característica incomum, uma vez que a maioria das eudicotiledôneas apresentam duas bractéolas em cada ramo floral (Ulmer & MacDougal, 2004; Prenner *et al.*, 2009).

Ocorre, portanto, uma divergência entre as informações taxonômicas, ontogenéticas e evolutivas do caráter, sendo que várias evidências surgidas ao longo do histórico de estudos apontam para uma interpretação da ontogenia diferente daquela aceita nos dias de hoje. Com exceção de *P. suberosa*, que exhibe plasticidade, todas as espécies observadas no presente trabalho possuem um conjunto de três estruturas foliares por flor produzida, sejam elas chamadas de brácteas ou bractéolas.

A observação do desenvolvimento da axila foliar de espécies dos subgêneros *Astrophea* e *Deidamioides*, realizada neste estudo, revela que o meristema axilar

produz inicialmente uma bráctea, na axila da qual está presente um meristema. Esse meristema produz duas bractéolas e então se transforma em um meristema floral. Esse padrão de desenvolvimento é o mais comum para eudicotiledôneas (Prenner *et al.*, 2009).

Com base nesses dados, é plausível a interpretação de que nos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba* o padrão de desenvolvimento seja o mesmo, em oposição à ideia de um meristema axilar que se divide diretamente em meristemas florais que, por sua vez, produzem três brácteas. Analisando-se as projeções do meristema axilar que darão origem aos ramos florais, percebemos que a porção mais distante do que se tornará o meristema da gavinha, ou seja, o “vértice” da forma triangular trata-se da bráctea. Portanto, as outras duas “brácteas” descritas na literatura são bractéolas presentes na base da flor. Assim, resolve-se a problemática acerca da divisão do meristema axilar em um complexo de meristemas sem a formação de órgãos foliares, bem como aquela sobre o número de brácteas.

A dificuldade na interpretação da arquitetura de inflorescências em Passifloraceae decorre tanto do alto grau de redução estrutural, como da rapidez na ontogênese dessas estruturas nos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*. Nesses casos, o meristema da bráctea expande-se e produz as bractéolas imediatamente após seu estabelecimento. Contribui também para a má interpretação o fato de brácteas e bractéolas geralmente atingirem o mesmo tamanho e morfologia. De fato, Shah & Dave (1971) observam que *Passiflora vespertilio* L. (subgênero *Decaloba*) parece apresentar o ramo floral na base da bráctea, mas concluem erroneamente que é o meristema do ramo floral que produz três brácteas, visto que estas formam um involúcro floral.

Dada a grande variação de tamanhos e formas, brácteas/bractéolas estavam entre os primeiros caracteres utilizados para definição de grupos dentro do gênero *Passiflora* (Ulmer & MacDougal, 2004). Recentemente, Milward-de-Azevedo *et al.* (2014) utilizam caracteres relacionados às brácteas na elaboração de uma filogenia para o subgênero *Decaloba*, inclusive sua filotaxia (alterna ou verticilada). Será interessante reavaliar a evolução deste caráter no grupo sob a luz da interpretação levantada no presente estudo. Estados de caractere como a presença de duas ou três brácteas, tratadas como condição plesiomórfica ou apomorfica, respectivamente, bem como sua filotaxia, vem sendo considerados de maneira equivocada. Com base nos resultados aqui expostos, o caráter mais correto a ser considerado é a redução ou não da bráctea em relação às bractéolas, bem como o tempo de iniciação desses primórdios.

Passiflora suberosa representa um caso à parte: nas ocasiões em que apenas duas estruturas são formadas por flor, a estrutura ausente é a bráctea. Assim sendo, os primórdios produzidos pelo meristema axilar parecem ser diretamente outros meristemas, e não uma bráctea. Mesmo quando a bráctea é presente, parece ser produzida pelo meristema do ramo floral, dado seu tamanho reduzido.

Isso, contudo, não invalida a interpretação aqui proposta. Esse deve tratar-se de um caso de extrema redução da bráctea em prol de um maior investimento em seu meristema axilar. O mecanismo através do qual isso ocorre pode estar relacionado à expressão do gene ortólogo ao *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*. Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., o destino de células de um determinado primórdio produzido em um meristema está intimamente relacionado com a expressão de *STM*, que é expresso no meristema apical caulinar e é regulado negativamente em células que farão parte de um novo primórdio. Contudo, um grupo de poucas células na região

abaxial do novo primórdio mantém a expressão de *STM* e posteriormente se desenvolve em um meristema axilar (Long & Barton, 2000). Assim, células que expressam *STM* mantêm a identidade meristemática enquanto células que deixam de expressar *STM* tornam-se um órgão determinado (folha, bráctea ou órgãos florais) (Long & Barton 2000). É possível então que em *P. suberosa*, um grande grupo de células do novo primórdio formado pelo meristema axilar mantenha a expressão do ortólogo de *STM*, mantendo dessa forma sua identidade meristemática, enquanto uma pequena região onde esse gene foi desligado componha uma bráctea diminuta.

4.2. Gema vegetativa

Enquanto um único meristema se desenvolve na axila foliar da maioria das angiospermas, meristemas acessórios podem ocorrer em alguns táxons. Em Cucurbitaceae, por exemplo, ocorre uma situação semelhante àquela encontrada em Passifloraceae: o meristema inicial se subdivide em (1) uma gavinha ramificada, (2) uma flor pistilada, (3) uma inflorescência estaminada, e (4) uma gema vegetativa (Gerrath, *et al.*, 2008). Desta forma, o meristema vegetativo parece surgir como uma subdivisão do meristema axilar inicial.

Em *Passiflora*, o desenvolvimento da gema vegetativa começa quando todos os tecidos circundantes já estão em pleno processo de diferenciação. Esse fato, combinado com sua posição (região adaxial da base da gavinha), aponta para uma origem diferente daquela dos meristemas florais. Assim sendo, o meristema vegetativo surge como uma nova estrutura, independente da atividade meristemática do meristema axilar original. Esta interpretação vai de encontro à observação de Shah & Dave (1970, 1971) de que a gema vegetativa em espécies de *Passiflora* surge como uma gema acessória derivada de tecidos caulinares.

Ainda assim, é importante ressaltar que o grupo de células que dão origem ao meristema vegetativo pode ter seu destino determinado por meio da expressão de *STM*, da mesma maneira como descrito para o meristema axilar da bráctea. Assim, um grupo incipiente de células manteria expressão de *STM* desde sua separação do meristema apical caulinar, desenvolvendo o meristema acessório vegetativo apenas em plastocronos mais avançados.

A origem evolutiva do meristema acessório vegetativo está, provavelmente, ligada ao recrutamento do meristema axilar original para a produção de uma gavinha. Dado seu hábito, as espécies de *Passiflora* dependem de suas gavinhas ao longo de todo o ano, e não só durante o período de floração. Assim sendo, o meristema axilar passou a produzir gavinhas (e conseqüentemente flores) em todos os nós após a passagem para o estágio adulto. Contudo, este padrão de desenvolvimento tornaria a planta incapaz de ramificação, ameaçando assim a continuidade de seu desenvolvimento, uma vez que seus meristemas axilares seriam sempre consumidos para a produção de gavinhas e flores. A solução para este problema foi a seleção de um mecanismo capaz de promover a formação de um meristema secundário, capaz de crescer vegetativamente quando necessário.

Esta hipótese é sustentada também pelo fato de que outras espécies de hábito escandente, que se utilizam de gavinhas associadas a estruturas reprodutivas, também são capazes de produzir gemas vegetativas acessórias, como Cucurbitaceae ou Sapindaceae, ou então apresentam alternância entre a produção de gavinhas e inflorescência, como Vitaceae (Millington, 1966; Boss & Thomas, 2002; Carmona *et al.*, 2002; Calonje *et al.*, 2004; Gerrath, *et al.*, 2008).

4.3. Natureza da gavinha

Havendo estabelecido que o meristema axilar em *Passiflora* se comporte inicialmente como um meristema de inflorescência, resta agora a questão: A gavinha surge por modificação de qual estrutura?

A origem evolutiva da gavinha em *Passiflora* foi interpretada de diferentes maneiras ao longo da história, variando de uma flor modificada a um simples crescimento do meristema axilar (Darwin, 1865; Gangstad, 1938; Shah & Dave, 1970; 1971; Cutri *et al.*, 2013). Mais recentemente, com base em um cenário filogenético bem sustentado, a gavinha foi sugerida como a porção terminal de uma cimeira composta (Krosnick & Freudenstein, 2005).

A busca do órgão ao qual a gavinha de *Passiflora* é homóloga não é uma questão simples de ser abordada. Interpretações de que a gavinha representa uma flor modificada têm por base a topologia da inflorescência. Contudo, essa interpretação implica na conversão de uma flor em outro órgão, o que deveria resultar na presença de caracteres vestigiais, sejam eles estruturais ou ontogenéticos, como subproduto. Ou seja, se gavinhas são flores modificadas, seria esperado que compartilhassem alguns passos de seu desenvolvimento.

Como previamente discutido, os primeiros órgãos formados no ramo floral são duas bractéolas. Além disso, *P.suberosa* apresenta uma constrição na base de suas flores. A presença de constrições em flores é um caráter conhecido para alguns grupos de plantas e pode fornecer evidência para a interpretação da arquitetura de suas inflorescências (Prenner & Rudall, 2007). Em *Euphorbia* L. e outros membros da subtribo Euphorbiinae (Euphorbiaceae), por exemplo, cada estame possui uma constrição em sua base. Além disso, existem diferenças morfológicas entre a porção proximal (pedicelo) e distal (filete) em relação à constrição, levando à interpretação

dessa constrição como sendo um perianto suprimido. Portanto, a inflorescência destas espécies é interpretada como um agregado de flores extremamente reduzidas (Prenner & Rudall, 2007).

Contudo, bractéolas e constrições não foram encontradas na base da gavinha de quaisquer das espécies analisadas no presente estudo. A gavinha parece, portanto, surgir por meio da continuidade do crescimento do eixo principal da inflorescência, sem a indução ao desenvolvimento floral. Essa interpretação é sustentada pela reversibilidade da identidade do meristema da gavinha para meristema apical caulinar quando submetido a condições ambientais específicas (Cutri *et al.*, 2013)

4.4. Plasticidade do desenvolvimento

Foi observada a plasticidade no desenvolvimento do complexo de gemas e suas estruturas derivadas em um mesmo indivíduo de algumas espécies. É notável a variação encontrada no número de flores produzidas por nó. Embora coerentes com a descrição dos subgêneros (Feuillet & MacDougal, 2004), os resultados obtidos confrontam com o que é descrito como situação típica encontrada nos subgêneros, i.e., uma flor no subgênero *Passiflora*, e duas flores no subgênero *Decaloba* (Cutri *et al.*, 2013).

Seis, das onze espécies do subgênero *Passiflora* apresentaram duas flores por nó. Além disso, cinco destas espécies exibem plasticidade, podendo produzir uma ou duas flores em nós de um mesmo ramo. Acredita-se que o mecanismo ontogenético que controla a produção de uma ou duas flores é susceptível a mudanças induzidas por condições ambientais ou hormônios (Cutri *et al.*, 2013). Essa habilidade foi demonstrada em *P. edulis*, indicando assim que espécies que produzem apenas uma flor retêm o mecanismo molecular para a produção de mais flores (Cutri *et al.*, 2013).

Passiflora suberosa foi a única espécie observada capaz de produzir mais de duas flores por nó, sendo essas formadas por meristemas presentes nas axilas das bractéolas. Desta maneira, bractéolas subtendendo outros ramos florais se comportam como brácteas de um ramo de segunda ordem dentro de um dicásio, indicando maior grau de ramificação desta inflorescência (Krosnick & Freudenstein, 2005; Prenner *et al.*, 2009).

Outro aspecto observado em relação à plasticidade diz respeito a mudanças observadas entre os diferentes estágios de vida da planta. Espécies de *Passiflora* passam por uma transição marcada pelo início da produção de gavinhas e flores, bem como por mudança no formato de folhas (lanceoladas em estágio juvenil para trilobadas em estágio adulto de *Passiflora edulis*; Cutri *et al.*, 2013). Nossos dados demonstram também a mudança na filotaxia entre os diferentes estágios.

A plasticidade no desenvolvimento pode ser especialmente notada durante a transição de estágios de vida. Flores podem estar presentes ou ausentes nos primeiros nós nos quais uma gavinha é formada. Além disso, estruturas vestigiais foram encontradas em *P. suberosa* no lugar de flores.

A formação de primórdios “abortados” em *P. suberosa* pode indicar mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento de gavinhas e ramos florais. É possível que a maquinaria responsável pela iniciação e manutenção de meristemas florais necessite de um nível crítico de expressão de um dado conjunto de genes para que possa funcionar adequadamente. Assim sendo, embora suficiente para a iniciação de um primórdio de ramo floral, o meristema deste é prontamente consumido com a diferenciação de células parenquimáticas.

A observação de estruturas semelhantes a brácteas no lugar onde normalmente haveria um meristema do ramo de segunda ordem aponta para outra possibilidade: a

alteração na expressão do ortólogo putativo de *STM*, de modo que o primórdio produzido pelo meristema axilar torna-se uma bráctea sem o desenvolvimento de seu meristema axilar que dará origem ao meristema floral.

Em *P. suberosa* o número de brácteas/bractéolas produzidas varia. Esse fato, associado às outras formas de plasticidade encontrada na espécie, sugere uma maior flexibilidade dos mecanismos moleculares capazes de regular tais características. Essa hipótese é suportada pelo fato de *P. suberosa* ser uma espécie tetraploide, dispondo assim de genoma com maior diversidade de alelos (Snow & MacDougal, 1993; Yotoko *et al.*, 2011).

5. Conclusões

O presente estudo apresenta uma nova proposta quanto a ontogenia das estruturas presentes na axilar foliar de espécies de *Passiflora*. Aqui demonstramos que a formação do complexo de gemas fundamenta-se na produção de brácteas e meristemas associados a partir do meristema axilar, que então se torna o meristema da gavinha. Não foram encontradas evidências que suportem a proposta de homologia entre flores e gavinhas, sendo mais provável que está seja uma modificação do eixo de primeira ordem da inflorescência.

6. Referências

- Boss, P. K.; Thomas, M. R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape “green revolution” mutation. **Nature** **416**: 847–50.
- Calonje, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J. M.; Carmona, M. J. 2004. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. **Plant** **135**: 1491–1501.

- Carmona, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J. 2002. *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. **Plant Physiology** **130**: 68–77.
- Cusset, G. 1968. Les vrilles des Passifloracées. **Bulletin de la Société Botanique de France** **115**: 45–61.
- Cutri, L. 2009. Estudo da função do gene *LEAFY* (*LFY*) em duas espécies de *Passiflora*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Cutri, L.; Nave, N.; Ami, M. Ben; Chayut, N.; Samach, A.; Dornelas, M. C. 2013. Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. **Mechanisms of development** **130**: 61–69.
- Darwin, C. R. 1865. On the movements and habits of climbing plants. **Journal of the Linnean Society of London (Botany)** **9**: 1-118.
- Esau, K. 1960. Anatomy of seed plants. Wiley & Sons, New York.
- Feuillet, C. P.; Macdougall, J. M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora** **13**: 34-38.
- Feuillet, C. P.; Macdougall, J. M. 2007. Passifloraceae. In: Kubitzki, K. 2007. **The families and Genera of vascular Plants**. Springer Berlin Heidelberg.
- Gangstad, V. 1938. A morphological study of the leaf and tendril of *Passiflora caerulea*. **American Midland Naturalist** **20**: 704–708.
- Gerrath, J. M.; Guthrie, T. B.; Zitnak, T. a; Posluszny, U. 2008. Development of the axillary bud complex in *Echinocystis lobata* (Cucurbitaceae): interpreting the cucurbitaceous tendril. **American journal of botany** **95**: 773–781.
- Gourlay, C. W.; Hofer, J. M.; Ellis, T. H. 2000. Pea compound leaf architecture is regulated by interactions among the genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, and *TENDRIL-LESSN*. **The Plant cell** **12**: 1279–1294.

- Hagerup, O. 1930. Vergleichende morphologische und systematische Studien über die Ranken und andre vegetative Organe der Cucurbitaceen und Passifloraceen. **Dansk Botanisk Arkiv** 6. Bd., Nr. 8: 1-103.
- Hansen, A. K.; Gilbert, L. E.; Simpson, B. B.; Downie, S. R.; Cervi, A. C.; Jansen, R. K. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31: 138–150.
- Isnard, S.; Silk, W. K. 2009. Moving with climbing plants from Charles Darwin's time into the 21st century. **American journal of botany** 96: 1205–1221.
- Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. 3.ed. Paul B. Hoeber Inc, New York.
- Kraus, J. E.; Sousa, H. C.; Rezende, M. H.; Castro, N. M.; Vecchi, C. & Luque, R. 1998. Astra blue and basic fucsin double staining of plant materials. **Biotechnic & Histochemistry** 73: 235 – 243.
- Krosnick, S. E.; Freudenstein, J. V. 2005. Monophyly and Floral Character Homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). **Systematic Botany** 30: 139–152.
- Long, J.; Barton, M. K. 2000. Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. **Developmental biology** 218: 341–353.
- Millington, W. 1966. The tendril of *Parthenocissus inserta*: determination and development. **American Journal of Botany** 53: 74–81.
- Milward-de-Azevedo, M. A.; Freitas, L. B. De; Kinoshita, L. S. 2014. Taxonomy and evolutionary relationships of *Passiflora* subg. *Decaloba* supersect. *Decaloba* sect. *Xerogona* (Passifloraceae): contributions of palynological, morphological and molecular studies. **Acta Botanica Brasilica** 28: 301–308.
- Nave, N.; Katz, E.; Chayut, N.; Gazit, S.; Samach, A. 2010. Flower development in the passion fruit *Passiflora edulis* requires a photoperiod-induced systemic graft-transmissible signal. **Plant, cell & environment** 33: 2065–2083.
- Pantano, S. C. 2007. Propagação. In: Leonel, S.; Sampaio, A. C. 2007. **Maracujá-doce: aspectos técnicos e econômicos**. Editora UNESP, São Paulo.

- Prenner, G.; Rudall, P. J. 2007. Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and its allies: exploring the organ–flower–inflorescence boundary. **American journal of botany** **94**: 1612–1629.
- Prenner, G.; Vergara-Silva, F.; Rudall, P. J. 2009. The key role of morphology in modelling inflorescence architecture. **Trends in plant science** **14**: 302–309.
- Ruzin, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.
- Shah, J.; Dave, Y. 1970. Tendrils of *Passiflora foetida*: Histogenesis and Morphology. **American Journal of Botany** **57**: 786–793.
- Shah, J.; Dave, Y. 1971. Morpho-histogenic studies on tendrils of *Passiflora*. **Annals of Botany** **35**: 627–635.
- Silveira, M. 1989. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Souza, W. (ed.). **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. v.1. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro.
- Snow, N.; MacDougal, J. M. 1993. New Chromosome Reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany** **18**: 261–273.
- Sousa-Baena, M. S.; Sinha, N. R.; Lohmann, L. G. 2014. Evolution and Development of Tendrils in Bignoniaceae (Lamiales, Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **99**: 323–347.
- Ulmer, T., & MacDougal, M. J. 2004. **Passiflora: Passionflowers of the world**. Timber Press, Inc., Portland.
- Wydler, H. 1852. **Ueber einige Eigenthümlichkeiten der Gattung *Passiflora***. Mitth d. Bern. Naturh. Ges. No.243-244.
- Yotoko, K. S. C.; Dornelas, M. C.; Togni, P. D.; Fonseca, T. C.; Salzano, F. M.; Bonatto, S. L.; Freitas, L. B. 2011. Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. **PLoS one** **6**: 1-8.



Capítulo II

**Expressão de *PasAP1*, ortólogo de *APETALA1*,
durante o desenvolvimento do complexo de gemas
em *Passiflora L.***

Resumo

Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae), o gene *APETALA1* (*API*), pertencente à família MADS-box, desempenha dois papéis distintos: o estabelecimento e manutenção da identidade dos meristemas florais, e a atividade de gene da classe A do modelo ABC, determinando a identidade de sépalas e pétalas. Tendo em vista sua função no estabelecimento da identidade dos meristemas florais, *API* age diretamente no controle da arquitetura da inflorescência juntamente com os genes *LEAFY* (*LFY*) e *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*). Em *Passiflora*, a gavinha está ligada ao desenvolvimento reprodutivo, tendo sido interpretada como uma flor ou inflorescência modificada. Neste trabalho, nós mostramos a expressão dos ortólogos de *API* em duas espécies de *Passiflora* em diferentes órgãos e etapas do desenvolvimento da gema axilar. Nossos resultados demonstram que *PasAPI* apresenta uma grande amplitude de expressão se comparado a seus ortólogos em outras espécies nas quais tem a função de determinação de identidade meristemática floral e de gene da classe A, expressando em outros verticilos florais e em outros tecidos meristemáticos como sistema vascular, meristema vegetativo e folhas, indicando uma possível função na manutenção destas características.

Palavras-chave: gavinha; complexo de gemas, euAPI

Abstract

The *Arabidopsis* MADS-box gene *APETALA1* (*API*) plays two distinct roles: it acts as a floral meristem identity gene and also as a class A gene from the ABC model, establishing sepal and petal identity. Given its meristem identity function, it interacts with *LEAFY* (*LFY*) and *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) to establish inflorescence architecture. In *Passiflora*, a tendril is linked to reproductive development, and it is currently understood as a modified terminal flower or as a modified inflorescence axis. Therefore, the present work aimed to assess the expression pattern of *PasAPI*, the orthologs of *API* in *Passiflora* species during the bud complex development. We show that *PasAPI* has a much broader expression than *API* in *Arabidopsis*. Transcripts were found in floral organs other than sepals and petals. We also found evidence of its expression in vegetative meristems, procambium and meristematic tissues of leaves, pointing to a possible function in the maintenance of meristematic characteristics.

Key words: tendril, bud complex, euAPI

1. Introdução

Os fatores de transcrição da família MADS-box estão presentes em diversos organismos eucariotos. Em plantas, esses genes controlam variados fatores do desenvolvimento, sobretudo no que se refere à transição de fase (vegetativa – reprodutiva) e ao desenvolvimento floral e do fruto (Shore & Sharrocks, 1995). O nome “MADS” é um acrônimo das quatro primeiras proteínas descritas: MCM1 (de *Saccharomyces cerevisiae*), AGAMOUS (de *Arabidopsis thaliana*), DEFICIENS (de *Antirrhinum majus*) e SRF (de *Homo sapiens*) (Schwarz-Sommer, *et al.*, 1990).

As proteínas codificadas pelos genes MADS, em plantas, possuem 4 domínios bem definidos, cada qual demonstrando diferentes funções (para uma revisão sobre o tema, veja Theissen *et al.*, 2000):

- “MADS” – a região mais bem conservada da proteína. Atua primariamente na ligação com a molécula de DNA de maneira específica em uma região chamada de “CArG box”, composta por sequências GG(A/T)₆GG (Shore & Sharrocks, 1995; Tilly *et al.*, 1998);
- “intervening” (I) – promove a formação de dímeros que tem a capacidade de ligação com DNA (Münster *et al.*, 1997; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000);
- “keratin-like” (K) – interações proteína-proteína entre MADS-box e formação de complexos ternários (Davies & Schwarz-Sommer, 1994; Davies *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1997);
- “C-terminal” (C) – formação de complexos ternários e ativação transcricional (Litt & Irish, 2003; Vandenbussche *et al.*, 2003).

Muitas vezes o peptídeo funcional é um tetrâmero composto por hetero ou homodímeros de proteínas MADS, capaz de se ligar a duas regiões distintas da

mesma fita de DNA e aproximá-las através do dobramento de sua molécula (Theissen, 2001; Theissen & Saedler, 2001).

Na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae), o gene *APETALA1* (*API*), pertencente à família MADS, desempenha dois papéis distintos: o estabelecimento e manutenção da identidade dos meristemas florais (Bowman *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1995), bem como a determinação da identidade de sépalas e pétalas, desempenhando, portanto, a função de gene da classe A do modelo ABC de determinação dos órgãos florais (Coen & Meyerowitz, 1991). Dessa maneira, sua expressão é regulada positivamente em meristemas logo após a expressão do gene *LEAFY* (*LFY*) e restringe suas expressões aos verticilos 1 e 2 (sépalas e pétalas) em estágios posteriores do desenvolvimento (Theissen *et al.*, 2000; Blázquez, *et al.*, 2006; Irish, 2010).

Em Brassicaceae, *API* possui um parálogo denominado *CAULIFLOWER* (*CAL*), resultado de uma recente duplicação (Lowman & Purugganan, 1999; Alvarez-Buylla *et al.*, 2006). Assim, em *Arabidopsis thaliana*, *API* e *CAL* desempenham função redundante no estabelecimento da identidade de meristema floral. Duplo mutantes *ap1 cal* são incapazes de transformar seus meristemas de inflorescência em meristemas florais, portanto não produzem flores (Kempin *et al.*, 1995; Ferrándiz *et al.*, 2000).

Tendo em vista sua função no estabelecimento da identidade dos meristemas florais, *API* age diretamente no controle da arquitetura da inflorescência juntamente com os genes *LFY* e *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*). Nesse modelo, *API* e *LFY* são expressos em meristemas que se tornarão meristemas florais, enquanto que a expressão de *TFL1* regula negativamente ambos os genes no meristema da inflorescência (Schultz & Haughn, 1991; Liljegren *et al.*, 1999; Blázquez, *et al.*,

2006; Benlloch *et al.*, 2007). O papel dos ortólogos de *LFY*, *API* e *TFL1* na determinação da arquitetura da inflorescência foi demonstrado em diversas espécies de angiospermas e parece ser conservado, de modo que diferenças no padrão de expressão levam a arquiteturas diferentes (Benlloch *et al.*, 2007; Prusinkiewicz, *et al.*, 2007). Contudo, a presença ou não de uma flor terminal resultando em uma arquitetura determinada ou indeterminada, pode estar relacionada com a expressão de outros genes que não o *TFL1* (Bull-Hereñu & Claßen-Bockhoff, 2011).

Embora a arquitetura da inflorescência seja bem clara em alguns grupos de plantas, como na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, outros grupos apresentam estruturas complexas e de difícil interpretação. Portanto, o estudo da expressão de genes como *API*, *LFY* e *TFL1* podem fornecer pistas para a interpretação da morfologia.

Em Passifloraceae ocorre o desenvolvimento de uma gavinha na axila foliar, juntamente com flores e um meristema acessório vegetativo (Shah & Dave, 1970; 1971; Ulmer & MacDougal, 2004). Estudos morfológicos e taxonômicos levaram a várias interpretações sobre a origem ontogenética da gavinha (Darwin, 1865; Gangstad, 1938; Cutri *et al.*, 2013). Recentemente, a hipótese de que a gavinha seja o eixo central de uma inflorescência recebeu forte suporte com base no estudo de diferentes taxa (Krosnick & Freudenstein, 2005; Cutri *et al.*, 2013; Capítulo I).

Passiflora edulis Sims sempre produz um botão floral associado à gavinha, mesmo quando fora do período de floração (Nave *et al.*, 2010), embora tenha sido registrado um período transiente no qual ocorre a produção de gavinhas sem a formação de botões florais (Capítulo I). Portanto, o controle da floração nessa espécie baseia-se na repressão do desenvolvimento dos botões florais, e não no controle de sua iniciação a partir do meristema da inflorescência (Nave *et al.*, 2010).

A relação das gavinhas em *Passiflora* L. com a floração também foi demonstrada do ponto de vista molecular. *PeLFY* e *PsLFY*, o ortólogos putativos de *LFY*, se expressam em meristemas axilares e gavinhas de *Passiflora edulis* e *P. suberosa* L., respectivamente. Esses genes se expressam apenas após a transição do estágio juvenil para o adulto, quando a planta passa a produzir gavinhas, (Cutri, 2009).

Genes relacionados à identidade meristemática floral e à determinação da arquitetura de inflorescência também foram observados em gavinhas de *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) (Carmona *et al.*, 2002; Calonje *et al.*, 2004; Carmona *et al.*, 2007). Nessa espécie, gavinhas são formadas por meristemas que, em plantas em fase reprodutiva podem passar a formar inflorescências (Boss & Thomas, 2002). Embora *VFL* (ortólogo de *LFY*) se expresse de maneira transiente em gavinhas, *VAPI* e *VFUL-L* (ortólogos de *API* e *FUL*) continuam sendo expressos de maneira consistente, indicando um possível papel destes para seu desenvolvimento (Calonje *et al.*, 2004). Além disso, um dos ortólogos de *TFL1* em *Vitis*, *VvTFL1A* é expresso no meristema de inflorescências e nos meristemas da gavinha durante seu desenvolvimento, apontando para uma possível função na manutenção da indeterminação celular (Carmona *et al.*, 2007).

No Capítulo I da presente tese, descrevemos como o meristema axilar em diversas espécies de *Passiflora* forma, inicialmente, uma ou duas brácteas com seus meristemas axilares associados, que por sua vez formam duas bractéolas e então transformam-se em meristemas florais. Dessa maneira, sustentando a hipótese de que a gavinha representa um eixo de primeira ordem da inflorescência.

Contudo, tendo em vista o cenário aqui exposto, algumas questões surgem em relação aos mecanismos que controlam identidade meristemática e arquitetura de

inflorescência em *Passiflora*: Estaria o ortólogo putativo de *API* agindo na determinação da identidade do meristema floral? Estaria ele também se expressando em gavinhas nesse grupo? Como ocorre a expressão desse gene durante o desenvolvimento da flor? Estaria ele se comportando como um gene da classe A do modelo ABC? Neste trabalho são apresentados dados da expressão dos ortólogos de *API* em duas espécies de *Passiflora* em diferentes órgãos e etapas do desenvolvimento da gema axilar.

2. Material e Métodos

2.1. Material botânico

Para o presente trabalho foram selecionadas *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora suberosa* L.. A escolha destas espécies se baseou no fato de já terem sido alvo de estudos prévios sobre a expressão de ortólogos do gene LFY (Cutri, 2009). Além disso, uma sequência parcial de *PeAPI* já se encontra depositada no Genbank (número de acesso JN087003), facilitando assim a clonagem do gene. Essas espécies apresentam dois morfotipos diferentes quanto ao desenvolvimento da inflorescência, sendo produzida apenas uma flor em *P. edulis* enquanto duas ou mais flores estão presentes na axila foliar de *P. suberosa*.

Foram considerados os estágios juvenil (fase na qual o indivíduo não produz flores nem gavinhas) e adulto (fase na qual gavinhas e botões florais são produzidos). Para obtenção de indivíduos em estágio juvenil e adulto, foram coletadas sementes de *Passiflora edulis* e *Passiflora suberosa* a partir dos frutos de plantas em fase reprodutiva. As sementes foram germinadas e plântulas foram mantidas em casa de vegetação segundo Pantano (2007), fornecendo também as amostras de indivíduos em estágio adulto.

2.2.Obtenção de RNA e síntese de cDNA

RNAs totais de ambas as espécies foram isolados através do método do cloreto de lítio (Barlow, *et al.*, 1963), a partir de amostras dos diferentes tecidos: ápices caulinares de indivíduos em estágio adulto, ápices caulinares de indivíduos em estágio juvenil, raízes, folhas jovens, e gavinhas jovens (com 2 a 3 centímetros de comprimento).

Cada amostra de RNA foi tratada com o kit “TURBO DNA-free™” (Ambion) para remoção de DNA contaminante, e então utilizada para síntese de cDNA com o uso do kit “Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen), segundo especificações do fabricante.

2.3.Verificação da homologia entre *PeAPI* e *API*

Para confirmar a ortologia entre a sequência de *PeAPI* (JN087003) e *API* de *Arabidopsis thaliana*, foram selecionadas sequências de ortólogos de AP1 de diferentes espécies, bem como de ortólogos do gene FUL, e os genes SEP1, SEP2 e SEP3 (tabela 1).

As sequências putativas das proteínas codificadas por esses genes foram alinhadas com a utilização do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). O melhor modelo de substituição foi determinado por meio do programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2000). A árvore filogenética foi reconstruída pelo método de máxima verossimilhança, utilizando-se Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992) como modelo de substituições de aminoácidos, e a taxa de variação com distribuição gama. A robustez da árvore foi testada com cálculos de bootstrap com 1000 repetições.

Tabela 1. Sequências de proteínas utilizadas para reconstrução filogenética dos ortólogos de *AP1* e genes relacionados.

Gene	Espécie	Acesso
AmDEFH28	<i>Antirrhinum majus</i> L.	AAK72467
AmFUL	<i>Antirrhinum majus</i>	AAP83363
AmSQUA	<i>Antirrhinum majus</i>	CAA45228
AtAP1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	AAM28450
AtCAL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE30674
AtFUL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38876
BpMADS3	<i>Betula pendula</i> Roth	CAA67967
BpMADS4	<i>Betula pendula</i>	CAA67968
BpMADS5	<i>Betula pendula</i>	CAA67969
CaAP1	<i>Coffea arabica</i> L.	AHW58038
CsAP1	<i>Corylopsis sinensis</i> Hemsl.	AAP83370
CsinAP1	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	AAR01228
DIAP1-1	<i>Dimocarpus longan</i> Lour.	AEZ63951
EgSQUA	<i>Erythranthe guttata</i> G.L. Nesom	ADG59811
FBP 26	<i>Petunia hybrida</i> E. Vilm.	AAF19164
FBP29	<i>Petunia hybrida</i>	AAK21258
HeaAP1	<i>Heuchera americana</i> L.	AAP83372
LeMADS-MC	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	AF448521
Lj AP1a	<i>Lotus japonicus</i> (Regel) K. Larsen	AAX13296
MAP1	<i>Mangifera indica</i> L.	ACL68407
MdMADS2	<i>Malus domestica</i> Borkh	AAC83170
MdMADS5	<i>Malus domestica</i>	ABG85297
NAP1-1	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	AAD01421
NAP1-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAD01422
NtMADS11	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAO12211
NtMADS11	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAD39035
PaAP1	<i>Phytolacca americana</i> L.	AAP83384
PaFL1	<i>Phytolacca americana</i>	AAP83385
PaFL2	<i>Phytolacca americana</i>	AAP83386
PaFUL	<i>Phytolacca americana</i>	AAP83387
PeAP1	<i>Passiflora edulis</i> Sims	AER30447
PpMADS6	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	AAU29514
PsufAP1	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews	ADM21461
SAP1	<i>Salix discolor</i> Muhl.	AAY82244
SEP1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	AAA32732
SEP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAA32734
SEP3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAB67832
SiAP1	<i>Sesamum indicum</i> L.	AIS82596
SpAP1-1	<i>Spinacia oleracea</i> L.	ACE75943
SpAP1-2	<i>Spinacia oleracea</i>	ACE75944
StAP1	<i>Solanum tuberosum</i>	ADA77531
TDR4	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	AAM33098
VAP1	<i>Vitis vinifera</i> L.	ACZ26528

Gene	Espécie	Acesso
VFUL-L	<i>Vitis vinifera</i>	AAT07448
VuAP1	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	BAJ22385
ZjAP1	<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	ACG70964

Tabela 1 Continuação.

2.4. Amplificação dos ortólogos de *APETALA1*

Com base na sequência do ortólogo de *API* de *Passiflora edulis* (número de acesso JN087003), foi desenhado o seguinte par de primers: 5'-CGGTCAAGGAAGAACCAAC-3' / 5'-TTTAAACACGGGAGGACTGG-3'. Tais primers foram desenhados de modo a amplificar uma região não conservada entre os genes da família MADS-box, evitando assim a amplificação de genes indesejados.

Esses primers foram utilizados em reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do ortólogo de *Passiflora edulis* e *P. suberosa*, denominados aqui de *PeAPI* e *PsAPI*, respectivamente. Para tanto, o kit “GoTaq® DNA Polymerase” (Promega) foi utilizado segundo especificações do fabricante, tendo como molde amostras de cDNA provenientes de ápices meristemáticos de plantas adultas. As seguintes condições foram utilizadas para a PCR: desnaturação inicial por 2 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 56 °C e 40 segundos a 72 °C, e extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos das PCRs foram purificados com o uso do kit “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel) segundo especificações do fabricante.

2.5. Clonagem e sequenciamento de *PeAPI* e *PsAPI*

Os produtos purificados de PCR foram clonados no vetor pGem®T-easy (Promega®) de acordo com especificações do fabricante e utilizados na transformação por eletroporação (Sambrook & Russel, 2001) de células

eletrocompetentes de *Escherichia coli* (linhagem DH10B). Após processo de eletroporação, 1 ml de meio SOC líquido (2% Triptona, 05% Extrato de Levedura; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄; 20mM glucose) foi adicionado à suspensão de bactérias e as mesmas foram incubadas a 37°C por 1h. Em seguida, os possíveis transformantes foram espalhados em placas contendo meio LB-ágar (Peptona 10g/l; Extrato de Levedura 5g/l; NaCl 5g/l; Agar 15g/l) suplementado com ampicilina (100µg/ml), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-Dgalactopyranoside 3%) e IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside 100mM). Colônias transformantes foram individualizadas e cultivadas em meio LB líquido.

Recuperação do DNA plasmidial foi realizada com o kit “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Reações de sequenciamento foram realizadas com o uso do “BigDye Terminator Sequencing Kit” (Applied Biosystems) no Genomics and Transposable Elements Lab (GaTE) do IB-USP.

2.6. Análise de expressão por RT-PCR

Para verificar a expressão de *PeAPI* e *PsAPI* foram realizadas PCRs utilizando-se como molde cDNA oriundo de ápices caulinares de indivíduos em estágio adulto, ápices caulinares de indivíduos em estágio juvenil, raízes, folhas jovens, e gavinhas jovens (com 2 a 3 centímetros de comprimento). As PCRs foram realizadas sob condições idênticas às descritas no tópico 2.3.

Como controle positivo, foram realizadas reações utilizando os primers 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' / 5'-ATCGGGAGGGGCGATACCGTA-3' que amplificam um fragmento de aproximadamente 750pb do gene constitutivo

ACTINA em espécies de *Passiflora* sob as seguintes condições: desnaturação inicial por 2 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C e 40 segundos a 72 °C, e extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e os resultados obtidos foram fotografados e analisados.

2.7. Caracterização da expressão por técnica de hibridização *in situ*

Para ambas as espécies, amostras do ápice caulinar contendo aproximadamente um centímetro de comprimento foram coletadas e fixadas a vácuo em 4% paraformaldeído (p/v) em tampão fosfato, por no máximo 16 horas a 4°C. Em seguida o material foi desidratado em série etílica até etanol absoluto e emblocado em paraplast com o uso de xilol (Ruzin, 1999). Secções transversais e longitudinais, de 9µm a 12µm, foram obtidas com o uso de micrótomo rotativo e montadas em lâminas histológicas, as quais foram mantidas a 4°C.

As hibridizações foram conduzidas segundo técnica já descrita na literatura (Dornelas *et al.*, 1999; 2000). O material foi submetido ao tratamento de pré-hibridização, consistindo em duas lavagens de xilol de 10 minutos cada, seguidas de duas lavagens com etanol absoluto por 5 minutos cada. Após secas, as lâminas foram tratadas por 30 segundos com solução de proteinase-K (1µg/ml em Tris 0,05M pH 7,5) a 37°C.

As hibridizações *in situ* foram realizadas com o uso de sondas não-radioativas, sintetizadas a partir dos fragmentos de *PeAPI* e *PsAPI* obtidos como descrito no item 2.5. Para tanto, amostras dos plasmídeos foram linearizadas com as enzimas *NcoI* e *PstI* (a 37°C por 1h), e então utilizadas em reações de transcrição *in vitro* com o uso

das enzimas SP6 e T7, respectivamente com a utilização do kit “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)” (Roche).

A visualização do sinal foi obtida através de reação colorimétrica, utilizando-se anticorpos anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina em tampão contendo 1M Tris-HCl; 5M NaCl; 1% Blocking agent (Roche) (1:1000), empregando NBT/BCIP (Sigma) como substrato. As lâminas hibridizadas foram observadas ao microscópio e fotografadas para posterior análise.

3. Resultados

3.1. Análise filogenética dos ortólogos de *API*

Para verificar a homologia da sequência de *PeAPI* depositada no Genbank (número de acesso JN087003) e os genes ortólogos de *API* conhecidos, foi elaborada uma árvore de relações entre as proteínas preditas desses genes e de genes de sequência similar.

Os resultados demonstram que a sequência de *PeAPI* encontra-se no clado denominado “euAPI”, juntamente com outros ortólogos de *API* (Fig. 1). Reforçando a ortologia, foi identificado um motivo conservado na região C-terminal exclusiva de genes pertencentes ao grupo *euAPI*, responsável por ativação transcricional (Fig. 2).

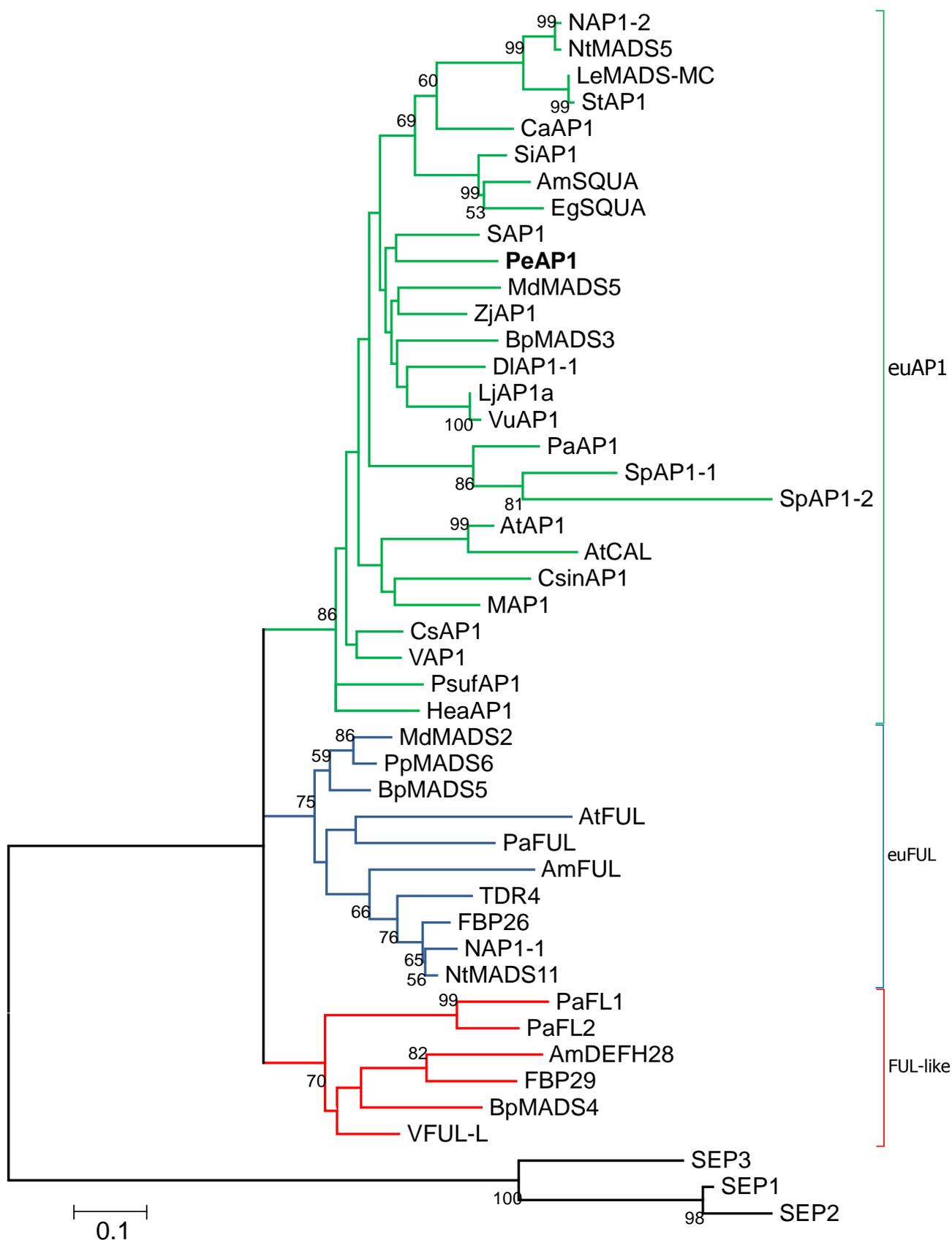


Figura 1. Relações entre 46 sequências de aminoácidos pertencentes aos grupos *euAPI*, *euFUL* e *FUL-like*, inferidas pelo método de máxima verossimilhança baseado no modelo JTT com distribuição gama. A escala representa o número de substituições por posição. Valores de bootstrap foram determinados a partir de 1000 repetições e são exibidos para ramos com valor superior a 50%.

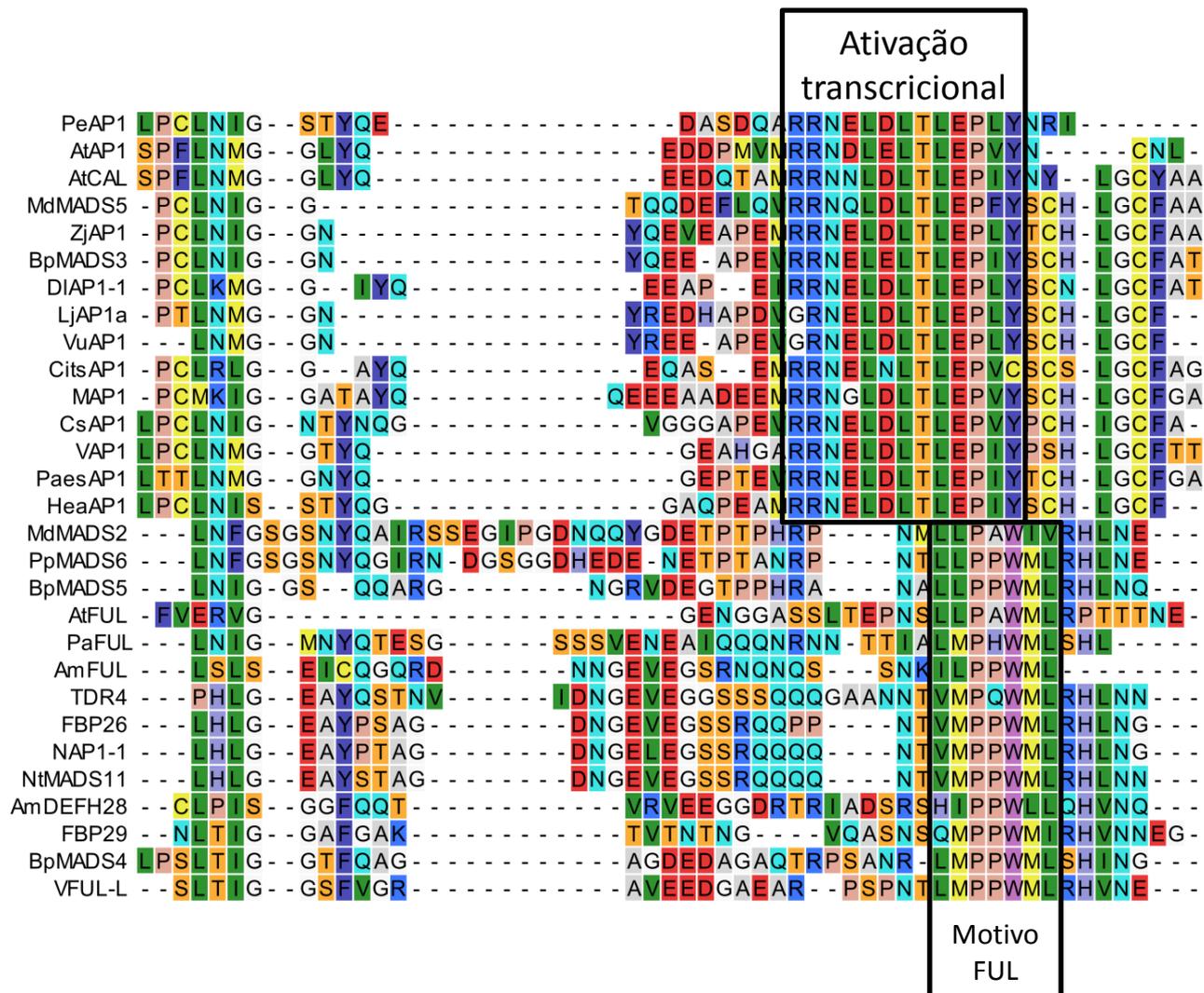


Figura 2. Alinhamento da região C-terminal de proteínas pertencentes aos grupos euAP1, euFUL e FUL-like. Os quadros assinalam motivos conservados em proteínas do grupo euAP1 (ativação transcricional) e dos grupos euFUL e FUL-like (motivo FUL).

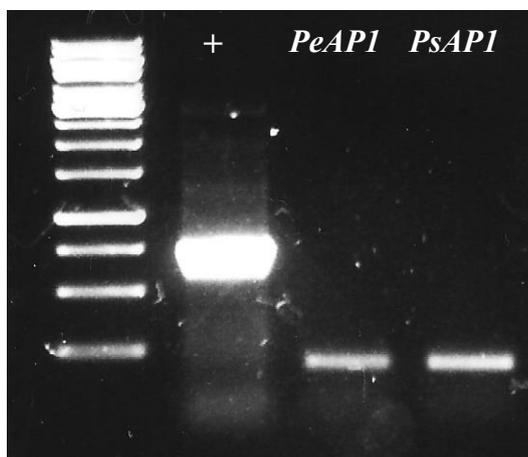


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR contendo cDNA de ápices de *Passiflora edulis* e *P. suberosa* como molde, e os primers específicos para amplificação do fragmento de 207pb de PeAP1 e PsAP1. O controle positivo foi realizado com DNA genômico de *Adelosperma napiforme* e primers específicos para amplificação de um fragmento de 750pb.

3.2. Caracterização dos fragmentos clonados

Uma vez que a sequência de *PeAPI* demonstra ser ortóloga aos genes do clado “euAPI”, utilizamos primers específicos para sua amplificação a partir de RNA isolado do ápice caulinar de *Passiflora edulis* e *P. suberosa*. Após eletroforese em gel do produto da PCR, foi possível identificar um fragmento único de aproximadamente 200 pares de base (pb) (Fig. 3). Esse fragmento foi então clonado, sendo seis clones independentes de cada gene sequenciados. Para fins práticos, *PeAPI* e *PsAPI* serão denominados coletivamente de *PasAPI*. Além disso, uma vez que os clones representam apenas um fragmento do gene como um todo, na presente tese estes serão designados *PeAPI'* e *PsAPI'*.

A análise revelou não haver diferenças nas sequências obtidas para os clones de *PeAPI'*. Para *PsAPI'*, foram encontrados dois alelos que diferem em um único nucleotídeo na posição 37 da região clonada (Fig. 4A). Assim, denominados os diferentes clones de *PsAPI-1'* e *PsAPI-2'*. Esses diferem de *PeAPI'* em 17 e 18 nucleotídeos, respectivamente, representando assim similaridade de aproximadamente 91,5% entre as espécies.

Os 207 nucleotídeos codificam uma sequência de 68 aminoácidos correspondente à região final do domínio “K” e aproximadamente metade da região C-terminal de *PasAPI* (Fig. 4B). Verificando a sequência de aminoácidos codificada por esses clones, notamos que os alelos de *PsAPI'* não diferem entre si, caracterizando assim um caso de variação sinônima. De seus 68 aminoácidos, *PeAPI'* e *PsAPI'* diferem em 8, apresentando uma similaridade de 88%. Todas as variações pertencem à região C-terminal da proteína. O alinhamento das sequências de proteínas preditas de *PasAPI* com outras sequências de proteínas do clado euAPI pode ser vista na figura 5.

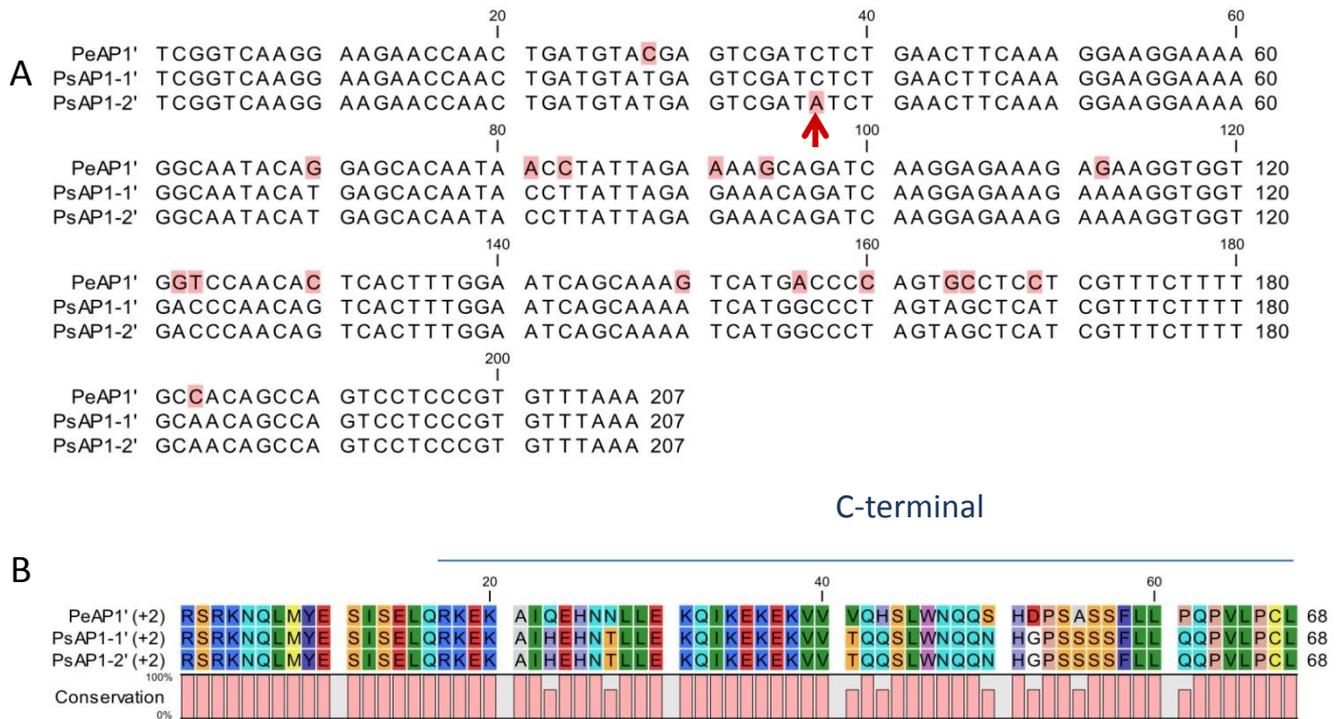
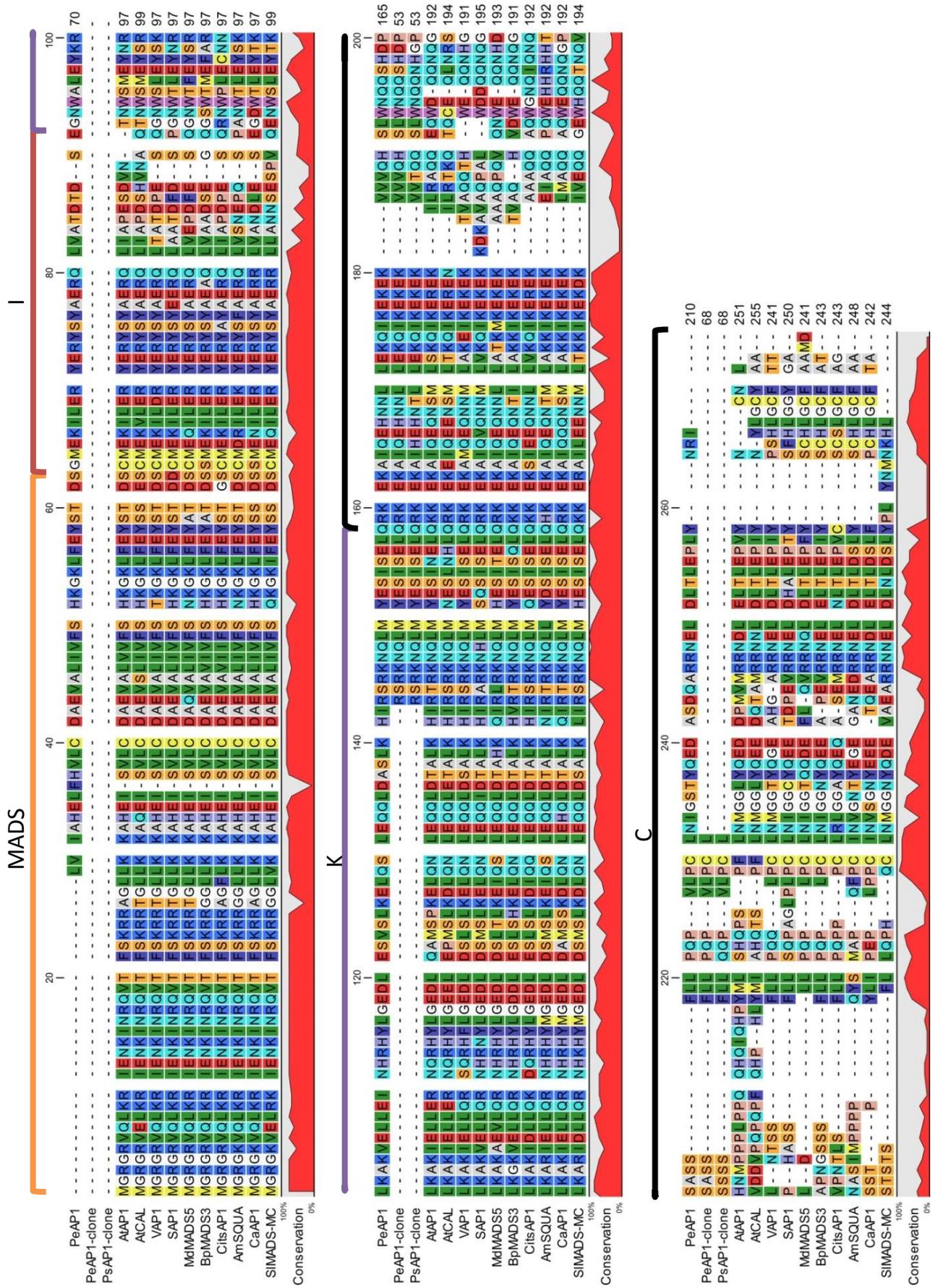


Figura 4. Sequências dos clones de *PeAP1* e *PsAP1* obtidos. **A.** Sequência dos nucleotídeos de cada clone. Posições em vermelho indicam variações entre as sequências de *PeAP1* e *PsAP1*. Seta indica polimorfismo encontrado em alelos de *PsAP1*. **B.** Sequência putativa de aminoácidos codificados pelos clones de *PasAP1*. Barra indica o domínio C-terminal das proteínas MADS-box.

3.3. Expressão de *PeAP1* e *PsAP1* em diferentes tecidos

Os fragmentos de *PasAP1* foram clonados a partir de amostras de ápices caulinares em estágio reprodutivo, contendo diferentes tecidos onde esses genes poderiam estar sendo expressos

Figura 5 (direita). Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas para os ortólogos de AP1 (clado euAP1), incluindo os clones de *PasAP1*. Barras acima das sequências indicam os domínios reconhecidos das proteínas MADS-box. Gráfico abaixo do alinhamento indica, em porcentagem, a conservação de cada posição. .



Foram então realizadas PCRs tendo como molde cDNA obtido especificamente de diferentes tecidos, a fim de caracterizar a expressão de *PasAPI* nos mesmos. Os tecidos selecionados foram: raízes, folhas em estágios iniciais do desenvolvimento, gavinhas de até 2cm de comprimento e ápices de plantas em estágio juvenil.

A análise dos produtos de PCR por eletroforese revelou a presença de uma banda única, do tamanho esperado (aproximadamente 200pb) nas amostras de gavinhas e folhas jovens, indicando assim a expressão de *PasAPI* nesses tecidos (Fig. 6), além da constatação prévia de sua expressão em ápices caulinares de plantas em estágio adulto. Ademais, a intensidade da expressão em folhas parece ser muito reduzida em comparação à expressão em ápices e gavinhas, indicado pela intensidade da banda referente ao gene nesses tecidos. Não ocorreu amplificação de DNA em amostras oriundas de raízes e plantas em estágio juvenil.

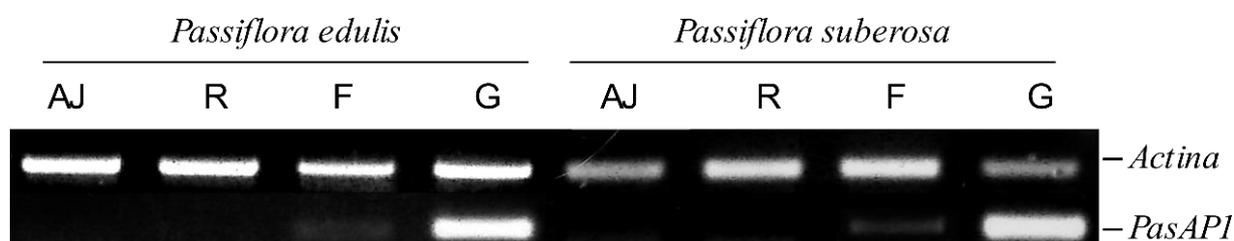


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR contendo cDNA de diferentes tecidos de *Passiflora edulis* e *P. suberosa* como molde, e os primers específicos para amplificação do fragmento de 207pb de PeAP1 e PsAP1. O controle positivo foi realizado com primers específicos para amplificação de um fragmento de 750pb do gene da actina.

3.4. Caracterização da expressão por hibridização *in situ*

Os tecidos que demonstraram expressão nos experimentos de RT-PCR foram então selecionados para análise por hibridização *in situ*, com a finalidade de confirmar e determinar a localização da expressão de *PasAPI*.

PasAPI é expresso desde os estágios iniciais de desenvolvimento do meristema axilar. Inicialmente sua expressão é uniforme em toda a região do meristema (Figs. 7A-B). Em *P. edulis*, ocorre uma redução do sinal na região do meristema que dará origem à bráctea, mas nota-se forte expressão na região adaxial da mesma (i.e., a região de seu meristema axilar) (Fig. 7C). Por outro lado, *P. suberosa* não demonstra diferenças de sinal entre a região central, que dará origem à gavinha, e as regiões laterais, que se desenvolverão em meristemas florais (Fig. 7B).

A expressão de *PasAPI* também foi observada no meristema assessorio vegetativo, desde estágios iniciais de sua formação até estágios após a formação dos primeiros perfis (Figs. 7D-F, 8A).

Os diferentes órgãos derivados da gema axilar também mantêm a expressão de *PasAPI*. Foi observado forte sinal na região meristemática das gavinhas (Fig. 8B). Em estágios posteriores do desenvolvimento, a gavinha apresenta sinal de hibridização de maneira homogênea em sua região apical (Fig. 8C). Já nos eixos de segunda ordem da inflorescência (i.e., na estrutura lateral produzida pelo meristema axilar e que compreende bráctea, seu meristema associado e estruturas derivadas do mesmo), o sinal de *PasAPI* é encontrado com maior intensidade no meristema floral (Fig. 8A, 8D). Em *P. edulis*, os primórdios de brácteas e bractéolas também exibem sinal, mais intensificado na região adaxial (Figs. 8D-F).

Em *P. suberosa*, a expressão de *PasAPI* foi acompanhada também durante ontogenia da flor. O meristema floral mantém expressão do gene durante todo o desenvolvimento da flor (Fig. 9A). Depois de formadas, tépalas tem o sinal restrito à sua região adaxial, sendo que em estágios posteriores o sinal torna-se mais fraco (Figs. 9B-C). Estames também apresentam sinal mais intenso na região adaxial no início do desenvolvimento (Figs. 9B-C). Em estágios posteriores, as anteras

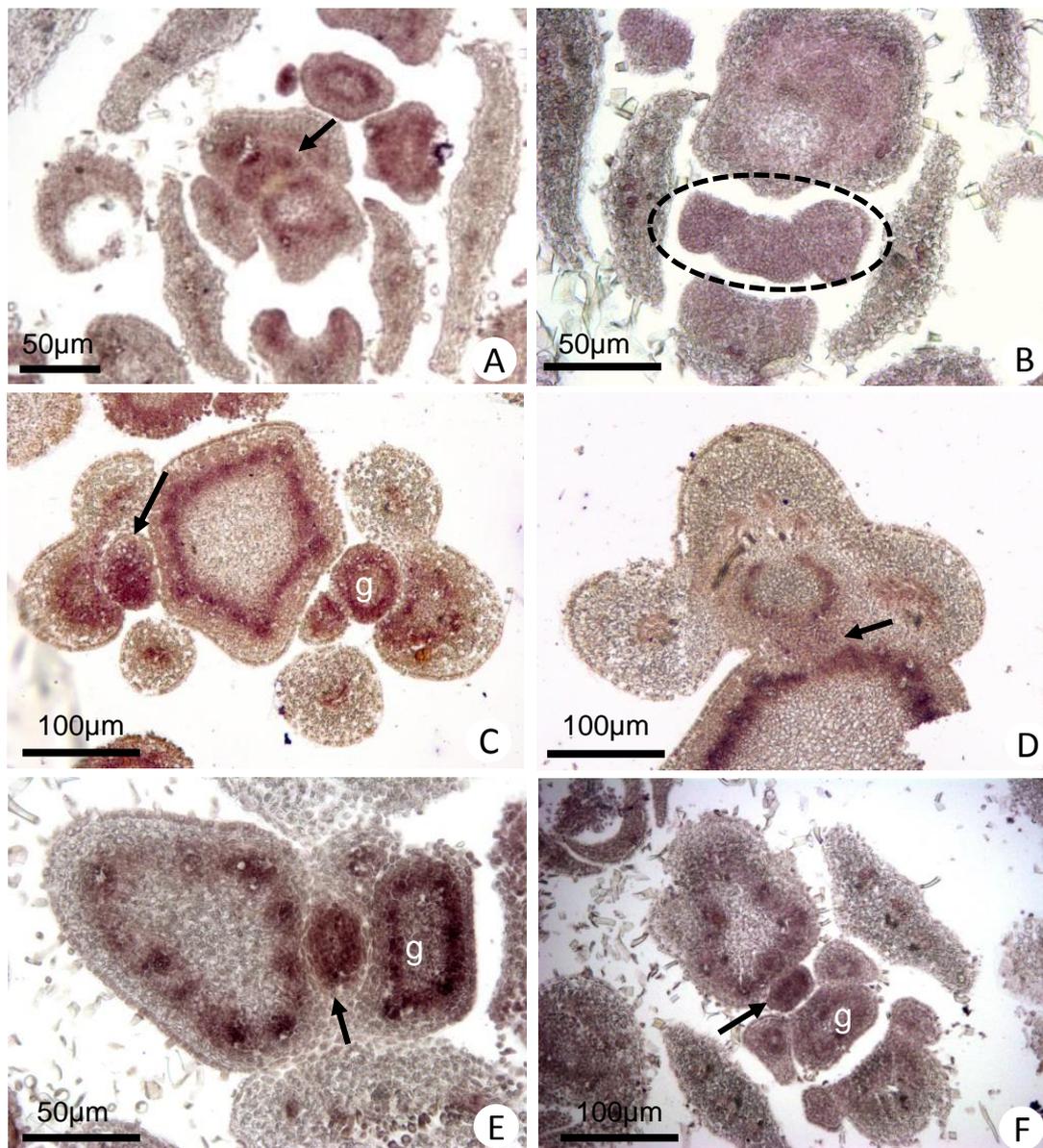


Figura 7. Expressão de *PasAPI* em *Passiflora suberosa* (A-B, E-F) e em *P. edulis* (C-D), em secção transversal. **A.** Estágio inicial do desenvolvimento da gema axilar exibindo sinal de maneira uniforme (**seta**). **B.** Meristema axilar em processo de formação dos meristemas dos eixos de segunda ordem da inflorescência (**região circulada**). Tanto o meristema central quanto os laterais exibem sinal em intensidade semelhante. **C.** Meristema axilar produzindo primórdio de bráctea. Notar sinal reduzido na região abaxial do primórdio de bráctea (**seta**), mas intenso na sua região adaxial. **D-F.** Expressão de *PasAPI* nos meristemas acessórios vegetativos em formação (**setas**). **g** – gavinha;

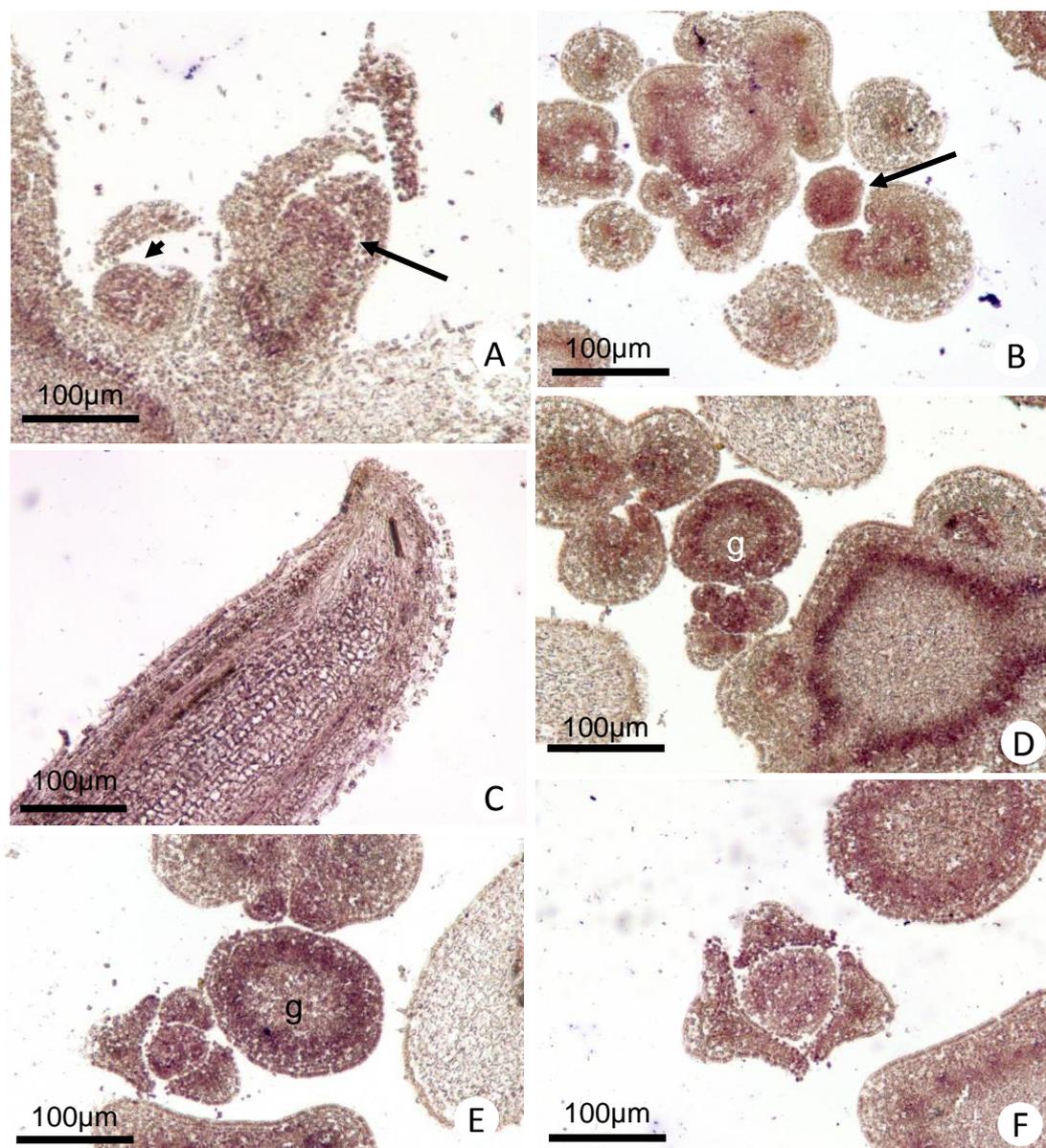


Figura 8. Expressão de *PeAP1* em *Passiflora edulis*, em secção longitudinal (A, C) e transversal (B, D-F). **A.** Meristema floral (*seta*) e meristema vegetativo (ponta de seta) exibindo expressão. **B.** Forte sinal no meristema da gavinha (*seta*). **C.** Gavinha exibindo sinal de maneira homogênea em sua porção distal. **D-F.** Expressão durante o desenvolvimento do eixo de segunda ordem. Notar expressão mais intensa no meristema floral e na região adaxial das brácteas e bractéolas. **g** – gavinha;

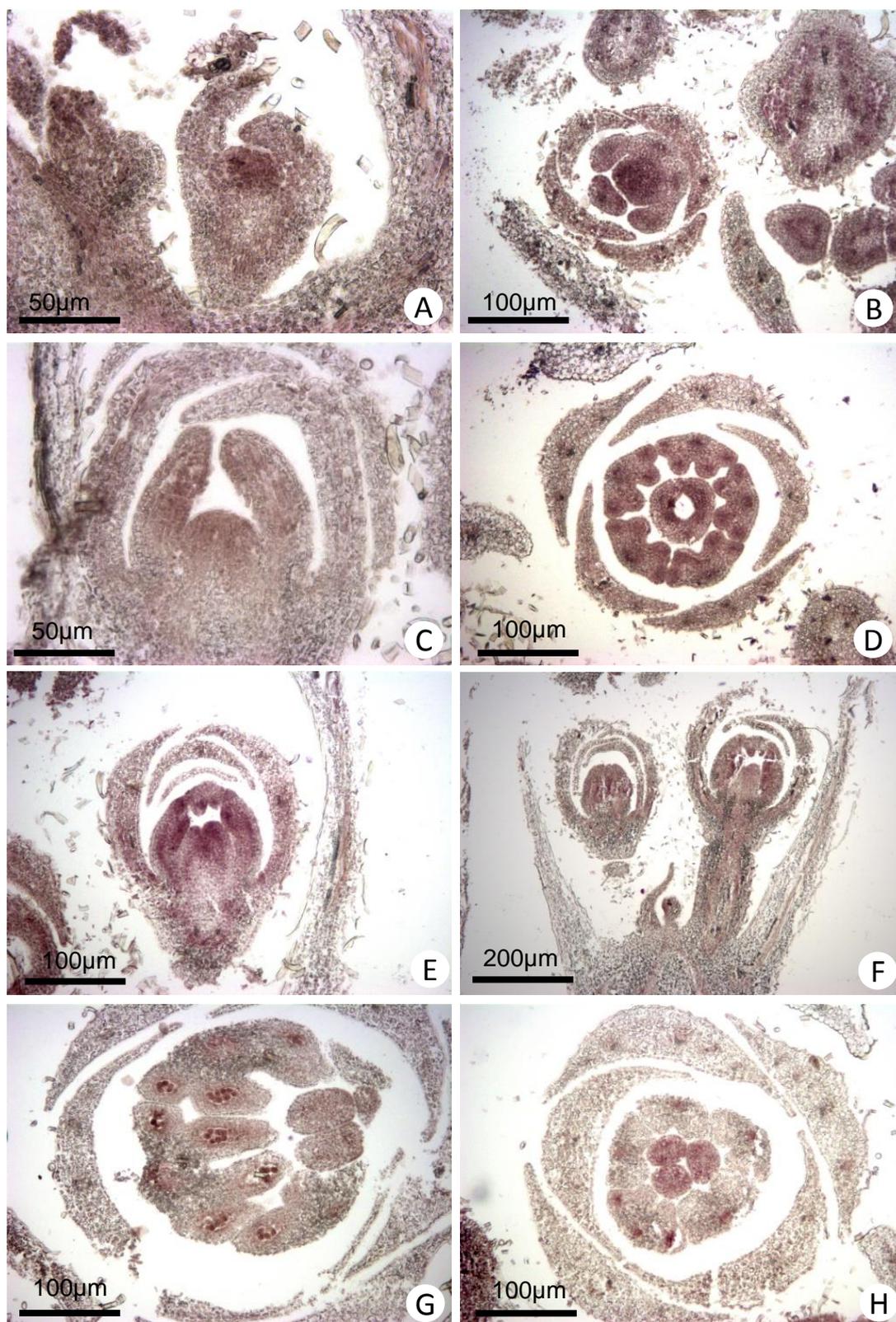


Figura 9. Expressão de *PasAPI* ao longo do desenvolvimento floral em *Passiflora suberosa*, em secção longitudinal (A, C, E-F) e transversal do eixo caulinar (B, D, G-H). **A.** Meristema floral e primórdios de tépalas. **B-C** Meristema floral após iniciação dos estames. **D-E.** Expressão durante o desenvolvimento de estames e carpelos. **F-G.** Expressão em estágios posteriores do desenvolvimento dos estames. Notar forte sinal em tecidos do microsporângio e microsporos. **H.** Sinal localizado apenas no tecido vascular em diferenciação e no estigma.

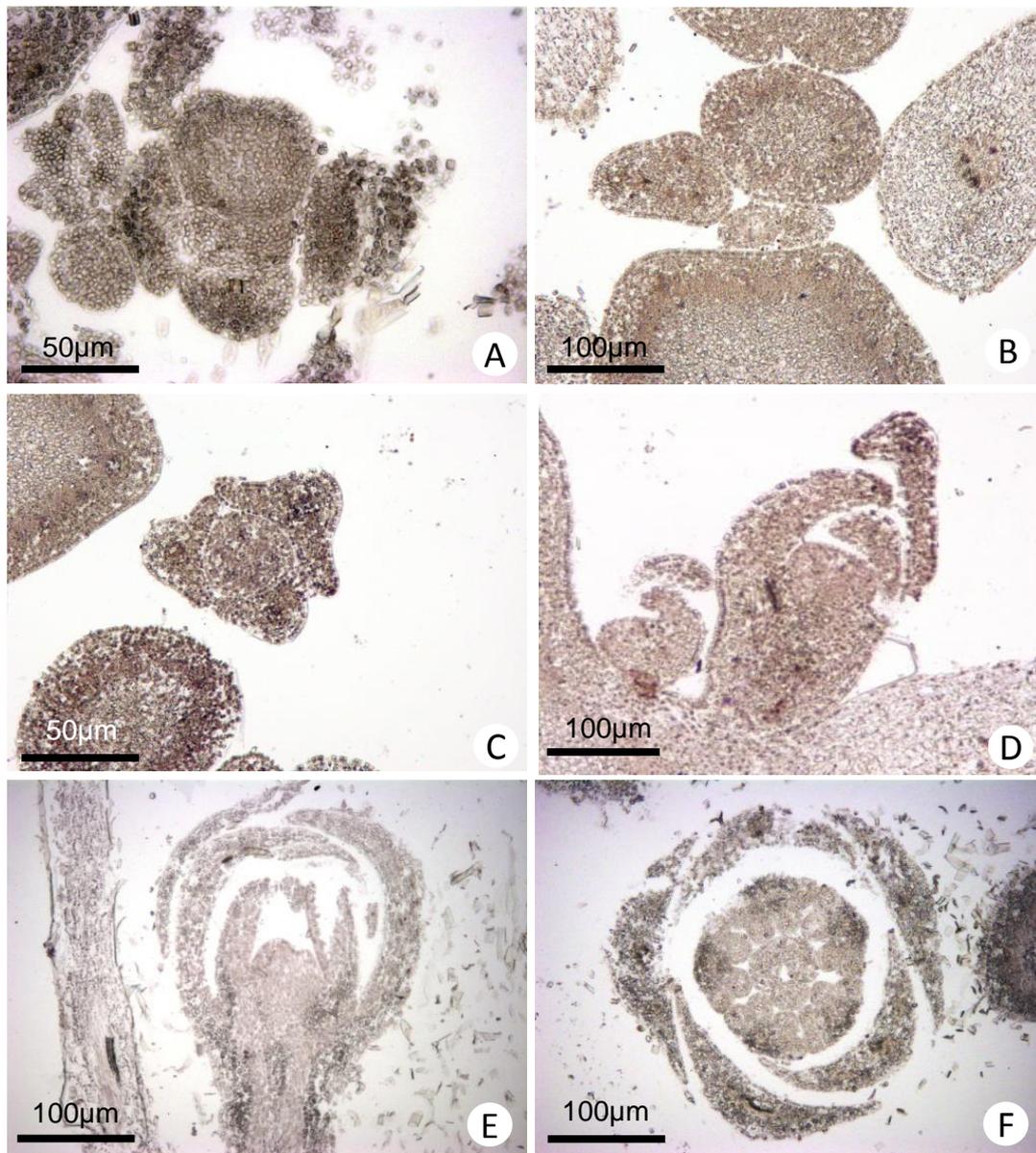


Figura 10. Controle negativo realizado com sonda senso de *PasAP1* em *Passiflora suberosa* (A, E-F) e *P. edulis* (B-D). **A.** Ápice caulinar em secção transversal. **B-C** Gavinha, eixo de segunda ordem e meristema acessório vegetativo em secção transversal. **D-E.** Secções longitudinais do meristema floral. **F.** Secção transversal da flor exibindo tépalas, estames e carpelo.

apresentam sinal apenas nas regiões onde se formarão os sacos polínicos e no procâmbio (Figs. 9D-F), até que a expressão torna-se notável nos microsporângios (Fig. 9G). Sinal também foi observado ao longo do carpelo e na região do estigma durante o desenvolvimento dos mesmos (Figs. 9D e 9H).

Forte sinal também foi observado no procâmbio e tecido vascular em diferenciação de todas as estruturas analisadas, i.e., caule, folhas, estípulas, gavinha, brácteas/brectéolas, estames e carpelos (Figs. 7-9). Nenhum sinal foi observado no controle negativo (Fig. 10)

4. Discussão

4.1. Ortologia de *PasAPI*

Acredita-se que os grupos *euAPI* e *euFUL* tenham surgido a partir de um evento de duplicação que coincide com a diversificação das eudicotiledôneas nucleares, de maneira que sequências de proteínas semelhantes de monocotiledôneas, eudicotiledôneas basais e angiospermas basais agrupam-se no clado denominado “FUL-like” (Becker & Theissen, 2003; Litt & Irish, 2003). Nesses grupos, as proteínas *FUL-like* desempenham funções equivalentes às desempenhadas pelos genes *euAPI* e *euFUL* no grupo das eudicotiledôneas nucleares (Pabón-Mora, *et al.*, 2012).

O posicionamento da sequência de *PeAPI* no grupo *euAPI* confirma sua ortologia em relação a esses genes. Além disso, a identificação do motivo de ativação transcricional presente na região C-terminal, característicos de genes do grupo *euAPI* sustenta ainda mais sua identidade com esse grupo. Esse motivo surgiu na linhagem dos *euAPI* por meio de uma mudança no quadro de leitura após a duplicação do gene

ancestral *FUL-like*, e embora seja capaz de induzir transcrição em leveduras, parece não ser responsável pela diferença de função entre genes *euAPI* e *euFUL* (Litt & Irish, 2003).

As sequências de aminoácidos preditas para *PeAPI* e *PsAPI* tem 88% de identidade. Embora *P. edulis* e *P. suberosa* sejam espécies filogeneticamente próximas (mesmo gênero), essa discrepância não é surpreendente, visto que se encontram na região C-terminal da proteína. Essa região é a menos conservada dos genes da família MADS-box (Litt & Irish, 2003; Vandenbussche *et al.*, 2003).

Ainda que tenhamos clonado uma pequena região de *PsAPI* (207pb), fomos capazes de registrar a presença de dois alelos diferentes para o gene. Embora, nesse caso, trate-se de uma variação sinônima, a identificação de polimorfismo em uma região tão pequena pode ser indício da diversidade de alelos para o gene, especialmente considerando a condição tetraploide da espécie (Snow & MacDougal, 1993; Yotoko *et al.*, 2011). Assim sendo, é possível que a grande plasticidade demonstrada no Capítulo I da presente tese para *P. suberosa*, seja decorrente da disponibilidade de diferentes alelos dos genes que regulam seu desenvolvimento.

4.2. Padrão de expressão de *PasAPI*

A ausência de expressão de *PasAPI* em ápices de indivíduos juvenis e raízes era esperada, uma vez que ortólogos de *API* estão tipicamente relacionados ao desenvolvimento reprodutivo, sobretudo no estabelecimento e manutenção da identidade do meristema floral (Bowman *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1995). Além disso, em *Passiflora edulis* e *P. suberosa* foi demonstrada a ausência de expressão dos ortólogos do gene *LFY* (*PeLFY* e *PsLFY*) em raízes e em plantas juvenis (Cutri, 2009). Em *Arabidopsis*, esse gene regula positivamente a expressão de *API*,

assegurando a transição de um meristema vegetativo para um meristema floral (Liljegren *et al.*, 1999). Assim, parece clara a ligação de *PasAPI* com o estágio de vida da planta.

Contudo, a expressão de *PasAPI* observada no presente trabalho difere substancialmente do que é normalmente esperado para o gene quanto à sua função como gene da classe A do modelo ABC (especificando identidade de sépalas e pétalas) (Coen & Meyerowitz, 1991) e na determinação da identidade do meristema floral. Embora a participação dos ortólogos de *API* como gene de classe A seja descrito em algumas espécies, como *Arabidopsis thaliana* e *Pisum sativum* (Coen & Meyerowitz, 1991; Berbel *et al.*, 2001), a conservação dessa função em eudicotiledôneas apresenta diversos problemas e vem sendo questionada (veja Causier *et al.*, 2010 para uma revisão sobre o tema).

O padrão de expressão de ortólogos de *API*, em diversas espécies, é mais amplo do que aquele encontrado em *Arabidopsis thaliana*, não sendo restrito a meristemas florais e posteriormente a primórdios de sépalas e pétalas. *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. (Asteraceae), por exemplo, expressa seu ortólogo de *API* (*CDM111*) também em brácteas e durante o desenvolvimento de estames (Shchennikova *et al.*, 2004). *Antirrhinum majus* L. (Plantaginaceae) exibe expressão de *SQUAMOSA* (*SQUA*) também em carpelos e brácteas, de maneira fraca. No carpelo, apenas na região que formará a parede do ovário, mas não em células do estilete ou estigma (Huijser, *et al.* 1992). Um padrão muito semelhante é descrito para *SLM4* e *SLM5* (ortólogos de *API*) em *Silene latifolia* Poir. (Caryophyllaceae) (Hardenack *et al.*, 1994). Em *Vitis vinifera*, *VAPI* se expressa inicialmente em todo o meristema floral. Com o desenvolvimento de primórdios dos órgãos florais, *VAPI*

passa a ser restrito apenas ao ápice de pétalas, estames e à região que dá origem aos carpelos (Calonje *et al.*, 2004).

Spinacia oleracea L. (Amaranthaceae), possui dois genes que se enquadram no grupo dos *euAPI*: *SpAPI-1* e *SpAPI-2*. Em conjunto, esses genes exibem padrão de expressão em flores muito semelhante ao encontrado para *PasAPI*. *SpAPI-1* expressa amplamente em meristemas florais, em estames em início de desenvolvimento, e em carpelos na região do ovário. *SpAPI-2* é ausente em meristemas florais ou tecidos vegetativos, mas passa a ser expresso após a diferenciação de estames e carpelos. Nos estames, *SpAPI-2* se expressa inicialmente na região central das anteras, e passa a se concentrar na região dos sacos polínicos e por fim em tecidos do microsporângio. Já no carpelo, expressão de *SpAPI-2* ocorre em óvulos e na região do estigma (Sather & Golenberg, 2009).

É interessante notar, portanto, que o padrão de expressão de ortólogos de *API* em eudicotiledôneas nucleares, ou seja, de genes do clado *euAPI*, pode se assemelhar bastante ao padrão dos genes *euFUL* e *FUL-like*. O gene *FUL*, em *Arabidopsis thaliana* se expressa em brácteas, meristemas de inflorescência, primórdios de carpelos e frutos, e está envolvido na transição de fase e desenvolvimento do fruto (Gu *et al.*, 1998; Melzer *et al.*, 2008). Em outras eudicotiledôneas nucleares, genes *euFUL* se expressam em folhas, brácteas, meristemas florais e de inflorescência, todos os órgãos florais, frutos e óvulos (Hardenack *et al.*, 1994; Immink *et al.*, 1999; Calonje, *et al.*, 2004; Shchennikova *et al.*, 2004; Sather & Golenberg, 2009).

Padrão de expressão semelhante é encontrado em genes *FUL-like* de angiospermas não eudicotiledôneas nucleares (Kim *et al.*, 2005; Pabón-Mora, *et al.*, 2012). *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), por exemplo, possui dois parálogos de *FUL-like*: *PapsFL1* e *PapsFL2* (Litt & Irish, 2003). *PapsFL1* é expresso em

meristemas e órgãos florais em início de desenvolvimento, enquanto *PapsFL2* é expresso em meristemas vegetativos, sépalas e carpelos. Além disso, ambos os genes se expressam em brácteas, frutos, óvulos e em meristemas dormentes na axila das brácteas mais basais da inflorescência (Pabón-Mora, *et al.*, 2012).

Há relatos também de genes *euAPI* e *FUL-like* com expressão no tecido procambial. *GSQUA*, ortólogo de *API/SQUA* em *Gerbera hybrida* (Asteraceae), parece ser expresso no procâmbio da flor e inflorescência (Yu, *et al.*, 1999). Os ortólogos de *FUL-like* em *Eschscholzia californica* (Papaveraceae), *EscaFL1* e *EscaFL2*, são expressos também nos cordões de procâmbio do eixo da inflorescência (Pabón-Mora, *et al.*, 2012).

As diferenças observadas nos padrões de expressão desses genes não necessariamente são decorrentes de grandes mudanças estruturais nas proteínas por eles codificadas. *CDM111* (Asteraceae), por exemplo, embora se expresse também em brácteas e estames, quando expresso em mutantes *apl* de *Arabidopsis thaliana*, é capaz de resgatar quase que completamente o fenótipo selvagem (Shchennikova *et al.*, 2004).

Esses resultados fazem sentido quando considerado o mecanismo de ação de genes MADS-box, i.e., através da formação de complexos com outras proteínas (Theissen, 2001; Theissen & Saedler, 2001). Assim, a função de proteínas como *API* é determinada pelo contexto proteico ao qual está exposta, bem como sua habilidade para formar complexos ternários específicos, característica essa determinada primariamente por motivos presentes em sua região C-terminal (Sather & Golenberg, 2009).

Além disso, o padrão de expressão de *PasAPI* similar ao de *euFUL* e *FUL-like* pode ser reflexo de sua ancestralidade. Uma vez que genes *FUL-like*

desempenham papéis tanto de genes *euAPI* e *euFUL* (Pabón-Mora *et al.*, 2012), e dadas as similaridades na sequencias desses genes, é possível que em *Passiflora* esses genes apresentem uma sobreposição de padrões de expressão e função, sobretudo àquelas relacionadas a especificação e proliferação de meristemas. Estudos que investiguem a expressão do(s) ortólogo(s) de *FUL* em *Passiflora* podem trazer novos insights para o assunto.

4.3. O papel de *PasAPI* para a arquitetura da inflorescência em *Passiflora*

O mecanismo que determina a arquitetura de inflorescência em *Passiflora* difere daquele encontrado em *A. thaliana* e outras espécies na qual o balanço entre LFY/API e TFL1 especifica a identidade de meristemas florais e de inflorescência (Liljgren *et al.*, 1999; Blázquez, *et al.*, 2006; Benlloch *et al.*, 2007). Dado que a gavinha representa o eixo principal de uma cimeira composta em *Passiflora* (Krosnick & Freudenstein, 2005; Cutri *et al.*, 2013; Capítulo I), seria esperada a ausência de expressão de *PasLFY* e *PasAPI* na mesma.

Há ainda a sugestão de que a gavinha poderia representar uma flor terminal. Como demonstramos no Capítulo I, não há indícios anatômicos ou ontogenéticos para tal interpretação, além do topológico. Poder-se-ia argumentar que a expressão de *PasLFY* (Cutri, 2009) e *PasAPI* no meristema da gavinha ocorre como vestígio de uma indução floral. Essa situação, contudo, parece improvável, uma vez que os equivalentes desses genes são os reguladores chave do desenvolvimento floral em outras espécies. Além disso, a expressão desses genes ocorre desde o início do estabelecimento do meristema axilar em *Passiflora*, antes mesmo da formação de brácteas, o que sustenta sua expressão no meristema enquanto ainda possui identidade de meristema de inflorescência.

Somado a esse fato, ocorre também a expressão de *PasAPI* em meristemas acessórios vegetativos, em tecidos com características meristemáticas de folhas e no procâmbio. Portanto, *PasAPI* parece estar ligado, de alguma forma, à manutenção de tais características.

SLM4 e *SLM5* se expressam em meristemas de inflorescência de *Silene latifolia* (Caryophyllaceae). Foi proposto que essa expressão pode estar ligada à arquitetura dessa inflorescência, que possui uma flor terminal (Hardenack *et al.*, 1994). Dado que o eixo principal da inflorescência nas espécies de *Passiflora* estudadas não produz uma flor terminal, a expressão de *PasAPI* pode ser, de fato, necessária para o desenvolvimento deste órgão.

A participação de um gene ortólogo ao *API* no desenvolvimento de gavinhas já foi relatada em *Vitis vinifera*. Nesta espécie, gavinhas são ramificadas e a expressão de *VAPI* concentra-se na região após o ponto onde se ramificam, enquanto que *VFUL-L* (ortólogo de *FUL*) se expressa em todas as regiões da gavinha (Calonje *et al.*, 2004). Em *Vitis*, no entanto, *VFL* tem expressão transiente na gavinha, de maneira que apenas *VAPI* e *VFUL-L* mantêm sua expressão ao longo de todo seu desenvolvimento, indicando assim uma possível função para seu desenvolvimento (Carmona *et al.*, 2002; Calonje *et al.*, 2004).

Por fim, a expressão de *PasAPI* em meristemas acessórios vegetativos pode estar indicando situação semelhante àquela encontrada em *Arabidopsis thaliana*. Nessa espécie, *FUL*, em conjunto com *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, mantêm a dormência de meristemas axilares (Melzer *et al.*, 2008). Função similar é descrita para genes *FUL-like* em Papaveraceae (Pabón-Mora *et al.*, 2012). É possível, portanto, que *PasAPI* participe de maneira semelhante, reprimindo a ramificação em *Passiflora*.

5. Conclusões

PasAPI apresenta uma grande amplitude de expressão se comparado a seus ortólogos em outras espécies nas quais tem a função de determinação de identidade meristemática floral e de gene da classe A. Embora seu padrão de expressão se assemelhe àquele de genes *euFUL* e *FUL-like*, diversos genes *euAPI* também apresentam domínios de expressão amplos e desempenhando outros papéis. Com base nos resultados do presente trabalho, *PasAPI* parece desempenhar papel relevante no desenvolvimento da gavinha e na manutenção de tecidos com características meristemáticas. Futuros estudos de superexpressão/silenciamento poderão fornecer maiores informações sobre as funções do gene.

6. Referências

- Alvarez-Buylla, E. R.; García-Ponce, B.; Garay-Arroyo, A. 2006. Unique and redundant functional domains of APETALA1 and CAULIFLOWER, two recently duplicated *Arabidopsis thaliana* floral MADS-box genes. **Journal of experimental botany** **57**: 3099–3107.
- Alvarez-Buylla, E. R.; Pelaz, S.; Liljegren, S. J.; Gold, S. E.; Burgeff, C.; Ditta, G. S.; Ribas de Pouplana, L.; Martinez-Castilla, L.; Yanofsky, M. F. 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **97**: 5328–5333.
- Barlow, J. J.; Mathias, A. P.; Williamson, R.; Gammack, D. B. 1963. A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **13**: 61–66.

- Becker, A.; Theissen, G. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **29**: 464–489.
- Benlloch, R.; Berbel, A.; Serrano-Mislata, A.; Madueño, F. 2007. Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. **Annals of botany** **100**: 659–676.
- Berbel, A.; Navarro, C.; Ferrándiz, C.; Cañas, L. A.; Madueño, F.; Beltrán, J. P. 2001. Analysis of *PEAM4*, the pea *API* functional homologue, supports a model for *API-like* genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. **The Plant Journal** **25**: 441–451.
- Blázquez, M. A.; Ferrándiz, C.; Madueño, F.; Parcy, F. 2006. How floral meristems are built. **Plant molecular biology** **60**: 855–870.
- Boss, P. K.; Thomas, M. R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape “green revolution” mutation. **Nature** **416**: 847–50.
- Bowman, J. L.; Alvarez, J.; Weigel, D.; Meyerowitz, E. M.; Smyth, D. R. 1993. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. **Development** **119**: 721–743.
- Bull-Hereñu, K.; Classen-Bockhoff, R. 2011. Open and closed inflorescences: more than simple opposites. **Journal of Experimental Botany** **62**: 79–88.
- Calonje, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J. M.; Carmona, M. J. 2004. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. **Plant** **135**: 1491–1501.
- Carmona, M. J.; Calonje, M.; Martínez-Zapater, J. M. 2007. The FT/TFL1 gene family in grapevine. **Plant molecular biology** **63**: 637–650.
- Carmona, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J. 2002. *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. **Plant Physiology** **130**: 68–77.

- Causier, B.; Schwarz-Sommer, Z.; Davies, B. 2010. Floral organ identity: 20 years of ABCs. **Seminars in cell & developmental biology** **21**: 73–79.
- Coen, E.; Meyerowitz, E. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**: 31–37.
- Cutri, L. 2009. Estudo da função do gene *LEAFY (LFY)* em duas espécies de *Passiflora*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Cutri, L.; Nave, N.; Ami, M. Ben; Chayut, N.; Samach, A.; Dornelas, M. C. 2013. Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. **Mechanisms of development** **130**: 61–69.
- Darwin, C. R. 1865. On the movements and habits of climbing plants. **Journal of the Linnean Society of London (Botany)** **9**: 1-118.
- Davies, B.; Schwarz-Sommer, Z. (1994). Control of floral organ identity by homeotic MADS box transcription factors. In: Nover, L. (ed.). **Plant Promoters and Transcription Factors**. Springer-Verlag. Berlin.
- Davies, B.; Egea-cortines, M.; Silva, E. D. A.; Saedler, H.; Sommer, H. 1996. Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. **The EMBO journal** **15**: 4330–4343.
- 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, 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.

- Fan, H. ying; Hu, Y.; Tudor, M.; Ma, H. 1997. Specific interactions between the K domains of *AG* and *AGLs*, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. **The Plant Journal** **12**: 999–1010.
- Ferrándiz, C.; Gu, Q.; Martienssen, R.; Yanofsky, M. F. 2000. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. **Development** **127**: 725–734.
- Gangstad, V. 1938. A morphological study of the leaf and tendril of *Passiflora caerulea*. **American Midland Naturalist** **20**: 704–708.
- Gu, Q.; Ferrándiz, C.; Yanofsky, M. F.; Martienssen, R. 1998. The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. **Development** **125**: 1509–1517.
- Hardenack, S.; Ye, D.; Saedler, H.; Grant, S. 1994. Comparison of MADS Box Gene Expression in Developing Male and Female Flowers of the Dioecious Plant White Campion. **The Plant cell** **6**: 1775–1787.
- Huijser, P.; Klein, J.; Lonngig, W. ekkehard; Meijer, H.; Saedler, H.; Sommer, H. 1992. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. **The EMBO journal** **11**: 1239–1249.
- Immink, R. G. H.; Hannapel, D. J.; Ferrario, S.; Busscher, M.; Franken, J.; Campagne, M. M. L.; Angenent, G. C. 1999. A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. **Development** **126**: 5117–5126.
- Irish, V. F. 2010. The flowering of *Arabidopsis* flower development. **The Plant journal** **61**: 1014–1028.
- Jones, D. T.; Taylor, W. R.; Thornton, J. M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences** **8**: 275-282.

- Kempin, S. A.; Savidge, B.; Yanofsky, M. F. 1995. Molecular Basis of the *cauliflower* Phenotype in *Arabidopsis*. **Science** **268**: 522–525.
- Kim, S.; Koh, J.; Yoo, M. J.; Kong, H.; Hu, Y.; Ma, H.; Soltis, P. S.; 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.
- Krosnick, S. E.; Freudenstein, J. V. 2005. Monophyly and Floral Character Homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). **Systematic Botany** **30**: 139–152.
- Liljgren, S. J.; Gustafson-Brown, C.; Pinyopich, A.; Ditta, G. S.; Yanofsky, M. F. 1999. Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. **The Plant cell** **11**: 1007–1018.
- Litt, A.; Irish, V. F. 2003. Duplication and Diversification in the *APETALA1* / *FRUITFULL* Floral Homeotic Gene Lineage: Implications for the Evolution of Floral Development. **Genetics** **165**: 821–833.
- Lowman, A. C.; Purugganan, M. D. 1999. Duplication of the *Brassica oleracea* *APETALA1* Floral Homeotic Gene and the Evolution of Domesticated Cauliflower. **The Journal of Heredity** **90**: 514–520.
- Melzer, S.; Lens, F.; Gennen, J.; Vanneste, S.; Rohde, A.; Beeckman, T. 2008. Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. **Nature genetics** **40**: 1489–1492.
- Munster, T.; Pahnke, J.; Di Rosa, A.; Kim, J. T.; Martin, W.; Saedler, H.; Theissen, G. 1997. Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **94**: 2415–2420.
- Nave, N.; Katz, E.; Chayut, N.; Gazit, S.; Samach, A. 2010. Flower development in the passion fruit *Passiflora edulis* requires a photoperiod-induced systemic graft-transmissible signal. **Plant, cell & environment** **33**: 2065–2083.

- Pabón-Mora, N.; Ambrose, B. a; Litt, A. 2012. Poppy *APETALA1/FRUITFULL* orthologs control flowering time, branching, perianth identity, and fruit development. **Plant physiology** **158**: 1685–1704.
- Pantano, S. C. 2007. Propagação. In: Leonel, S.; Sampaio, A. C. 2007. **Maracujá-doce: aspectos técnicos e econômicos**. Editora UNESP, São Paulo.
- Prusinkiewicz, P.; Erasmus, Y.; Lane, B.; Harder, L. D.; Coen, E. 2007. Evolution and development of inflorescence architectures. **Science** **316**: 1452–1456.
- 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** **93**: 4793–4798.
- Ruzin, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sather, D. N.; Golenberg, E. M. 2009. Duplication of *API* within the *Spinacia oleracea* L. *API/FUL* clade is followed by rapid amino acid and regulatory evolution. **Planta** **229**: 507–521.
- Schultz, E. a.; Haughn, G. W. 1991. *LEAFY*, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in *Arabidopsis*. **The Plant cell** **3**: 771–781.
- Schwarz-Sommer, Z.; Huijser, P.; Nacken, W.; Saedler, H.; Sommer, H. 1990. Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. **Science** **250**: 931–936.
- Shah, J.; Dave, Y. 1970. Tendrils of *Passiflora foetida*: Histogenesis and Morphology. **American Journal of Botany** **57**: 786–793.
- Shah, J.; Dave, Y. 1971. Morpho-histogenic studies on tendrils of *Passiflora*. **Annals of Botany** **35**: 627–635.

- Shchennikova, A. V.; Shulga, O. A.; Immink, R.; Skryabin, K. G.; Angenent, G. C. 2004. Identification and Characterization of Four Chrysanthemum MADS-Box Genes, Belonging to the *APETALA1/FRUITFUL* and *SEPALLATA3* Subfamilies. **Plant physiology** **134**: 1632–1641.
- Shore, P.; Sharrocks, A. D. 1995. The MADS-Box Family of Transcription Factors. **European Journal of Biochemistry** **229**: 1–13.
- Snow, N.; MacDougal, J. M. 1993. New Chromosome Reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany** **18**: 261–273.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution** **30**: 2725–9.
- 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.; Rosa, A. Di; Kanno, A.; Kim, J. T.; Winter, K. uwe; Saedler, H. 2000. A short history of MADS-box genes in plants. **Plant molecular biology** **42**: 115–149.
- Theissen, G.; Saedler, H. 2001. Floral quartets. **Nature** **409**: 469–471.
- Tilly, J. J.; Allen, D. W.; Jack, T. 1998. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects. **Development** **125**: 1647–1657.
- Ulmer, T., & MacDougal, M. J. 2004. ***Passiflora: Passionflowers of the world***. Timber Press, Inc., Portland.
- Vandenbussche, M. 2003. Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. **Nucleic Acids Research** **31**: 4401–4409.
- Yotoko, K. S. C.; Dornelas, M. C.; Togni, P. D.; Fonseca, T. C.; Salzano, F. M.; Bonatto, S. L.; Freitas, L. B. 2011. Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. **PloS one** **6**: 1-8.

Yu, D.; Kotilainen, M.; Po, E.; Mehto, M.; Elomaa, P.; Helariutta, Y.; Albert, V. A.; Teeri, T. H. 1999. Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). **The Plant journal** 17: 51–62.



Considerações finais

Considerações finais

A proposta inicial deste trabalho foi estabelecer uma descrição detalhada da ontogenia do complexo de gemas, bem como averiguar a expressão de *PasAPI* durante o desenvolvimento de tal estrutura. Dado que o desenvolvimento da gavinha é relacionado ao estágio de vida da planta, consideramos de fundamental importância incluir os diferentes estágios de vida da planta na análise. Inicialmente selecionamos duas espécies de *Passiflora* (*P. edulis* e *P. suberosa*) pois, além de já terem sido investigadas anteriormente quanto ao desenvolvimento e quanto à expressão do ortólogo de *LFY*, também apresentam dois modelos diferentes de desenvolvimento, apresentando uma e duas flores, respectivamente.

Uma vez que mais material se tornou disponível para análise, provenientes do projeto de doutorado de outros integrantes de nossa equipe, resolvemos ampliar o estudo de desenvolvimento e, assim, foi mais clara a percepção de que o desenvolvimento dos meristemas “adicionais” do complexo de gemas, ou seja, a subdivisão do meristema axilar nos meristemas florais e no da gavinha, passa na realidade por um estágio onde o meristema axilar produz brácteas e seus meristemas axilares associados. Esses meristemas nas axilas das brácteas, por sua vez, produzem bractéolas. Assim o que normalmente é considerado como a presença de 3 brácteas na realidade trata-se de uma bráctea e duas bractéolas. Será interessante reavaliar diversos trabalhos existentes sob essa nova perspectiva.

No que se refere à expressão de *PasAPI*, dada a função de *API* de *Arabidopsis* no estabelecimento da identidade de meristema floral, nossa hipótese inicial era a de que *PasAPI* deveria se expressar apenas na região do meristema axilar que daria origem às flores, e não na região que se tornaria o meristema da gavinha.

Nossos resultados, no entanto, demonstram uma grande amplitude de expressão desse gene, presente não só em meristemas florais, mas também em meristemas vegetativos, folhas e tecido procambial. Mesmo nas flores, *PasAPI* não fica restrito aos verticilos do perianto, mas encontram-se também em estames e carpelos. Essa expressão é muito semelhante ao ortólogo de *API* em outras eudicotiledôneas nucleares e, sobretudo, a genes *FUL-like*, presentes em angiospermas não-eudicotiledôneas nucleares.

Futuros estudos de perda e ganho de função de *PasAPI*, bem como estudos da expressão de outros genes, como o ortólogo de *FUL* e de *TLF1*, podem elucidar muitas das questões referentes ao estabelecimento da arquitetura da inflorescência em *Passiflora*, bem como do real papel de *PasAPI* para o desenvolvimento da gavinha.



Anexo

**Relatório de atividades científicas desenvolvidas
junto ao grupo PDS, Wageningen**

Interação de proteínas MADS-box em tomate

Os fatores de transcrição da família MADS-box estão presentes em plantas, animais e fungos. Em plantas, esses genes controlam diversos fatores do desenvolvimento, sobretudo no que se refere à transição de fase (vegetativa – reprodutiva) e o desenvolvimento floral e do fruto. Normalmente, os genes MADS possuem 4 domínios bem definidos, com diferentes papéis:

“MADS” – ligação à molécula de DNA

I – interação proteína-proteína

K – interações proteína-proteína e formação de complexos de ordem superior

C – formação de complexos de ordem superior e ativação transcricional

Geralmente o peptídeo funcional é um tetrâmero composto por hetero ou homodímeros de proteínas MADS. Embora o papel de diversos genes seja bem compreendido na planta modelo *Arabidopsis*, portadora de frutos secos, ainda pouco se sabe como estes genes se comportam durante o desenvolvimento de frutos carnosos, como o tomate.

Em tomate existem duas cópias homólogas ao gene *FRUITFULL (FUL)* de *Arabidopsis*, *SIFUL1* e *SIFUL2*. Ambos são expressos durante o amadurecimento do fruto e possuem importante papel nesta fase do desenvolvimento. *FUL* é um gene que possui diferentes funções, primeiro na determinação do meristema da inflorescência e mais tardiamente na regulação da identidade das células das valvas dos frutos.

Foi observado previamente que o gene *SIFUL1* possui dois diferentes alelos: "*SIFUL1* round", presente na maioria dos cultivares comerciais, e "*SIFUL1* cherry", comumente encontrado em algumas variedades e em espécies selvagens filogeneticamente próximas ao tomate comercial. A principal diferença entre os dois

alelos é uma deleção de 15 nucleotídeos presente no início do domínio C do alelo “round”, resultando em uma proteína com 5 aminoácidos a menos (Fig. 1).

RoundTomato	:	DRALQEQNNQLSKKVKEREKEVAQQNQW-----EINSSSFVLPQQLDSPHLGEA
CherryTomato	:	DRALQEQNNQLSKKVKEREKEVAQQNQWDQQNHEINSSSFALPQQLDSPHLGEA
Pimpinellifolium	:	DRALQEQNNQLSKKVKEREKEVAQQNQWDQQNHEINSSSFVLPQQLDSPHLGEA
Peruvianum	:	DRALQEQNNQLSKKVKEREKEVAQQNQWDQQNHEINSSSFVLPQQLDSPHLGEA
Commersoni	:	DRALQEQNNQLSKKVKEREKEVEQQNQWDQQNHEINSSTFVLPQQLDSPHLGEA
Dulcamarum	:	DKALQEQNNQLSKKVKEREKEGAQQYQWDQQNHEINSSTFVLPQQLDSPYLGEA
Potato	:	DRALQEQNNQLSKKVKEREKEVAQQNQWDQQNHEINSSTFVLPQQLDSPHLGEA

C-domain 

Figura 1. Alinhamento da sequência de parte da proteína SIFUL1 de tomate comercial (Round Tomato), da variedade “cherry” e de outras espécies semelhantes. Notar deleção de 5 aminoácidos presente no início do domínio C (indicado pela seta vermelha).

Uma vez que, como previamente mencionado, as proteínas MADS interagem entre si para formar um fator de transcrição funcional, é possível que proteínas resultantes de diferentes alelos interajam de forma diferente com seus parceiros, resultando em diferenças durante o amadurecimento do fruto.

Com o intuito de averiguar a existência de tais diferenças, foi realizado um experimento de duplo híbrido em levedura (yeast two hybrid; Y2H). Neste experimento, testa-se a capacidade de interação entre proteínas utilizando-se leveduras que só são capazes de crescer em meio seletivo caso ocorra interação entre as proteínas alvo. Para tanto foram selecionados MADS-box genes de interesse, cujas proteínas sabidamente interagem com SIFUL1 e/ou que se expressam durante o amadurecimento do fruto (tabela 1). Estes genes já haviam sido previamente clonados pelo grupo de pesquisa de Wageningen.

Tabela 1. Genes selecionados para o experimento de duplo híbrido em levedura e suas funções conhecidas. Linhas em cinza indicam genes do grupo SEPALLATA.

SIFUL1	
Round	
SIFUL1	Promove amadurecimento do fruto
Cherry	
SIFUL2	
TAG1	Promove determinação do meristema floral
TAGL1	Controle da espessura do pericarpo e promoção do amadurecimento do fruto
RIN	Regulador chave do amadurecimento
SIMBP21	Expressão durante o desenvolvimento do fruto. Função ainda não plenamente conhecida
SIMADS1	Inibe amadurecimento interferindo na produção de etileno. Regula negativamente <i>SIFUL1</i>, <i>RIN</i> e <i>TAGL1</i>
TM5	Diferenciação de órgãos florais
TM29	Manutenção do meristema floral, identidade de órgãos florais e inibição do desenvolvimento de frutos

O experimento foi realizado em duplicata, utilizando-se uma matriz de combinações entre os referidos genes. É importante ressaltar que, dada a capacidade de autoativação de proteínas do grupo SEPALLATA, promovida pelo domínio C, foram usadas apenas versões truncadas destas proteínas para a realização do experimento.

Como resultado, foram confirmadas diversas interações já conhecidas, bem como identificadas as seguintes novas interações, nunca antes observadas: SIFUL1 x MBP21, TM29 x SIFUL2, MBP21 x MADS1 e RIN x RIN (figura 2).

A

BD AD	SIFUL1 Round	SIFUL1 Cherry	FUL2	TAG	TAGL1	RIN	MBP21	MADS1	TM5	TM29
SIFUL1 Round						*	X			
SIFUL1 Cherry						X	X			
FUL2				X		*	*	*		
TAG			*			*	*	*	*	X
TAGL1						*	*		*	X
RIN	*	X	*	*	X	X	*			*
MBP21			*	*	*	*	*			
MADS1			*			*	X			
TM5			*	*	*					
TM29			X	*	*	*	*			

 Interaction strength
 According to [Leseberg et al 2008](#)
 *
 X Interactions never reported before



Figura 2. Interações observadas no experimento de Y2H. **A.** Força da interação inferida a partir da taxa de crescimento das colônias de levedura. Notar que interações com TM5 não foram observadas devido a um problema presente no clone. Azul = Genes do clado *APETALA1 / FRUITFULL*; Rosa = Genes do clado *AGAMOUS* Verde = Genes do clado *SEPALLATA*. **B.** Colônias do experimento após 7 dias de crescimento em meio seletivo. Disposição das colônias segue a ordem da figura “A”.

É importante notar que nenhum das combinações realizadas com TM5 resultou em crescimento das colônias. Verificando o clone usado para o experimento através de sequenciamento, constatou-se que o inserto estava clonado na orientação errada, além de possuir uma mudança de quadro de leitura.

Embora não tenham sido encontradas diferenças qualitativas entre as interações, indícios de que as proteínas codificadas pelos alelos apresentam diferente afinidade por seus parceiros foram encontradas. Para confirmar esta hipótese, um novo experimento foi realizado utilizando-se apenas as interações positivas com SLFUL1, desta vez tomando-se o cuidado de quantificar precisamente a concentração inicial de leveduras no início do experimento. Desta maneira, foi possível confirmar que a proteína codificada pelo alelo “cherry” interage mais fortemente com seus parceiros em relação à codificada pelo alelo “round” (figura 3).

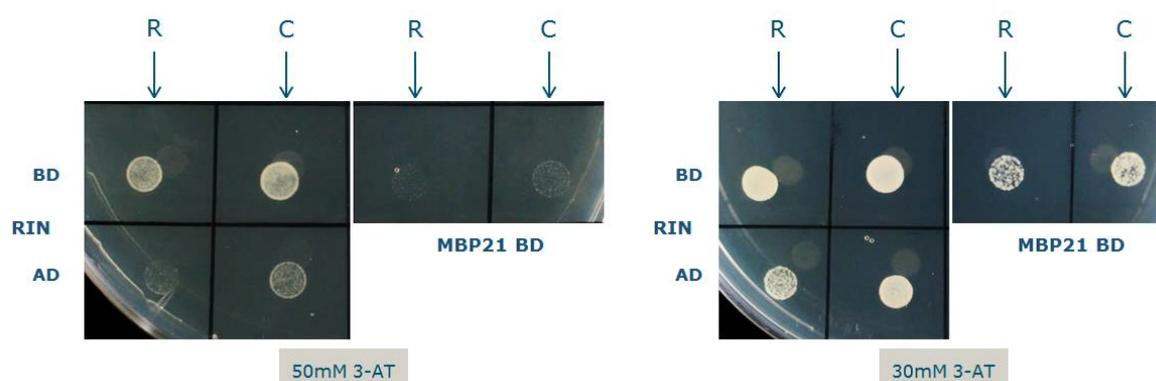


Figura 3. Interações entre as proteínas codificadas pelo alelo “round” (R) e “cherry” (C) e seus parceiros observados no experimento de Y2H. Valores abaixo da figura indicam a concentração (em molar) de 3-AT, substância que aumenta a seleção para a interação. Notar que as interações com “cherry” sempre resultam em crescimento mais robusto.

Contudo, após o experimento de Y2H, foi constatado que o alelo “round” não era idêntico ao encontrado no genoma do tomate comercial (Heinz), possuindo uma deleção de um nucleotídeo que resulta em um códon de parada prematuro, truncando a proteína em seu “domínio C”. Para confirmar se esta deleção ocorre naturalmente, o gene *SIFUL1* foi clonado de outras variedades de tomate, selecionadas com base, e

provenientes, do 150 Tomato Genome ReSequencing Project” (também desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Wageningen). Estas clonagens resultaram na identificação de um outro alelo adicional, ainda não descrito na literatura, juntamente com a confirmação da ocorrência do alelo previamente clonado (figura 4).

```
Cherry      : SKKVKEREKEVAQQNQWDDQNH EINSSEFALPQQLDSPHLGEAYQSTNVIDNGEVEGGSSSQQGAANNTVMPQWMLRHLNN
HEINZ_roun : SKKVKEREKEVAQQNQW-----EINSSEFVLPQQLDSPHLGEAYQSTNVIDNGEVEGGSSSQQGAANNTVMPQWMLRHLNN
DGG_round  : SKKVKEREKEVAQQNQW-----EINSSEFALPQQLDSPHLGEAYQSTNVIDNGEVEGGSSSQQGAANNTVMPQWMLRHLNN
MB_round   : SKKVKEREKEVAQQNQW-----EINSSEFVLPQQLDSPHLGEHTRVLM-----
```



C-domain

Figura 4. Sequência alinhada dos alelos de *SLFULI* clonados. DGG_round e MB_round foram obtidos das variedades Dixy Golden Giant e Moneyberg, respectivamente. Estes alelos foram identificados pela primeira vez no presente trabalho e apresentam variações no domínio C (seta vermelha).

Futuros experimentos serão conduzidos para a quantificação apropriada da força de interação entre os diferentes alelos de *SIFULI* e seus parceiros através de um ensaio de LacZ. Além disso, uma vez que a deleção presente nos alelos “round” ocorre em uma região reconhecidamente importante para interações de ordem superior (interações entre dímeros de proteínas MADS), foram iniciados os preparativos para um experimento de triplo híbrido (Y3H) entre proteínas de interesse. Estes experimentos estão sendo conduzidos pelo grupo de pesquisa da universidade de Wageningen.

Splicing alternativo em MADS-box de tomate

Como explicado anteriormente, o domínio C das proteínas MADS além de promover autoativação nas proteínas SEPALLATA são importantes para interações de ordem superior. Desta forma, para o experimento de Y3H, foram clonadas as versões completas dos genes que codificam estas proteínas. Durante o processo de clonagem, foram encontradas variações de splicing para alguns destes genes.

O sequenciamento dos clones de *SIMADSI* indicou a presença de dois RNA mensageiros que diferem quanto à presença/ausência de uma sequência de 42

nucleotídeos. Verificando-se esta sequência no genoma do tomate, foi observado que este evento de splicing se trata de em caso de “exon skipping”, onde o sexto exon pode estar completamente ausente no RNAm (figura 5).

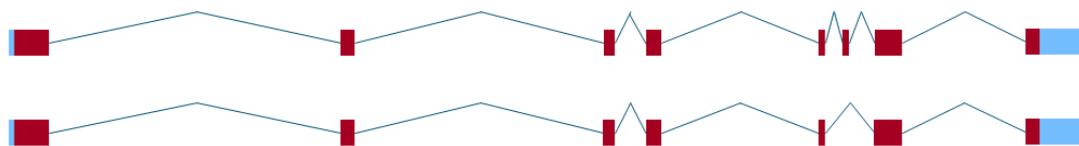
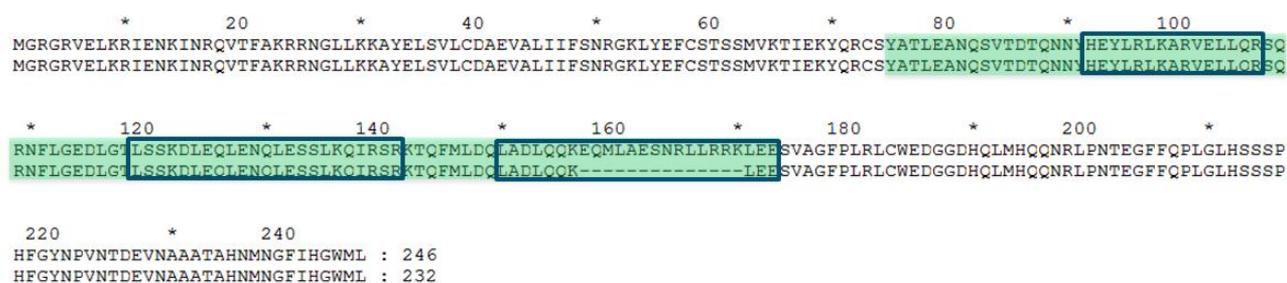


Figura 5. Modelos do RNAm de *SLMADSI* proveniente dos diferentes eventos de splicing. O sexto exon do gene não está presente na versão menor de seu RNAm. Porções em azul indicam regiões não traduzidas.

Para verificar o efeito dos diferentes eventos de splicing, as proteínas resultantes destes RNA mensageiros foram avaliadas. Suas sequências indicam que a diferença de 14 aminoácidos está presente no final do domínio K, responsável por interações entre proteínas. Mais especificamente, a sequência é parte integrante da última alfa-hélice presente neste domínio, reconhecidamente responsável pela especificidade de interações com outras proteínas MADS (figura 6).



K domain
 Predicted alpha helix

Figura 6. Splicing alternativo em *SLMADSI*. Alinhamento da sequência da proteína proveniente de diferentes eventos de splicing. A região modificada está contida no domínio K e contém parte de uma alfa-hélice responsável por interações proteína-proteína.

Em *Arabidopsis* foi demonstrado que a perda desta alfa-hélice altera significativamente o número de parceiros com as quais a proteína em questão é capaz de interagir. Desta maneira, para confirmar a hipótese de diferença estrutural entre as duas versões da proteína, sua estrutura secundária foi avaliada através do software DNASTar. A predição indica que a região variante, de fato, compõe a estrutura da última alfa-hélice do domínio K. Embora a alfa-hélice esteja presente em ambas as proteínas, na variante menor esta apresenta estrutura alterada, não formando uma região de “coiled-coil” (figura 7). Esta conformação geralmente está associada à interação entre proteínas, sugerindo que de fato existe uma diferença funcional entre as variantes.



Figura 7. Predição da estrutura secundária de ambas as proteínas codificadas pelo gene *SIMADSI*. Gráfico em verde mostra a probabilidade de alfa-hélice. Barras laranja indicam regiões de conformação em “coiled-coil”. Região destacada em vermelha corresponde à região presente apenas na versão longa da proteína.

No grupo dos genes *SEPALLATA*, além de *SIMADSI*, foi identificada uma variação de splicing para *TM29/SISEPI*. Neste caso, o gene apresenta dois possíveis aceptores para splice do sexto exon, resultando na incorporação ou não de uma glutamina adicional também na região da terceira alfa-hélice. Através da análise da sequência de ambas as proteínas foi possível observar que a incorporação de uma única glutamina altera a conformação “coiled-coil” de maneira muito semelhante à observada para *SIMADSI*.

As variantes encontradas para *SIMADSI* e *TM29* são de especial interesse pois sua estrutura secundária indica prováveis diferenças funcionais. Desta maneira, ambas as formas de splice parecem promissoras e foram clonadas em vetores apropriados para os futuros experimentos de duplo e triplo híbrido.

Outro caso de splicing alternativo foi encontrado em *TAGLI*, que apresenta incorporação ou não de duas glicinas no domínio C. Contudo, analisando-se a estrutura secundária destas proteínas, não foi observada diferenças significativas. Desta maneira, optou-se pela não inclusão de ambas as formas em estudos futuros.

Busca por diferentes fenótipos entre *SIFULI* “cherry” e “MB round”

Para averiguar se os diferentes alelos de *SIFULI* causam um fenótipo perceptível durante o desenvolvimento dos frutos, foram avaliadas plantas homozigóticas para o alelo “round” e para o alelo “cherry”.

Sementes de três diferentes linhagens provenientes do cruzamento entre plantas “cherry” e plantas “round” foram germinadas. Estas sementes representam a sétima geração promovida por autogamia a partir do cruzamento original. Plântulas foram genotipadas e três indivíduos homozigóticos para cada genótipo foi selecionado para cada linhagem, totalizando 18 plantas. Os frutos dessas plantas foram avaliados quanto ao aspecto geral, incluindo morfologia e coloração.

Embora tenham sido encontradas diferenças quanto ao tamanho e coloração entre os frutos das diferentes linhagens, não houve diferença significativa entre os diferentes genótipos dentro de uma mesma linhagem.

De modo a aprofundar a busca por fenótipo, foram analisados os seguintes caracteres:

1- “Flowering time”: calculado com base no número de folhas produzidas pelo indivíduo antes deste entrar em fase reprodutiva;

2- Tempo de desenvolvimento do fruto: período de tempo entre a antese e o estágio “breaker” (início do amadurecimento);

3- Dureza do fruto: medida com o uso de penetrômetro 7 dias após o estágio “breaker” (breaker +7).

Infelizmente, ao longo do experimento as plantas sofreram infecção por vírus, o que prejudicou muito as linhagens 26 e 27, cujos indivíduos apresentaram maior susceptibilidade à doença. Ainda assim, as análises foram conduzidas durante o tempo em que as plantas se encontravam saudáveis.

Desta maneira, os seguintes resultados foram obtidos:

1- “Flowering time”

Não foram observadas quaisquer variações entre os genótipos

2- Tempo de desenvolvimento

A linhagem número 23 exibiu uma diferença significativa entre o período de desenvolvimento do fruto entre o genótipo “round” e “cherry”, sendo este aproximadamente três dias mais rápido nos indivíduos homozigóticos para “round” (figura 8).

Estes dados são interessantes uma vez que podem indicar uma diferença funcional entre as proteínas. Além disso, um menor tempo de desenvolvimento explicaria o motivo de este alelo ter sido selecionado nas variedades comerciais.

Infelizmente não foi encontrada diferença significativa para a linhagem 27, possivelmente por uma amostragem não suficiente. Enquanto que a linhagem 26 não pôde ser analisada dada a grande susceptibilidade ao vírus.

Line	23	Days														Mean (Days)						
	6	41	32	31	35	35	35	41	42	34	43	32	32	47					T test			
Plant	11	33	36	36	36	39	35	32	32	33	38	34	32	46	53	62		Round	36,8947368			
Number	15	36	41	34	33	32	32	32	34	36	35								p-value	0,06987		
	12	30	33	37	36	49	39	32	32	32	34	39	36	35	41			Cherry	40			
	5	39	33	46	35	34	34	53	39	35	41	63	64									
	9	45	44	46	40	40	33	32	32	52	37	39	39	35	62	48	35					
Line	26																					
	13																					
Plant	16	50																				
Number	17	46																				
	14																					
	15																					
	6																					
Line	27																					
	8	35	22	43	34	36	36	39	37											T test		
Plant	13	43	37	43	48	41	40	38	43													
Number	18	35																		p-value	0,56836	
	14	34	35	35	12	45	37	34	40	40	60	50	37	42	49	37	44	40	43	40	Cherry	39,5217391
	22																					
	19	39	39	37	40																	

Figura 8. Tempo de desenvolvimento dos frutos de três diferentes linhagens. Foi considerado o número de dias entre a antese e o estágio “breaker” do fruto. Números em verde indicam plantas homozigóticas para o alelo “round” enquanto os azuis, para o alelo “cherry”.

3- Dureza do fruto

Foram encontradas diferenças significativas entre os frutos “cherry” e “round” para as linhagens 26 e 27. Contudo, os resultados são contraditórios, sendo “round” os mais duros na linhagem 26, enquanto “cherry” na linhagem 27 (figura 9).

Mais uma vez, estes resultados provavelmente indicam uma amostragem não suficiente para ambas as linhagens. Plantas da linhagem 23 tiveram mais frutos amostrados e não exibiram diferenças significativas.

Line	Plant number					Line	Plant number					Line	Plant number							
23	6	11	15	12	5	9	26	13	16	17	14	15	6	27	8	13	18	14	22	19
	49,6	56,7	51,8	48,3	58,2	60,3		63,6	60,2	67	54,2	55,1		46,7	55,6	58,7	61,2			
	55,3	56	56,9	56,1	59,9	60,6		66,8	71	62,5		58		50,7	60	60,3	70,6			
	59,4	54,3	50,4	58,1	63,2	60,2		69		64,5		56,4		59,6	59,3	61,4				
	59	52,5	48,4	61,7	64,9	60,6		74,4						57,3	50,6	64,2				
	58,3	57,7	62	57,6	62,8	63,1		66,4							56,3	66,7				
	62	59,2	56,5	65,7	60,8	67,5		69,9							64,2	65,7				
	57,7	63,7	61,8	60,6	63,1	65,2		68,5							65,4					
	60,5	63,5	62,2	63,6	61,4	63,6		64,4												
	65,3	62,3	59,2	54,5	58,2	59,7		73,1												
	66,5	64,4	50	52,5	66,1	58,1		67,7												
	69,6	67,3	63,9	60,9	58,6	64,1		78												
	62,8		59,6	60,4	61	59,7														
	60,5			51,9	61,9	72,7														
	55			59,4		66,1														
	65,7			56,4		55,4														
	62,7			58,8																
				56,6																
				58,9																
T test							T test						T test							
	p-value	0,264						p-value	0,0000004648					p-value	0,008					
Mean	Round	59,2					Mean	Round	67,9				Mean	Round	56,9					
	Cherry	60,4						Cherry	55,9					Cherry	63,6					

Figura 9. Dureza dos frutos de três diferentes linhagens. O valor de cada medição representa a média de 4 mensurações realizadas ao longo da circunferência mediana do fruto. Números em verde indicam plantas homozigóticas para o alelo “round” enquanto os azuis, para o alelo “cherry”.

Por fim, foram coletados frutos de todos os indivíduos cultivados (três para cada indivíduo, com réplica biológica) e armazenados em freezer à -80°C. Estes frutos serão utilizados em análises futuras de metabolômica e de expressão gênica.

Experimentos realizados em paralelo

Uma série de experimentos foi realizada em paralelo ao projeto principal. Estes experimentos representam análises preliminares de tópicos de pesquisa potencialmente interessantes e/ou continuidade de pesquisa já em andamento.

VAHOX1

O gene *VAHOX1* foi originalmente descrito como expressando no floema de tomate. Posteriormente, foi observado por dados de micro-arranjo que este gene é expresso durante o amadurecimento do fruto de tomate. Além disso, um grupo de

pesquisa da Bulgária, que colabora com o “PDS group” relatou um possível fenótipo presente na epiderme dos frutos. Com o objetivo de averiguar o possível fenótipo, plantas expressando RNAi para o silenciamento desse gene foram produzidas previamente pelo grupo de pesquisa.

A partir de um conjunto inicial de plantas selecionadas, experimentos de expressão quantitativa foram realizados para confirmação da regulação negativa do gene. Foram isolados RNA totais inicialmente de folhas de todas as plantas, em duplicata, para a análise de qPCR. Uma vez que os resultados pareceram incongruentes (figura 10), uma segunda análise foi realizada a partir de RNA isolado de pecíolos, de onde o gene foi inicialmente clonado e identificado. Com base nos resultados foi possível concluir que todas as plantas selecionadas tem o nível de expressão do gene *VAHOX1* reduzido (figura 10). Estas plantas foram cultivadas até a fase reprodutiva para análise dos frutos.

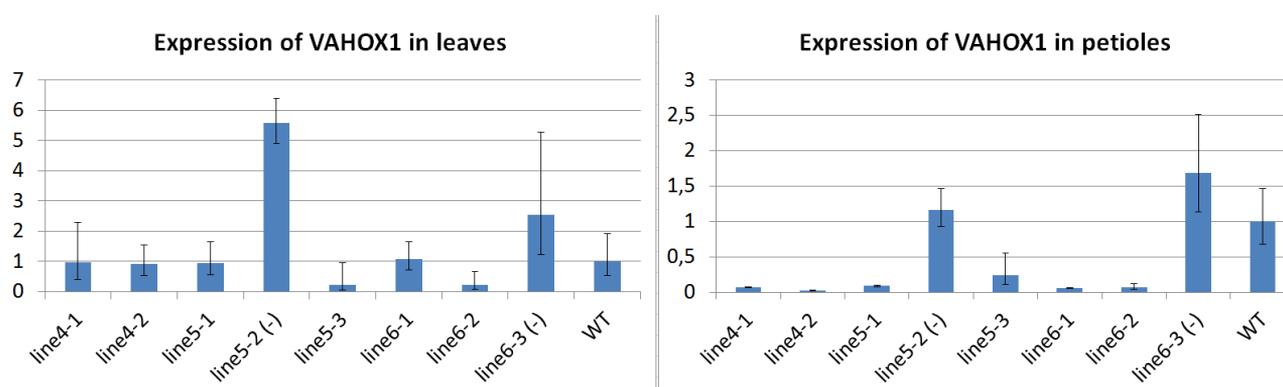


Figura 10. Expressão relativa de *VAHOX1* em folhas e pecíolos de tomate, normalizada em relação à planta selvagem. WT – “wild type” / selvagem; Indivíduos sinalizados com “-” representam não segregantes para o RNAi (controle negativo).

Após início da fase reprodutiva, frutos foram observados quanto à morfologia externa e interna, sobretudo às características da epiderme. Contudo, nenhum fenótipo foi observado em relação aos segregantes negativos ou aos indivíduos selvagens. Visto que um dos supostos fenótipos estaria relacionado à integridade da

epiderme, foi realizado um experimento para avaliar a taxa de perda de água pelo fruto.

Para tanto, foram coletados frutos no estágio “breaker +7” de diferentes plantas com o gene silenciado, bem como de plantas selvagens. Os frutos foram pesados no ato da coleta e passaram a ser pesados diariamente. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre a taxa de transpiração dos mesmos (figura 11).

Para realização de futuras análises de expressão, foram coletados três frutos (em duplicata) de todos os indivíduos com expressão reduzida e de indivíduos selvagens. O material foi armazenado em freezer à -80°C .

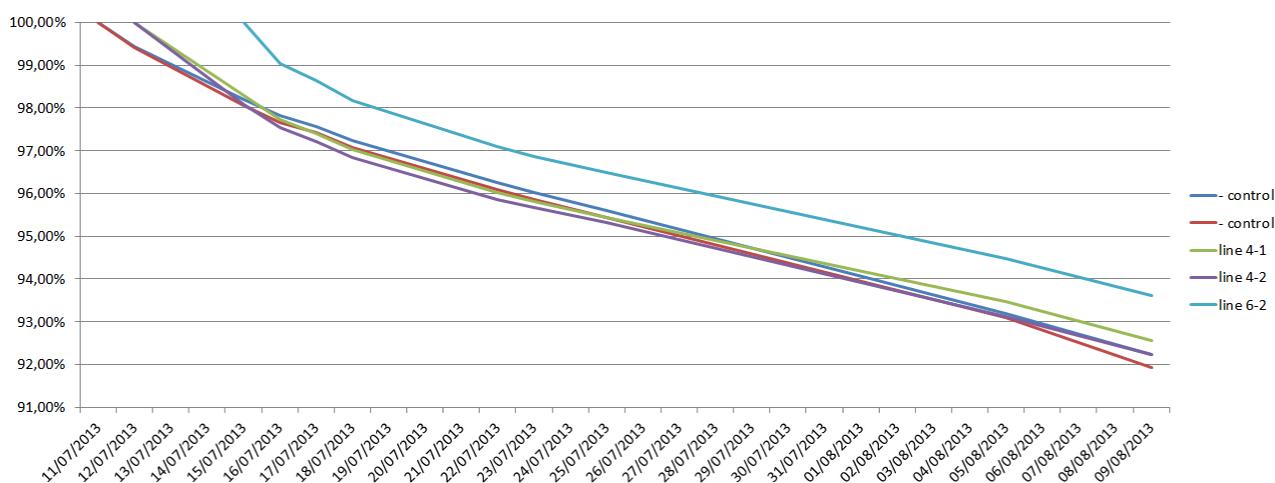


Figura 11. Peso relativo de frutos de tomate em diferentes tempos após coleta. A taxa de perda de água (inferida pelo ângulo das curvas) de linhagens RNAi para *VAHOX1* e dos controles negativos não apresentam diferenças significativas.

Expressão e interações de *AGL16* e *GOA* em *Arabidopsis*

AGL16 e *GOA* são genes de *Arabidopsis thaliana*, pertencentes à família MADS-box, que são conhecidos por participarem no desenvolvimento de estômatos e de frutos, respectivamente. Dados de experimentos realizados anteriormente pelo grupo PDS em colaboração com o laboratório do Professor Marcelo Dornelas sugerem que as proteínas codificadas por ambos os genes podem interagir entre si, e que estão relacionadas ao controle da divisão e expansão celular.

Para testar essas hipóteses, foram selecionadas linhagens de mutantes para cada gene, bem como produzidas linhagens para suas superexpressões (através do uso do promotor 35S). Além disso, foi realizado previamente o cruzamento entre mutantes *agl16* e *goa*, de modo a produzir uma linhagem de duplo-mutantes.

Foram então germinadas sementes resultantes de tal cruzamento, sendo as plântulas então genotipadas para ambos os genes. De um total de 38 plântulas genotipadas, foram encontrados dois duplo-mutantes, cujos indivíduos foram mantidos em câmara de germinação até o fim de seu ciclo para obtenção de sementes.

Com o objetivo de testar se a presença em excesso ou ausência de *AGL16* ou *GOA* altera mutuamente seus níveis de expressão (em relação ao esperado para plantas selvagens), foram realizados experimentos de qPCR. Para tanto, plantas de cada linhagem (*agl16*, *goa*, *agl16/goa*, *35S::AGL16* e *35S::GOA*), além de plantas selvagens (Col-0), foram germinadas simultaneamente. A partir destas plantas foram obtidos tecidos (quinta folha produzida) para extração de RNA, com consequente produção de cDNA utilizado para o experimento de qPCR.

Como resultado, foi observada menor expressão de *GOA* em folhas de mutantes *agl16*, sendo que nenhuma outra alteração significativa parece ocorrer (figura 12). Contudo, foi observada expressão de *GOA*, em níveis próximos aos

detectados em plantas selvagens. Este fato possivelmente representa um falso positivo, uma vez que a expressão observada em plantas selvagens foi extremamente reduzida.

Desta maneira, uma vez que é conhecida a maior expressão de *GOA* em frutos no estágio 17 (após término de seu alongamento), estes foram coletados para a repetição do experimento. Neste caso, *GOA* apresentou expressão quase cinco vezes maior em mutantes *agl16*. Sua expressão, contudo, também foi acentuada em plantas superexpressando *AGL16*. Além disso, superexpressão de *GOA* reduziu significativamente os níveis de *AGL16*.

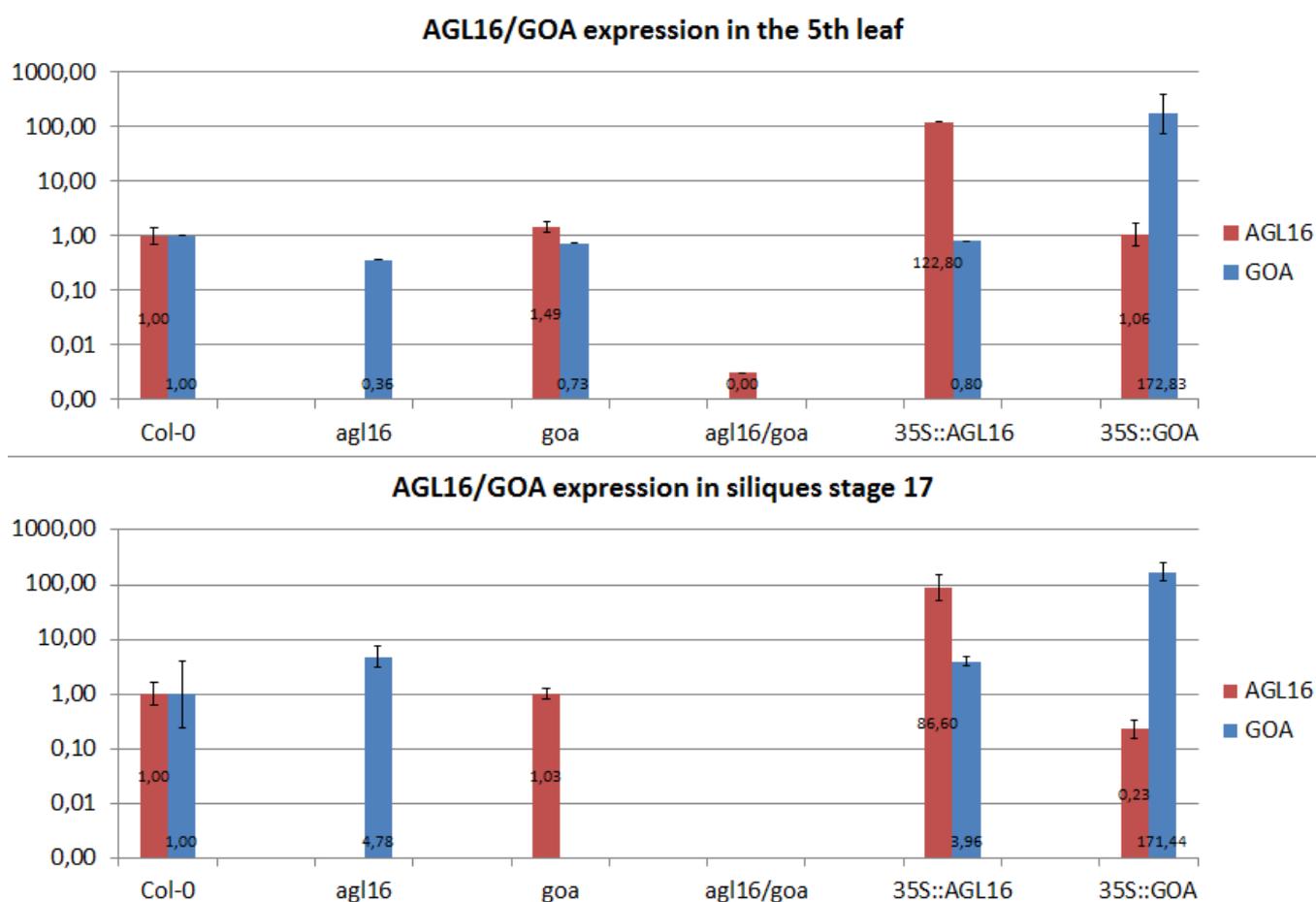


Figura 12. Expressão relativa de *AGL16* e *GOA* em diferentes linhagens, normalizada em relação às plantas selvagens (Col-0). Eixo vertical em escala logarítmica. Valores de expressão mostrados nas colunas.

Além das análises de expressão, foram realizadas avaliações de fenótipos nestas linhagens. Dada a clara variação de tamanho entre indivíduos das diferentes linhagens (figura 13A), foi medida a área da roseta (soma da área de todas as folhas), 24 dias após a germinação. Foram encontradas diferenças significativas para as diferentes linhagens (figura 13B), sendo as maiores áreas pertencentes a indivíduos 35S::GOA e mutantes *agl16*, enquanto indivíduos 35S::AGL16 e mutantes *goa* exibiram as menores áreas.

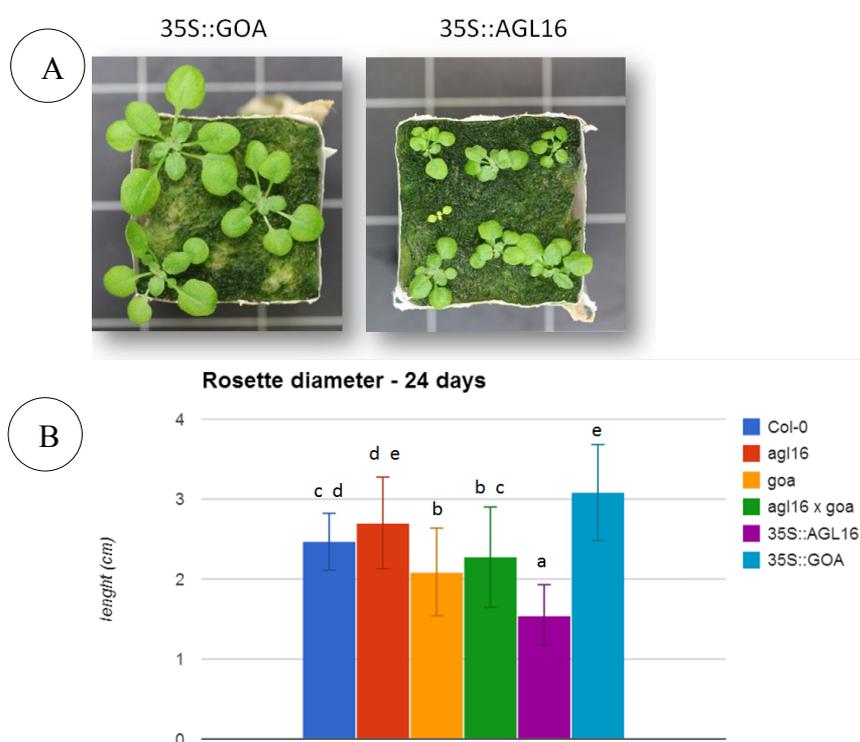


Figura 13. **A.** Exemplo de indivíduos de linhagens superexpressando *GOA* e *AGL16*, exibindo diferenças notáveis de tamanho. **B.** Média da área da roseta (soma das áreas foliares) de indivíduos, 24 dias após germinação. Letras indicam diferenças significativas no tamanho.

Considerando o papel de *AGL16* e *GOA* no desenvolvimento de estômatos e do fruto, respectivamente, além da influência geral no tamanho da planta, é de se esperar mudanças no padrão de divisão e expansão celular. Para avaliar esse efeito, a quinta folha produzida por estas diferentes linhagens foram coletadas 15 dias após a germinação. As folhas foram então clarificadas com o uso de hipoclorito de sódio e

tiveram toda a sua superfície abaxial fotografada em microscopia de contraste de fase. Estas imagens estão sendo utilizadas para a confecção de desenhos de células epidérmicas que abrangem toda a área da superfície abaxial, que serão então processadas através de software específico para avaliação dos padrões de divisão celulares. Além disso, frutos no estágio 17 foram coletados de todas as linhagens para a realização de imagens em microscopia eletrônica de varredura (procedimento que será realizado no Brasil).

Capa: Ramo de *Passiflora suberosa* L.
