

LILIAN CRISTINA BALDON AIZZA

**Caracterização molecular da pigmentação dos filamentos da
corona no gênero *Passiflora* (Passifloraceae)**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LILIAN CRISTINA BALDON AIZZA

“Caracterização molecular da pigmentação dos filamentos da coroa no gênero *Passifora* (Passifloraceae)”

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida pela candidata

Lilian Cristina Baldon Aizza

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Doutora em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

CAMPINAS,
2014

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

Ai99c Aizza, Lilian Cristina Baldon, 1977-
Caracterização molecular da pigmentação dos filamentos da corona no gênero *Passiflora* (Passifloraceae) / Lilian Cristina Baldon Aizza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcelo Carnier Dornelas.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Pigmentação. 2. Antocianina. 3. Corona (Botânica). 4. *Passiflora*. 5. Expressão gênica. I. Dornelas, Marcelo Carnier, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular characterization of the pigmentation of the corona filaments in *Passiflora* genus (Passifloraceae)

Palavras-chave em inglês:

Pigmentation

Anthocyanin

Corona (Botany)

Passiflora

Gene expression

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marcelo Carnier Dornelas [Orientador]

Adriana Pinheiro Martinelli

Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pina

Maria Helena de Souza Goldman

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Data de defesa: 24-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 24 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (orientador)



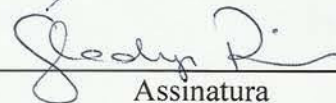
Assinatura

Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli



Assinatura

Profa. Dra. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna



Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman



Assinatura

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya



Assinatura

Profa. Dra. Vera Lucia Scatena

Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Assinatura

Profa. Dra. Marlies Sazima

Assinatura

RESUMO

Antocianinas são frequentemente responsáveis pela grande diversidade de cores encontrada em flores, frutos, sementes e folhas de angiospermas. Estes pigmentos têm uma função ecológica fundamental como discriminação visual na atração de animais para polinização e dispersão de sementes. Dada a importância da pigmentação floral na atração de polinizadores e visto que as flores de *Passiflora* são exuberantes devido à diversidade de coloração, foi de particular interesse neste estudo caracterizar a pigmentação na coroa e identificar os genes envolvidos na biossíntese destes pigmentos. O perfil das antocianinas foi caracterizado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por “*electrospray*” (UPLC-ESI-MS/MS) nos filamentos da coroa de *P. edulis*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. incarnata*, *P. suberosa* e do híbrido interespecífico artificial *P. ‘Lady Margaret’*. A diversidade de pigmentação observada nestas espécies de *Passiflora* pode ser explicada pela combinação de moléculas específicas de antocianinas acumuladas nas células epidérmicas dos filamentos da coroa. A morfologia celular da epiderme dos filamentos da coroa em flores de *Passiflora* pode funcionar como guia visual e tátil para os polinizadores. Análises de bioinformática no banco de etiquetas de sequências expressas (ESTs) de *Passiflora edulis* e *Passiflora suberosa* (PASSIOMA) identificaram quinze genes de seis famílias gênicas potencialmente envolvidas na biossíntese de antocianina em *Passiflora*. As sequências putativas de aminoácidos codificadas pelos genes estudados juntamente com os seus possíveis homólogos em espécies conhecidas foram alinhadas e analisadas. A determinação da expressão temporal e espacial dos genes *PeDFR*, *PeGT*, *PeWD40* e *PsMYB-R2R3* pode contribuir para a compreensão dos mecanismos da biossíntese de antocianinas em *Passiflora*.

ABSTRACT

Anthocyanins are frequently responsible for most of the color diversity found in flowers, fruits, seeds and leaves of angiosperms. These pigments have a key ecological function as visual discrimination in animal attraction for pollination and seed dispersal. Given the importance of floral pigmentation in the attraction of pollinators and since the passionflowers are exuberant due to the great diversity in color it was of particular interest in this study to characterize the pigments present in the corona and identification of genes involved in the biosynthesis of these pigments in *Passiflora*. The anthocyanin profile was characterized by ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization and tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) in coronal filaments of *P. edulis*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. incarnata*, *P. suberosa* and of the artificial interspecific hybrid *P. 'Lady Margaret'*. The diversity of pigmentation observed in these *Passiflora* species can be explained by the combination of different anthocyanin molecules accumulated in the epidermal and subepidermal cells of the corona filaments. The cell morphology of the epidermis of the corona filaments in flowers of *Passiflora* can function as a tactile and visual guide for pollinators. Bioinformatics analysis from the PASSIOMA database obtained from reproductive expressed sequence tags (ESTs) of *Passiflora edulis* and *Passiflora suberosa* identified fifteen genes from six gene families potentially involved in the anthocyanin biosynthesis in *Passiflora*. The putative protein sequences encoded by studied genes together with possible homologs in known species were analyzed by sequence alignment. The determination of the temporal and spatial expression of *PeDFR*, *PeGT*, *PeWD40* and *PsMYB-R2R3* genes may contribute to understanding the mechanisms of anthocyanin biosynthesis in *Passiflora*.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Pigmentação floral: um sinal visual para a interação com polinizadores.....	1
1.2. A via biossintética das antocianinas	2
1.3. Regulação transcricional da via biossintética das antocianinas	6
1.4. Diferentes mecanismos moleculares da via biossintética das antocianinas em monocotiledôneas e dicotiledôneas.....	7
1.5. Como o complexo MYB-bHLH-WD40 modula a regulação transcricional da via biossintética de antocianinas em flores?	11
1.6. Fatores envolvidos na pigmentação final das flores.....	13
1.7. <i>Passiflora</i>	15
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Material vegetal.....	21
3.1.1. Solventes e padrões	22
3.2. Metodologia	22
3.2.1. Obtenção e purificação dos extratos	22
3.2.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência	23
3.2.3. ESI-MS (Espectrometria de Massas com Ionização por “ <i>Eletrospray</i> ”).....	24
3.2.4. Observação do acúmulo de antocianinas	24
3.2.5. Microscopia eletrônica de varredura	25
3.2.6. Análise “ <i>Data Mining</i> ” do PASSIOMA e comparações das sequências	25
3.2.7. Análise de expressão gênica via RT-PCR	26
4. RESULTADOS	31
4.1. Identificação das antocianinas nos filamentos da corona em <i>Passiflora</i> spp.	31
4.2. Caracterização morfológica da epiderme dos filamentos da corona em <i>P. edulis</i> , <i>P. suberosa</i> e em <i>P. coccinea</i>	39
4.3. Identificação e análises filogenéticas dos genes de <i>Passiflora</i> potencialmente envolvidos na biossíntese e no transporte de antocianinas.....	43
4.4. Identificação e análises filogenéticas de genes de <i>Passiflora</i> potencialmente envolvidos na regulação da biossíntese de antocianinas	52
4.5. Análise temporal e espacial da expressão dos genes potencialmente envolvidos na biossíntese das antocianinas em <i>P. edulis</i> e em <i>P. suberosa</i>	57
5. DISCUSSÃO	71
5.1. Caracterização do perfil de pigmentação nos filamentos da corona em espécies de <i>Passiflora</i>	71
5.2. Análise morfológica da epiderme dos filamentos da corona em <i>P. edulis</i> , <i>P. suberosa</i> e <i>P. coccinea</i>	74
5.3. Identificação e caracterização dos genes potencialmente envolvidos na via biossintética das antocianinas em <i>P. edulis</i> e em <i>P. suberosa</i>	75
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS	87
8. ANEXOS	105

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Processo nº 2009/54492-6) e à CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas pela oportunidade, confiança e orientação durante todos os anos de mestrado e doutorado.

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

À Profª. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya pela colaboração com as análises de UPLC-MS/MS.

Aos colegas, funcionários e professores do Departamento de Biologia Vegetal.

Às Profas. Dras. Alexandra Sawaya, Adriana Pinheiro Martinelli, Gladys Flávia Pinna de Albuquerque e Maria Helena Goldman, convidadas para a banca examinadora, por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA) da ESALQ- Universidade de São Paulo pelo uso do Microscópio Eletrônico de Varredura para realização das análises morfológicas.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pelo uso do UPLC-MS/MS.

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

Ao meu esposo Edson pelo incentivo, paciência e compreensão.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANR – Antocianidina redutase

ANS – Antocianidina sintase

ASN – Asparagina

ASP – Ácido aspártico

bHLH – do inglês *basic helix-loop-helix*

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

C4H – Cinamato 4-hidroxilase

4 CL – 4-curamatoco-enzima A ligase

CHS – Chalcona sintase

CHI – Chalcona isomerase

DB1 – Tampão de detecção 1

DB2 – Tampão de detecção 2

DB3 – Tampão de detecção 3

DHK – Dihidrokaempferol

DHM – Dihidromiricetina

DHQ – Dihidroquercetina

DFR – Dihidroflavonol 4- redutase

EST – Etiquetas de Sequências Expressas

ESI- MS/MS – Espectrometria de massas com analisadores sequenciais e ionização por “*eletrospray*”

FLS – Favonol sintase

F3’H – Flavonóide 3’ hidroxilase

F3’5’H – Flavonóide 3’5’ hidroxilase

GT – Glicosiltransferase

GST – Glutathione S-transferase

LAR – Leucocianidina redutase

MEGA – do inglês *The Molecular Genetics Analysis*

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MS – Espectrometria de massas (do inglês *Mass Spectrometry*)

m/z – razão massa/carga

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*

PAL – Fenilalanina amônia liase

RT-PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de uma reação em cadeia de polimerase

UPLC – Cromatografia de ultra-eficiência (do inglês *ultra performance liquid chromatography*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pigmentação floral: um sinal visual para a interação com polinizadores

A diversidade fenotípica floral encontrada entre as angiospermas é visualmente imensa e evolutivamente enigmática. A explicação mais plausível para essa diversidade floral é atribuída às diferentes formas em que as flores adaptaram-se para tornarem mais atraentes e garantir o sucesso reprodutivo das espécies (Whitney e Glover, 2007; Crepet e Niklas, 2009; Friedman, 2009).

Especificamente no caso de flores polinizadas por animais, caracteres morfológicos e fisiológicos coevoluíram com as características anatômicas, fisiológicas e comportamentais dos polinizadores (Fenster et al, 2004; Whitney e Glover, 2007). Os animais reconhecem determinados caracteres florais como morfológicos (tamanho e simetria) e/ou químicos (pigmento, odor e néctar) exercendo forte pressão seletiva em muitas espécies (Harbone, 1994; Fenster et al., 2004; Miller et al., 2009; Kay e Sargent, 2009). O conjunto desses caracteres florais adaptados às características morfológicas e fisiológicas de um particular polinizador é conhecido como “sistema de polinização” (Faegri e Pijl, 1971; Thomson e Wilson, 2008; Rausher, 2008; Kay e Sargent, 2009).

Dentre as características florais, a pigmentação desempenha uma função importante na atração de polinizadores, uma vez que os pigmentos podem refletir diferentes comprimentos de onda da luz propiciando sinais específicos aos animais (Glover e Martin 1998; Clegg e Durbin, 2000, 2003; Chittka e Kevan, 2005; Lunau et al., 2006).

Geralmente, as flores adaptadas à polinização por abelhas apresentam padrões de pigmentação distintos pela combinação de colorações representadas por manchas ou listras no tubo floral e/ou pétalas, conhecidos como “guias de néctar”, direcionando os polinizadores aos recursos e órgãos reprodutivos (Fenster et al., 2004; Lunau et al., 2006).

1.2. A via biossintética das antocianinas

As plantas sintetizam uma quantidade grande de metabólitos secundários, acumulados em diferentes órgãos e em determinados estágios de desenvolvimento da planta como sinais químicos em resposta aos estímulos endógenos e exógenos com função importante na interação planta-meio (Grotewold, 2006; Yang et al., 2012).

Dentre os metabólitos secundários, as antocianinas representam a maior subclasse dos flavonóides e são responsáveis pela enorme diversidade de cores presentes em flores, frutos, sementes e folhas de angiospermas. Além da relevância aos benefícios à saúde humana, estes pigmentos encontrados em flores e frutos exercem um papel ecológico importante na atração de animais contribuindo para a polinização das flores e a dispersão de sementes (Fenster et al., 2004; Grotewold, 2006; Rausher, 2008; Miller et al., 2009).

Normalmente, as antocianinas acumulam-se nos vacúolos de células epidérmicas de pétalas de flores e frutos (Martin e Gerarts, 1993), podendo também ser encontradas em órgãos vegetativos em resposta aos estresses abióticos e bióticos relacionados à radiação ultravioleta, temperatura, seca ou em defesa contra patógenos (Davies, 2004; Gould, 2004; Castellarin et al., 2007; Czemmel et al., 2009; Vogt, 2010; Katerova et al., 2012).

Quando extraídas do meio natural, as antocianinas encontram-se associadas às moléculas de açúcares, sendo estruturalmente derivados glicosilados do cátion flavílico polihidroxilado e/ou polimetoxilado. A remoção da porção glicosilada da estrutura molecular das antocianinas por hidrólise ácida ou enzimática gera a antocianidina que consiste de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um heterociclo oxigenado (C) conforme a Figura 1A (Harborne, 1994; Grotewold, 2006). A Figura 1B mostra as seis antocianidinas principais com as diferenças nas configurações dos substituintes no anel B e as respectivas massas moleculares.

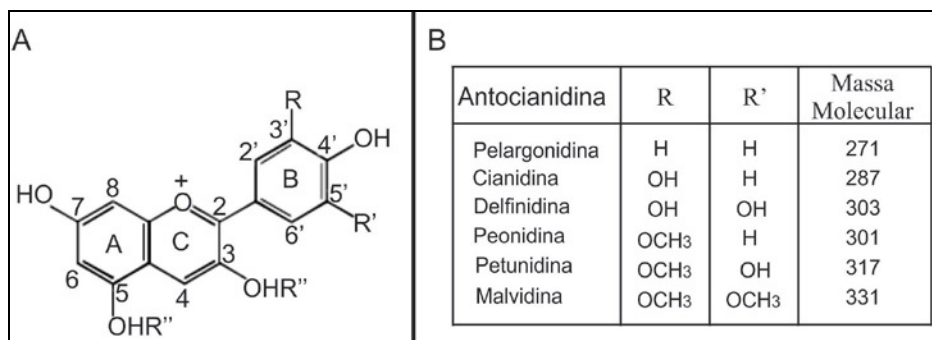


Figura 1. (A) Estrutura da antocianidina. Geralmente, hidroxilação ocorre na posição 3 do anel C, na posições 5 e 7 do anel A e 4' do anel B. (B) Seis antocianidinas comuns, os substituintes encontrados nas posições R e R' e as massas moleculares. Glicosilação e acilação ocorrem na posição R''. Adaptação de Wu e Prior, 2005.

Uma representação geral da via metabólica dos flavonóides, originando as antocianinas e demais compostos fenólicos está ilustrada na Figura 2. Inicialmente, o aminoácido fenilalanina é utilizado como esqueleto carbônico para a condensação de uma molécula de 4-cumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA através da ação da chalcona sintase (CHS), formando tetrahidroxil-chalcona. Posteriormente, este primeiro flavonóide é isomerizado pela chalcona isomerase (CHI) para formar naringenina e se converter em dihidrokaempferol (DHK) pela enzima flavanona 3-hidroxilase (F3H).

Flavonóide 3' hidroxilase (F3'H) e flavonóide 3'5' hidroxilase (F3'5'H) catalisam a hidroxilação do dihidrokaempferol para produzir dihidroquercetina e dihidromiricetina, respectivamente (Figura 2). Apesar das diferentes colorações presentes na natureza, todas as antocianinas são derivadas de três principais antocianidinas: pelargonidina, cianidina e delfinidina com um, dois ou três grupos de hidroxilas ligados ao anel B do dihidrokaempferol devido à atividade das enzimas F3'H e F3'5'H, resultando ramos alternativos da via metabólica e com função crucial na determinação da coloração final de flores e frutos (Figura 2; Holton e Tanaka, 1994; Tanaka et al., 2008; Streisfeld e Rausher, 2009; Tanaka e Sasaki, 2010; Halbwirth, 2010).

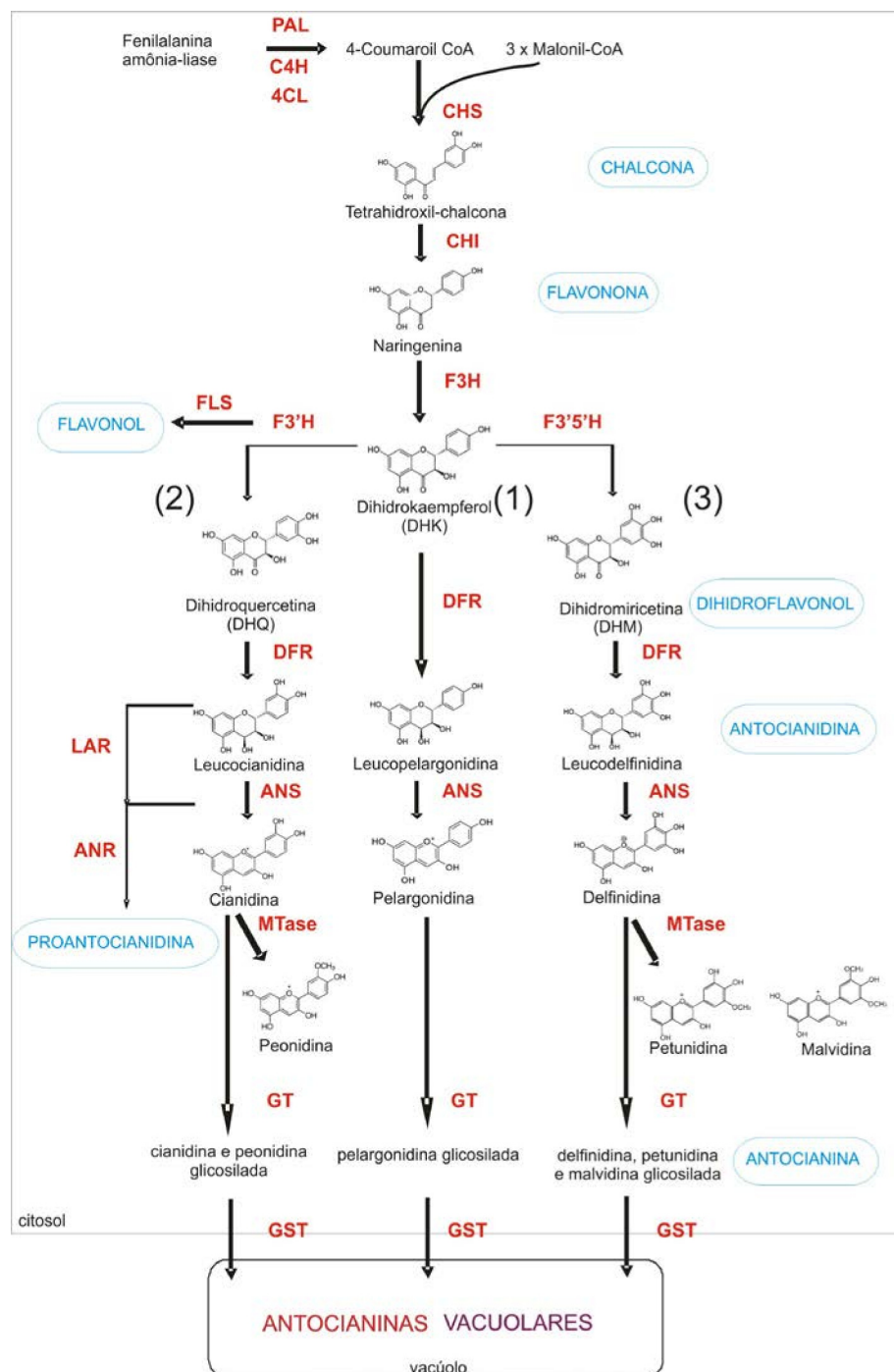


Figura 2. Representação esquemática da via biossintética das antocianinas. As enzimas que catalisam cada etapa da via estão indicadas em vermelho e as classes de alguns compostos fenólicos em azul. PAL: fenilalanina amônia liase; C4H: cinamato 4-hidroxilase; 4CL: 4-coumarato-coenzima A ligase; CHS: chalcona sintase; CHI: chalcona isomerase; F3H: flavanona 3-hidroxilase; FLS: flavonol sintase; F3'H: flavonóide 3'-hidroxilase; F3'5'H: flavonóide 3'5'-hidroxilase; DFR: dihidroflavonol 4-redutase; ANS: antocianidina sintase; LAR: leucoantocianidina redutase; ANR: antocianidina redutase; MTase: metiltransferase; GT: glucosiltransferase; GST: glutathione S-transferase. Os números 1, 2 e 3 representam os três ramos da via de acordo com o número de hidroxilas ligadas ao anel B do dihidrokaempferol resultando na produção das diferentes antocianinas. Adaptação de Grotewold, 2006 e Tanaka et al., 2008.

Dihidroflavonol 4-redutase (DFR) é uma enzima importante para a biossíntese das antocianinas capaz de usar os dihidroflavonóis como substrato para a produção dos precursores das antocianidinas. Em seguida, antocianidina sintase (ANS) converte compostos incolores em três principais antocianidinas coloridas: cianidina, pelargonidina e delphinidina. Dessa forma, pelargonidina reflete a cor laranja-avermelhada, cianidina produz cores do vermelho ao violeta e delphinidina reflete cores entre o roxo e o azul (Rauscher, 2008).

Metiltransferase (MTase) é responsável pela adição de um grupo metil à cianidina, resultando em peonidina. Enquanto, petunidina e malvidina correspondem às 3' O-metil delphinidina e 3'5' O-dimetil delphinidina, respectivamente (Jonsson et al., 1984). Glicosiltransferase (GT) é a enzima responsável pela glicosilação das antocianidinas, conferindo maior estabilidade às moléculas (Grotewold, 2006, Davies, 2009; Chen et al., 2011; Saito et al., 2013). Glutathione S-transferase (GST) juntamente com transportadores específicos na membrana vacuolar são recrutados para o transporte intracelular das antocianinas (Grotewold, 2006; Modolo et al., 2007).

Vale ressaltar que o dihidroflavonol pode ser recrutado como substrato para a produção de outros compostos fenólicos: os flavonóis pela enzima flavonol sintase (FLS) e as proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, pela redução de leucocianidina devido às atividades das enzimas leucoantocianidina redutase (LAR) e antocianidina redutase (ANR) como representado na Figura 2 (Mol et al., 1998; Grotewold, 2006; Gonzalez et al., 2008; Czemplin et al., 2012). Em geral, a biossíntese e o acúmulo dos flavonóis ocorrem em folhas e frutos, enquanto as proantocianidinas são acumuladas principalmente no tegumento das sementes, mas podem ser encontradas em raízes, folhas, caules, pétalas e sépalas provendo defesa contra insetos, herbívoros e patógenos

microbianos (Koes et al., 1994; Lepiniec et al., 2006; Hanhineva et al., 2008; Abeynayake et al., 2012).

1.3. Regulação transcricional da via biossintética das antocianinas

A via biossintética das antocianinas constitui a via metabólica de compostos secundários melhor caracterizada bioquimicamente e geneticamente em muitas espécies que apresentam flores com morfologias, padrões de pigmentação e “sistemas de polinização” diferenciados como petúnia (Quattrocchio et al., 1999; Spelt et al., 2000); *Matthiola incana* (Heller et al., 1985); *Dianthus caryophyllus* (Stich et al., 1992); *Eustoma grandiflorum* (Davies et al., 1993); *Gerbera hybrida* (Hellariutta et al., 1993), *Zea mays* (Grotewold et al., 1994; Hernandez et al., 2004); *Antirrhinum majus* (Schwinn et al., 2006), *Ipomoea* (Morita et al., 2006; Park et al., 2007), *Cyclamen persicum* (Boase et al., 2010), *Dahlia variabilis* (Ohno et al. 2011).

Pelo menos dois grupos de genes são necessários para a biossíntese dos flavonóides: o primeiro grupo corresponde aos genes estruturais que codificam as enzimas para a produção de precursores dos flavonóides, como aquelas envolvidas na biossíntese das antocianinas. O segundo grupo inclui os genes regulatórios que controlam diretamente a expressão espacial e temporal dos genes estruturais através de um complexo ternário formado pelos fatores de transcrição das famílias MYB, bHLH e as proteínas com domínio WD40 (Holton e Cornish, 1995; Mol et al., 1998; Winkel-Shirley, 2001; Koes et al., 2005; Ramsay e Glover, 2005; Grotewold, 2006; Davies, 2009; 2012; Petroni e Tonelli, 2011, Hichri et al. 2011; Yan et al., 2012).

Por esta razão, os genes estruturais e os fatores de transcrição responsáveis pela transcrição tecido-específica das enzimas envolvidas no metabolismo dos flavonóides

foram clonados, sequenciados e caracterizados estruturalmente nas espécies citadas anteriormente e em muitas outras espécies economicamente importantes como uva (*Vitis vinifera*), maçã (*Malus domestica*), pimenta (*Capsicum* spp), batata doce roxa (*Ipomoea batatas*), morango (*Fragaria x ananassa*) e entre outras (Takos et al., 2006; Deluc et al., 2006; 2008; Espley et al., 2007; Ban et al., 2007; Mano et al., 2007; Griesser et al., 2008; Brueggemann et al., 2010; Matus et al., 2010; Czempl et al., 2012; Aza-González et al., 2012).

1.4. Diferentes mecanismos moleculares da via biossintética das antocianinas em monocotiledôneas e dicotiledôneas

A interação dos fatores de transcrição MYB-R2R3 e bHLH e as proteínas com domínio WD40 é essencial para a regulação da biossíntese dos flavonóides em muitas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Koes et al., 2005; Davies, 2009; 2012; Petroni e Tonelli, 2011; Feller et al., 2011; Saito et al., 2013; Smith et al., 2013). Entretanto, este complexo pode determinar diferentemente os padrões temporais e espaciais da expressão dos genes estruturais na via metabólica e assim, resultar mecanismos regulatórios distintos entre as espécies (Figura 3).

Em flores de milho (*Zea mays*), a interação entre *COLORLESS1* (*ZmC1*) ou *PURPLE LEAF1* (*ZmPL1*), os quais codificam proteínas MYB e *RED1* (*ZmR1*) ou *BOOSTER1* (*ZmB1*), pertencentes da família bHLH ativa todos os genes da via biossintética dos flavonóides (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS* e *GT*) como um único conjunto (Cone et al., 1986; Paz-Ares et al., 1987; Ludwig et al., 1989; Ludwig e Wessler, 1990; Goff et al., 1990; Grotewold et al., 1994; 2000; Hernandez et al., 2004).

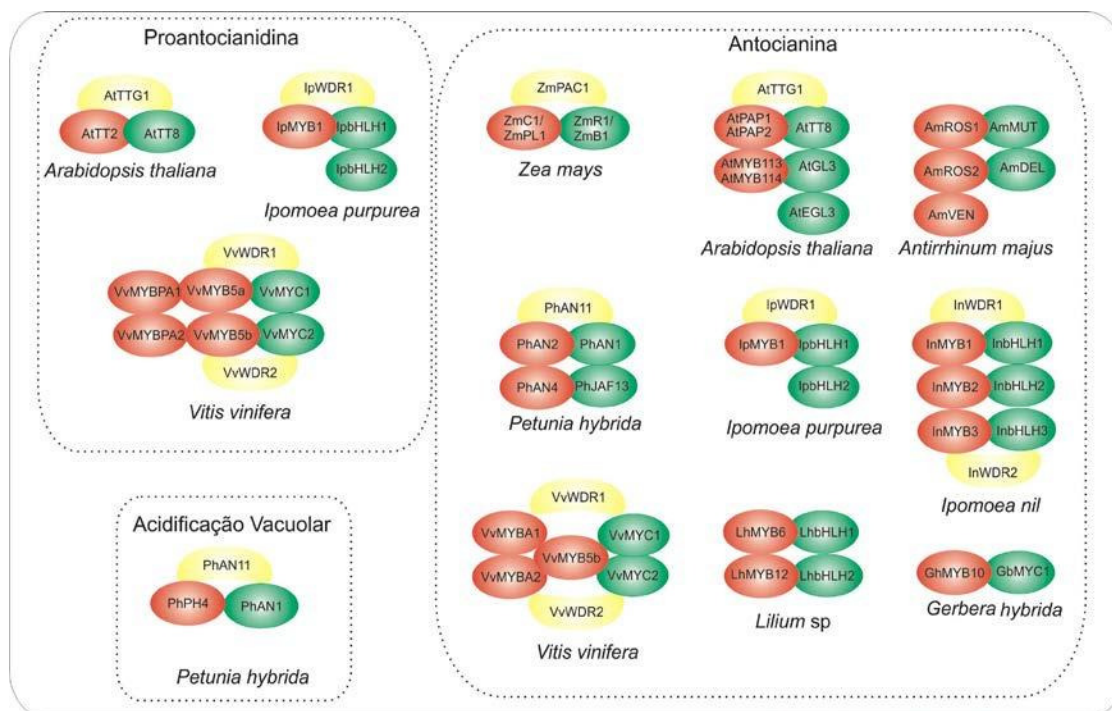


Figure 3. Redes regulatórias formadas pelo complexo ternário MYB-bHLH-WD40 ou simplesmente pelo complexo binário MYB-bHLH envolvidas na biossíntese de proantocianidina / antocianina em diferentes espécies e na acidificação vacuolar em petúnia. Proteínas MYB estão indicadas em vermelho, bHLH em verde e WD40 em amarelo. Adaptado de Feller et al., 2011.

Adicionalmente, PALE ALEURONE COLOR1 (ZmPAC1), uma proteína WD40 participa na ativação da via biossintética da antocianina, responsável pelo acúmulo de pigmentos nas sementes, uma vez que mutantes *pac1* mostraram uma redução na produção de antocianina no pericarpo do grão (Selinger e Chandler, 1999; Carey et al., 2004).

Por outro lado, numerosos estudos indicaram que a via metabólica da antocianina em *Arabidopsis* requer uma combinação diferencial dos genes regulatórios MYB-bHLH-WD40 (Mehrten et al., 2005; Stracke et al., 2007; Gonzalez et al., 2008). A ativação da expressão dos genes estruturais presentes no início da via biossintética dos flavonóides dentre eles *CHS*, *CHI* e *F3H* é realizada por AtMYB11, AtMYB12 e AtMYB111, fatores de transcrição da família R2R3-MYB. Estes genes parecem agir redundantemente e independentemente das proteínas bHLHs, uma vez que o triplo mutante mostrou uma

alteração na biossíntese dos flavonóides no início da via, porém não afetando a produção e o acúmulo de antocianinas (Stracke et al., 2001; 2007; Mehrten et al., 2005).

Três reguladores, TRANSPARENT TESTA2 (AtTT2), uma proteína MYB-R2R3, TRANSPARENT TESTA8 (AtTT8), um fator bHLH e TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (AtTTG1), uma proteína WD40 são especificamente responsáveis para a produção de proantocianidinas em sementes pela ativação da expressão do gene *BANYLUS* que codifica a enzima antocianidina redutase (ANR, Nesi et al., 2000, 2001; Baudry et al., 2004).

Similarmente, AtTTG1 forma um complexo ternário adicional com outras proteínas bHLHs: AtTT8, GLABRA3 (AtGL3) e ENHANCER OF GLABRA3 (AtEGL3) modulando a síntese de antocianinas nas folhas de *Arabidopsis*. Além disso, este complexo participa em processos de diferenciação celular como aqueles envolvidos na formação de pelos radiculares, tricomas e mucilagem do tegumento de sementes (Nesi et al., 2000; 2001; Zhang et al., 2003).

PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1/2 (AtPAP1 e AtPAP2), AtMYB113 e AtMYB114 são fatores de transcrição MYB-R2R3 que agem redundantemente no controle da biossíntese de antocianinas em *Arabidopsis*, regulando a expressão dos genes estruturais envolvidos na fase tardia da via metabólica: *DFR*, *ANS* e *GT* (Stracke et al., 2007, Gonzalez et al., 2008). Estudos com duplo-híbrido revelaram as interações protéicas entre AtPAP1, AtPAP2, AtMYB113 e AtMYB114 com AtTTG1 (WD40), AtTT8, AtGL3 e AtEGL3 (bHLH), confirmando a formação do complexo ternário em *Arabidopsis* (Zhang et al., 2003, Gonzalez et al., 2008).

Uvas vermelhas (*Vitis vinifera*) representam uma fonte de diversos compostos fenólicos responsáveis pela adstringência e coloração dos vinhos. Proantocianidinas são

sintetizadas predominantemente em sementes durante o estágio inicial do desenvolvimento do fruto (Kennedy et al., 2001), enquanto as antocianinas são acumuladas nos frutos em estágio tardio de desenvolvimento, correspondente à fase de amadurecimento (Boss et al., 1996). Muitos estudos relacionados aos mecanismos moleculares confirmaram o controle combinatório da atividade do complexo protéico MYB-bHLH-WD40 na biossíntese e no acúmulo das duas subclasses de flavonóides em uvas (Takos et al., 2006, Deluc et al., 2006, 2008, Matus et al., 2010).

Dois genes MYB-R2R3, *VvMYBA1* e *VvMYBA2* controlam a expressão do gene *GT* que codifica a enzima responsável pela conversão das antocianidinas em antocianinas (Cutanda-Perez et al., 2009). A ausência de antocianinas em cultivares de uvas verdes deve-se à inserção de um retrotransposon na região promotora do gene *VvMYBA1* e duas mutações na região codificadora do gene *VvMYBA2* (Kobayashi et al., 2004, Walker et al., 2007). Os genes *VvMYBPA1* e *VvMYBPA2* (MYB-R2R3) ativam a síntese de proantocianidinas nas sementes por regular diretamente a expressão dos genes que codificam as enzimas antocianidina redutase (ANR) e leucoantocianidina redutase (LAR, Bogs et al., 2007, Terrier et al., 2009).

Adicionalmente, dois fatores de transcrição MYB-R2R3: *VvMYB5a* está especificamente envolvido na produção de proantocianidinas em sementes durante a fase inicial do desenvolvimento do fruto da uva, enquanto *VvMYB5b* promove a síntese e o acúmulo de proantocianidinas e antocianinas no mesocarpo e na casca dos frutos durante todo o desenvolvimento do fruto (Deluc et al., 2006, 2008).

VvMYC1 e *VvMYCA1* (bHLHs) em combinação com duas proteínas WD40, *VvWDR1* e *VvWDR2* completam o complexo protéico ternário para a indução da biossíntese de proantocianidinas e antocianinas nas uvas vermelhas (Matus et al., 2010,

Hichri et al., 2010). Experimentos complementares de duplo-híbrido demonstraram que VvMYC1 é capaz de interagir e formar dímeros com todos os MYB-R2R3: VvMYBA1/2, VvMYBPA1 e VvMYB5a/5b (Hichri et al., 2010).

1.5. Como o complexo MYB-bHLH-WD40 modula a regulação transcricional da via biossintética de antocianinas em flores?

Em plantas ornamentais, a coloração e o padrão de pigmentação das flores representam características de grande interesse agrônomo. Em petúnia, a proteína PhAN11 (WD40) interage com as proteínas PhAN1 (bHLH) e PhAN2 ou PhAN4 (MYB-R2R3) para a ativação da produção de antocianinas nas pétalas e nas anteras, respectivamente (de Vetten et al., 1997; Quattrocchio et al., 1999; Spelt et al., 2000; 2002; Zenoni et al., 2011). PhJAF13, um regulador adicional bHLH, também interage com PhAN2 para a ativação dos genes estruturais da via biossintética da antocianina (Quattrocchio et al., 1999; Spelt et al., 2000).

Adicionalmente, PhAN11 é encontrado em tecidos não-pigmentados, indicando que PhAN1 e PhAN11 são necessários para a acidificação do pH vacuolar nas células epidérmicas das pétalas, interagindo com um terceiro fator de transcrição MYB-R2R3, PhPH4. Análises de mutantes deste complexo MYB-bHLH-WD40 mostraram o pH vacuolar alcalino e consequentemente flores de petúnia mais azuladas foram observadas (Quattrocchio et al., 2006).

A corola de *Antirrhinum majus* exibe um padrão de venação que consiste de listras coloridas, afetando a intensidade da coloração e provendo sinais específicos para os polinizadores (Shang et al., 2011). Este padrão de pigmentação é resultado da interação de três fatores de transcrição MYBs-R2R3: ROSEA1 (AmROS1), ROSEA2 (AmROS2) e

VENOSA (AmVEN) com duas proteínas bHLHs, MUTABILIS (AmMUT) e DELILA (AmDEL, Schwinn et al., 2006; Shang et al., 2011).

ROSEA1 e ROSEA2 juntamente com DELILA regulam o padrão e a intensidade de pigmentação no tubo floral de *Antirrhinum majus*. Por outro lado, VENOSA e MUTABILIS estão associadas ao padrão de venação na corola somente quando ROSEA1 está inativa (Schwinn et al., 2006). A expressão dos genes *F3H*, *FLS*, *F3'H*, *DFR*, *ANS* e *GT* depende altamente da atividade de ROSEA1. Por sua vez, ROSEA2 controla os genes *CHI* e *F3'H* enquanto VENOSA induz a expressão dos genes *CHI*, *F3H*, *FLS*, *F3'H*, *ANS* e *GT*, com exceção do gene *DFR*. Aparentemente, ambos os fatores de transcrição bHLHs, MUTABILIS e DELILA agem redundantemente na ativação da expressão de um subconjunto de genes envolvidos tardiamente na biossíntese das antocianinas como *F3H*, *DFR*, *ANS* e *GT*.

Em flores de *Ipomoea purpurea*, as proteínas IpMYB1, IpbHLH1, IpbHLH2 e IpWDR1 formam o complexo protéico ternário essencial para a biossíntese de antocianina nos órgãos florais, o acúmulo de proantocianidinas nos tegumentos das sementes e a diferenciação de tricomas (Park et al., 2007). Observações do triplo mutante indicaram uma redução parcial da expressão de todos os genes envolvidos na produção de antocianinas, uma perda completa da expressão dos genes da fase tardia responsáveis pela produção de proantocianidinas nas sementes, entretanto sem alterar a transcrição dos genes da fase inicial da via biossintética dos flavonóides. Uma explicação provável é que o fator de transcrição IpMYB1 ativa a expressão de todos os genes estruturais, enquanto IpbHLH2 desempenha um controle parcial na via metabólica dos flavonóides e finalmente, os genes envolvidos na fase tardia são regulados independentemente dos fatores de transcrição MYB e proteínas WD40 (Park et al., 2007).

Em *Ipomoea nil*, três reguladores transcricionais MYBs-R2R3 (InMYB1, InMYB2, InMYB3) em combinação com três proteínas bHLHs (InbHLH1, InbHLH2, InbHLH3) e duas proteínas WD40 (InWDR1 e InWDR2) representam o complexo regulatório para a biossíntese de antocianinas em suas flores (Morita et al., 2006). Diferentemente de todas as eudicots, estudos nas duas espécies de *Ipomoea* indicaram que toda a via biossintética dos flavonóides, em especial a da antocianina é controlada como um único conjunto igualmente observado nas flores de milho (Morita et al., 2006).

As flores de *Lilium* spp. são reconhecidas pela grande variedade de coloração presente em suas tépalas com pontos vermelho escuros na superfície adaxial (Yamagishi et al., 2010; Yamagishi, 2013). As antocianinas são os pigmentos responsáveis por essa variabilidade e a indução da biossíntese é transcricionalmente ativada pela expressão combinada de dois fatores de transcrição MYBs-R2R3, LhMYB6 e LhMYB12, homólogos aos genes *PhAN2* (Yamagishi et al., 2010) e duas proteínas bHLHs, LhbHLH1 e LhbHLH2 homólogos aos genes *JAF13* e *AN1* de petúnia, respectivamente (Nakatsuka et al., 2009).

A produção e o acúmulo de antocianinas nas flores de *Gerbera hybrida* é regulada pela ativação coordenada dos genes estruturais pelos fatores de transcrição GhMYB10 (MYB-R2R3) e GhMYC1 (bHLH) (Elomma et al., 1988, 2003). Dessa forma, a biossíntese de antocianinas nas flores de *Antirrhinum*, lírios e gérberras é modulada por um complexo binário constituído pelos fatores de transcrição MYB-R2R3 e bHLH, aparentemente independente da expressão das proteínas WD40.

1.6. Fatores envolvidos na pigmentação final das flores

A coloração final das pétalas na maioria das flores de angiospermas não é determinada somente pela estrutura química das moléculas de antocianinas acumuladas nas

células epidérmicas, mas também por fatores endógenos e exógenos, destacando-se entre estes a temperatura (Shvarts et al., 1997; Mori et al., 2007), a luz (Mol et al., 1996, Irani e Grotewold, 2003; Meng et al., 2004; Vanderauwera et al., 2005), o pH vacuolar (Yoshida et al., 1995; Quattrocchio et al., 1999; Grotewold, 2006; Yoshida et al., 2009a, 2009b), a presença de íons metais (Mol et al., 1998) e a própria morfologia das células epidérmicas (Weiss, 2000; Whitney e Glover, 2007, Whitney et al., 2011).

De acordo com a literatura, a morfologia celular da epiderme em pétalas pode interferir na percepção da coloração pelos polinizadores. As células cônicas funcionam como lentes e possibilitam um maior ou menor aumento na quantidade de luz absorvida pelos pigmentos florais, resultando na intensidade da cor e do brilho do órgão pigmentado, funcionando como um sinal visual para os animais (Perez-Rodriguez et al., 2005; Baumann et al., 2007; Whitney e Glover, 2007, Whitney et al., 2011).

Em flores de *Antirrhinum majus*, o fator de transcrição MIXTA da família MYB é necessário para a formação de células cônicas na epiderme adaxial das pétalas (Noda et al., 1994). Mutantes *mixta* apresentam uma deficiência na coloração como resultado da diferença de luz refletida pelas células epidérmicas não-cônicas e consequentemente interferindo na percepção dos polinizadores (Noda et al., 1994; Glover e Martin, 1998; Perez-Rodriguez et al., 2005; Brockington et al., 2012). Experimentos adicionais demonstraram que a superfície das células cônicas na epiderme das pétalas de *Antirrhinum* funciona como uma plataforma para os polinizadores, oferecendo maior aderência para exploração das flores e o aumento da eficiência do forrageamento e polinização (Whitney et al., 2009).

1.7. *Passiflora*

Passiflora, o maior gênero da família Passifloraceae, compreende aproximadamente 600 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Ulmer e MacDougal, 2004). As flores de *Passiflora* são exemplos de complexidade e diversidade entre as angiospermas. A característica mais marcante do gênero é a variedade extrema de morfologias, cores e padrões de pigmentação observada principalmente nos filamentos da coroa, atraindo diferentes polinizadores (Ulmer e MacDougal, 2004).

Em *Passiflora*, as abelhas são os principais polinizadores seguidos de beija-flores e morcegos (Janzen, 1968; Sazima e Sazima, 1978, 1987; MacDougal, 1994; Koschnitzke e Sazima, 1997; Varassin et al., 2001; Ulmer e MacDougal, 2004; Fischer e Leal, 2006).

Diante da diversidade floral observada entre as espécies de *Passiflora*, acredita-se que os padrões de pigmentação distintos na coroa representam um modelo excelente para compreender a relação planta-polinizador e fornecer informações relevantes sobre a diversificação do gênero ao longo da evolução. Uma vez que, diversos estudos focaram na evolução da coloração floral associada ao espectro de cores percebido pelos polinizadores, proporcionando informações úteis sobre as trajetórias evolutivas de algumas famílias de angiospermas (Pérez et al., 2006; Thomson e Wilson, 2008; Streisfeld e Rausher, 2009; Toleno et al., 2010).

Em geral, as transições evolutivas de flores ancestrais azul-arroxeadas para flores derivadas vermelhas estão associadas com as transições da polinização realizada por abelhas para beija-flores e intimamente correlacionadas com as moléculas de antocianinas produzidas (Rausher, 2008). Desta forma há uma correlação direta entre a pigmentação das

flores, a interação com o agente polinizador e o sucesso reprodutivo das espécies (Hoballah et al., 2007; Sobel e Streisfeld, 2013; Smith et al., 2013).

Na literatura há poucos estudos sobre a identificação das antocianinas em *Passiflora* (Halim e Collins, 1970; Billot, 1974, Kidoy et al., 1997; Barp et al., 2006). Glicosídeos de cianidina e diglicosídeos de malvidina, petunidina e delphinidina foram identificados em flores de *P. quadrangularis* com o uso da cromatografia de papel e gasosa (Halim e Collins, 1970). Posteriormente, glicosídeos de malvidina, petunidina e delphinidina foram também encontrados nas flores desta espécie usando somente cromatografia de papel (Billot, 1974).

Kidoy e colaboradores (1997) analisaram os frutos de *P. edulis* e *P. suberosa* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), identificando oito antocianinas em *P. suberosa* e três em *P. edulis*, onde cianidina-3-O-glicosídeo representou a antocianina majoritária em ambas as espécies. E apenas a antocianidina pelargonidina foi detectada em folhas arroxeadas de *P. suberosa* com o uso da cromatografia de papel (Barp et al., 2006).

Para uma compreensão inicial da interação entre cor e superfície, uma análise morfológica adicional das células epidérmicas da corona de *P. edulis*, *P. suberosa* e *P. coccinea* pode corroborar com informações advindas da morfologia cônica das pétalas de *Antirrhinum majus* em relação ao acúmulo de antocianinas e a atração de polinizadores (Noda et al., 1994; Whitney e Glover, 2007).

Além disso, informações moleculares sobre o controle transcricional responsável pela biossíntese de antocianinas e os mecanismos envolvidos na formação da variedade de padrões de pigmentação floral em *Passiflora* são inexistentes na literatura científica.

Assim, este trabalho caracteriza o perfil de pigmentação dos filamentos da corona de *P. edulis* Deg., *P. alata* Curtis, *P. coccinea* Aubl., *P. incarnata* L., *P. suberosa* L. e do

híbrido interespecífico artificial *P. 'Lady Margaret'*. Buscou-se ainda a observação da morfologia epidérmica dos filamentos da coroa de três espécies: *P. edulis*, *P. suberosa* e *P. coccinea* que pode fornecer informações relacionadas ao aumento da intensidade da coloração e percepção pelos polinizadores. E finalmente, a identificação e a caracterização de genes estruturais e regulatórios potencialmente envolvidos na via metabólica das antocianinas em *P. edulis* e em *P. suberosa*.

Deste modo, espera-se que os resultados obtidos deste estudo possam contribuir para uma melhor compreensão, do ponto de vista molecular dos mecanismos evolutivos responsáveis pela diversidade de pigmentação geradora de novas interações entre as espécies de *Passiflora* e seus polinizadores.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar a pigmentação dos filamentos da coroa em espécies de *Passiflora*, priorizando os aspectos bioquímicos, morfológicos e moleculares. Com esse intuito, objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Isolar e identificar as antocianinas dos filamentos da coroa com diferentes padrões de pigmentação em flores de *P. edulis* Deg., *P. alata* Curtis, *P. coccinea* Aubl., *P. incarnata* L. (subgênero *Passiflora*), *P. suberosa* L. (subgênero *Decaloba*) e do híbrido interespecífico artificial *P. 'Lady Margaret'* T. Skimina (*P. incarnata* x *P. coccinea*) utilizando métodos cromatográficos e espectrométricos.

2. Caracterizar morfológicamente a epiderme dos filamentos da coroa de *P. edulis*, *P. suberosa* e *P. coccinea*.

3. Identificar e caracterizar os genes estruturais e regulatórios envolvidos potencialmente na biossíntese de antocianina nos filamentos da coroa nas espécies *P. edulis* Deg. e *P. suberosa* L. mediante a análise de “*Data Mining*” do banco de dados do Projeto PASSIOMA.

4. Analisar a expressão temporal e espacial de homólogos dos genes *DIHIDROFAVONOL 4-REDUTASE*, *GLICOSILTRANSFERASE*, *MYB* e *WD40* com o emprego de RT-PCR e hibridização *in situ* durante o desenvolvimento floral de *P. edulis* e *P. suberosa*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo foi proveniente de plantas cultivadas na casa de vegetação e nos campos experimentais do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp (Campinas, SP).

Para a determinação do perfil de pigmentação, filamentos da coroa de flores em antese de *P. edulis*, *P. alata*, *P. coccinea* e *P. incarnata* (subgênero *Passiflora*), *P. suberosa* (subgênero *Decaloba*) e do híbrido interespecífico artificial *P. 'Lady Margaret'* (*P. incarnata* x *P. coccinea*) foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenados a -80°C até o momento da utilização.

Devido ao número elevado de moléculas de antocianinas associado à dificuldade de obter todos os padrões autênticos destes pigmentos, a identificação inicial das antocianinas em *Passiflora* foi baseada por comparação do tempo de retenção, da razão massa/carga (*m/z*) e do padrão de fragmentação MS/MS das antocianinas isoladas e identificadas nos extratos de frutos de morango (*Fragaria* x *ananassa*), amora (*Morus nigra*), jussara (*Euterpe edulis*), ameixa (*Prunus domestica*), mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) e jambolão (*Syzygium cumini*) descritas anteriormente na literatura (Lopes da Silva et al., 2002; 2007; Wu e Prior, 2005; de Brito et al., 2007, Hassimotto et al., 2007; Faria et al., 2011).

Para a observação da morfologia celular epidérmica por microscopia eletrônica de varredura, os filamentos da coroa de flores em antese de *P. edulis*, *P. suberosa* e *P. coccinea* foram coletados e preparados de acordo com o item 3.2.5.

Análises de expressão dos homólogos dos genes *DIHIDROFAVONOL 4-REDUTASE*, *GLICOSILTRANSFERASE*, *MYB* e *WD40* foram realizadas somente nas espécies *P. edulis* e *P. suberosa*, uma vez que são as espécies-modelo que tiveram um

número grande de genes expressos durante o desenvolvimento floral clonado e sequenciado no âmbito do Projeto PASSIOMA (Dornelas et al., 2006; Cutri e Dornelas, 2012).

No caso de RT-PCR, diferentes órgãos vegetativos e florais de *P. edulis* e *P. suberosa* foram coletados em N₂ líquido e devidamente armazenados a -80°C até o momento da extração de RNA e síntese de cDNA segundo descrito no item 3.2.7. Enquanto, botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento de *P. edulis* e *P. suberosa* destinados à hibridização *in situ* foram fixados e preparados conforme descrito no item 3.2.8.

3.1.1. Solventes e padrões

Todos os solventes empregados foram de grau analítico. Metanol, acetato de etila e ácido fórmico foram obtidos da Synth (P.A., São Paulo, Brazil). A água foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, USA). Padrões de cianidina 3-O-glicosídeo, cianidina 3,5-O-diglicosídeo, malvidina 3-O-glicosídeo e malvidina 3,5-O-diglicosídeo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (P.A., São Paulo, Brasil). A pureza dos padrões foi 90% e todos foram dissolvidos em metanol para obter a concentração inicial de 1 mg/mL. Em seguida, foram diluídos em água Milli-Q até atingir concentrações entre 0,1 e 100 µg/mL para a construção das curvas de calibração.

3.2. Metodologia

3.2.1. Obtenção e purificação dos extratos

Todas as amostras dos extratos de frutos e dos filamentos da corona de *Passiflora* foram liofilizadas e maceradas. Para a extração dos pigmentos utilizou-se 10 mg dos frutos e dos filamentos da corona liofilizados em 1 mL de solução extratora aquosa acidificada

com ácido fórmico (1%) por 30 minutos no banho ultrassônico. Em seguida, centrifugou-se e ao sobrenadante foi adicionado 1 mL da solução aquosa acidificada, retornando ao banho ultrassônico. Repetiu-se duas vezes este procedimento para garantir a extração total dos pigmentos.

Baseado em Giusti et al. (1999), o extrato obtido passou por um processo de purificação para obtenção de antocianinas totais, usando cartucho C18 (Merck, Li Chrolut RP-18) previamente ativado com 1 mL de metanol e lavado com água. Uma lavagem inicial com 3 mL de água Milli-Q permitiu que as antocianinas e outros compostos fenólicos fossem adsorvidos à mini-coluna, enquanto açúcares, ácidos e outros compostos foram removidos.

Posteriormente, os fenólicos não-antocianinas, isto é, os demais flavonóides foram lavados da coluna com 3 mL de acetato de etila e subsequentemente, as antocianinas foram eluídas com metanol contendo 0,1% de ácido fórmico. O extrato foi concentrado até eliminação do metanol sob atmosfera de nitrogênio (por se tratar de pequena quantidade de extrato) e os pigmentos foram dissolvidos em 1 mL de água Milli-Q.

3.2.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência

A cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês UPLC – *ultra performance liquid chromatography*) foi usada para analisar os pigmentos extraídos. A cromatografia foi realizada em um sistema ACQUITY UPLC® (Waters®) acoplado à espectrometria de massas (UPLC-MS).

As condições da corrida cromatográfica foram idênticas para os padrões autênticos, os extratos dos frutos e os filamentos da coroa de *Passiflora*. As separações ocorreram em colunas próprias para UPLC: BEH C18 (2,1mm x 50 mm, 1.7 µL de tamanho da partícula).

A fase móvel consistiu de dois solventes: (A) água MILLI-Q com 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila. O gradiente de solvente foi 95% de A e 5% de B no início, 50% de A e 50% de B em 5 min, 5% de A e 95% de B em 9 min, mantendo este gradiente até 10 min e retornando às condições iniciais até 12 min. O fluxo foi 0,250 mL/min, a temperatura de 30°C e o volume de injeção foi 5µL para todos os extratos de *Passiflora*, dos frutos e dos padrões autênticos.

3.2.3. ESI-MS (Espectrometria de Massas com Ionização por “*Eletrospray*”)

Os extratos dos frutos e dos filamentos da coroa obtidos como descrito no item 3.2.1 foram submetidos à ionização positiva e negativa realizando uma varredura de razão massa/carga entre 190 e 1000 no espectrômetro de massas triplo quadrupolo com ionização por “*eletrospray*” (Waters).

As voltagens do capilar e do cone foram de 3KV e 30V respectivamente, utilizando nitrogênio como gás de dessolvatação. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram 150°C e 300°C, respectivamente. Os picos de razão massa/carga (m/z) de interesse foram fragmentados a uma energia de colisão de 30V, utilizando argônio como gás de colisão. Os melhores resultados com informação estrutural das moléculas foram obtidos em modo positivo e serão descritos nesta tese.

3.2.4. Observação do acúmulo de antocianinas

Para a observação do acúmulo de antocianinas nas células epidérmicas, cortes transversais frescos do filamento da coroa de *P. edulis* foram imersos em polietileno-glicol (PEG 8.000) de acordo com Mudalige et al. (2003) e observados em microscópio ZEISS modelo AxioCam HRc.

3.2.5. Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização morfológica da epiderme, os filamentos da coroa de flores em antese de *P. edulis*, *P. suberosa* e *P. coccinea* foram coletados e fixados em 4% paraformaldeído (p/v) em tampão fosfato sob vácuo (aproximadamente 600 mmHg) por 20 minutos e mantidos a 4°C por pelo menos 16h.

Em seguida, os filamentos da coroa foram desidratados em série etílica, secos ao ponto crítico, montados em suporte metálico com fita dupla-face e metalizados com ouro coloidal (Blazers Sputter: camada de 30nm). A observação foi feita em microscópio de varredura LEO 435 VP no laboratório de microscopia eletrônica do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA-ESALQ/USP, Piracicaba, SP). As imagens digitalizadas das observações foram obtidas utilizando-se o programa LEOUIF.

3.2.6. Análise “Data Mining” do PASSIOMA e comparações das sequências

O banco de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) de *Passiflora edulis* e *Passiflora suberosa* gerado pelo projeto PASSIOMA foi utilizado como fonte primária na busca de genes potencialmente envolvidos na biossíntese de antocianinas em *Passiflora* (Dornelas et al., 2006; Cutri e Dornelas, 2012).

Para isso, as sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas principais envolvidas nas diferentes etapas enzimáticas da biossíntese de antocianinas em *Arabidopsis thaliana* e *Petunia hybrida* obtidas do National Center for Biotechnology Information presentes nos Anexos XIII-XVIII foram usadas como sequências de referência (*query*) em busca no banco de dados do PASSIOMA.

Após a seleção das sequências de ESTs (*reads*) relevantes encontradas no PASSIOMA, estas foram clusterizadas com o algoritmo CAP3 (Huang e Madan, 1999) do software BioEdit (Hall, 1999). As sequências significativas com *e*-value menores que 10^{-5} foram consideradas e novamente comparadas com o banco de dados NCBI com o uso do algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990).

Para as análises filogenéticas, as sequências das proteínas de *Passiflora* foram alinhadas com as proteínas homólogas descritas para outras espécies de plantas, utilizando apenas as regiões com domínios protéicos conservados por meio do programa Clustal X (Thompson et al., 1997). Eventualmente, os alinhamentos foram corrigidos manualmente e utilizados para obtenção de uma matriz de parcimônia pelo método de Neighbor Joining com o uso do software *The Molecular Genetics Analysis* (MEGA) versão 4.0 (Tamura et al., 2007). A robustez das árvores obtidas foi testada com cálculos de Bootstrap em 1000 repetições.

3.2.7. Análise de expressão gênica via RT-PCR

Para a realização da RT-PCR, RNAs totais de diferentes órgãos vegetativos e florais de *P. edulis* e *P. suberosa* listados na Tabela 1 foram isolados pelo reagente Trizol® (Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante), com posterior tratamento com DNase® (AMBION) e a síntese do cDNA a partir de RNA total de cada amostra utilizando-se o kit “Super Script First Strand Synthase” (Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante).

Tabela 1. Órgãos vegetativos e florais de *Passiflora edulis* e *Passiflora suberosa* utilizados na análise de RT-PCR.

<i>P. edulis</i>	<i>P. suberosa</i>
raiz hidropônica	raiz hidropônica
caule	caule
folha juvenil	folha juvenil
ápice caulinar juvenil	folha adulta
ápice caulinar adulto vegetativo	ápice caulinar reprodutivo
ápice caulinar reprodutivo	botão floral I (0,3 cm de comprimento)
botão floral I (1 cm de comprimento)	botão floral II (0,8 cm de comprimento)
botão floral II (2,5 cm de comprimento)	tépala
sépala	corona
pétala	androgínóforo
corona	estame
androgínóforo	pistilo
estame	
pistilo	

Em relação aos materiais vegetais utilizados na análise de RT-PCR, é preciso esclarecer que em ambas as espécies analisadas, botão floral I correspondeu ao último estágio de desenvolvimento não-pigmentado, enquanto o botão floral II indicou um estágio intermediário referente à pigmentação na corona. Além disso, todos os órgãos florais foram separados da flor em antese.

As fitas de cDNA foram utilizadas como molde nas reações de PCR e a qualidade dos cDNAs sintetizados foi analisada com os primers de *PeACTINA1* (*PeACT1*) ou *PsACTINA1* (*PsACT1*, Tabela 2). Os ciclos das reações de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30s, temperatura de anelamento correspondente ao primer (°C, ver Tabela 2 por 30s), 72°C por 30s e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Tabela 2. Primers utilizados na análise de RT-PCR em *Passiflora edulis* e em *Passiflora suberosa*.

Genes	"Primer foward"	"Primer reverse"	Temperatura de anelamento
<i>PeACT1</i>	AGAGCATCCAGTCCTCCTCA	TATGGGAACTGTGTGGCTCA	60°C
<i>PsACT1</i>	GGTTAAGGCTGGTTTGCTG	CATCTCCAGAGTCGAGCACA	60°C
<i>PeDFR</i>	AGGACCCCGAGAATGAAGTG	CCAAATCACACCAGCAGCTT	61°C
<i>PeGT</i>	CATGTAATGGCGTTCCCTG	TTCTCACAGCTTCCACCAGT	61°C
<i>PeWD40</i>	CAGCAGAAACGATCGGAGAT	CGTTCCAGTCGAAGGAGTA	61°C
<i>PsMYB</i>	GGCTCCGTTTCTACATCAA	CTGGTAATCTCCCGCAATA	60°C

Os pares de primers específicos aos genes que codificam algumas das enzimas e fatores de transcrição da via biossintética da antocianina em *Passiflora* foram desenhados utilizando-se o software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>; Rozen e Skaletsky, 1998) a partir das sequências identificadas no item 3.2.6. (Tabela 2).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) corado com brometo de etídeo (1 µg/50mL). O comprimento dos produtos de PCR foi determinado pela comparação com o marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Para a visualização e fotodocumentação dos produtos de PCR foi utilizado o Gel Doc XR⁺ BioRad® com o software Image Lab.

3.2.8. Hibridização *in situ*

As hibridizações *in situ* foram realizadas utilizando-se sondas não-radioativas, segundo a técnica descrita na literatura (Dornelas et al., 1999; 2000). Sondas sense e antisense foram sintetizadas por transcrição *in vitro* de plasmídeos linearizados com os cDNAs de interesse encontrados no banco do Projeto PASSIOMA (Dornelas et al., 2006; Cutri e Dornelas, 2012), utilizando as enzimas T7 e SP6, respectivamente em reação

contendo uracilas marcadas com digoxigenina (DIG-UTP), segundo as instruções do fabricante do kit *DIG RNA Labeling* (Roche).

Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento de *P. edulis* e *P. suberosa* foram fixados a vácuo em paraformaldeído a 4% (p/v) por 16h a 4°C. A seguir as amostras foram desidratadas em série etílica, embebidas em série crescente de álcool: xilol (3:1, 1:1, 1:3 e xilol puro), substituído por parafina derretida e posteriormente emblocadas em parafina, seccionadas em série (8 µm) e montadas em lâminas de vidro pré-tratadas com solução 2% de 3-Aminopropiltrietoxisilana (Pierce) em acetona.

Os cortes do material emblocado foram desparafinizados com dois banhos de xilol puro por 15 minutos cada, seguidos por banhos com séries de xilol: etanol nas proporções 3:1; 1:1 e 1:3, também por 15 minutos cada banho, finalizando com duas imersões em etanol absoluto de 15 e 5 minutos e finalmente, as lâminas foram secas ao ar. As amostras foram submetidas ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (1 µg/mL em Tris-HCl 0,05M pH7,5) por 5 minutos a 37°C e lavadas a seguir com água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). Foram adicionados 300 µL de solução de hibridização em cada lâmina (10mM Tris-HCl pH7,5; 300mM NaCl; 50% formamida deionizada; 1mM EDTA; 1 x Denharts; 10% Dextran Sulfato 50% e 600 ng de sonda marcada), cobertos com filme plástico e incubados em câmara úmida a 42°C por 16 horas. O tratamento de pós-hibridização foi conduzido sob condições de estringência apropriadas, onde o excesso de sonda não-hibridizada foi retirado com duas lavagens em solução salina SSC (0,15M NaCl e 0,015 citrato de sódio) quatro vezes concentrada por trinta minutos cada e duas lavagens em solução salina SSC duas vezes concentrada, também por trinta minutos cada. Todas as lavagens foram realizadas à temperatura de 42°C. Para o processo de imuno-deteção, as lâminas foram inicialmente mantidas em cubetas com tampão de deteção 1 (DB1: 1M

Tris-HCl e 5M NaCl pH7,5) por 5 minutos. Em seguida, o material foi submetido por 30 minutos ao tratamento em tampão de bloqueio DB2 (1% Blocking reagent (Roche) dissolvido em DB1). Após essa etapa, as lâminas foram enxaguadas em DB1 e, posteriormente submetidas ao tratamento com solução DB2 contendo anticorpo (anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina, diluição 1:1000), incubando-as por 60 min em câmara úmida.

Após esse período, duas lavagens seguidas em DB1 de 15 minutos cada e uma lavagem em tampão de detecção 3 (DB3: 0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,05m MgCl₂. 6H₂O; pH9,5) por 5 minutos foram realizadas. Para finalizar, aplicou-se 300 µL da solução comercial de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) / BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphatase p-Toluidine) contendo o supressor (Levamisole 1mM) como substrato (AMRESCO). A reação de detecção ocorreu em câmara úmida e no escuro "overnight". O sinal de hibridização e o controle negativo foram observados e fotodocumentados em microscópio ZEISS modelo AXIOSKOPE acoplado a uma câmera digital Zeiss AxioCam HRc.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação das antocianinas nos filamentos da corona em *Passiflora* spp.

A Figura 4 ilustra as espécies selecionadas para este estudo com destaque para a variabilidade de padrões de pigmentação observada principalmente nos filamentos da corona. *P. edulis* apresenta uma corona multisseriada com longos filamentos filiformes de coloração púrpura escura na base (Figura 4A). As flores de *P. alata* exibem uma corona de filamentos carnosos com bandeamento de coloração vermelho-púrpura (porção basal) e azul arroxeada (porção superior, Figura 4B). *P. suberosa* apresenta duas séries de corona morfologicamente distintas: a série externa de filamentos filiformes sem pigmentação e a série interna com os filamentos menores de ápice capitado com pigmentação púrpura presente somente na base e o opérculo plicado com extremidades fimbriadas também de coloração púrpura (Figura 4C).

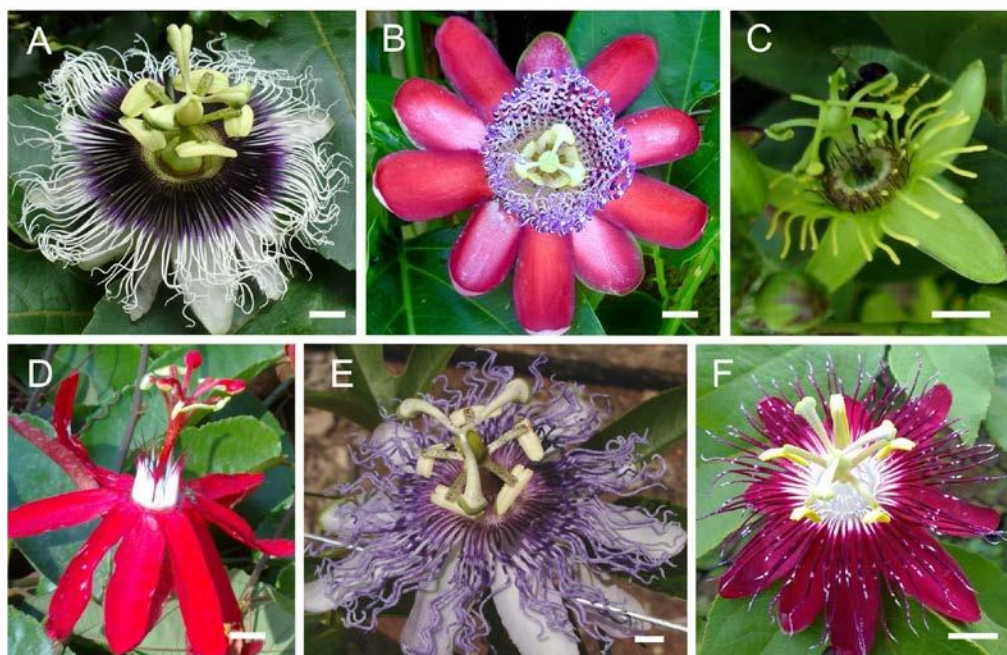


Figura 4. Espécies selecionadas para análise das antocianinas presentes nos filamentos da corona: (A) *P. edulis*, (B) *P. alata*, (C) *P. suberosa*, (D) *P. coccinea*, (E) *P. incarnata* e (F) híbrido interespecífico artificial *P. 'Lady Margaret'*. Barras= 1cm.

Adicionalmente, os filamentos da coroa de duas espécies parentais e de seu híbrido artificial foram analisados para avaliar a herança da pigmentação da coroa relacionada à identificação das antocianinas. *P. coccinea* apresenta uma coroa reduzida com duas séries de filamentos brancos e curtos, onde apenas a série externa tem as extremidades dos filamentos pigmentados em vermelho vívido (Figura 4D). As flores de *P. incarnata* exibem uma coroa multisseriada na coloração lavanda-púrpura (Figura 4E). O híbrido artificial *P. ‘Lady Margaret’* entre *P. incarnata* e *P. coccinea* mostra um fenótipo intermediário em relação às características parentais, apresentando uma coroa com seis séries de filamentos, onde as duas externas mostram longos filamentos na coloração vermelho-púrpura com regiões não-pigmentadas (Figura 4F).

O tempo de retenção, a razão m/z dos íons e o espectro de fragmentação MS/MS das antocianinas isoladas e identificadas nos filamentos da coroa de *Passiflora* foram consistentes com as antocianinas obtidas das amostras dos frutos de jambolão, mirtilo, ameixa, jussara, morango e amora (Anexos I, II, III e IV, respectivamente). Em seguida, as antocianinas foram confirmadas com os padrões autênticos (Anexo V).

A Tabela 3 resume as antocianinas identificadas e os dados obtidos do tempo de retenção, da concentração, da razão massa/carga (m/z) do íon principal e dos íons produtos de fragmentação MS/MS em *Passiflora*.

Tabela 3. Tempo de retenção, concentração, íon principal e fragmentação das antocianinas identificadas na coroa de *Passiflora*.

	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/mL)	Massa molecular	MS/MS (m/z)	Antocianina
<i>P. edulis</i>	1.60	traços	611	449, 287	cianidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.90	traços	625	463, 301	peonidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.95	traços	655	493, 331	malvidina 3,5-O-diglicosídeo
	2.17	1,5	449	287	cianidina 3-O-glicosídeo
	2.51	0,6	463	301	peonidina 3-O-glicosídeo
	2.52	1	493	331	malvidina 3-O-glicosídeo
<i>P. alata</i> (superior)	1.60	traços	611	449, 287	cianidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.94	traços	625	463, 301	peonidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.98	0,4	655	493, 331	malvidina 3,5-O-diglicosídeo
<i>P. alata</i> (inferior)	1.56	1,4	611	449, 287	cianidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.58	1,4	641	479, 317	petunidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.91	1,3	625	463, 301	peonidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.99	0,5	655	493, 331	malvidina 3,5-O-diglicosídeo
	2.18	0,2	449	287	cianidina 3-O-glicosídeo
	2.55	0,1	463	301	peonidina 3-O-glicosídeo
<i>P. suberosa</i>	2.22	traços	449	287	cianidina 3-O-glicosídeo
	2.50	traços	433	271	pelargonidina 3-O-glicosídeo
<i>P. coccinea</i>	2.23	1,6	449	287	cianidina 3-O-glicosídeo
	2.48	4,1	433	271	pelargonidina 3-O-glicosídeo
<i>P. incarnata</i>	1.57	1,1	611	449, 287	cianidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.65	2,1	641	479, 317	petunidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.94	1,8	625	463, 301	peonidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.97	8,1	655	493, 331	malvidina 3,5-O-diglicosídeo
<i>P. 'Lady Margaret'</i>	1.60	2,9	611	449, 287	cianidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.62	0,2	641	479, 317	petunidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.89	0,7	595	433, 271	pelargonidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.94	1,4	625	463, 301	peonidina 3,5-O-diglicosídeo
	1.97	4,5	655	493, 331	malvidina 3,5-O-diglicosídeo
	2.20	0,8	449	287	cianidina 3-O-glicosídeo
	2.30	traços	595	287	cianidina 3-O-rutinosídeo
	2.50	traços	463	301	peonidina 3-O-glicosídeo
	2.57	traços	493	331	malvidina 3-O-glicosídeo

Em geral, os tempos de retenção relativamente curtos das antocianinas de todos os extratos de corona analisados indicaram a presença de antocianinas sem derivados acilados em suas moléculas (Tabela 3). Da mesma forma, as antocianinas diglicosiladas apresentaram os menores tempos de retenção devido ao maior número de grupos de hidroxila que permitem maior polaridade e consequentemente, maior afinidade com a fase móvel. Diferentemente, malvidina foi a última antocianidina a eluir da coluna de fase reversa, uma vez que é considerada uma molécula menos polar devido à presença de dois grupos metil no anel B.

As análises cromatográficas e espectrométricas realizadas com amostras da corona de *P. edulis* indicaram a presença de três antocianinas diglicosiladas e três antocianinas monoglicosiladas (Tabela 3 e Anexo VI).

O primeiro pico apresentou um íon de m/z 611 e dois fragmentos de m/z 449 e 287 devido às duas perdas sequenciais de moléculas de hexoses ([M-162-162]) correspondendo à cianidina 3,5-O-diglicosídeo. A segunda antocianina diglicosilada apresentou um íon de m/z 625 com dois fragmentos de m/z 463 e m/z 301, condizentes com peonidina 3,5-O-diglicosídeo. Enquanto, a terceira antocianina diglicosilada foi comprovada através dos espectros de massa do íon de m/z 655 e de dois fragmentos de m/z 493 e m/z 331, os quais corresponderam à massa molecular da malvidina 3,5-O-diglucosídeo.

Em relação às antocianinas monoglicosiladas, o quarto pico mostrou um tempo de retenção 2.17 minutos com o íon de m/z 449 e um fragmento de m/z 287 que correspondeu à cianidina 3-O-glucosídeo. O quinto pico com um íon de m/z 463 e um único fragmento de m/z 301 sugere ser a aglicona peonidina com a perda de uma molécula de hexose [M-162], correspondendo à peonidina 3-O-glicosídeo. Peonidina representa a forma metilada de cianidina, onde o íon de m/z 301 é resultado de um grupo metoxil adicional na posição 3 do

anel B ($287 + 14 = 301$). Finalmente, o último pico com o tempo de retenção de 2.52 e o íon de m/z 493 com um único fragmento de m/z 331 foi confirmado como malvidina 3-O-glucosídeo.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que as antocianinas diglicosiladas apareceram em menores quantidades (traços) nas amostras analisadas. Desta forma, as antocianinas cianidina 3-O-glicosídeo (1,5 $\mu\text{g/mL}$), malvidina 3-O-glicosídeo (1 $\mu\text{g/mL}$) e peonidina 3-O-glicosídeo (0,6 $\mu\text{g/mL}$) podem ser responsáveis pela pigmentação púrpura escura da coroa de *P. edulis*.

Para a análise cromatográfica, as bandas coloridas dos filamentos da coroa de *P. alata* foram analisadas separadamente em região superior (coloração azulada) e em região inferior (coloração vermelho-púrpura), excluindo as regiões não-pigmentadas. 3,5-O-diglicosídeos de cianidina, peonidina e malvidina foram identificados na região superior, onde malvidina 3,5-O-diglicosídeo foi majoritária (0,4 $\mu\text{g/mL}$), enquanto as duas restantes foram caracterizadas em quantidades menores (Tabela 3 e Anexo VII).

Quatro antocianinas diglicosiladas e duas antocianinas monoglicosiladas foram isoladas e caracterizadas na região inferior dos filamentos da coroa de *P. alata* (Tabela 3 e Anexo VIII). O primeiro pico com o tempo de retenção 1.56 min mostrou um íon de m/z 611 com dois fragmentos de m/z 449 e m/z 287 correspondente à massa molecular da cianidina 3,5-O-glicosídeo. O segundo pico com um íon de m/z 641 apresentou uma fragmentação em dois íons de m/z 479 e m/z 317, sugerindo ser petunidina 3,5-O-glicosídeo. A terceira antocianina apresentou um tempo de retenção de 1.91 min com o íon de m/z 625 e dois fragmentos de m/z 463 e m/z 301 indicando ser peonidina 3,5-O-glicosídeo. A última antocianina diglicosilada foi identificada como malvidina 3,5-O-glicosídeo devido ao seu principal íon de m/z 655 e os dois fragmentos de m/z 493 e m/z

331. Finalmente, as duas antocianinas monoglicosiladas foram identificadas como cianidina 3-O-glicosídeo por apresentar um íon de m/z 449 e um fragmento de m/z 287. A sugestão de peonidina 3-O-glicosídeo foi baseada no único fragmento de m/z 301 a partir do principal íon de m/z 463.

Diante desses resultados, as principais antocianinas isoladas e identificadas na região inferior da corona de *P. alata* foram 3,5-O-diglicosídeos de cianidina (1,4 µg/mL), petunidina (1,4 µg/mL) e peonidina (1,3 µg/mL). As antocianinas em menores quantidades corresponderam à malvidina 3,5-O-diglicosídeo (0,5 µg/mL), cianidina 3-O-glicosídeo (0,2 µg/mL) e peonidina 3-O-glicosídeo (0,1 µg/mL, Tabela 3 e Anexo VIII).

Assim, sugere-se que a coloração azulada na região superior é devido ao acúmulo maior de malvidina, responsável pela coloração roxo-azulada em muitas flores. Por outro lado, a coloração avermelhada exibida na base dos filamentos da corona em *P. alata* pode ser atribuída pela combinação das diferentes antocianinas identificadas.

As análises cromatográficas realizadas na corona de *P. suberosa* indicaram a presença de duas antocianinas monoglicosiladas, como resultado da perda de uma única molécula de hexose ([M-162], Tabela 3 e Anexo IX). O primeiro pico apresentou um íon de m/z 449 e seu principal fragmento de m/z 287, correspondendo à cianidina 3-O-glicosídeo. Enquanto o segundo pico com o íon de m/z 433 e um fragmento de m/z 271 indicou ser pelargonidina 3-O-glicosídeo. Entretanto, ambas as antocianinas em *P. suberosa* foram encontradas apenas como traços, o que seria justificado pela área pequena pigmentada na base dos filamentos menores.

Nos filamentos da corona de *P. coccinea* foram identificadas as duas antocianinas monoglicosiladas encontradas em *P. suberosa* (Tabela 3 e Anexo X). O íon de m/z 449 e seu principal fragmento de m/z 287 são dados espectrais consistentes com cianidina 3-O-

glicosídeo que apresentou uma concentração de 1,6 µg/mL. Enquanto, o íon de m/z 433 e um fragmento de m/z 271 indicaram ser pelargonidina 3-O-glicosídeo. Desta forma, as extremidades avermelhadas dos filamentos da corona podem ser resultado do acúmulo majoritário de pelargonidina 3-O-glicosídeo (4,1 µg/mL).

A composição das antocianinas dos filamentos da corona de *P. incarnata* foi caracterizada pela presença de 3,5-O-diglicosídeos de cianidina, petunidina, peonidina e malvidina (Tabela 3 e Anexo XI). O primeiro pico mostrou o íon de m/z 611 e resultou na fragmentação em dois íons de m/z 449 e m/z 287, devido às duas perdas sequenciais de moléculas de hexoses ([M-162-162]), condizentes com a massa molecular da cianidina 3,5-O-diglicosídeo.

O segundo pico com um íon de m/z 641 e a fragmentação em dois íons de m/z 479 e m/z 317 sugere ser petunidina 3,5-O-diglicosídeo. A terceira antocianina apresentou um íon de m/z 625 e dois íons de m/z 463 e m/z 301, indicativo de peonidina com duas hexoses, isto é 3,5-O-diglicosídeo de peonidina.

Finalmente, o íon de m/z 655 e dois fragmentos de m/z 493 e m/z 331 correspondeu à malvidina 3,5-O-diglicosídeo, representando a principal antocianina identificada nos filamentos da corona desta espécie (8,1 µg/mL), seguida por 3,5-diglicosídeos de petunidina (2,1 µg/mL), peonidina (1,8 µg/mL) e cianidina (1,1 µg/mL). Dessa forma, pode-se sugerir que a coloração lavanda-púrpura exibida pela corona de *P. incarnata* deve-se à concentração majoritária de malvidina.

No caso do híbrido *P. 'Lady Margaret'*, os filamentos da corona apresentaram o mesmo perfil de antocianinas dos seus parentais e quatro antocianinas adicionais foram identificadas (Tabela 3 e Anexo XII). 3,5-diglicosídeos de cianidina, petunidina, peonidina

e malvidina foram identificadas de acordo com os dados espectrais observados em *P. incarnata* (Anexo XI).

Dois picos mostraram íons de m/z 595 com tempos de retenção e padrões de fragmentação MS/MS diferentes. O primeiro íon, com um tempo de retenção de 1.89 minutos, apresentou uma fragmentação em dois íons de m/z 433 e m/z 271, indicando a presença de uma pelargonidina com duas hexoses, isto é 3,5-diglicosídeo de pelargonidina. Enquanto o outro íon de m/z 595, com um tempo de retenção de 2.30 minutos mostrou um principal fragmento de m/z 287 devido à perda de 308 Da que corresponde a uma molécula de rutinosídeo (composta por dois açúcares: ramnose e glicose), sendo caracterizada como cianidina 3-O-rutinosídeo.

Os três últimos picos no extrato de *P. 'Lady Margaret'* indicaram a presença de antocianinas monoglicosiladas. Um íon de m/z 449 com o principal fragmento de m/z 287 correspondeu à massa molecular da cianidina 3-O-glicosídeo. A identificação da outra antocianina como peonidina 3-O-glicosídeo foi proposta devido ao íon de m/z 463 com a perda de uma molécula de hexose, resultando um íon de m/z 301. Finalmente, o pico com o íon de m/z 493 e um fragmento de m/z 331 correspondeu à malvidina 3-O-glicosídeo.

De acordo com esses resultados, as antocianinas principais identificadas na corona de *P. 'Lady Margaret'* foram 3,5-O-diglicosídeos de malvidina (4,5 µg/mL), cianidina (2,9 µg/mL) e peonidina (1,4 µg/mL). Enquanto, as antocianinas em menores quantidades foram cianidina 3-O-glicosídeo (0,8 µg/mL), pelargonidina 3,5-O-diglicosídeo (0,7 µg/mL) e petunidina 3,5-O-diglicosídeo (0,2 µg/mL). Malvidina 3-O-glicosídeo, cianidina 3-O-rutinosídeo e peonidina 3-O-glicosídeo foram encontradas somente como traços. Assim, a variedade e proporção das antocianinas identificadas nos filamentos da corona podem explicar a coloração vermelho-púrpura do híbrido *P. 'Lady Margaret'*.

4.2. Caracterização morfológica da epiderme dos filamentos da corona em *P. edulis*, *P. suberosa* e em *P. coccinea*

A corona multisseriada de *P. edulis* com os filamentos filiformes de coloração púrpura escura na base e os filamentos dentiformes coloridos (seta) nas séries internas está ilustrada nas Figuras 5A,D e 6A,B. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas na região basal e pigmentada do filamento (Figuras 5B,C) e na região apical não-pigmentada (Figuras 5E,F). Em ambas as regiões, a epiderme apresentou células cônicas, porém no caso da região pigmentada, as células mostraram-se mais justapostas (Figuras 5B,C) em relação às células da região não-pigmentada (Figuras 5E,F).

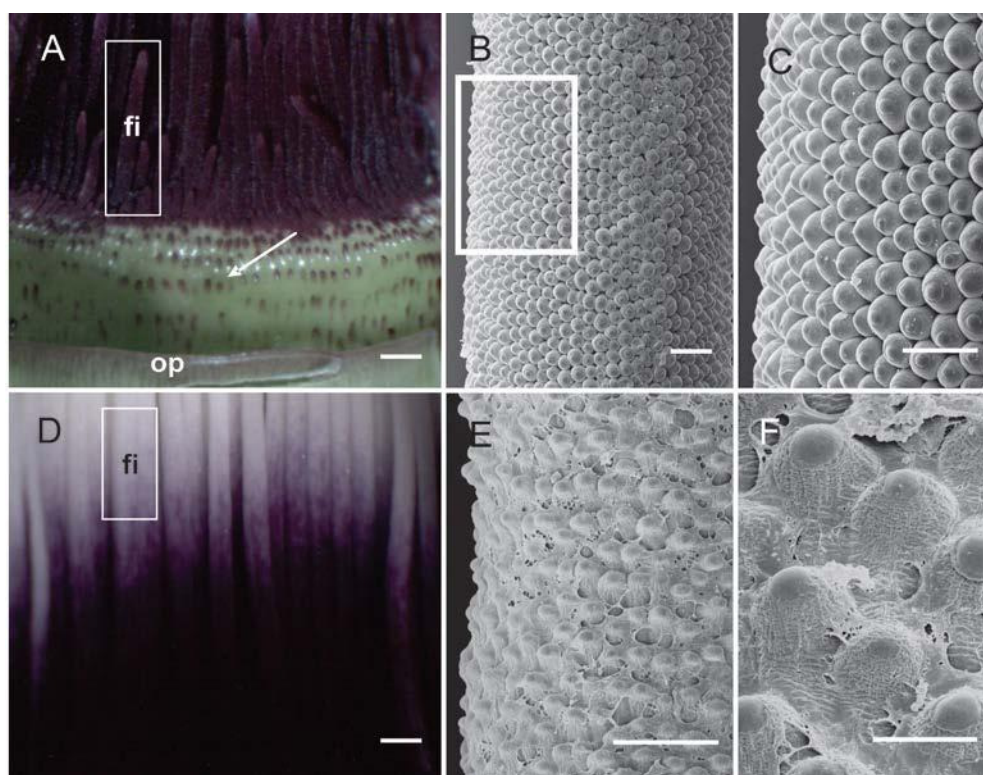


Figura 5: Caracterização morfológica da epiderme dos filamentos da corona em *P. edulis*. (A) Imagem das várias séries de filamentos filiformes pigmentados, as séries internas com filamentos reduzidos pigmentados (seta) e o opérculo na porção inferior do tubo floral com a margem pigmentada. (B, C) Microscopia eletrônica de varredura da epiderme do filamento filiforme pigmentado destacado em (A). (C) Visão mais detalhada das células cônicas. (D) Imagem do limite da pigmentação na base e ausência de pigmentação no ápice dos filamentos. (E, F) Microscopia eletrônica de varredura da epiderme do filamento filiforme não-pigmentado destacado em (D). (F) Visão mais detalhada das células cônicas. fi: filamentos filiformes, op: opérculo. Barras= 50mm (A), 100 µm (B, C), 50 µm (E), 20 µm (F).

Adicionalmente, secção transversal do filamento filiforme com o acúmulo de antocianinas nas células epidérmicas (Figuras 6C,D) e em algumas células subepidérmicas (Figuras 6E) que proporciona a coloração marcante na corona de *P. edulis*.

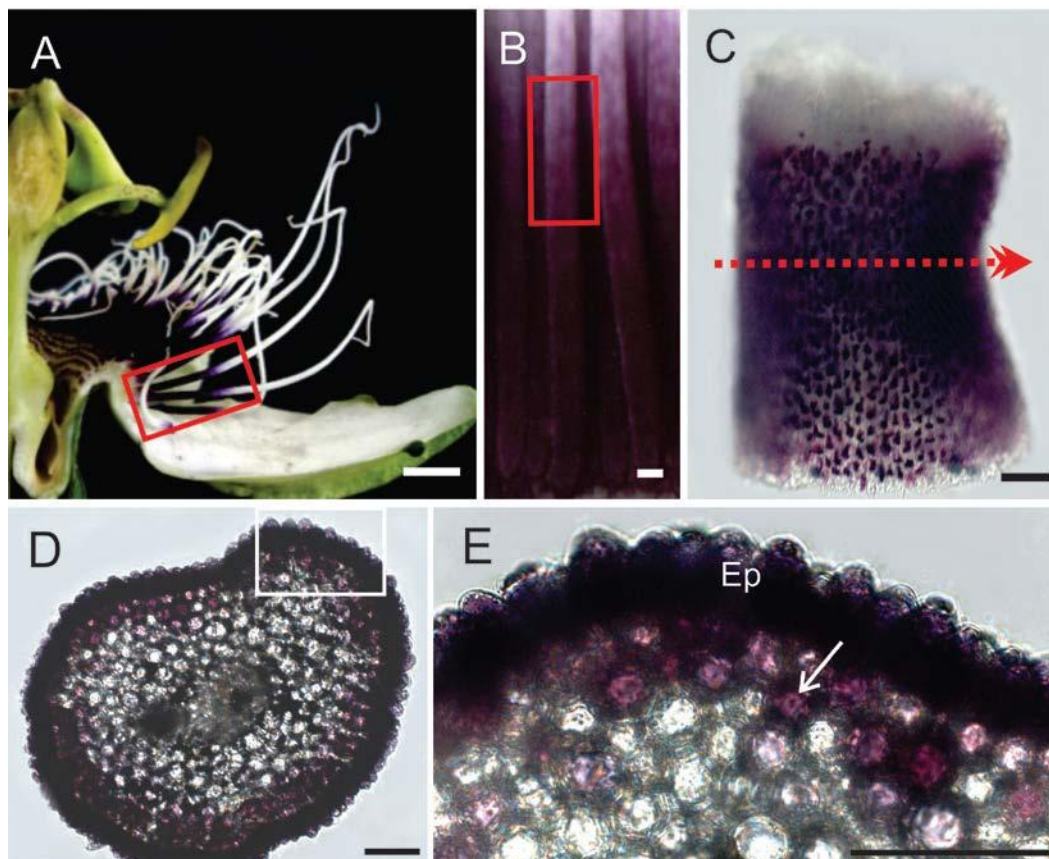


Figura 6. Acúmulo de antocianinas em *P. edulis* examinado em microscopia de luz: (A) Flor em antese com a corona multisseriada seccionada longitudinalmente com os filamentos filiformes pigmentados na base. (B) Detalhe dos filamentos filiformes mostrado em (A). (C) Pequeno fragmento do filamento mostrado em (B). (D) Secção transversal do filamento indicada pela linha pontilhada em (C). (E) Detalhe da região selecionada em (D), mostrando o acúmulo de antocianinas em todas as células epidérmicas e em algumas células subepidérmicas (seta). Ep: epiderme. Barras= 50 mm (A, B) e 100 μ m (C-E).

Em *P. suberosa*, as antocianinas estão presentes somente na região basal dos filamentos menores de ápice capitado e na base do opérculo plicado com suas extremidades fimbriadas (Figura 7A). Os filamentos filiformes da série externa não exibem pigmentação (Figura 7A) e imagens de MEV mostraram a presença de células poliédricas na epiderme (Figuras 7B,C). Enquanto, células epidérmicas com cutícula ornamentada foram observadas em ambas as regiões apical e basal do filamento menor (Figuras 7D-F). As Figuras 7G-H mostram detalhes das extremidades fimbriadas do opérculo com as células papilares.

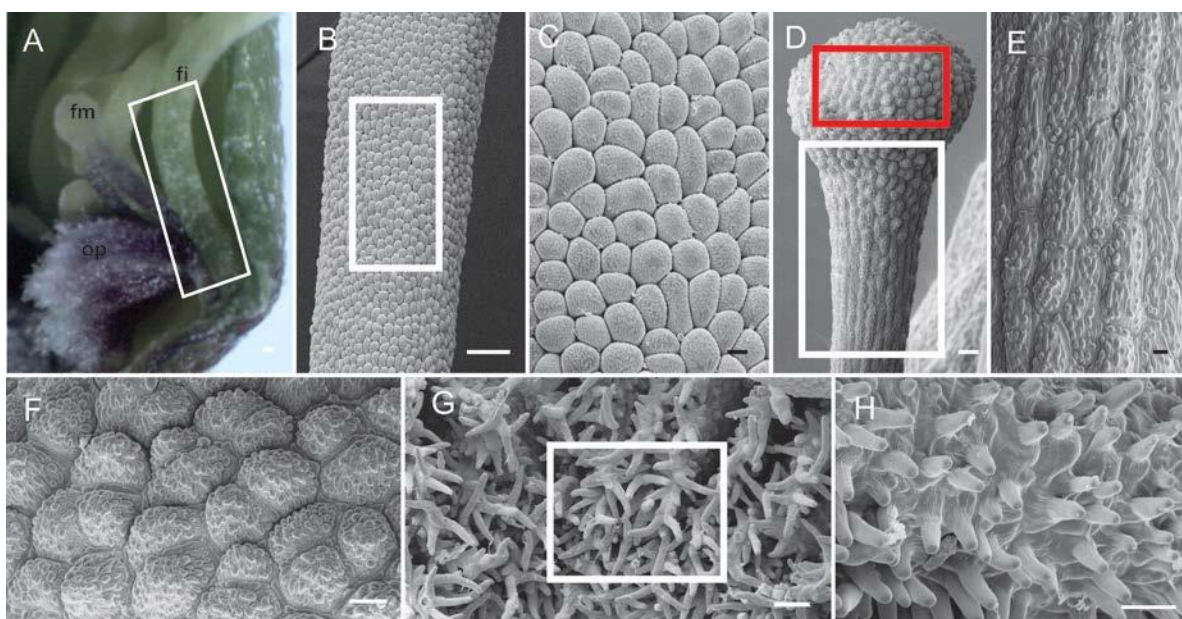


Figura 7: Caracterização morfológica da epiderme dos filamentos da corona e do opérculo em *P. suberosa*. (A) Duas séries distintas de corona: filamentos filiformes externos não-pigmentados e os filamentos menores com ápice capitado exibindo pigmentação na base e o opérculo plicado com extremidades fimbriadas pigmentadas na coloração púrpura. (B) Microscopia eletrônica de varredura da epiderme do filamento filiforme da série externa destacado em (A). (C) Detalhe das células poliédricas da região selecionada em (B). (D) Microscopia eletrônica de varredura da epiderme do filamento filiforme com ápice capitado. (E) Detalhe das células com cutícula ornamentada na porção basal do filamento menor destacado pelo retângulo branco em (D). (F) Detalhe das células com cutícula ornamentada na porção apical do filamento menor destacado pelo retângulo vermelho em (D). (G) Extremidades fimbriadas do opérculo. (H) Detalhe de uma região equivalente à mostrada em (G) com as células apresentando morfologia papilar. fi: filamentos filiformes, fm: filamentos menores, op: opérculo. Barras= 50mm (A) e 100 µm (B, C, D, E, F, G, H).

Diferentemente, a corona de *P. coccinea* apresenta pigmentação nas extremidades apicais dos filamentos da série externa (Figura 8A). Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas na epiderme de duas diferentes regiões do filamento: pigmentada (Figuras 8B-D) e não-pigmentada (Figuras 8B,E,F). Diferenças na morfologia celular epidérmica foram observadas. Na região apical e pigmentada do filamento conforme destacado em vermelho (Figura 8B), as células são ligeiramente cônicas (Figuras 8C,D), enquanto a região mediana caracterizada pela ausência de pigmentação e destacada em branco (Figura 8B) mostrou as células mais planas (Figuras 8E-F) se comparadas com a região apical.

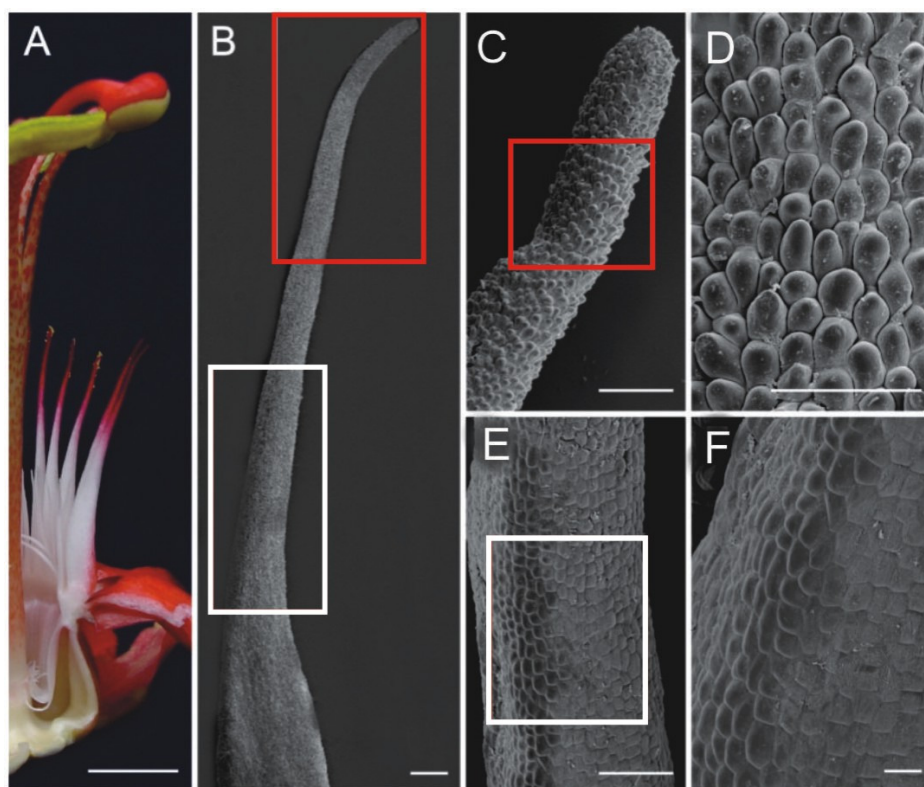


Figura 8: Caracterização morfológica da epiderme dos filamentos da corona em *P. coccinea*. (A) Duas séries de filamentos da corona, onde os filamentos da série externa apresentam as extremidades apicais pigmentadas em vermelho. (B) Microscopia eletrônica de varredura da epiderme do filamento da corona. (C) Região apical pigmentada do filamento destacada em vermelho em (B). (D) Detalhe da região selecionada em (C), mostrando a morfologia da epiderme com as células ligeiramente cônicas. (E) Região mediana do filamento sem pigmentação destacada em branco em (B). (F) Detalhe da região selecionada em (E) com células mais planas na epiderme. Barras= 50mm (A) e 100 μm (B, C, D, E, F, G, H).

4.3. Identificação e análises filogenéticas dos genes de *Passiflora* potencialmente envolvidos na biossíntese e no transporte de antocianinas

Uma análise de “*Data Mining*” do banco de dados PASSIOMA foi realizada com o objetivo de identificar genes potencialmente envolvidos na via biossintética das antocianinas em *Passiflora*. Os resultados obtidos desta análise foram publicados no Journal of Nucleic Acids: A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in Passionflowers (doi: 10.4061/2011/371517; Aizza e Dornelas, 2011).

Esta análise *in silico* das sequências possibilitou a identificação e a classificação total de 75 sequências de ESTs de *Passiflora*, onde 34 corresponderam às sequências de *P. edulis* e 41 oriundas da biblioteca de *P. suberosa*. Quando todas as sequências foram alinhadas com o algoritmo CAP3, o número válido de *clusters* foi reduzido a 15, correspondendo potencialmente a 15 diferentes genes (Tabela 4).

Na maioria das vezes, quando as sequências desses aminoácidos foram comparadas às sequências de proteínas de outras espécies em bancos de dados públicos, o primeiro BLAST (*hit*) correspondeu às sequências de *Populus* e *Ricinus*. Esta observação poderia ser esperada, uma vez que estes gêneros e o gênero *Passiflora* pertencem à ordem Malpighiales e são, portanto, filogeneticamente relacionados (Moore et al., 2010).

Para determinar suas relações evolutivas, as 15 sequências deduzidas de aminoácidos de *Passiflora* foram alinhadas com as sequências das proteínas de outras espécies depositadas em bancos de dados públicos. Os alinhamentos permitiram a construção de árvores filogenéticas para cada uma dessas famílias de proteínas envolvidas nas diferentes etapas enzimáticas da biossíntese das antocianinas. Desta forma, esta análise permitiu a identificação de homólogos de CHALCONA SINTASE (CHS), DIHIDROFLAVONOL 4-REDUTASE (DFR),

GLICOSILTRANSFERASE (GT), GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST), MYB e WD40 (Tabela 4).

Tabela 4. ESTs de *Passiflora* com similaridade às proteínas envolvidas nas diferentes etapas da via biossintética das antocianinas.

Enzima	<i>Passiflora</i> *	Primeiro BLAST	e-value	ID/SM
CHS	PACEPE3010G11.g	ABD24222 CHS <i>Populus alba</i>	7e-72	85/90
	PACEPE3014B06.g	ABC86919 CHS <i>Populus alba</i>	9e-67	77/84
	PACEPE3007G06.g	XP_002305446 CHS-like <i>Populus trichocarpa</i>	7e-121	84/92
	PACEPE3023H10.g	XP_002326830 CHS-like <i>Populus trichocarpa</i>	3e-110	82/91
	PACEPS7017D03.g	AAQ62589 CHS3 <i>Glycine Max</i>	1e-98	82/88
DFR	PACEPE3003G04.g	XP_002307667 DFR2 <i>Populus trichocarpa</i>	1e-95	82/94
GT	PACEPE3030G03.g	XP_002532899 UFGT <i>Ricinus communis</i>	6e-31	53/70
	PACEPS7021H07.g	XP_002518725 UFGT <i>Ricinus communis</i>	8e-57	56/72
GST	PACEPE3013H01.g	AF048978 GST <i>Glycine Max</i>	7e-52	79/90
	PACEPE3007A05.g	XM_002519342 GST theta <i>Ricinus communis</i>	4e-52	77/89
	PACEPE3018F08.g	ADB11335 GSTF7 phi <i>Populus trichocarpa</i>	2e-82	68/83
	PACEPS4006H06.g	ADB11332 GSTF4 phi <i>Populus trichocarpa</i>	2e-61	63/78
	PACEPS7023B03.g	AF243378 GST 23 <i>Glycine max</i>	1e-51	80/88
MYB	PACEPS7022E07.g	XP_002530824 R2R3 MYB <i>Ricinus communis</i>	7e-80	88/91
WD40	PACEPE3007G07.g	XP_002512788 WD-repeat protein <i>Ricinus communis</i>	3e-124	92/96

Abreviações: CHS: Chalcona sintase; DFR: Dihidroflavonol 4-redutase; GT: Glicosiltransferase e GST: Glutathione S-transferase; PACEPE: *Passiflora edulis*; PACEPS: *Passiflora suberosa*.

ID/SM = identidade/similaridade (ambas baseadas na sequência de aminoácidos) com o primeiro BLAST.

* códigos referem-se aos clones de cDNAs mais longos.

Devido às limitações gerais da abordagem baseada em ESTs, homólogos de *Passiflora* que correspondessem à chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), antocianidina sintase (ANS) e os fatores de transcrição da família bHLH não foram encontrados no PASSIOMA. Três sequências correspondentes a um homólogo putativo de

flavonóide 3'-hidroxilase (F3'H) e uma sequência que mostrou similaridade significativa ao gene codificando flavonóide 3'5'-hidroxilase (F3'5'H) foram identificadas, porém não utilizadas nas análises filogenéticas por se apresentarem muito incompletas e consequentemente com valores de bootstrap baixos.

Chalcona sintase (CHS)

Cinco genes supostamente codificadores de enzimas chalconas sintases foram identificados no PASSIOMA: PACEPE3010G11.g, PACEPE3014B06.g, PACEPE3007G06.g, PACEPE3023H10.g e PACEPS7017D03.g. Estas proteínas deduzidas mostraram mais que 80% de similaridade à chalconas sintases de outras espécies, codificando 231, 158, 254, 237 e 222 aminoácidos, respectivamente.

Para determinar a relação filogenética das diferentes CHSs, sequências protéicas de espécies diferentes, dentre elas: cianobáctéria (*Synechococcus* sp.) e de algumas briófitas, pteridófitas, gimnospermas, angiospermas foram alinhadas com as sequências de *Passiflora*.

A árvore filogenética foi resolvida em três clados altamente suportados com valores de bootstrap de 100% (Figura 9). As proteínas CHS de *Passiflora* foram posicionadas em dois clados diferentes: três sequências foram agrupadas no clado com proteínas envolvidas no metabolismo de flavonóides, incluindo as antocianinas (destacado na Figura 9), enquanto as duas sequências remanescentes foram agrupadas em outro clado monofilético que contém as proteínas chalconas sintases consideradas anteras-específicas.

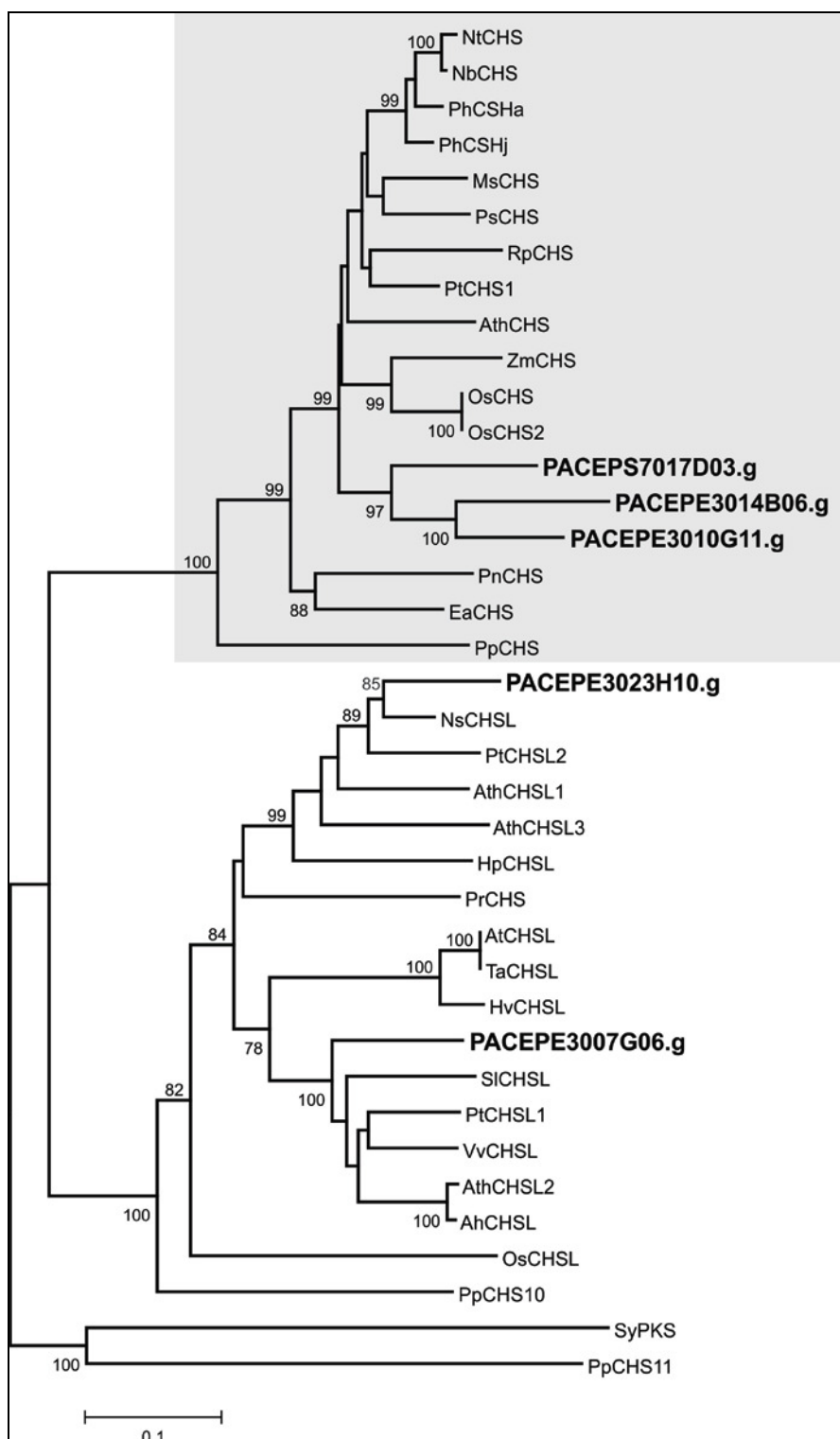


Figura 9. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining obtida pela análise de sequências de aminoácidos de chalcona sintase (CHS). O cluster destacado agrupou as enzimas CHS envolvidas no metabolismo de flavonóides. Valores de bootstrap para 1000 repetições foram usados para acessar a robustez da árvore. Os valores em cada nó indicam os números de repetições de bootstrap e somente os valores superiores a 75% foram indicados. Os nomes das espécies e os respectivos códigos das proteínas do GenBank encontram-se no anexo XIII.

Dihidroflavonol 4-redutase (DFR)

Uma única sequência de cDNA de 850 pares de base codificando uma proteína de 240 aminoácidos foi identificada em *Passiflora*: PACEPE3003G04.g e mostrou 94% de similaridade à sequência de dihidroflavonol 4-redutase de *Populus trichocarpa* (Tabela 4). A Figura 10 ilustra o alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de DFR de *P. edulis* com as sequências de outras espécies, mostrando um domínio de ligação ao NADP, considerado uma região de especificidade do substrato das enzimas DFRs (Beld et al., 1989; Johnson et al., 2001). Adicionalmente, a enzima DFR de *P. edulis* mostrou um ácido aspártico (Asp) na posição 134 da proteína (indicado pela seta), igualmente observado em *Petunia* e *Populus* (Figura 10).

A análise filogenética baseada no alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de DFRs está representada na Figura 11. As DFRs das monocotiledôneas e das eudicotiledôneas foram posicionadas separadamente. Enquanto, as monocots formaram um único clado, as eudicots divergiram em dois clados. A terminologia para determinar os motivos conservados presentes na sequência de DFR, bem como designar os tipos de DFRs está de acordo com Shimada e colaboradores (2005).

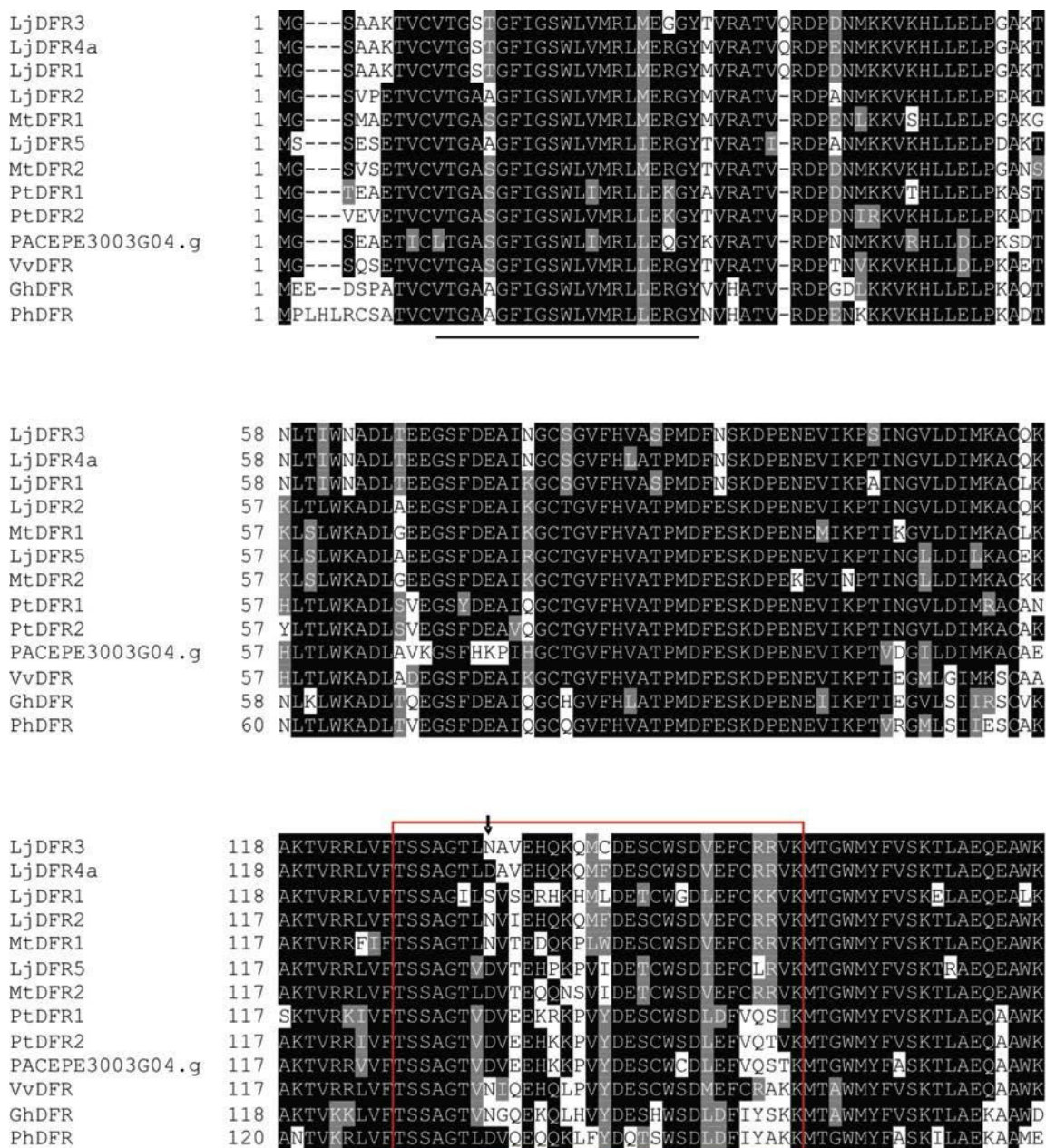


Figura 10. Alinhamento da sequência de *P. edulis* com sequências de proteínas DFRs de diferentes espécies. Os aminoácidos idênticos e similares estão sombreados em preto e em cinza, respectivamente. O domínio de ligação NADP está sublinhado. Aminoácidos dentro do retângulo vermelho são considerados essenciais para a especificidade do substrato da enzima DFR (Beld et al., 1989) e o aminoácido indicado pela seta é especialmente importante para essa especificidade (Johnson et al., 2001). O alinhamento foi realizado usando os programas CLUSTAL X e BOXSHADE.

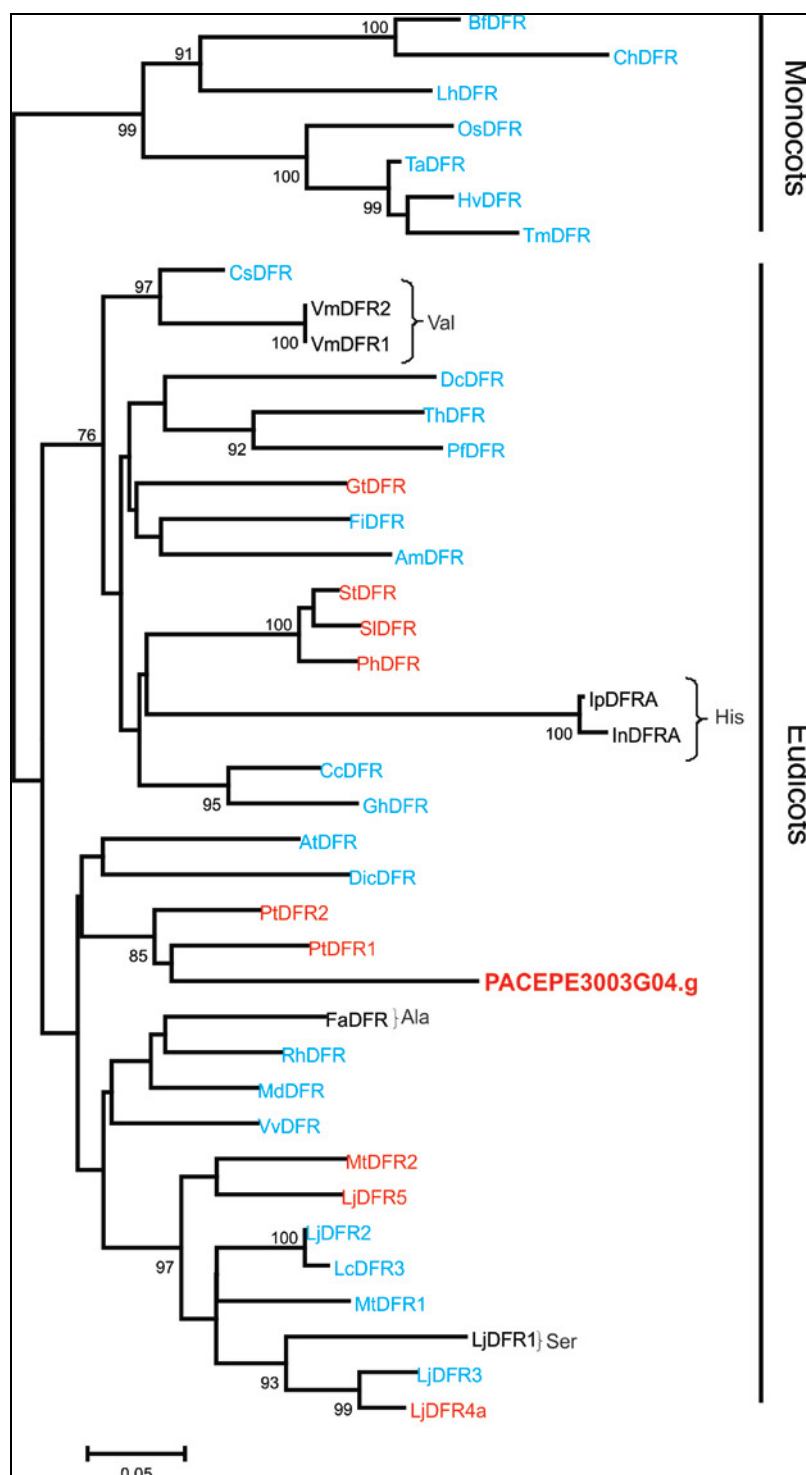


Figura 11. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining obtida pela análise de sequências de aminoácidos de dihidroflavonol 4-redutase (DFR). Valores de bootstrap para 1000 repetições foram usados para acessar a robustez da árvore. Os valores em cada nó indicam os números de repetições de bootstrap e somente os valores superiores a 75% foram indicados. DFRs do tipo Asn, do tipo Asp e DFRs de nenhum dos dois tipos estão indicadas em azul, vermelho e preto, respectivamente de acordo com Shimada et al., 2005. Os nomes das espécies e os respectivos códigos das proteínas do GenBank encontram-se no anexo XIV.

Glicosiltransferase (GT)

Duas sequências de ESTs foram identificadas: PACEPE3030G03.g de *P. edulis* e PACEPS7021H02.g de *P. suberosa*. Ambas apresentaram similaridades à glicosiltransferase de *Ricinus communis* (Tabela 4).

Para a análise filogenética, as prováveis glicosiltransferases (GTs) de *Passiflora* foram comparadas com as proteínas GTs de diferentes espécies vegetais, baseando-se na especificidade do substrato *in vitro* conforme Kavinick et al. (2010).

O clado I reúne as enzimas flavonóide-3-O-glicosiltransferases, o clado II inclui GTs com alta especificidade catalítica para mais de uma classe de flavonóides como chalconas, flavonas e flavonóis. Enzimas do clado III têm atividades relacionadas ao substrato das enzimas isoflavona-7-O-glicosiltransferases e/ou flavonóide 3,5-O-glicosiltransferases, enquanto as enzimas do clado IV apresentam maior afinidade aos flavonóis e isoflavonóis e por fim, as enzimas do clado V estão relacionadas às enzimas flavonóide-5-O-glicosiltransferases e/ou flavonóide-7-O-glicosiltransferases.

A Figura 12 mostra a árvore filogenética com cinco clados, onde as duas sequências de *Passiflora* foram posicionadas com as glicosiltransferases do clado II que mostraram especificidade *in vitro* a diferentes subclasses de flavonóides.

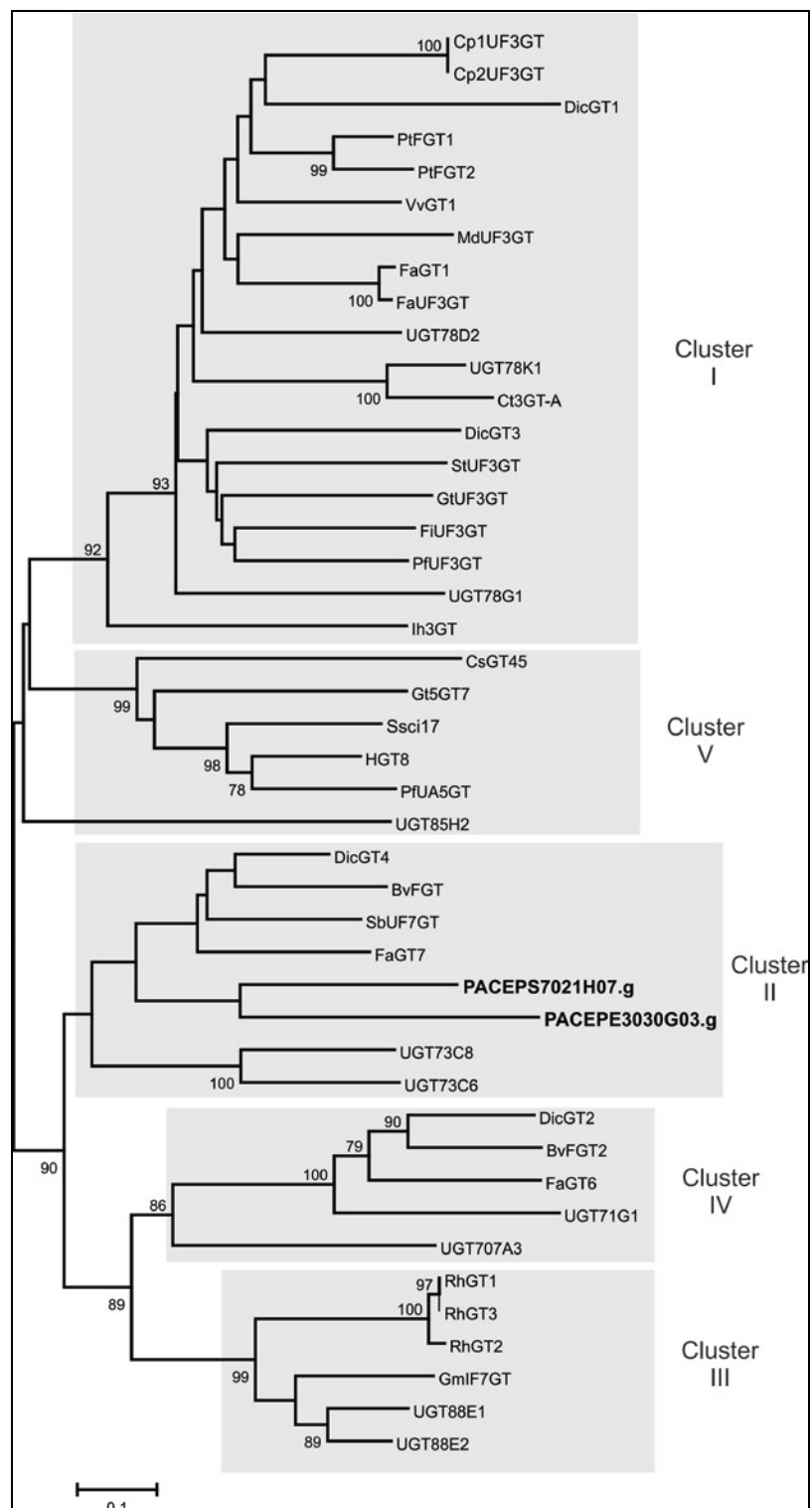


Figura 12. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining obtida pela análise de sequências de aminoácidos de glicosiltransferase (GT). Valores de bootstrap para 1000 repetições foram usados para acessar a robustez da árvore. Os valores em cada nó indicam os números de repetições de bootstrap e somente os valores superiores a 75% foram indicados. Os nomes das espécies e os respectivos códigos das proteínas do GenBank encontram-se no anexo XV.

Glutathione S-Transferase (GST)

Cinco sequências de ESTs codificando prováveis GSTs foram identificadas em *Passiflora*. Comparações dessas sequências deduzidas de aminoácidos com aquelas depositadas no GenBank indicaram similaridade com GSTs de *Populus*, *Ricinus* e *Glycine* (Tabela 4).

Para caracterizar as relações filogenéticas das enzimas GSTs, as sequências deduzidas de aminoácidos de *Passiflora* foram comparadas com as sequências de GSTs de diferentes espécies de acordo com Dixon et al (2002). Baseado na similaridade de sequências, as cinco supostas proteínas GSTs de *Passiflora* foram agrupadas em três diferentes clados (Figura 13). PACEPE3018F08.g, PACEPS4006H06.g e PACEPS7023B03.g foram posicionadas no mesmo clado das GSTs do tipo I, PACEPE3007A05.g representa uma GST do tipo II, enquanto PACEPE3013H01.g foi agrupada ao clado do tipo III.

4.4. Identificação e análises filogenéticas de genes de *Passiflora* potencialmente envolvidos na regulação da biossíntese de antocianinas

Dando continuidade à análise *in silico* das sequências, vinte e quatro sequências de *P. edulis* e *P. suberosa* mostraram similaridade ao fator de transcrição MYB, porém somente um homólogo potencial ao fator de transcrição MYB com os domínios R2R3 foi identificado no banco de dados PASSIOMA. PACEPS7022E07 é oriunda da biblioteca de *P. suberosa* e codifica uma proteína de 132 aminoácidos com 91% de similaridade à subfamília R2R3 do gene MYB de *Ricinus communis* (Tabela 4).

O alinhamento da sequência de *P. suberosa* com outras 17 sequências de MYB-R2R3 está representado na Figura 14 e indicou um motivo de aminoácidos conservado no

domínio R3 destacado pelo retângulo vermelho, sendo considerado importante para a interação entre as proteínas MYB e bHLH em *Arabidopsis* (Zimmermann et al., 2004), além de quatro aminoácidos específicos (representados pela seta) anteriormente identificados em milho e considerados necessários para a interação com proteínas bHLHs (Grotewold et al., 2000).

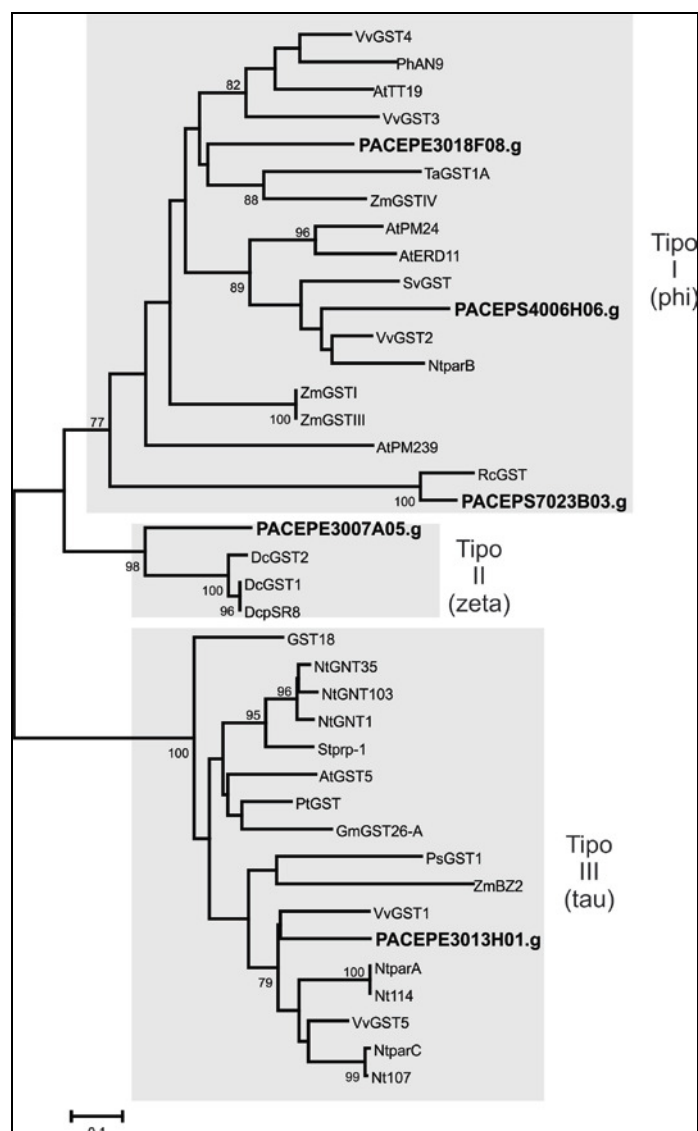


Figura 13. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining obtida pela análise de sequências de aminoácidos de Glutathione S-Transferase (GST) com três tipos de classes representados por phi, tau e zeta, de acordo com Dixon et al., 2002. Valores de bootstrap para 1000 repetições foram usados para acessar a robustez da árvore. Os valores em cada nó indicam os números de repetições de bootstrap e somente os valores superiores a 75% foram indicados. Os nomes das espécies e os respectivos códigos das proteínas do GenkBank encontram-se no anexo XVI.

Um segundo motivo conservado, ANDV ou DNEI no domínio R3, destacado no retângulo azul está relacionado à biossíntese de antocianina e/ou proantocianidina. No caso, a sequência de *P. suberosa* mostrou a presença do domínio DNEI (Figura 14).

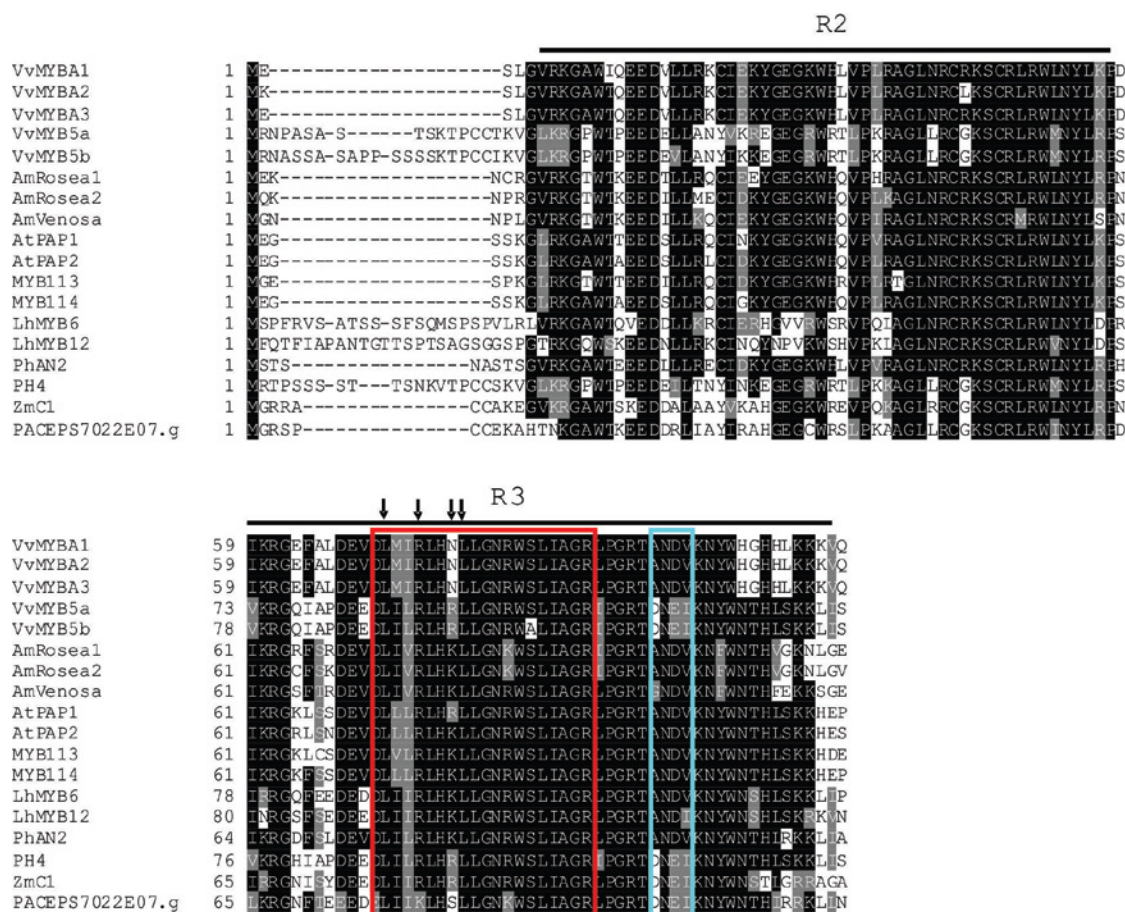


Figura 14. Alinhamento da sequência de *P. suberosa* com sequências de MYB- R2R3 de diferentes espécies. Os aminoácidos idênticos e similares estão sombreados em preto e em cinza, respectivamente. Retângulo vermelho mostra um motivo importante para a interação com as proteínas bHLH no domínio R3 (Zimmermann et al., 2004) e as setas indicam quatro aminoácidos específicos identificados em milho e necessários para a interação com um cofator bHLH (Grotewold et al., 2000). Retângulo azul destaca um segundo motivo conservado no domínio R3 relacionado à biossíntese de antocianina e/ou proantocianidina (Quattrocchio et al., 2006). O alinhamento foi realizado usando os programas CLUSTAL X e BOXSHADE.

A Figura 15 representa a árvore filogenética usando apenas a região conservada dos domínios R2R3 do alinhamento. A sequência de *Passiflora* mostrou-se ortóloga às proteínas ZMC1 (*Zea mays*), PhPH4 (*Petunia hybrida*), VvMYB5a e VvMYB5b (*Vitis vinifera*).

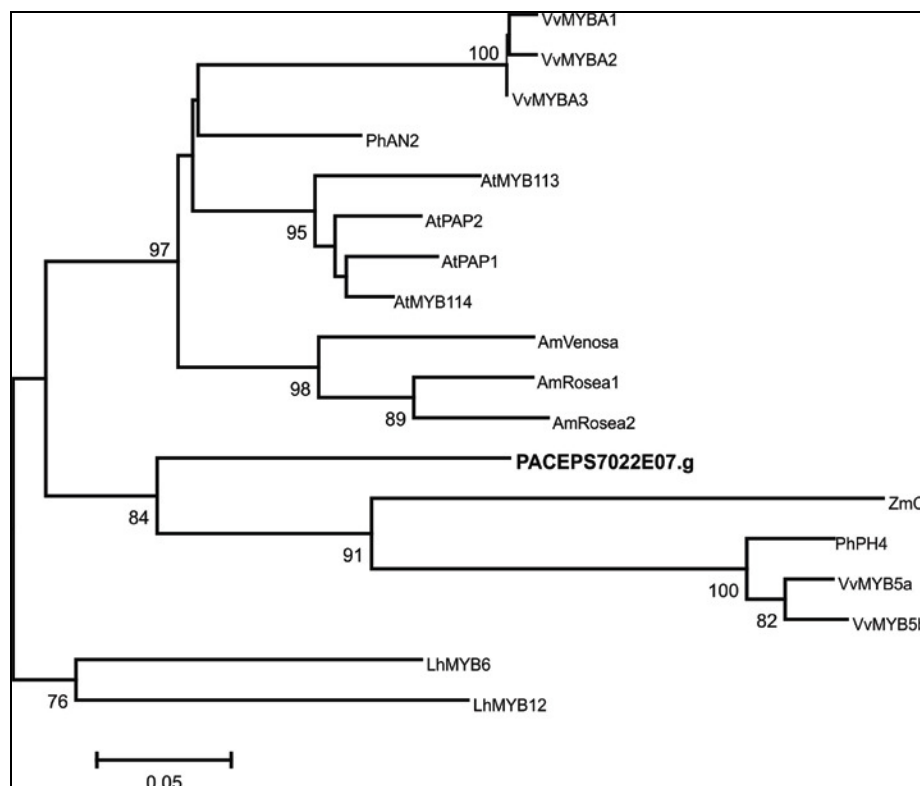


Figura 15. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining obtida pela análise de sequências de aminoácidos de MYB- R2R3. Valores de bootstrap para 1000 repetições foram usados para acessar a robustez da árvore. Os valores em cada nó indicam os números de repetições de bootstrap e somente os valores superiores a 75% foram indicados. Os nomes das espécies e os respectivos códigos das proteínas do GenkBank encontram-se no anexo XVII.

E finalmente, o clone PACEPE3007G07.g codifica uma proteína com 291 aminoácidos e mostrou 96% de similaridade à proteína WD40 de *Ricinus communis* (Tabela 4). Comparações de proteínas WD40 de outras espécies e da sequência obtida de *P. edulis* indicaram a presença de quatro domínios conservados na região C-terminal (Figura 16). Relações filogenéticas mostraram que WD40 de *P. edulis* é ortóloga à proteína WD40 de *Ricinus communis* (Figura 17).

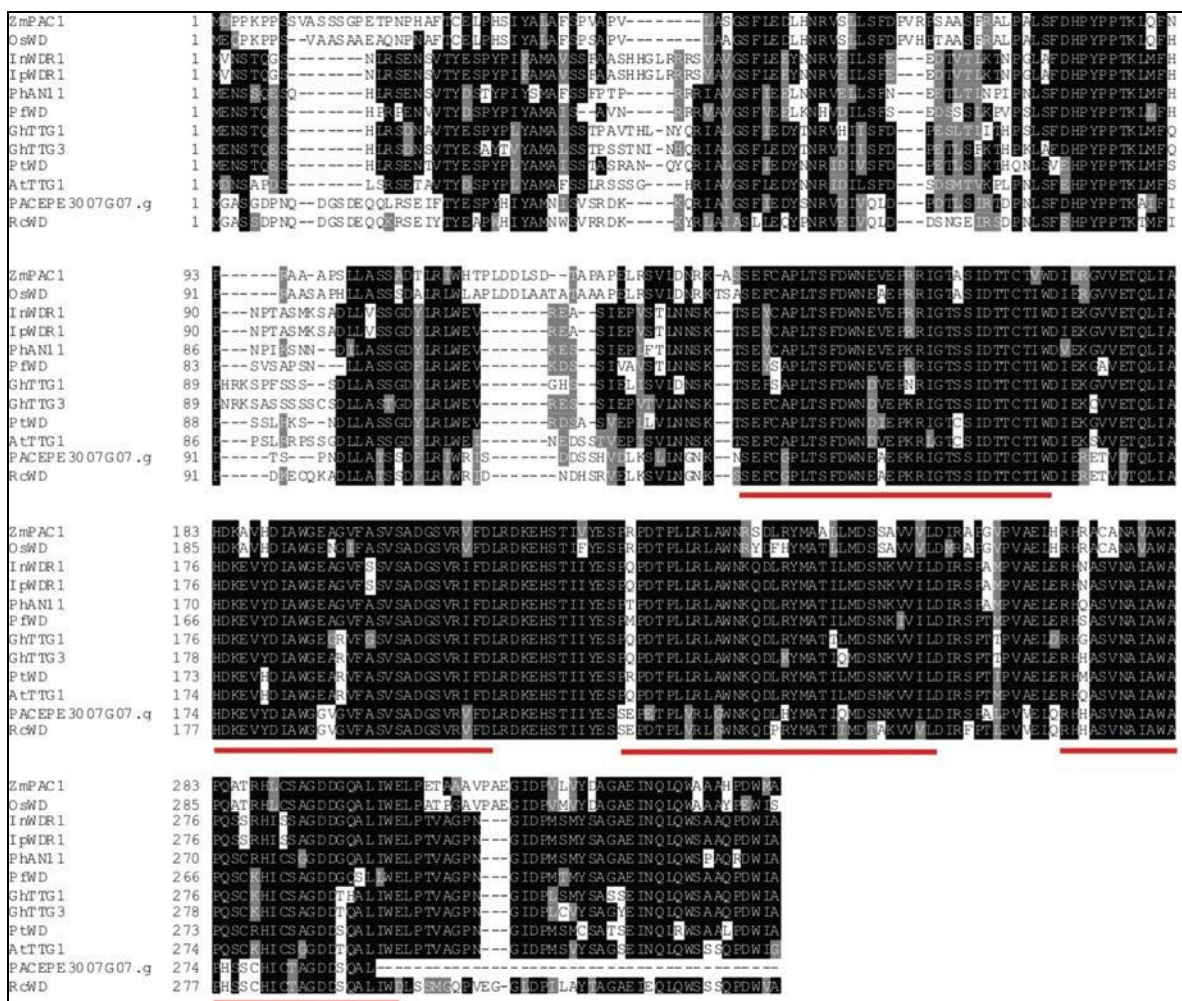


Figura 16. Alinhamento da sequência de *P. edulis* com as sequências de proteínas WD40 de outras espécies. Os aminoácidos idênticos e similares estão sombreados em preto e em cinza, respectivamente. Quatro domínios conservados nas proteínas WD40 estão sublinhados em vermelho. O alinhamento foi realizado usando os programas CLUSTAL X e BOXSHADE.

Após a identificação de alguns genes potencialmente envolvidos na biossíntese das antocianinas e a confirmação de suas identidades a partir de árvores filogenéticas, os clones escolhidos para a análise de expressão gênica foram renomeados com a adição do prefixo Pe (para *P. edulis*) ou Ps (para *P. suberosa*).

Os clones PACEPE3003G04, PACEPE3030G03 e PACEPE3007G07 foram identificados como os possíveis ortólogos de *P. edulis* dos genes codificadores das proteínas DIHIDROFLAVONOL 4-REDUTASE, GLICOSILTRANSFERASE e WD40, respectivamente. Enquanto, a sequência de PACEPS7022E07 mostrou grande similaridade à sequência codificadora da proteína MYB-R2R3 em *P. suberosa*. Por esta razão, daqui em diante os referidos genes serão indicados como *PeDFR*, *PeGT*, *PeWD40* e *PsMYB-R2R3*.

Caracterização de *PeDFR*, *PeGT* e *PeWD40* em *P. edulis*

A Figura 18 mostra a expressão diferencial de *PeDFR*, *PeGT* e *PeWD40* nos órgãos vegetativos e florais de *P. edulis*. De modo geral, a expressão de *PeDFR* mostrou-se fraca em raiz, caule, folha jovem, botão floral I, botão floral II, sépala, corona, androginóforo e estame. Transcritos de *PeGT* foram detectados em botão floral I e II, corona, androginóforo e estame. Enquanto *PeWD40* apresentou uma expressão generalizada em todos os órgãos com exceção do pistilo que apresentou uma banda mais fraca.

Caracterização de *PsMYB-R2R3* em *P. suberosa*

Análises de RT-PCR em *P. suberosa* indicaram a presença de transcritos do gene *PsMYB-R2R3* em raiz, caule, folha adulta, ápice caulinar reprodutivo, botão floral I e II, porém preferencialmente em todos os órgãos florais (Figura 19).

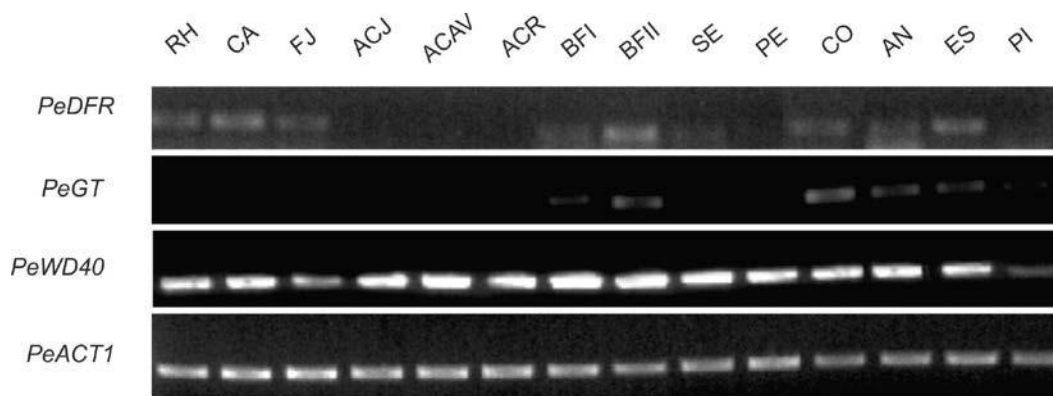


Figura 18. Análise da expressão temporal dos genes *PeDFR*, *PeGT* e *PeWD40* em diferentes órgãos de *Passiflora edulis*. Raiz hidropônica (RH), caule (CA), folha jovem (FJ), ápice caulinar juvenil (ACJ), ápice caulinar adulto vegetativo (ACAV), ápice caulinar reprodutivo (ACR), botão floral I (BFI), botão floral II (BFII), sépala (SE), pétala (PE), coroa (CO), androginóforo (AN), estame (ES) e pistilo (PI). O padrão de expressão do gene *PeACT1* foi considerado como constitutivo e utilizado como normalizador.

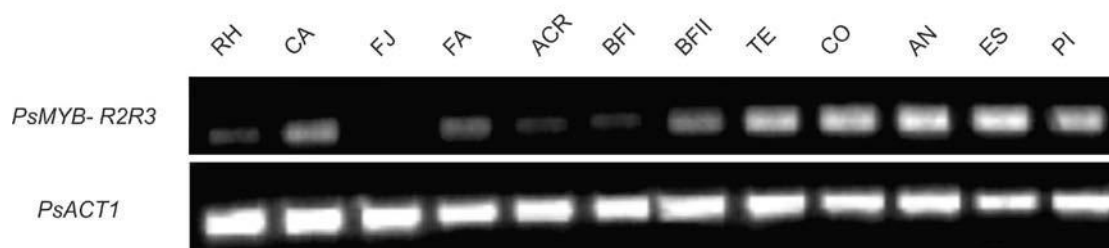


Figura 19. Análise da expressão temporal do gene *PsMYB-R2R3* em diferentes órgãos de *Passiflora suberosa*. Raiz hidropônica (RH), caule (CA), folha jovem (FJ), folha adulta (FA), ápice caulinar reprodutivo (ACR), botão floral I (BFI), botão floral II (BFII), tépala (TE), coroa (CO), androginóforo (AN), estame (ES) e pistilo (PI). O padrão de expressão do gene *PsACT1* foi considerado como constitutivo e utilizado como normalizador.

Hibridização *in situ*

Neste trabalho, houve interesse pela análise do padrão de expressão de alguns genes que codificam as enzimas e fatores de transcrição envolvidos na fase tardia da via metabólica dos flavonóides, em especial na biossíntese das antocianinas. Para verificar o padrão espacial destes genes durante o desenvolvimento da coroa relacionado ao acúmulo de pigmentos, a expressão de *PeDFR*, *PeGT* e *PeWD40* foi investigada por hibridização *in*

situ em *P. edulis* e do gene *PsMYB-R2R3* em *P. suberosa*. Para isso, houve a preocupação em sintetizar sondas específicas para cada gene estudado de acordo com a espécie.

Com atenção em especial à corona, vale reforçar que observações morfo-anatômicas previamente realizadas durante o desenvolvimento floral em diferentes espécies de *Passiflora* mostraram evidências de que a formação ontogenética dessa estrutura é tardia, aparecendo após a formação de todos os órgãos florais como uma emergência do tubo floral, constituída pelo opérculo na porção inferior e por uma a várias séries de filamentos filiformes acima do opérculo, dependendo da espécie (Aizza, 2010).

Botões florais de ambas as espécies em diferentes estágios de desenvolvimento seccionados longitudinalmente e transversalmente foram hibridizados com sondas antisense e sense correspondentes ao gene de interesse. De modo geral, o sinal de hibridização foi observado como um precipitado púrpuro ou roxo-avermelhado nas células dos diferentes tecidos em caso da presença de transcritos.

O padrão de expressão gênica de *PeDFR* foi verificado durante o desenvolvimento floral em *Passiflora edulis* conforme representado pela Figura 20. Um botão floral com 0,8 cm de comprimento seccionado longitudinalmente mostra o início do desenvolvimento da corona e a presença de transcritos do respectivo gene nas células dos diferentes tecidos (Figura 20A).

O sinal de hibridização apareceu fraco e uniforme nas células epidérmicas e subepidérmicas desde o início, quando a corona surge como uma emergência do tubo floral e no primórdio do nectário (asterisco, Figura 20B). Em seguida, a distribuição uniforme e a intensidade fraca do sinal permaneceram nos primórdios dos filamentos filiformes da série externa (seta vermelha), do opérculo (seta preta) e do nectário (asterisco) e um pouco mais pronunciado nos micrósporos (seta verde, Figura 20C).

No estágio avançado de desenvolvimento, verificou-se ainda a expressão fraca do gene nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos externos (seta vermelha), do opérculo (seta preta), do nectário (asterisco) e na região interna correspondente aos primórdios dos filamentos dentiformes (seta azul, Figura 20D). Na secção transversal do botão floral de 2,2 cm de comprimento que corresponde a um estágio pigmentado, duas séries de filamentos filiformes desenvolvidas, cujas células epidérmicas e subepidérmicas apareceram hibridizadas (Figura 20E). Adicionalmente, um sinal de hibridização forte de *PeDFR* foi visualizado nas células epidérmicas da superfície abaxial das sépalas (seta, Figura 20E). Na Figura 20F, a seta indica a presença de transcritos nas células epidérmicas da superfície abaxial das pétalas. Expressão de *PeDFR* não foi detectada nos filamentos filiformes da coroa hibridizados com a sonda sense (Figura 20G).

A Figura 21 apresenta o padrão de expressão do gene *PeGT* observado nos diferentes estágios de desenvolvimento floral em *P. edulis*. Na Figura 21A observa-se o botão floral no início do desenvolvimento da coroa seccionado longitudinalmente e hibridizado com sonda antisense do gene de interesse, mostrando o sinal de hibridização nas células dos diferentes órgãos florais. Transcritos de *PeGT* foram observados nas células do nectário ao longo de todo o desenvolvimento floral conforme indicado pelo asterisco (Figuras 21B-E). Inicialmente, verificou-se uma distribuição uniforme do sinal de hibridização nas células epidérmicas e subepidérmicas no início do desenvolvimento da coroa como uma emergência do tubo floral e no primórdio do nectário (asterisco, Figura 21B). Posteriormente, o sinal manteve-se nas células dos primórdios dos filamentos da série externa (seta vermelha), do opérculo (seta preta), do nectário (asterisco), das sépalas e nos micrósporos (Figura 21C).

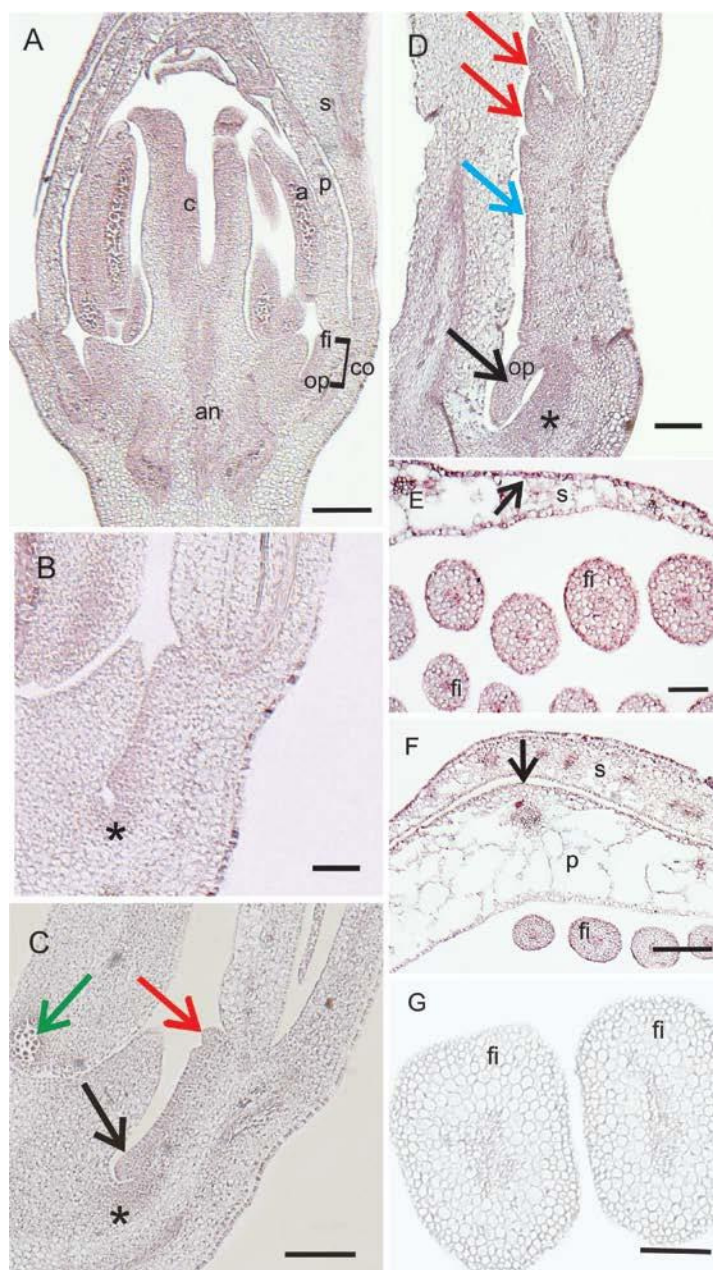


Figura 20. Análise da expressão espacial do gene *PeDFR* por hibridização *in situ* em diferentes estágios do desenvolvimento floral em *Passiflora edulis*. Secções longitudinais (A, B, C, D) e transversais (E, F, G). (A) Visão geral do botão floral. (B) Sinal fraco de hibridização nas células epidérmicas e subepidérmicas no início do desenvolvimento da coroa e no primórdio do nectário (asterisco). (C) Sinal de hibridização nos primórdios dos filamentos filiformes (seta vermelha), do opérculo (seta preta) e do nectário (asterisco). Sinal mais intenso nos micrósporos (seta verde). (D) Expressão fraca de *PeDFR* no estágio tardio de desenvolvimento nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da séries externas (seta vermelha), do opérculo (seta preta), do nectário (asterisco) e dos filamentos dentiformes das séries internas (seta azul). (E) Secção transversal do botão floral de 2,2 cm de comprimento com duas séries de filamentos filiformes, mostrando as células epidérmicas e subepidérmicas hibridizadas. Adicionalmente, expressão forte de *PeDFR* nas células epidérmicas da superfície abaxial das sépalas (seta). (F) A seta indica a presença de transcritos nas células epidérmicas da superfície abaxial das pétalas. (G) Expressão de *PeDFR* não foi detectada nos filamentos filiformes hibridizados com sonda sense. s: sépala, p: pétala, a: antera, c: carpelo, an: androginóforo, fi: filamentos filiformes, co: coroa, op: opérculo, n: nectário. Barras= 100 μm.

O sinal de hibridização de *PeGT* mostrou um aumento de intensidade nas células epidérmicas e subepidérmicas do opérculo (seta preta), nos filamentos das séries externas e no nectário (asterisco). Adicionalmente, a expressão foi observada nas células epidérmicas e subepidérmicas da sépala (seta laranja), em alguns grupos de células da pétala (seta branca) e nos micrósporos (Figura 21D).

No estágio tardio de desenvolvimento, a expressão intensificou-se nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos das séries externas (seta vermelha), no nectário (asterisco) e nos micrósporos (seta azul). No entanto, o sinal de hibridização manteve-se restrito às células epidérmicas do opérculo (seta preta) e dos filamentos dentiformes das séries internas (seta azul) e nas células do tapete (seta verde, Figura 21E). Na secção transversal da antera, o sinal de hibridização visualizado nas células do tapete (seta preta) e nos micrósporos (seta vermelha, Figura 21F). A Figura 21G ilustra uma secção transversal do botão floral de 2,2 cm de comprimento com duas séries de filamentos filiformes da corona. Um detalhe da Figura 21G com o sinal de hibridização forte nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos filiformes da série mais externa, enquanto nos filamentos da série interna foi observado um sinal mais fraco (Figura 21H). Transcritos não foram detectados nos filamentos da corona hibridizados com sonda sense (Figura 21I).

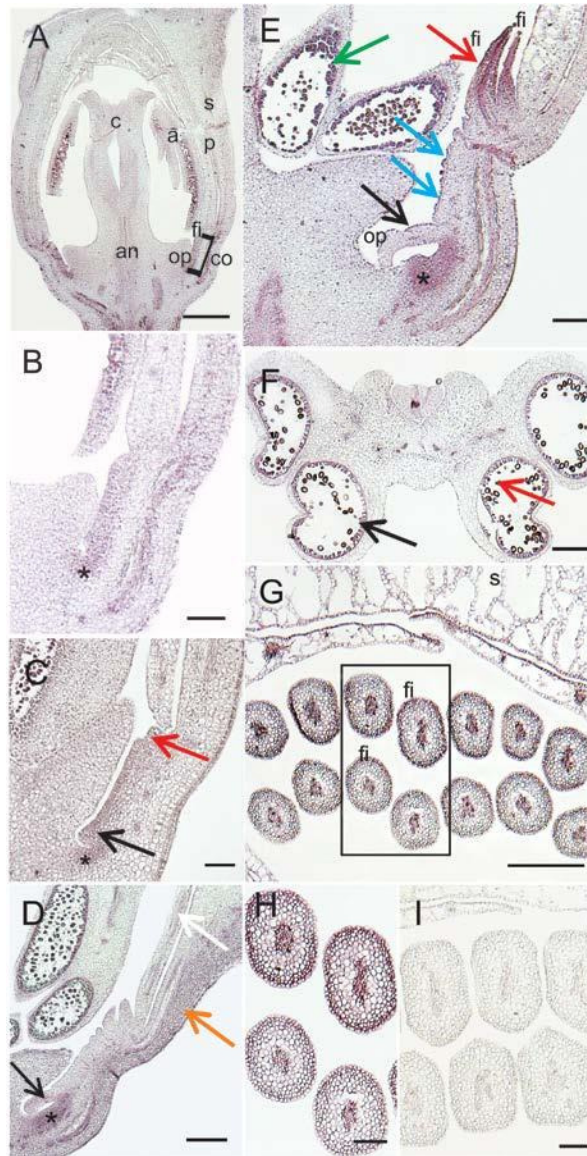


Figura 21. Análise da expressão espacial do gene *PeGT* por hibridização *in situ* em diferentes estágios do desenvolvimento floral em *Passiflora edulis*. Secções longitudinais (A, B, C, D, E) e transversais (F, G, H, I). (A) Visão geral do botão floral. (B) Distribuição uniforme do sinal de hibridização nas células epidérmicas e subepidérmicas no início do desenvolvimento da coroa e no primórdio do nectário (asterisco). (C) Presença do sinal nas células dos primórdios dos filamentos da série externa (seta vermelha), do opérculo (seta preta), do nectário (asterisco). (D) Aumento da intensidade da expressão gênica no opérculo (seta preta), no nectário (asterisco), nas células epidérmicas e subepidérmicas da sépala (seta laranja), em alguns grupos de células da pétala (seta branca) e nos micrósporos. (E) Estágio tardio de desenvolvimento com sinal de hibridização forte nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos das séries externas (seta vermelha) e do nectário (asterisco), mantendo-se somente nas células epidérmicas do opérculo (seta preta) e dos filamentos das séries intermediárias (seta azul) e micrósporos (seta verde). (F) Secção transversal da antera com as células do tapete (seta preta) e os micrósporos (seta vermelha) hibridizados. (G) Secção transversal do botão floral de 2,2 cm de comprimento com duas séries de filamentos filiformes da coroa. (H) Detalhe mostrado em (G) com sinal de hibridização intenso nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da série externa e o sinal mais fraco nos filamentos da série interna. (I) Expressão de *PeGT* não foi detectada nos filamentos da coroa hibridizados com sonda sense. s: sépala, p: pétala, a: antera, c: carpelo, an: androginóforo, fi: filamentos filiformes, co: coroa, op: opérculo, n: nectário. Barras= 100 µm.

A expressão do gene *PeWD40* durante o desenvolvimento da coroa está ilustrada na Figura 22. Visão geral do botão floral seccionado longitudinalmente com a localização da coroa (Figura 22A). O sinal de hibridização forte foi observado nas células epidérmicas e subepidérmicas desde o início do desenvolvimento da coroa no tubo floral e no primórdio do nectário (asterisco, Figura 22B). Subsequentemente, a intensidade e a distribuição uniforme do precipitado foram igualmente observadas nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos das séries externas (seta vermelha), da região mais interna dessa emergência (seta azul) e do nectário (asterisco, Figura 22C). A Figura 22D mostra transcritos de *PeWD40* nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da série externa (seta vermelha), do tapete (seta verde) e nos micrósporos, mantendo-se presente apenas nas células epidérmicas do opérculo (seta preta) e dos filamentos dentiformes das séries internas (seta azul).

Em estágio tardio de desenvolvimento, a expressão generalizada de *PeWD40* permaneceu nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos das séries mais externas (seta vermelha) e do nectário (asterisco), ficando restrita às células epidérmicas do opérculo (seta preta) e dos filamentos dentiformes das séries internas (seta azul, Figura 22E). A Figura 22F mostra uma secção transversal do botão floral de 2,2 cm de comprimento com duas séries de filamentos filiformes que mostra a presença de transcritos nas células epidérmicas e subepidérmicas da superfície abaxial das sépalas (seta preta) e nas células epidérmicas da superfície abaxial das pétalas (seta vermelha). A Figura 22G mostra o sinal de hibridização nas células epidérmicas e em algumas células subepidérmicas hibridizadas dos filamentos filiformes destacados na Figura 22F. Na secção transversal do ovário as setas indicam a expressão fraca de *PeWD40* nas paredes do ovário (seta branca) e

nos óvulos (seta preta, Figura 22H). A presença de transcritos não foi visualizada no filamento da coroa hibridizado com a sonda sense (Figura 22I).

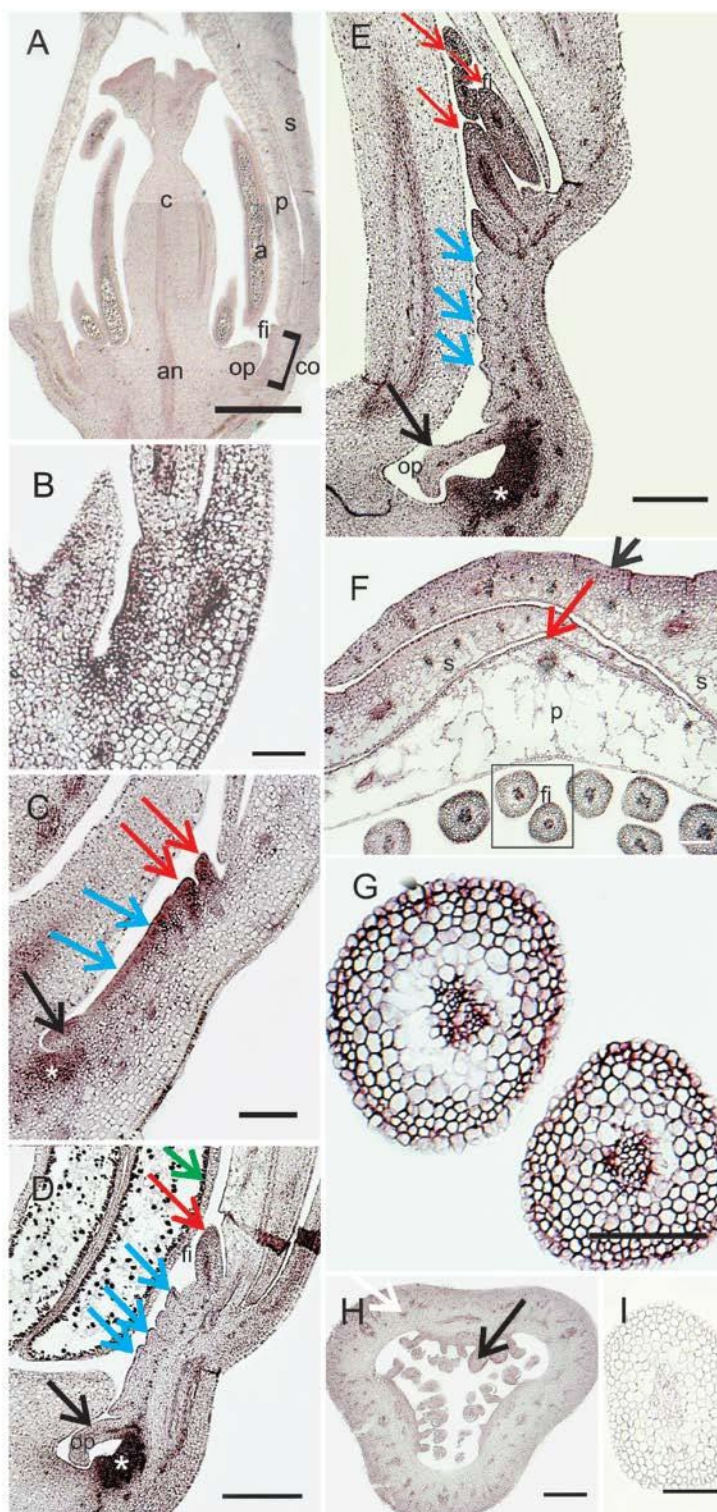


Figura 22. Análise da expressão espacial do gene *PeWD40* por hibridização *in situ* em diferentes estágios do desenvolvimento floral em *Passiflora edulis*. Secções longitudinais (**A, B, C, D, E**) e transversais (**F, G, H, I**). (**A**) Visão geral do botão floral. (**B**) Sinal de hibridização forte foi observado nas células epidérmicas e subepidérmicas desde o início do desenvolvimento da corona no tubo floral e no primórdio do nectário (asterisco). (**C**) Sinal de hibridização intenso e uniforme nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da série externa (seta vermelha), dos filamentos dentiformes das séries internas (seta azul), do opérculo (seta preta) e no nectário (asterisco). (**D**) Intensidade de sinal manteve-se nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da série externa (seta vermelha), do opérculo (seta preta), do nectário (asterisco), do tapete (seta verde) e dos micrósporos e somente nas células epidérmicas dos filamentos das séries internas (seta azul). (**E**) Expressão forte de *PeWD40* nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos das séries mais externas (seta vermelha) e do nectário (asterisco), ficando restrita às células epidérmicas dos filamentos dentiformes das séries internas (seta azul) e do opérculo (seta preta). (**F**) Secção transversal do botão floral de 2,2 cm de comprimento com duas séries de filamentos filiformes hibridizados e presença de transcritos nas células epidérmicas e subepidérmicas da superfície abaxial das sépalas (seta preta) e nas células epidérmicas da superfície abaxial da pétala (seta vermelha). (**G**) Detalhe do sinal de hibridização nas células epidérmicas e em algumas células subepidérmicas dos filamentos filiformes mostrados em (**F**). (**H**) Secção transversal do ovário com expressão baixa de *PeWD40* nas paredes do ovário (seta branca) e nos óvulos (seta preta). (**I**) Presença de transcritos não foi visualizada no filamento da corona hibridizado com a sonda sense. **s:** sépala, **p:** pétala, **a:** antera, **c:** carpelo, **an:** androginóforo, **fi:** filamentos filiformes, **co:** corona, **op:** opérculo, **n:** nectário. Barras= 100 µm (**A, B, C, D, E, F, H, I**) e 50 µm (**G**).

Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos anteriormente na análise semi-quantitativa RT-PCR, mostrando expressão generalizada nos órgãos do perianto (sépala e pétala), corona, estames e a expressão fraca no pistilo.

A expressão do gene *PsMYB-R2R3* ao longo do desenvolvimento floral em *Passiflora suberosa* está ilustrada na Figura 23. A secção longitudinal do botão floral mostra a presença de transcritos de *PsMYB-R2R3* em diferentes órgãos como tépalas, androginóforo, ovários, óvulos, micrósporos, nectário e na corona, estrutura que compreende o opérculo na porção inferior do tubo floral, os filamentos filiformes da série externa e os filamentos menores com ápice capitado na série intermediária (Figura 23A).

Desde o início do desenvolvimento floral, a distribuição uniforme do sinal de hibridização foi observada na tépala, nas células dos primórdios dos filamentos filiformes da série externa (seta vermelha), do opérculo (seta preta), do nectário (asterisco), da base do androginóforo e micrósporos (seta verde, Figuras 23 B-C). Adicionalmente, a expressão foi visualizada no filamento menor indicada pela seta branca (Figura 23D). No estágio tardio de desenvolvimento, a expressão generalizada foi observada nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da coroa das duas séries, do opérculo, do ovário e óvulos (seta preta), da base do tubo floral (seta branca), da tépala e do nectário (asterisco). A expressão não foi detectada nas células da região superior da tépala (Figura 23E).

A Figura 23F apresenta a secção transversal do botão floral com 0,8 cm de comprimento, mostrando a expressão de *PsMYB-R2R3* nos filamentos filiformes da série externa e nos feixes vasculares do estame (seta). Figura 23G representa os filamentos filiformes da série externa com o sinal de hibridização nas células epidérmicas e subepidérmicas destacado na Figura 23F. A Figura 23H representa uma secção longitudinal equivalente àquela mostrada na Figura 23E hibridizada com sonda sense de *PsMYB-R2R3*, onde a presença de transcritos não foi visualizada.

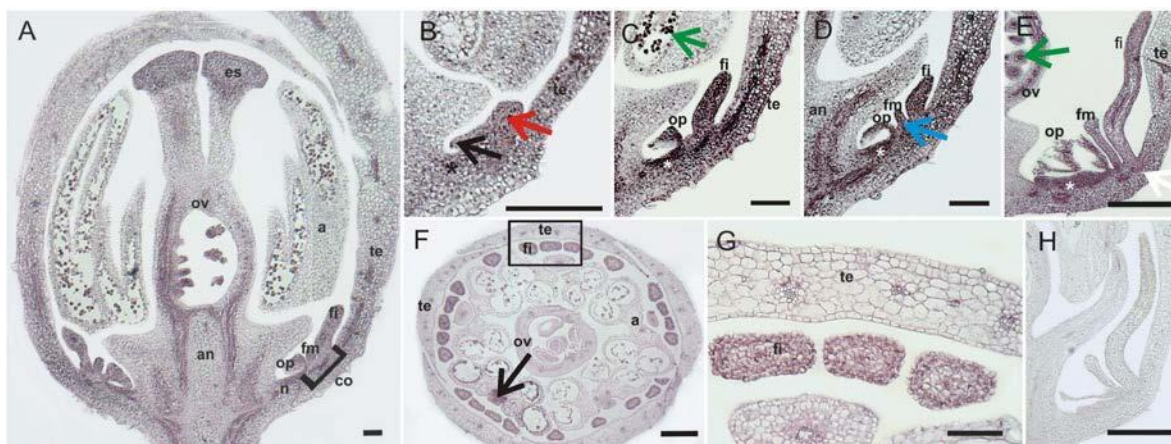


Figura 23. Análise da expressão espacial do gene *PsMYB-R2R3* por hibridização *in situ* em diferentes estágios do desenvolvimento floral em *Passiflora suberosa*. Secções longitudinais (A, B, C, D, E, H) e transversais (F, G). (A) Visão geral da expressão de *PsMYB-R2R3* no botão floral. (B) Sinal de hibridização uniforme durante emergência do filamento da série externa (seta vermelha) e do opérculo (seta preta) no tubo floral, no primórdio do nectário (asterisco) e na base da tépala. (C) Intensificação do precipitado no filamento externo da corona, no opérculo, no nectário (asterisco), na base da tépala e nos micrósporos (seta verde). (D) Sinal de hibridização intenso manteve-se em todas as células anteriormente detectado, estendendo-se às células do filamento menor (seta azul). (E) Desenvolvimento tardio da corona, expressão generalizada nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da corona das duas séries, do opérculo plicado, do nectário (asterisco), da base do tubo floral (seta branca), da tépala, do ovário e óvulos (seta verde). (F) Secção transversal do botão floral em estágio tardio de desenvolvimento com 0,8 cm de comprimento. (G) Detalhe dos filamentos filiformes da série externa mostrada em (F) com a presença de transcritos nas suas células epidérmicas e subepidérmicas. (H) Secção longitudinal equivalente àquela mostrada em (E) hibridizada com sonda sense. Não foi detectado sinal de hibridização. te: tépala, a: antera, es: estigma, ov: ovário, an: androginóforo, fi: filamentos filiformes, fm: filamentos menores com ápice capitado, co: corona, op: opérculo, n: nectário. Barras= 50 µm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do perfil de pigmentação nos filamentos da corona em espécies de *Passiflora*

Pigmentos são comumente encontrados em pétalas ou tépalas (Shang et al., 2010; Boase et al., 2010; Yamagishi, 2013; Qi et al., 2013). Entretanto, a síntese e o acúmulo de pigmentos também podem ser observados em outros órgãos florais como estames roxos que se destacam das tépalas amarelo-esverdeadas em *Stemona kerrii*, estames e anteras de coloração alaranjada que contrastam com as pétalas amarelo-esverdeadas de *Anigozanthos flavidus*, anteras pretas que se diferenciam dos estigmas e ovários verdes em *Tulipa armena*, anteras amarelas presentes em flores de coloração laranja na espécie *Caesalpinia pulcherrima* (Miller et al., 2009). No caso das espécies do gênero *Passiflora*, os diferentes padrões de pigmentação são principalmente exibidos nos filamentos da corona, estrutura localizada entre a pétala e o androginóforo, uma coluna que eleva os órgãos reprodutivos (Ulmer e MacDougal, 2004).

Dentre os cinco padrões de pigmentação floral identificados em *Passiflora* (Monte Bello, 2012), as espécies analisadas neste estudo caracterizam-se como padrão “*degradée*” (*P. edulis*, *P. suberosa* e *P. coccinea*) e “bandeado” (*P. alata* e *P. incarnata*). No caso do híbrido *P. ‘Lady Margaret’*, os filamentos apresentam um discreto bandejamento devido aos diferentes padrões “*degradée*” e “bandeado” dos respectivos parentais.

Em relação à caracterização do perfil de pigmentação nas espécies selecionadas para este estudo, antocianinas O-glicosiladas foram identificadas pelo fato de apresentarem uma fragmentação mais fácil de detectar a antocianidina e os possíveis glicosídeos ligados à molécula. Comparações entre os dados de separação dos compostos por UPLC e do padrão

de fragmentação por ESI-MS/MS provém importante informação estrutural para a identificação e caracterização das antocianinas em amostras que apresentam um complexo perfil de antocianinas (Nagy et al., 2009; Horai et al., 2010).

Espectros de massas dos outros picos indicaram a presença de demais compostos. Uma explicação provável é que antocianinas com açúcares ligados ao carbono (C-glicosiladas) também compõem a pigmentação da coroa, entretanto a análise desses respectivos espectros exige um estudo mais aprofundado. Outra explicação possível é que os filamentos da coroa podem apresentar outros flavonóides C-glicosilados, uma vez que os extratos de folhas e frutos de *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. alata* são comumente utilizados como fitoterápicos devido a sua ação ansiolítica, cuja propriedade é atribuída pela presença predominante das flavonas C-glicosiladas derivadas de apigenina e luteolina (Pereira et al., 2005; Zucolotto et al., 2011).

De acordo com os resultados obtidos, a variabilidade de cores exibida na coroa de *Passiflora* pode ser explicada parcialmente pela combinação de moléculas de antocianinas específicas acumuladas. As antocianinas identificadas na coroa das espécies analisadas derivaram de ramos diferentes da via metabólica (ver Figura 2).

P. edulis, *P. alata* e *P. incarnata* apresentaram antocianidinas de dois ramos distintos, correspondentes à cianidina e malvidina. Supostamente pela presença dos genes que codificam as enzimas F3'H e F3'5'H associado ao uso preferencial de dihidroquercetina e/ou dihidromiricetina como substrato para produção de outros derivados azul-arroxeados.

P. coccinea e *P. suberosa* apresentaram duas das três antocianidinas principais: cianidina e pelargonidina. Provavelmente, o ramo da delphinidina pode ter sido perdido nestas espécies ao decorrer da evolução como resultado de alguma mutação ao longo da via

metabólica e consequentemente, flores azuladas não são encontradas nestas espécies como nas espécies de rosa, cravo e *Ipomoea* (Holton e Tanaka, 1994; Rausher, 2008; Tornielli et al., 2009).

Diferentemente, o híbrido *P. 'Lady Margaret'* mostrou antocianidinas derivadas dos três ramos da via metabólica, resultado da combinação das antocianinas herdadas de seus parentais. Todas as antocianinas identificadas na corona de *P. incarnata* foram encontradas no híbrido, mas somente cianidina 3-O-glicosídeo identificada na corona de *P. coccinea* foi caracterizada na amostra do híbrido. Pelargonidina 3,5-O-diglicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, malvidina 3-O-glicosídeo e peonidina 3-O-glicosídeo foram exclusivamente identificadas na corona de *P. 'Lady Margaret'*. Porém, vale ressaltar que duas destas quatro antocianinas: cianidina 3-rutinosídeo e pelargonidina 3,5-O-diglicosídeo também foram identificadas neste estudo nas pétalas vermelhas de *P. coccinea*.

Adicionalmente, pode-se sugerir que a localização espacial e a proporção relativa de antocianinas específicas acumuladas nos vacúolos das células epidérmicas contribuem para a diversidade de pigmentação em *Passiflora*. Afinal, o perfil das antocianinas está correlacionado com a coloração final das flores como descrito em muitas outras espécies: petúnia (Ando et al., 1999), *Anagallis monelli* (Quintana et al., 2007), híbridos de *Lagerstroemia* (Zhang et al., 2008), azaléias (Mizuto et al., 2009), *Cleomeae* (Nozzolillo et al., 2010), *Muscari latifolium* (Qi et al., 2013).

Dessa forma, o efeito apresentado pela diferenciação de cores na corona bandeada em *P. alata* pode ainda ser explicado como resultado da combinação das diferentes moléculas de antocianinas identificadas neste estudo que compõem especificamente cada região do filamento associada à influência do pH celular previamente investigado (Monte Bello, 2012). O teste foi baseado na propriedade das antocianinas alterarem o espectro de

absorção e consequentemente a cor refletida em função da acidez ou alcalinidade do meio como resultado de modificações estruturais complexas nas moléculas de antocianinas (de Pascual-Teresa e Sanchez-Ballesta 2008). Em *Ipomoea tricolor* a variação de cor em diferentes regiões das tépalas é influenciada pelas diferenças do pH vacuolar (Yoshida et al. 2005, 2009a, b).

E ainda com base nos estudos realizados nas espécies-modelo petúnia e *Antirrhinum* (Quattrocchio et al., 1999; Schwinn et al., 2006; Shang et al., 2010), a hipótese da expressão diferencial dos genes estruturais e/ou regulatórios resultando na diversidade de distribuição de antocianinas ao longo da corona como o padrão bandeado observado em *P. alata* não pode ser desconsiderada.

Considerando os resultados obtidos do padrão de fragmentação das antocianinas caracterizadas em *Passiflora* pode-se constatar que a glicose foi o açúcar prevalente ligado às antocianidinas nos extratos de filamentos da corona. Convém ressaltar que o tempo de retenção, parâmetro baseado na hidrofobicidade da molécula, é influenciado pelo grau de glicosilação, de metilação e pela natureza dos açúcares presentes nesses pigmentos (Barnes et al., 2009). Portanto, de acordo com os tempos de retenção e, consequentemente, a ordem de eluição, pode-se inferir os tipos de antocianinas presentes nos extratos, entretanto o padrão de fragmentação ainda permite uma maior informação sobre a estrutura molecular.

5.2. Análise morfológica da epiderme dos filamentos da corona em *P. edulis*, *P. suberosa* e *P. coccinea*

Baseado nas informações da literatura e na análise morfológica da epiderme dos filamentos da corona pode-se sugerir que as células cônicas na base da corona de *P. edulis* proporcionam um aumento do efeito da coloração, possibilitando o direcionamento do

inseto para os órgãos reprodutivos, portanto funcionando como um “guia visual”. Adicionalmente, as células cônicas de ambas as regiões (pigmentada e não-pigmentada) podem também funcionar como um “guia tátil” para o direcionamento ao néctar e aos órgãos reprodutivos.

Em *P. suberosa*, as células epidérmicas com cutícula ornamentada na base dos filamentos menores e as células papilares do opérculo fimbriado pigmentado podem funcionar como um sinal visual, enquanto as células poliédricas dos filamentos externos podem servir como apoio para a atividade de forrageamento e contribuir para a polinização.

Provavelmente em *P. coccinea*, somente as extremidades apicais dos filamentos com as células ligeiramente cônicas refletem mais eficientemente a luz ressaltando a intensidade da coloração, funcionando como sinal visual para os beija-flores. Por outro lado, a região não-pigmentada dos filamentos com células planas aparentemente não é funcionalmente importante como superfície de apoio, uma vez que as aves não precisam de plataforma de pouso (Fenster et al., 2004).

5.3. Identificação e caracterização dos genes potencialmente envolvidos na via biossintética das antocianinas em *P. edulis* e em *P. suberosa*

A terceira parte deste estudo focou-se na identificação e na análise do padrão de expressão espacial e temporal de alguns genes estruturais e fatores de transcrição envolvidos na biossíntese e no transporte de antocianinas em *P. edulis* e em *P. suberosa*.

Chalcona sintase é considerada enzima-chave na biossíntese de antocianinas, flavonóis, isoflavonóides e taninos condensados, desempenhando diversas funções na planta como proteção UV, defesa contra patógenos, síntese de pigmentos e fertilidade do pólen (Durbin et al., 2000; Koduri et al., 2010). Chalcona sintase (CHS) é codificada pela

família policetídeo sintase ou PKS (do inglês polyketide synthase). Genes pertencentes à família da CHS foram descritos em *Azotobacter vinelandii* e *Neurospora crassa* (Funa et al., 2006; 2007), indicando que as funções de CHS podem ter divergido anteriormente às plantas.

Análises filogenéticas indicaram que duas chalconas sintases identificadas em *Passiflora* foram agrupadas no clado denominado chalcona sintase antera-específica. De acordo com a literatura, transcritos de chalcona sintase foram detectados nas células do tapete durante o estágio de micrósporo em *Silene latifolia* e em trigo (*Triticum* sp), indicando uma importante função no desenvolvimento da antera e fertilidade do pólen (Ageez et al., 2005; Wu et al, 2008).

As três proteínas remanescentes de *Passiflora* foram reunidas no clado-irmão juntamente com outras chalconas sintases, dentre elas as proteínas CHSA e CHSJ identificadas em tecidos florais e envolvidas na pigmentação floral em *Petunia* (Koes et al., 1989; Nakatsuka et al., 2007).

O alinhamento da sequência de aminoácidos de dihidroflavonol 4-redutase de *P. edulis* com DFRs de outras plantas foi baseado nas análises filogenéticas realizadas por Shimada et al. (2005). Segundo Johnson et al. (2001), a presença de um único aminoácido é essencial para a atividade da enzima. Em *P. edulis*, a sequência do gene codificador para a dihidroflavonol 4-redutase tem um ácido aspártico (Asp) na posição 134 como petúnia e *Populus*. De tal forma, enzimas DFR que apresentam o ácido aspártico (Asp) nesta posição não conseguem utilizar dihidrokaempferol como substrato para produzir pelargonidina (Nakatsuka et al., 2007; 2009).

Diferentemente, uma asparagina (Asn) na mesma posição foi observada nas proteínas DFRs de *Gerbera hybrida*. Alguns genótipos de *Gerbera* são capazes de utilizar

os três possíveis dihidroflavonóis: dihidrokaempferol (DHK), dihidromiricetina (DHM) e/ou dihidroquercetina (DHQ) como substrato das enzimas DFRs e consequentemente, flores alaranjadas a azuladas são encontradas (Helariutta et al., 1993; Nakatsuka et al., 2007; 2009).

De acordo com os resultados obtidos por espectrometria de massas neste estudo, pelargonidina não foi identificada no extrato de *P. edulis* e associada à presença do aminoácido ácido aspártico na posição 134 na sequência dihidroflavonol 4-redutase pode-se sugerir que esta espécie também não produz flores vermelho-alaranjadas porque é incapaz de usar dihidrokaempferol como substrato para produzir pelargonidina.

Apesar da expressão fraca de *PeDFR* observada nas células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos de *P. edulis* pode-se dizer que ela está em concordância com o acúmulo de pigmentos nos filamentos da coroa ao longo do desenvolvimento floral e portanto indicaria uma regulação tecido-específica deste gene.

Por outro lado, a discrepância de expressão do respectivo gene em órgãos não-pigmentados como caule, raiz, folha jovem e em botão floral não-pigmentado poderia sugerir que a transcrição de *PeDFR* está envolvido na síntese de outros flavonóides incolores. Sabe-se que DFR catalisa a redução de dihidroflavonol à incolor leucocianidina, comum precursor para antocianinas e proantocianidinas (Mol et al., 1998; Davies et al., 2012; Tereschenko et al., 2013). Recentemente, proantocianidinas foram identificadas em extratos foliares de *P. coccinea* e *P. alata* relacionadas à sua atividade antifúngica (Sakalem et al., 2012; Vasic et al., 2012).

As proantocianidinas emergiram com as primeiras plantas vasculares como função protetora contra agentes herbívoros e fungos, enquanto as antocianinas foram identificadas mais tarde coincidindo com o aparecimento das angiospermas conforme bem documentadas

na atração de polinizadores e dispersores de sementes (Koes et al., 1994). Presumivelmente, as diferentes enzimas e os respectivos genes envolvidos na via metabólica dos flavonóides apareceram em diferentes tempos de acordo com a sua funcionalidade na planta e desta forma seria prematuro dizer a função específica de *DFR* em *Passiflora*.

Para a análise filogenética das glicosiltransferases identificadas no PASSIOMA, a classificação destas enzimas foi baseada segundo Kovinick e colaboradores (2010). As duas glicosiltransferases de *Passiflora* foram agrupadas no clado correspondente às glicosiltransferases que mostraram preferência a múltiplos flavonóides como substratos.

Entretanto, a especificidade do substrato da enzima glicosiltransferase e nem a função *in vivo* podem ser previstas exclusivamente baseadas nas semelhanças de sequências de aminoácidos. Porém com base nas informações obtidas pelo padrão de fragmentação por ESI-MS/MS e por comparação com os padrões, as glicosilações ocorreram nas posições 3' ou 3' e 5' das antocianidinas, podendo indicar que o gene *PeGT*, cujo o padrão de expressão espacial e temporal foi observado neste estudo codifica uma enzima flavonóide-3-O-glicosiltransferase ou flavonóide-5-O-glicosiltransferase.

Adicionalmente, um aumento da expressão de *PeGT* observado ao longo do desenvolvimento da coroa de *P. edulis* foi correlacionado com o acúmulo de antocianinas nos filamentos e condizente com a atividade da enzima glicosiltransferase na estabilidade das antocianinas e responsável pela intensidade da coloração.

Chen e colaboradores (2011) verificaram um aumento gradual e significativo da expressão espacial e temporal do gene *PeF3GT* que codifica a enzima flavonóide-3-O-glicosiltransferase associado com o acúmulo de pigmentação nos diferentes estágios florais de *Phalaenopsis equestris*, desempenhando um papel crucial na formação da coloração floral nesta espécie.

O nível elevado de transcritos do respectivo gene também foi correspondente com o acúmulo de antocianinas em estágios tardios de desenvolvimento dos frutos de maçã, morango e lichia conferindo maior estabilidade às moléculas de antocianinas e intensidade na coloração dos frutos (Given et al., 1988; Ju et al., 1995; Zhao et al., 2012).

Glutathione S-transferases (GSTs) são proteínas multifuncionais codificadas por uma família gênica grande presentes em todos os organismos multicelulares (Lan et al., 2010). Estas enzimas e proteínas carreadoras específicas da família MATE presentes na membrana vacuolar são indispensáveis para o transporte das antocianinas do citosol para os vacúolos das células epidérmicas (Sun et al., 2012, Saito et al., 2013).

Segundo Dixon e colaboradores (2002), as GSTs podem ser classificadas em quatro classes com base na identidade das sequências de aminoácidos: phi, tau, theta, and zeta. As duas primeiras são específicas às plantas, enquanto theta e zeta são compartilhadas por plantas e animais. No caso de animais, as GSTs estão envolvidas no metabolismo e desintoxicação de xenobióticos (Wilce e Parker, 1994).

Três sequências de *Passiflora* identificadas neste estudo podem ser consideradas do tipo GST I como PhAN9 (*Petunia*) e AtTT19 (*Arabidopsis*), proteínas envolvidas exclusivamente no transporte de antocianinas (Alfenito et al., 1998; Kitamura et al., 2004; Sun et al., 2012). A quarta putativa glutathione S-transferase de *Passiflora* foi agrupada com as três sequências de cravo (*Dianthus caryophyllus*) do tipo GST II, que estão relacionadas à senescência das flores em resposta ao etileno (Meyer et al., 1991; Itzhaki et al., 1994). E a última representa o tipo GST III com função similar à GST I no sequestro de compostos, incluindo antocianinas (Alfenito et al., 1998).

Diante dessas observações, as GSTs de *Passiflora* foram identificadas como tipo I (phi), II (zeta) e III (tau). Pelo menos quatro GSTs podem ser recrutadas para o transporte

das antocianinas, enquanto a quinta GST provavelmente está relacionada a outro processo biológico associado ao desenvolvimento floral como observado em espécies de cravo (Meyer et al., 1991; Itzhaki et al., 1994). Entretanto, o mecanismo preciso de transporte de antocianinas em *Passiflora* ainda permanece desconhecido.

Numerosos estudos focaram na importância dos fatores de transcrição MYB com os domínios R2R3 envolvidos em diferentes processos bioquímicos e fisiológicos durante o desenvolvimento da planta (Martin and Paz-Ares, 1997; Jin and Martin, 1999; Quattrocchio et al., 1999; Schwinn et al., 2006; Shang et al., 2010). Dentre eles, a regulação do metabolismo de compostos secundários, o controle da morfogênese celular, da formação do meristema, do ciclo celular e do desenvolvimento de flores e sementes, além de respostas de defesa a estresses abióticos ou bióticos tais como exposição ultravioleta, hormônios, seca ou herbivoria (Martin e Paz-Ares 1997; Kranz et al. 2000; Gould, 2004; Schwinn et al., 2006; Shang et al., 2010; Dubos et al. 2010; Heppel et al., 2013).

Relações filogenéticas das proteínas MYB-R2R3 indicaram que a sequência de *PsMYB-R2R3* foi posicionada com as proteínas PhPH4 de petúnia, VvMYB5a e VvMYB5b de uva e curiosamente com a proteína ZmC1 de milho, uma monocotiledônea.

Como descrito na introdução deste trabalho, a proteína ZmC1 interage com proteínas bHLHs e WD40 para a ativação de todos os genes da via metabólica dos flavonóides em milho, incluindo aqueles envolvidos na síntese de antocianinas nas anteras e folhas do milho (Hernandes et al., 2004). PhPH4 é expressa na epiderme de pétalas e regula a acidificação do vacúolo em petúnia, interferindo na coloração final da flor (Quattrocchio et al., 2006). VvMYB5a regula a biossíntese de proantocianidinas nas sementes e VvMYB5b controla a produção e o acúmulo de proantocianidinas e antocianinas durante todo o desenvolvimento do fruto em uvas (Deluc et al., 2006; 2008).

Portanto, sugere-se que o gene *MYB-R2R3* pode ter sido recrutado para desempenhar ambas as funções durante a evolução do gênero *Passiflora*. Por exemplo, a biossíntese de proantocianidinas e antocianidinas é espacialmente coexistente nas células epidérmicas das pétalas de *Trifolium repens* com um padrão temporal concomitante dos genes de ambas as vias em flores parcialmente abertas (Abeynayake et al., 2012).

E ainda considerando a regulação diferencial do complexo transcricional MYB-bHLH-WD40 em diversos processos fisiológicos entre as espécies vegetais, supõe-se que a proteína PsMYB-R2R3 depende de parceiros distintos para regular o metabolismo de cada classe de flavonóide em órgãos diferentes. Além disso, poderia desempenhar uma função na acidificação do vacúolo celular e consequentemente regular a coloração final dos filamentos da coroa como descrito em petúnia.

Do mesmo modo, a expressão ampla de *PsMYB-R2R3* observada em alguns órgãos vegetativos (raiz, caule, folha adulta, ápice reprodutivo), no botão floral não-pigmentado e nos filamentos filiformes não-pigmentados da coroa pode ser justificada pelo fato da necessidade de recrutamento desta proteína regulatória, sozinha ou em combinação com outras proteínas, no controle de processos fisiológicos específicos. Enquanto, a presença de transcritos do respectivo gene em folhas adultas deve-se ao acúmulo de antocianinas observado na epiderme da superfície abaxial e/ou adaxial (Barp et al., 2006), um indicativo da regulação gênica tecido-específica da síntese de antocianinas em *P. suberosa*.

Evidências apontam para os fatores de transcrição MYB-R2R3 como os principais responsáveis pela variação natural de pigmentação em flores de petúnia e *Antirrhinum* (Quattrocchio et al., 1999; Schwinn et al., 2006; Shang et al., 2010). De fato, estas proteínas regulatórias ativam diferentemente a transcrição dos diversos genes estruturais envolvidos na fase inicial ou tardia da via das antocianinas.

Embora o padrão de expressão de MYB-R2R3 não tenha sido analisado em *P. edulis*, espera-se que este fator de transcrição desempenha papel crucial na pigmentação em *Passiflora*, especialmente nas espécies do subgênero *Passiflora* que apresentam uma variabilidade maior nos padrões de pigmentação na corona (Ulmer e MacDougal, 2004).

As proteínas com domínio WD40 são conservadas em diferentes organismos e representam proteínas regulatórias envolvidas em uma variedade de processos como controle do ciclo celular, transdução de sinal, processamento e síntese de RNA, tráfego vesicular, apoptose (Neer et al., 1994). Em plantas elas estão relacionadas a múltiplos processos fisiológicos, incluindo a regulação da síntese de antocianinas e proantocianidinas junto com os fatores de transcrição MYB e bHLH (de Vetten et al., 1997; Mol et al., 1998; Ramsay e Glover, 2005; Brueggemann et al., 2010; Davies et al., 2012). Assim seria prematuro sugerir as funções precisas que a proteína WD40 pode realizar em *Passiflora*, uma vez que o gene *PeWD40* mostrou uma expressão generalizada nos órgãos vegetativos e florais analisados no experimento de RT-PCR.

Como descrito anteriormente, a proteína WD40 TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) de *Arabidopsis* está envolvida na biossíntese de antocianinas e na formação de tricomas em folhas, pigmentação do tegumento e produção da mucilagem na semente (Nesi et al., 2001; Zhang et al., 2003; Gonzalez et al., 2008). Enquanto, MdTTG1, proteína ortóloga à TTG1 de *Arabidopsis*, é necessária para a ativação de proantocianidinas nos frutos de maçã (*Malus x domestica*, Brueggemann et al., 2010). Por outro lado, a proteína WD40 isolada de *Medicago truncatula* (MtWD40-1) está envolvida com a síntese tecido-específica de antocianinas e proantocianidinas, porém não é funcionalmente importante para o desenvolvimento de tricomas (Pang et al., 2009).

Por isso, a expressão alta de *PeWD40* observada nos filamentos da corona na hibridização *in situ* poderia indicar a participação desta proteína no controle transcricional da via biossintética das antocianinas em combinação com os genes regulatórios *MYB* e *bHLH*, considerando que a característica comum das proteínas WD40 é facilitar a interação proteína-proteína entre estes fatores de transcrição para a formação do complexo MBW (Ramsay e Glover, 2005).

Sompornpailin et al. (2002) identificaram uma proteína WD40 responsável pelo acúmulo de antocianinas em folhas de *Perilla frutescens*. Igualmente, a proteína PgWD40 está envolvida na regulação da síntese de antocianinas durante o desenvolvimento do fruto de romã (*Prunus granatum*, Bem-Simhon et al., 2011).

A biossíntese de antocianinas ocorre durante o desenvolvimento das pétalas na maioria das angiospermas, com o aumento gradual da expressão das enzimas envolvidas na via biossintética ao longo da formação da coloração nas flores, principalmente durante a expansão celular (Jackson et al., 1992, Martin e Gerats, 1993).

Neste estudo, o padrão de expressão espacial ao longo do desenvolvimento floral foi muito similar para todos os genes analisados. A presença de transcritos foi visualizada desde o início da formação da corona em *P. edulis* e *P. suberosa*, sugerindo que muitas das enzimas envolvidas na biossíntese de antocianinas são provavelmente induzidas precocemente no desenvolvimento do botão floral quando a pigmentação ainda está ausente. Entretanto, seria prematuro sugerir como o fator de transcrição MYB e a proteína WD40 modulam a transcrição da biossíntese de antocianinas e controlam a formação dos diferentes padrões de pigmentação na corona de *Passiflora*.

Apesar dos estames não apresentarem pigmentação nas espécies analisadas neste estudo, os micrósporos e principalmente as células do tapete mostraram expressão alta

independentemente dos genes analisados. Uma possível explicação é a presença de flavonóis como proteção à radiação UV (Gould e Lister, 2006). Estes compostos secundários são importantes para o desenvolvimento normal do tubo polínico e consequentemente para a fertilidade masculina (Ylstra et al., 1992, 1994). Constatação semelhante poderia ser sugerida para a expressão elevada dos genes analisados no nectário floral, sendo que recentemente apigenina, uma flavona, foi identificada no néctar de *P. alata* e *P. edulis* (Cardoso-Gustavson et al., 2013). Experimentos adicionais de identificação e quantificação total dos flavonóides em outros órgãos florais poderiam confirmar a presença de outros flavonóides, além das antocianinas.

Este estudo apresentou as primeiras informações sobre o perfil das antocianinas e a identificação de alguns genes envolvidos na pigmentação dos filamentos da corona de flores de *Passiflora*. Mediante estas informações, outras possíveis abordagens poderão ser utilizadas para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese das antocianinas e na formação dos diferentes padrões de pigmentação observados principalmente na corona das flores de *Passiflora* e que poderiam explicar as diferenças que atuam na atração dos polinizadores ao longo da história evolutiva do gênero.

6. CONCLUSÃO

Este estudo apresentou o perfil de antocianinas O-glicosiladas na corona de *Passiflora* por meio de uma técnica precisa e confiável (UPLC-ESI-MS/MS). Os resultados indicaram que a diversidade de pigmentação observada nas flores do gênero *Passiflora* deve-se à combinação de moléculas específicas de antocianinas acumuladas nos vacúolos das células epidérmicas e subepidérmicas dos filamentos da corona.

As partes pigmentadas e não-pigmentadas dos filamentos da corona das espécies de *Passiflora* analisadas possuem morfologia celular da epiderme diferenciada e pode funcionar como guia visual e tátil para os polinizadores.

A análise *in silico* das sequências de ESTs obtidas do banco de dados PASSIOMA representou os primeiros passos para a compreensão da biossíntese de antocianinas em *Passiflora* e que poderiam explicar as diferenças nas preferências dos polinizadores encontrados no gênero. Comparações das 15 sequências deduzidas de aminoácidos encontradas na biblioteca de cDNAs de duas distintas espécies *P. edulis* e *P. suberosa* apresentaram grande similaridade com genes que codificam elementos-chave envolvidos na biossíntese (8 sequências), na regulação da transcrição (2 sequências) e no transporte das moléculas de antocianinas (5 sequências).

A determinação da expressão temporal e espacial de dois genes estruturais (*PeDFR* e *PeGT*) e dois reguladores transcricionais (*PeWD40* e *PsMYB-R2R3*) pode contribuir para a compreensão dos mecanismos da biossíntese de antocianinas em *Passiflora*.

Este trabalho forneceu bases e contribuirá para a compreensão de como os agentes polinizadores moldaram o genoma das espécies do gênero *Passiflora* em relação aos genes envolvidos na síntese e modulação do acúmulo de antocianinas.

7. REFERÊNCIAS

- Aaby K, Ekeberg D, Skrede G (2007) Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. **Journal Agricultural Food Chemistry** **55**: 4395-4406
- Abeynayake SW, Panter S, Chapman R, Webster T, Rochfort S, Mouradov A, Spangenberg G (2012) Biosynthesis of Proanthocyanidins in White Clover Flowers: Cross Talk within the Flavonoid Pathway. **Plant Physiology** **158**: 666-678
- Ageez A, Kazama Y, Sugiyama R, Kawano S (2005) Male fertility genes expressed in male flower buds of *Silene latifolia* include homologs of anther-specific genes. **Genes and Genetic Systems** **80**: 403-413
- Aizza, LCB (2010) Desenvolvimento da corona em flores do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). Universidade Estadual de Campinas
- Aizza LCB, Dornelas MC (2011) A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in passionflowers. **Journal of Nucleic Acids** **2011**: 1-17
- Alfenito MR, Souer E, Goodman C et al. (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. **Plant Cell** **10**: 1135-1149
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** **215**: 403-410
- Ando T, Saito N, Tatsuzawa F, Kakefuda T, Yamakage K, Ohtani E, Koshi-Ishi M, Matsusake Y et al. (1999) Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae), **Biochemical System Ecology** **27**: 623-650
- Aza-González C, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2012) Molecular Biology of Chili Pepper Anthocyanin Biosynthesis. **Journal Mexican Chemical Society** **56**: 93-98
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T (2007) Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. **Plant Cell Physiology** **48**: 958-970
- Barnes JS, Nguyen HP, Shen S, Schug KA (2009) General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** **1216**: 4728-4735
- Barp EA, Soares GLG, Gosmann G, Machado AM, Vecchi C, Moreira GRP (2006) Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. **Brazilian Journal of Biology** **66**: 853-862

Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L (2004) *TT2*, *TT8*, and *TTG1* synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** **39**: 366-380

Baumann K, Perez-Rodriguez M, Bradley D, Venail J, Bailey P, Jin H, Koes R, Roberts K, Martin C (2007) Control of cell and petal morphogenesis by R2R3 MYB transcription factors. **Development** **134**: 1691-1701

Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, Gerats AGM (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. **Plant Molecular Biology** **13**: 491-502

Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Nadler-Hassar T, Trainin T, Bar-Ya'akov I, Borochoy-Neori H, Holland D (2011) A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40-repeat gene is a functional homologue of *Arabidopsis* *TTG1* and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development. **Planta** **234**: 865-81

Billot J (1974) Pigments anthocyaniques des fleurs de *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry** **13**: 2886

Boase MR, Lewis DH, Davies KM, Marshall GB, Patel D, Schwinn KE, Deroles SC (2010) Isolation and antisense suppression of flavonoid 3'5'-hydroxylase modifies flower pigments and color in cyclamen. **BMC Plant Biology** **10**: 107-119

Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. **Plant Physiology** **111**: 1059-1066

Bogs J, Jaffe FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP (2007) The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. **Plant Physiology** **143**: 1347-1361

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

Brockington SF, Alvarez-Fernandez R, Landis JB, Alcorn K, Walker RH, Thomas MM, Hileman LC, Glover BJ (2012) Evolutionary analysis of the *MIXTA* gene family highlights potential targets for the study of cellular differentiation. **Molecular Biology Evolutionary** **30**: 526-540

Brueggemann J, Weisshaar B, Sagasser (2010) A WD40-repeat gene from *Malus × domestica* is a functional homologue of *Arabidopsis thaliana* *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*. **Plant Cell Reports** **29**: 285-294

Cardoso-Gustavson P, Andreazza NL, Sawaya ACHF, Castro MM (2013) Only attract ants? The Versatility of Petiolar Extrafloral Nectaries in *Passiflora*. **American Journal of Plant Sciences** **4**: 460-469

Carey CC, Strahle JT, Selinger DA, Chandler VL (2004) Mutations in the pale aleurone color1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** **16**: 450-464

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

Chen WH, Hsu CY, Cheng HY, Chang Y, Chen HH, Ger (2011) Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*. **Plant Cell Report** **30**: 1007-1017

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

Clegg MT, Durbin ML (2000) Flower color variation: A model for the experimental study of evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **97**: 7016-7023

Clegg MT, Durbin ML (2003) Tracing floral adaptations from ecology to molecules. **Nature** **4**: 206-215

Crepet WL, Niklas KJ (2009) Darwin's second "abominable mystery": Why are there so many angiosperms species? **American Journal of Botany** **96**: 366-381

Christensen K, Hansen H (1998) SEM studies of epidermal patterns of petals in the angiosperms. **Opera Botanica** **135**: 1-91

Cominelli E, Gusmaroli G, Allegra D, Galbiati M, Wade HK, Jenkins GI, et al. (2008) Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. **Journal Plant Physiology** **165**: 886-94

Cone KC, Burr FA, Burr B (1986) Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **83**: 9631-9635

Cutanda-Perez MC, Ageorges A, Gomez C, Vialet S, Terrier N, Romieu C, Torregrosa L (2009) Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. **Plant Molecular Biology** **69**: 633-648

Cutri L, Dornelas MC (2012) PASSIOMA: Exploring expressed sequence tags during flower development in Passiflora spp. **Comparative and Functional Genomics**: 1-11

Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris NN, Walker AR, Robinson SP, Bogs J (2009) The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. **Plant Physiology** **151**: 1513-1530

Davies KM, Bradley JM, Schwinn KE, Markham KR, Podivinsky E (1993) Flavonoid biosynthesis in flower petals of five lines of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise). **Plant Science** **95**: 67-77

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

Davies K (2009) Plant pigments and their manipulation: An introduction to plant pigments in biology and commerce. **Annual Plant Reviews** **14**: 49-83

Davies KM, Albert NW, Schwinn KE (2012) From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower coloration and mechanisms for pigmentation patterning. **Functional Plant Biology** **39**: 6190-38

de Brito ES, Araújo MCP, Alves RE, Carkeet C, Clevidence BA, Novotny JA (2007) Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **55**: 9389-9394

de Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballestra, MT (2008) Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry Review** **7**: 281-299

Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde JP, Merillon JM, Hamdi S (2006) Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. **Plant Physiology** **140**: 499-511

Deluc L, Bogs J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon JM, Robinson SP, Barrieu F (2008) The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. **Plant Physiology** **147**: 2041-2053

de Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (1997) The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. **Genes and Development** **11**: 1422-1434

de Vlaming P, Scram AW, Wiering H (1983) Genes affecting flower colour and pH of flower limb homogenates in *Petunia hybrida*. **Theoretical Applied Genetics** **66**: 271-278

Dixon DP, Laphorn A, Edwards R (2002) Plant glutathione transferases. **Genome Biology** **3**: 1-10

Dornelas MC, Wittich P, von Recklinghausen I, van Lammeren A, Kreis M (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. **Plant Molecular Biology** **39**: 137-147

Dornelas MC, Van Lammeren AAM, Kreis Martin (2000) *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. **Plant Journal** **21**: 419-429

Dornelas MC, Tsai SM, Rodriguez APM (2006) Expressed sequence tags of genes involved in the flowering process of *Passiflora* spp. In: Jaime A. Teixeira da Silva. (Org.). Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Londres: **Global Science Books 1**: 483-488

Durbin ML, McCaig B, Clegg MT (2000) Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. **Plant Molecular Biology 42**: 79-92

Elomma P, Mehto M, Kotilainen M, Helariutta Y, Nevalainen L, Teeri TH (1998) A bHLH transcription factor mediates organ region and flower type specific signals on dihydroflavonol-4-reductase (dfr) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrid* (Asteraceae). **Plant Journal 16**: 93-99

Elomaa P, Uimari A, Mehto M, Albert VA, Laitinen RAE, Teeri TH (2003) Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots. **Plant Physiology 133**: 1831-1842

Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC (2007) Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. **Plant Journal 49**: 414-427

Faegri K, van der Piel, L (1979) Principles of pollination ecology, 3 edn. Pergamon: Oxford

Faria AF, Marques MC, Mercadante AZ (2011) Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry 126**: 1571-1578

Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. **Plant Journal 66**: 94-116

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

Ferrer JL, Austin MB, Stewart Jr C, Noel JP (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry 46**: 356-370

Fischer E, Leal IR (2006) Effect of nectar secretion rate on pollination success of *Passiflora coccinea* (Passifloraceae) in the Central Amazon. **Brazil Journal Biology 66**: 747-754

Friedman WE (2009) The meaning of Darwin's "Abominable Mystery". **American Journal of Botany 96**: 5-21

Funa N, Ozawa H, Hirata A, Horinouchi S (2006) Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103**: 6356-6361

Funa N, Awakawa T, Horinouchi S (2007) Pentaketide resorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from *Neurospora crassa*. **The Journal of Biological Chemistry** **282**: 14476-14481

Giusti MM, Rodriguez-Saona LE, Griffin D, Wrolstad RE (1999) Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **47**: 4657-4664

Given Nk, Venis NA, Gfiersen D (1988) Phenylalanine ammonialyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. **Plant Physiology** **133**: 25-30

Glover BJ, Martin C (1998) The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. **Heredity** **80**: 778-784

Goff SA, Klein TM, Roth BA, Fromm ME, Cone KC, Radicella JP, Chandler VL (1990) Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B regulatory genes into maize tissues. **EMBO Journal** **9**: 2517-2522

Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Journal** **53**: 814-827

Gorton HL, Vogelmann TC (1996) Effects of epidermal cell shape and pigmentation on optical properties of *Antirrhinum* petals at visible and ultraviolet wavelengths. **Plant Physiology** **112**: 879-888

Gould KS (2004) Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. **Journal of Biomedicine & Biotechnology** **5**: 314-320

Gould KS, Lister C (2006) Flavonoid functions in plants. Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications (ed. By O.M. Andersen and K.R. Markham), pp. 397-441. Taylor and Francis, Boca Raton, FL

Griesser M, Vitzthum F, Fink B, Bellido ML, Raasch C, Muñoz-Blanco J, Schwab W (2008) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria × ananassa*) achene and receptacle. **Journal Experimental Botany** **59**: 2611-2625

Grotewold E, Drummond BJ, Bowen B, Peterson T (1994) The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. **Cell** **76**: 543-55

Grotewold E, Sainz MB, Tagliani L, Hernandez, JM, Bowen B, Chandler, VL (2000) Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **97**: 13579-13584

Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annual Review of Plant Biology** **57**: 761- 780

Halbwirth H (2011) The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. **International Journal Molecular Sciences** **11**: 595-621

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

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** **41**: 95-98

Hanhineva K, Rogachev I, Kokko H, Mintz-Oron S, Venger I, Kärenlampi S, Aharoni A (2008) Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. **Phytochemistry** **69**: 2463-2481

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

Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM (2007) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **53**: 2928-2935

Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, Seppänen P, Teeri TH (1993) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4- reductase (*DFR*) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). **Plant Molecular Biology** **22**: 183- 193

Heller W, Forkmann G, Britsch L, Grisebach H (1985) Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3,4- cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. **Planta** **165**: 284- 287

Hernandez JM, Heine GF, Irani NG, Feller A, Kim, M-G, Matulnik T, Chandler VL, Grotewold E (2004) Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor C1. **The Journal of Biological Chemistry** **279**: 48205- 48213

Heppel SC, Jaffe FW, Takos AM, Schellmann S, Rausch T, Walker AR, Bogs J (2013) Identification of key amino acids for the evolution of promoter target specificity of anthocyanin and proanthocyanidin regulating MYB factors. **Plant Molecular Biology** **82**: 457-471

Hileman LC, Irish VF (2009) More is better: the uses of developmental genetic data to reconstruct perianth evolution. **American of Journal Botany** **96**: 83-95

Hichri I, Heppel SC, Pillet J, Leon C, Czemmél S, Delrot S, Lauvergeat V, Bogs J (2010) The basic helix–loop–helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. **Molecular Plant** **3**: 509-523

Hoballah ME, Gubitzi T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell’Olivo A, Arnold M, Kuhlemeier C (2007) Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. **Plant Cell** **19**: 779-790

Holton TA, Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell** **7**: 1071-1083

Holton TA, Tanaka Y (1994) Blue roses-a pigment of our imagination? **Trends Biotechnology** **12**: 40-42

Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K et al. (2010) MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry** **45**: 703-714

Huang X, Madan A (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research** **9**: 868-877

Irani NG, Grotewold E (2005) Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. **BMC Plant Biology** **5**: 7-22

Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR (1994) An ethylene responsive enhancer element is involved in the senescence related expression of the carnation glutathione-S-transferase (*GST1*) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **91**: 8925-8929

Jackson D, Roberts K, Martin C (1992) Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. **Plant Journal** **2**: 425-434

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

Jin H, Martin C (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. **Plant Molecular Biology** **41**: 577-585

Johnson ET, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H, Choi G (2001) Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. **Plant Journal** **25**: 325-333

Jonsson LMV, Aarsman MEG, Poulton JE, Schram AW (1984) Properties and genetic control of four methyltransferases involved in methylation of anthocyanins in flowers of *Petunia hybrida*. **Planta** **160**: 174-179

Ju ZG, Liu CL, Yuan YB (1995) Activities of chalcone synthase and UFGA1: flavonoid-3-O-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple. **Science Horticultural** **63**: 175-185

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

Kay QON, HS Daoud, CH Stirton (1981) Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. **Botanical Journal of the Linnean Society** **83**:57-84

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

- Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal S, Waters EJ, Jones GP (2001) Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **49**: 5348-5355
- Kevan PG, MA Lane (1985) Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **82**: 4750-4752
- Kidoy L, Nygar AM, Andersen OM, Aksnes DW, Kiremire BT (1997) Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. **Journal of Food composition and analysis** **10**: 49-54
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. **Science** **304**: 982
- Koduri PKH, Gordon GS, Barker EI, Colpitts CC, Ashton NW, Suh DY (2010) Genome-wide analysis of the chalcone synthase superfamily genes of *Physcomitrella patens*. **Plant Molecular Biology** **72**: 247-263
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays** **16**: 123-132
- Koes K, Verweij W, Quattrocchio F (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends in Plant Science** **10**: 236-242
- Koschnitzke C, Sazima M (1997) Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica** **20**: 119-126
- Kovinich N, Saleem A, Arnason JT, Miki B (2010) Functional characterization of a UDP-glucose:flavonoid 3-O- glucosyltransferase from the seed coat of black soybean (*Glycine max* (L. Merr.)). **Phytochemistry** **71**: 1253-1263
- Kranz H, Scholz K, Weisshaar B. (2000) *C-MYB* oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. **Plant Journal** **21**: 231-235
- Lan T, Yang ZL, Yang X, Liu YJ, Wang XR, ZengQY (2010) Extensive functional diversification of the *Populus* Glutathione S-Transferase Supergene Family. **Plant Cell** **21**: 3749-3766
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annual Review of Plant Biology** **57**: 405-430
- Lopes-da-Silva F, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2002) Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. **European Food Research and Technology** **214**: 248-253
- Lopes-da-Silva F, Escribano-Bailón MT, Alonso JJP, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2007) Anthocyanin pigments in strawberry. **LWT** **40**: 374-382
- Ludwig SR, Habera LF, Dellaporta SL, Wessler SR (1989) Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to

transcriptional activators and contains the myc-homology regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **86**: 7092-7096

Ludwig SR, Wessler SR (1990) Maize R gene family: tissue-specific helix-loop-helix proteins. **Cell** **62**: 849-851

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

Lunau K, Papiorek S, Eltz T, Sazima M (2011) Avoidance of achromatic colours by bees provides a private niche for hummingbirds. **Journal of Experimental Biology** **214**: 1607-1612

MacDougal JM (1994) Revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs** **41**: 1-146

McGuire CM (1999) *Passiflora incarnata*. A new fruit crop. **Economic Botany** **53**: 161-176

Mano H, Ogasawara F, Sato K, Higo H, Minobe Y (2007) Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. **Plant Physiology** **143**: 1252-1268

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

Matus JT, Poupin MJ, Cañón P, Bordeu E, Alcade JA, Arce-Johnson P (2010) Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Plant Molecular Biology** **72**: 607-620

Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E (1999) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. **Plant Journal** **1**: 37-49

Martin C, BJ Glover (2007) Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. **Current Opinion Plant Biology** **10**: 70-82

Martin C, Paz-Ares J (1997) MYB transcription factors in plants. **Trends Genetic** **13**: 677-73

Mehrten F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B (2005) The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Physiology** **138**: 1083-1096

Meng X, Xing T, Wang X (2004). The role of light in the regulation of anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. **Plant Growth Regulation** **44**: 243-250

Meyer RC, Goldsbrough PB, Woodson WR (1991) An ethylene-responsive flower senescence-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione S transferases. **Plant Molecular Biology** **17**: 277- 281

Miller R, Owens SJ, Rorslett B (2009) Plant and colour: flowers and pollination. **Optics & Laser Technology** **43**: 282-294

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

Modolo LV, Blount JW, Achnine L, Naoumkina MA, Wang X, Dixon RA (2007) A functional genomics approach to (iso) flavonoid glycosylation in the model legume *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology** **64**: 499-518

Mol J, Grofelowd E, Koes R (1998) How genes paint flowers and seeds. **Trends in Plant Science** **3**: 212-217

Monte Bello CC (2012) Padrões de pigmentação e influência de fatores hormonais na pigmentação da coroa de *Passiflora* spp. (Passifloraceae). Universidade Estadual de Campinas

Moore MJ, Soltis PS, Bell CD, Burleigh JG, Soltis DE (2010) Phylogenetic analysis of 83 plastid genes further resolves the early diversification of eudicots. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **107**: 4623-4628

Mori K, Yamamoto NG, Kitayama M, Hashizume K (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. **Journal of Experimental Botany** **58**: 1935-1945

Morita Y, Saitoh M, Hoshino A, Nitasaka E, Iida S (2006) Isolation of cDNAs for R2R3-myb, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of c and Ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. **Plant Cell Physiology** **47**: 457-470

Mudalige RG, Kuhnle AR, Amore DT. Pigment distribution and epidermal cell shape in *Dendrobium* species and hybrids. 2003. **HortScience** **38**: 573-577

Nagy KI, Redeuil K, Bertholet R, Steiling H, Kussmann M (2009) Quantification of anthocyanins and flavonols in milk-based food products by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry** **81**: 6347-6365

Nakatsuka T, Abe Y, Kakizaki Y, Yamamura S, Nishihara M (2007) Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports** **26**: 1951-1959

Nakatsuka A, Yamagishi M, Nakano M, Tasakia K, Kobayashi N (2009) Light-induced expression of basic helix-loop-helix genes involved in anthocyanin biosynthesis in flowers and leaves of Asiatic hybrid lily. **Horticultural Science** **121**: 84-91

Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. **Nature** **371**: 297-300

Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L (2000) The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. **Plant Cell** **12**: 1863-1878

Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L (2001) The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. **Plant Cell** **13**: 2099-2114

Noda K, Glover BJ, Linstead P, Martin C (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. **Nature** **369**: 661-664

Nozzolillo C, Amiguet VT, Bily AC, Harris CS, Saleem A, Andersen OM, Jordheim M (2010) Novel aspects of the flowers and floral pigmentation of two *Cleome* species (*Cleomaceae*), *C. hassleriana* and *C. serrulata*. **Biochemical Systematics and Ecology** **38**: 361-369

Ohno S, Hosokawa M, Hoshino A, Kitamura Y, Morita Y, Park K, Nakashima A, Deguchi A, Tatsuzawa F, Doi M, Iida S, Yazawa S (2011a) A bHLH transcription factor, DvIVS, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in dahlia (*Dahlia variabilis*). **Journal Experimental Botany** **62**: 5105-5116

Pang Y, Wenger JP, Saathoff K, Peel GJ, Wen J, Huhman D, Allen SN, Tang Y, Cheng X et al. (2009) A WD40 repeat protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but not for trichome development. **Plant Physiology** **151**: 1114-1129

Park KI, Ishikawa N, Morita Y, Choi JD, Hoshino A, Iida S (2007) A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. **Plant Journal** **49**: 641- 654

Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H (1987) The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. **EMBO Journal** **6**: 3553-3558

Pereira CAM, Yariwake JH, McCullagh M (2005) Distinction of the flavone C-glycoside pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using LC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis** **16**: 295-301

Perez F, Arroyo MTK, Medel R, Hershkovitz MA (2006) Ancestral reconstruction of flower morphology and pollination systems in *Schizanthus* (*Solanaceae*). **American Journal of Botany** **93**: 1029-1038

Perez-Rodríguez M, FW Jaffe, E Butelli, BJ Glover, C Martin (2005) Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Anthirrhinum majus* flowers. **Development** **132**: 359-370

Petroni K, Tonelli C (2011) Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. **Plant Science** **181**: 219-229

Qi Y, Lou Q, Li H, Yue J, Liu Y, Wang Y (2013) Anatomical and biochemical studies of bicolored flower development in *Muscari latifolium*. **Protoplasma** DOI 10.1007/s00709-013-0509-8

Quattrocchio F, Wing J, Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J, Koes R (1999) Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. **Plant Cell** **11**: 1433-1444

Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R (2006) Ph4 of petunia is a R2R3MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. **Plant Cell** **18**: 1274-1291

Quintana A, Albrechtova J, Griesbach RJ, Freyre R (2007) Anatomical and biochemical studies of anthocyanidins in flowers of *Anagallis monelli* L. (Primulaceae) hybrids. **Scientia Horticulturae** **112**: 413-421

Ramsay NA, Glover BJ (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. **Trends in Plant Science** **10**: 63-70

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

Rozen S, Skaletsky HJ (1998) Software: Primer3. http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.html

Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Higashi Y, Yamazaki M, Tohge T, Fernie AR (2013) The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity. **Plant Physiology and Biochemistry**: 1-14

Sakalem ME, Negri G, Tabach R (2012) Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **22**: 1219-1232

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

Sazima M, Sazima I (1987) Additional observations on *Passiflora mucronata*, the bat pollinated passionflower. **Ciência e Cultura** **39**: 310-312

Schwinn K, Venail J, Shang Y, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Vailey P, Davies K, Martin C (2006) A small family of MYB regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. **Plant Cell** **18**: 831-851

Selinger DA, Chandler VL (1999) A mutation in the pale aleurone color gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. **Plant Cell** **11**: 5-14

Shang Y, Venail J, Mackay S, Bailey PC et al. (2010) The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum*. **New Phytologist** **189**: 602-615

Shimada N, Sasaki R, Sato S et al. (2005) A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome. **Journal of Experimental Botany** **56**: 2573-2585

Shvarts M, Borochoy A, Weiss D (1997). Low temperature enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression. **Physiologia Plantarum** **99**: 67-72

Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, Koes R (2000) Anthocyanin1 of *Petunia* encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. **Plant Cell** **12**: 1619- 1631

Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (2002) *ANTHOCYANIN1* of *Petunia* controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. **Plant Cell** **14**: 2121-2135

Smith SD, Wang S, Rausher, MD (2013) Functional evolution of an anthocyanin pathway enzyme during a flower color transition. **Molecular Biology Evolution** **30**: 602-612

Sobel JM, Streisfeld MA (2013). Flower color as model system for studies of plant evo-devo. **Frontiers in Plant Science** **4**: 1-17

Sompornpailin K, Makita Y, Yamazaki M, Saito K (2002) A WD repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. **Plant Molecular Biology** **50**: 485-495

Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, Koes R (2000) Anthocyanin1 of *Petunia* encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. **Plant Cell** **12**: 1619- 1631

Stich K, Eidenberger T, Wurst F, Forkmann G (1992) Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). **Planta** **187**: 103- 108

Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Current Opinion in Plant Biology** **4**: 447-456

Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrrens F, Niehaus K, Weisshaar B (2007) Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. **Plant Journal** **50**: 660-677

Streisfeld MA, Rausher MD (2009) Genetic changes contributing to the parallel evolution of red floral pigmentation among *Ipomoea* species. **New Phytologist** **183**: 751-763

Sun Y, Li H, Huang JR (2012) *Arabidopsis TT19* Functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. **Molecular Plant** **5**: 387-400

Takos AM, Jaffe FW, Jacob SR, Bogs J, Robinson SP, Walker AR (2006) Light induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. **Plant Physiology** **142**: 1216-1232

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology Evolution** **24**: 1596-1599

Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal** **54**: 733-749

Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G et al. (2010) Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: Practical perspectives. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** **74**: 1760-1769

Tereshchenko OY, Arbuzova VS, Khlestkina EK. Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes. **Journal of Cereal Science** **57**: 10-13

Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verries C, Cheynier V, Romieu C (2009) Ectopic expression of VvMybPA2 promoters proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. **Plant Physiology** **149**: 1028-1041

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** **25**: 4876-4882

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

Toleno DM, Durbin, ML, Lundy, KE, Clegg, MT (2010) Extensive evolutionary rate variation in floral color determining genes in the genus *Ipomoea*. **Plant Species Biology** **25**: 30-42

Tornielli G, Koes R, Quattrocchio F (2009) *Petunia*: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics: The Genetics of Flower Color. Springer, New York

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

Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenabeele S, Langebartels C, Grissem W, Inzé D, Breusegem FV (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. **Plant Physiology** **139**: 806-821

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

Vasic SM, Stefanović OD, Ličina BZ, Radojević ID, Čomić LR (2012) Biological activities of extracts from cultivated granadilla *Passiflora alata*. **EXCLI Journal** **11**: 208-218

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

- Walker A, Lee E, Bogs J, McDavid D, Thomas M, Robinson S (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. **Plant Journal** **49**: 772-785
- Weiss D (2000) Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. **Physiologia Plantarum** **110**: 152-157
- Wilce MC, Parker MW (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica Biophysica Acta** **1205**: 1-18
- Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology** **126**: 485-493
- Whitney HM, Glover BJ (2007) Morphology and development of floral features recognized by pollinators. **Arthropod-Plant Interactions** **1**: 147-158
- Whitney HM, Chittka L, Bruce TJA, Glover BJ (2009) Conical epidermal cells allow bees to grip flowers and increase foraging efficiency. **Current Biology** **19**: 948-953
- Whitney HM, Bennett KMV, Dorling M, Sandbach L, Prince D, Chittka L, Glover BJ (2011) Why do so many petals have conical epidermal cells? **Annals of Botany** **108**: 609-616
- Wu S, O'Leary SJB, Gleddie S, Eudes F, Laroche A, Robert LS (2008) A chalcone synthase-like gene is highly expressed in the tapetum of both wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x Triticosecale Wittmack). **Plant Cell Reports** **27**: 1441-1449
- Wu X, Prior RL (2005) Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and Berries. **Journal Agricultural Food Chemistry** **53**: 2589-2599
- Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K (2010). Two R2R3-MYB genes, homologs of petunia AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepals spots and leaves of Asiatic Lily. **Plant and Cell Physiology** **51**: 463-474
- Yamagishi M (2013) How genes paint lily flowers: Regulation of colouration and pigmentation patterning. **Scientia Horticulturae** <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.024>
- Yan CQ, XiF, Wu XM, M YB, W LJ, Chen XY (2012) Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. **Journal of Integrative Plant Biology** **54**: 703-712
- Ylstra B, Touraev A, Benito Moreno RM, Stoger E, van Tunen, AJ, Vicente O et al. (1992) Flavonols simulate development, germination and tube growth of tobacco pollen. **Plant Physiology** **100**: 902-907
- Ylstra B, Busscher, Franken J, Hollman PCH, Mol JNM, van Tunen AJ (1994) Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth. **Plant Journal** **6**: 201-212
- Yoshida K, Kondo T, Okazaki Y, Katou K (1995) Cause of blue petal colour. **Nature** **373**: 291

Yoshida K, Kawachi M, Mori M, Maeshima M, Kondo M, Nishimura M, Kondo T (2005) The involvement of tonoplast proton pumps and Na⁺(K⁺)/H⁺exchangers in the change of petal color during flower opening of morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. **Plant Cell Physiology** **46**: 407-415

Yoshida K, Mori M, Kondo T (2009a) Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. **Natural Product Report** **26**: 884-915

Yoshida K, Miki N, Momonoi K, Kawachi M, Katou K, Okazaki Y, Uozumi N, Maeshima M, Kondo T (2009b) Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. **Proceedings of the Japan academy series a mathematical science** **85**: 187-197

Yuan YW, Byers KJRP, Bradshaw HD (2013) The genetic control of flower-pollinator specificity. **Current Opinion in Plant Biology** **16**: 422-428

Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT, Lloyd A (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. **Development** **130**: 4859-4869

Zhang J, Wang LS, Gao JM, Shu QY, Li CH, Yao J, Hao Q, Zhang JJ (2008) Determination of Anthocyanins and Exploration of Relationship between Their Composition and Petal Coloration in Crape Myrtle (*Lagerstroemia hybrid*). **Journal of Integrative Plant Biology** **50**: 581-588

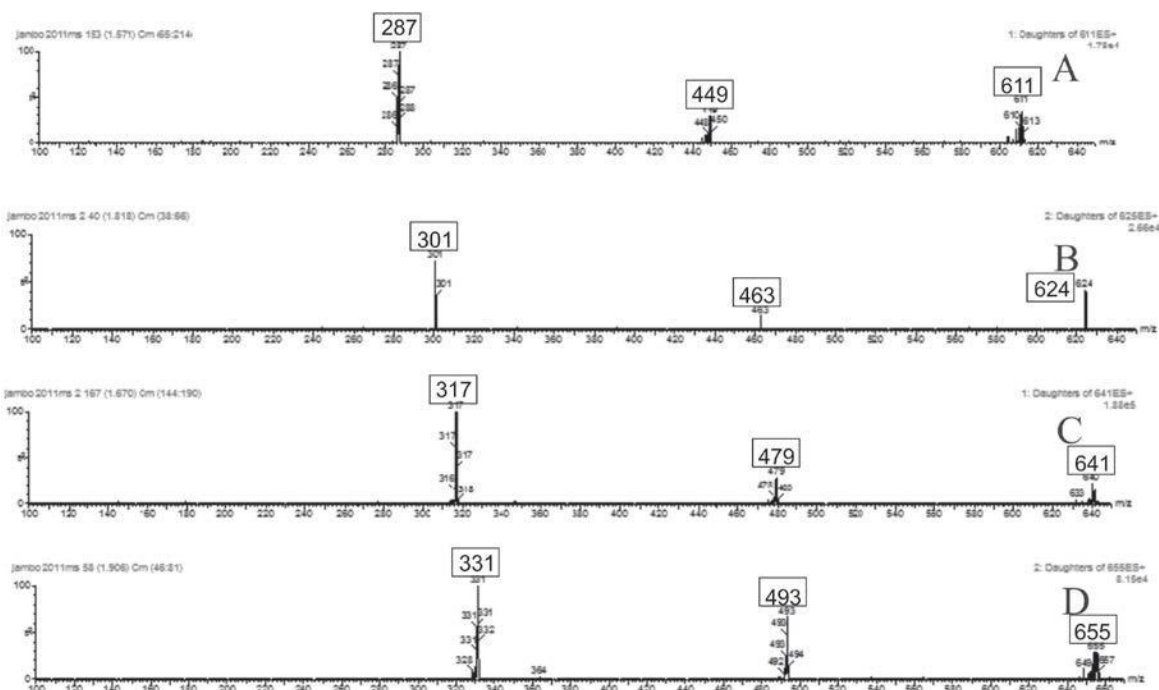
Zhao ZC, Hu ZB, Hu FC, Wang HC, Yang ZY, Lai B (2012) The UDP glucose: flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UGT) gene regulates anthocyanin biosynthesis in litchi (*Litchi chinesis* Sonn.) during fruit coloration. **Molecular Biology Reports** **39**: 6409-6415

Zenoni S, D'Agostino N, Tornielli GB, Quattrocchio F, Chiusano ML, Koes R, Zethof J, Guzzo F, Delledonne M, Frusciante L, Gerats T, Pezzotti M (2011) Revealing impaired pathways in the an11 mutant by high throughput characterization of *Petunia axillaris* and *Petunia inflata* transcriptomes. **Plant Journal** **68**: 11-27

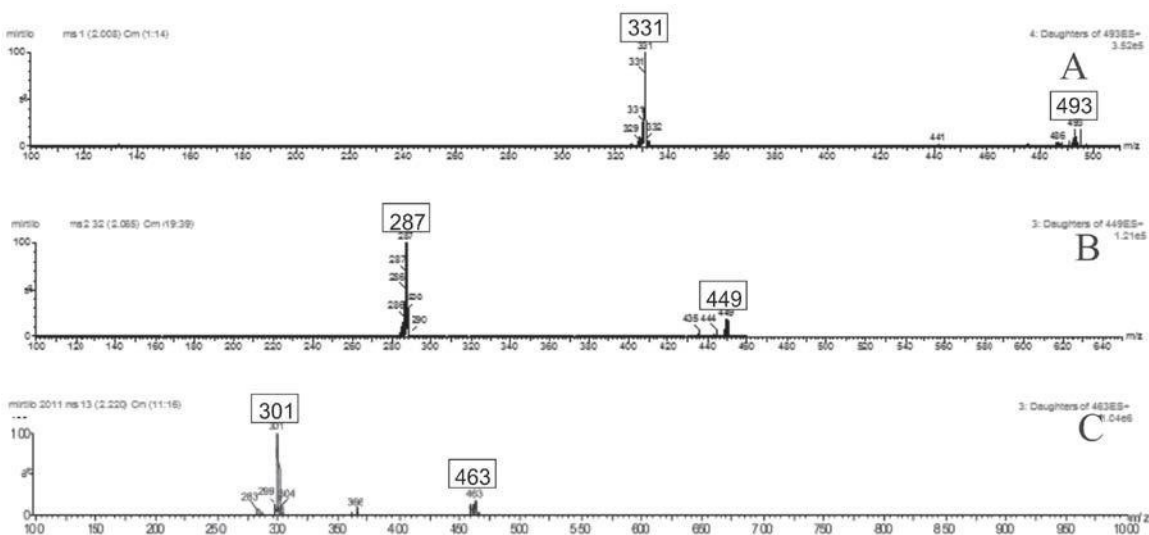
Zimmermann IM, Heim MA, Weisshaar B, Uhrig JF (2004) Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. **Plant Journal** **40**: 22-34

Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duqueb C, Schenke EP (2011) Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis** **23**: 232-239

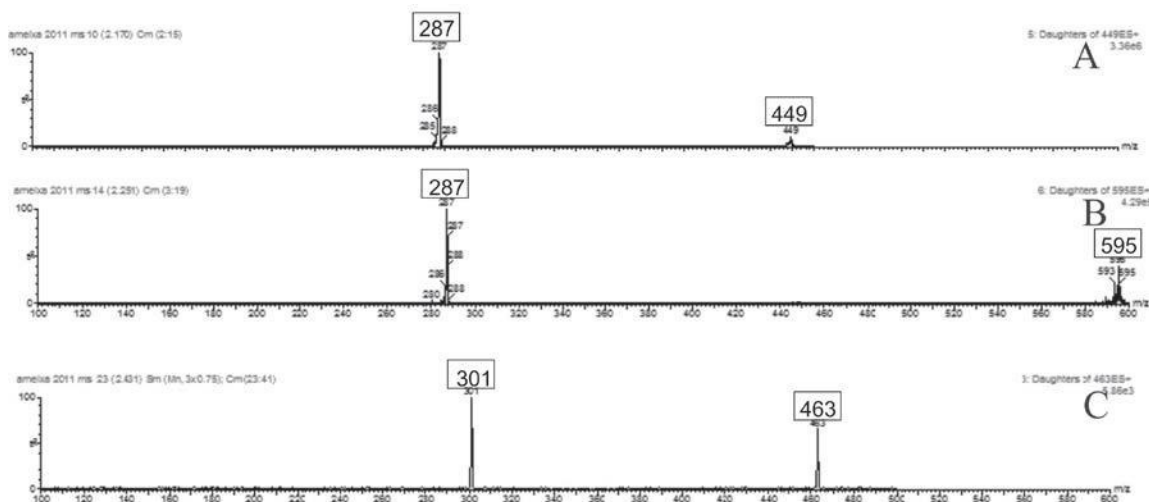
8. ANEXOS



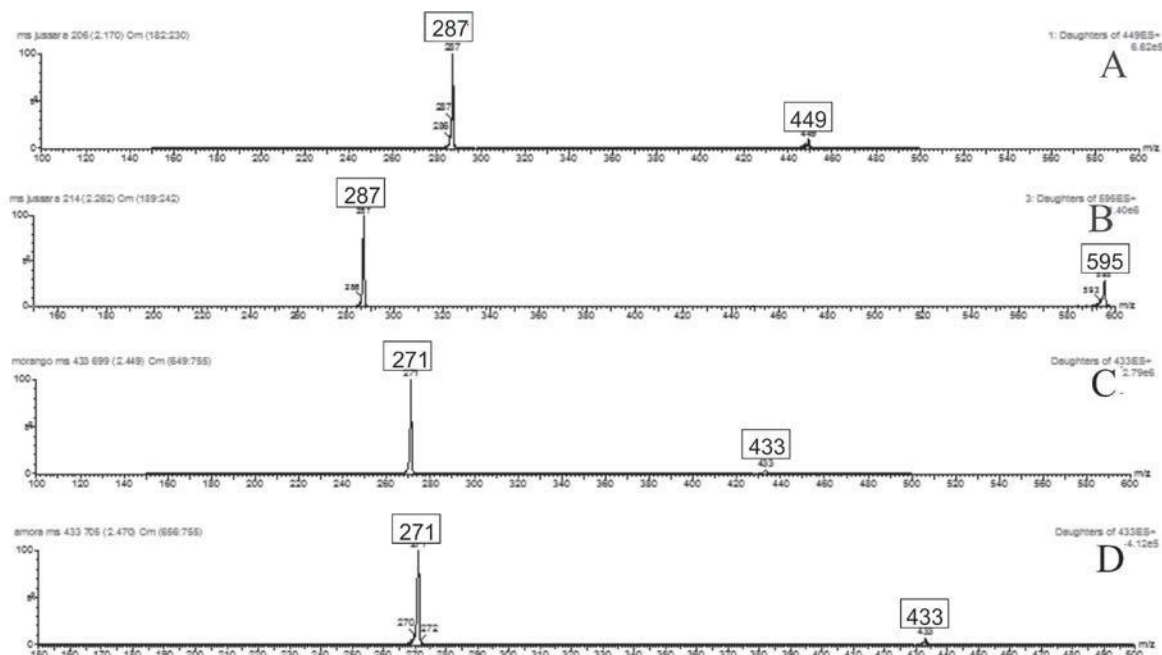
Anexo I. Antocianinas identificadas nos extratos de jambolão: cianidina 3,5-O-diglicosídeo (A) MS/MS, peonidina 3,5-O-diglicosídeo (B) MS/MS, petunidina 3,5-O-diglicosídeo (C) MS/MS e malvidina 3,5-O-diglicosídeo (D) MS/MS. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



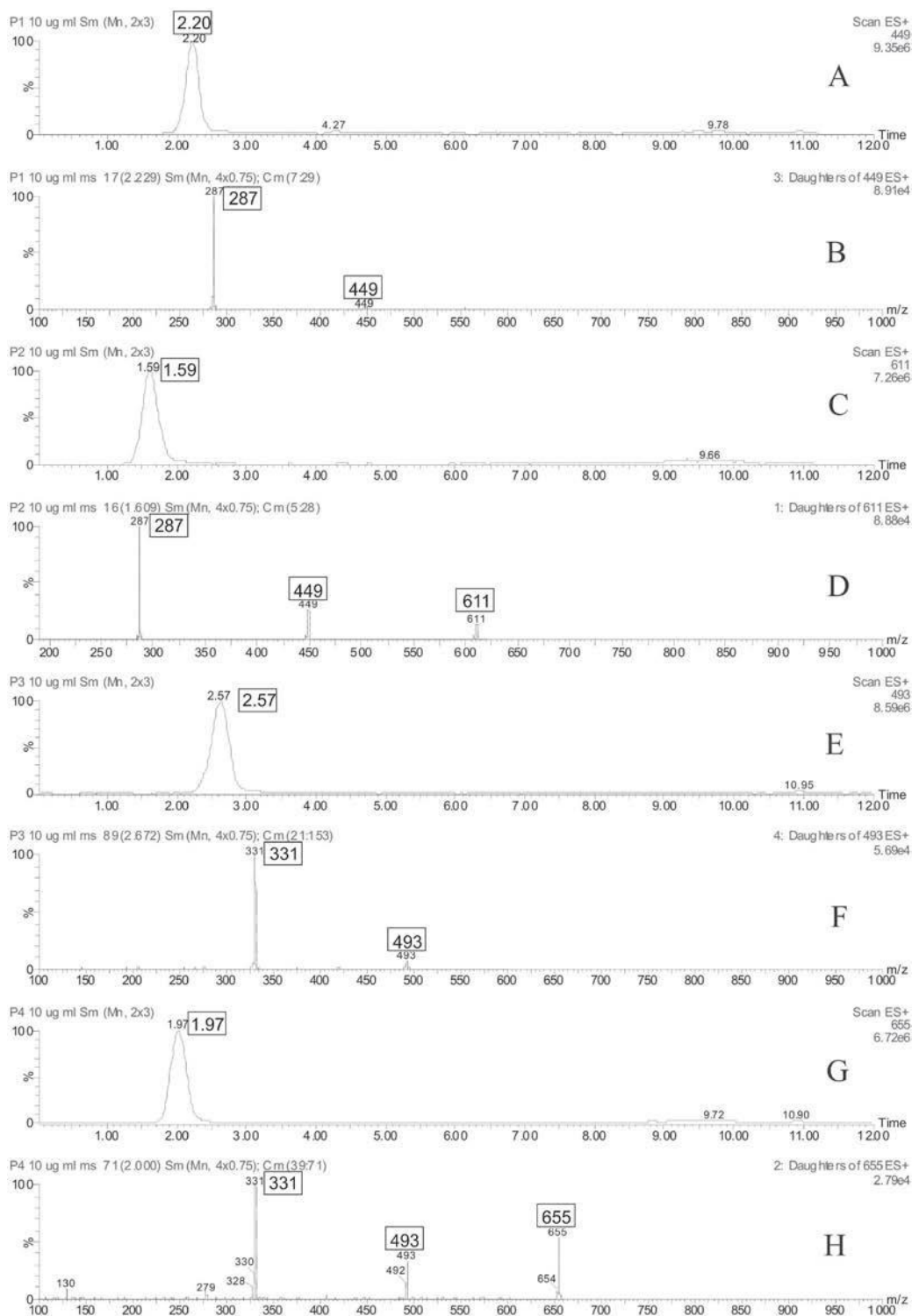
Anexo II. Antocianinas identificadas nos extratos de mirtilo: malvidina 3-O-glicosídeo (A) MS/MS, cianidina 3-O-glicosídeo (B) MS/MS, peonidina 3-O-glicosídeo (C) MS/MS. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



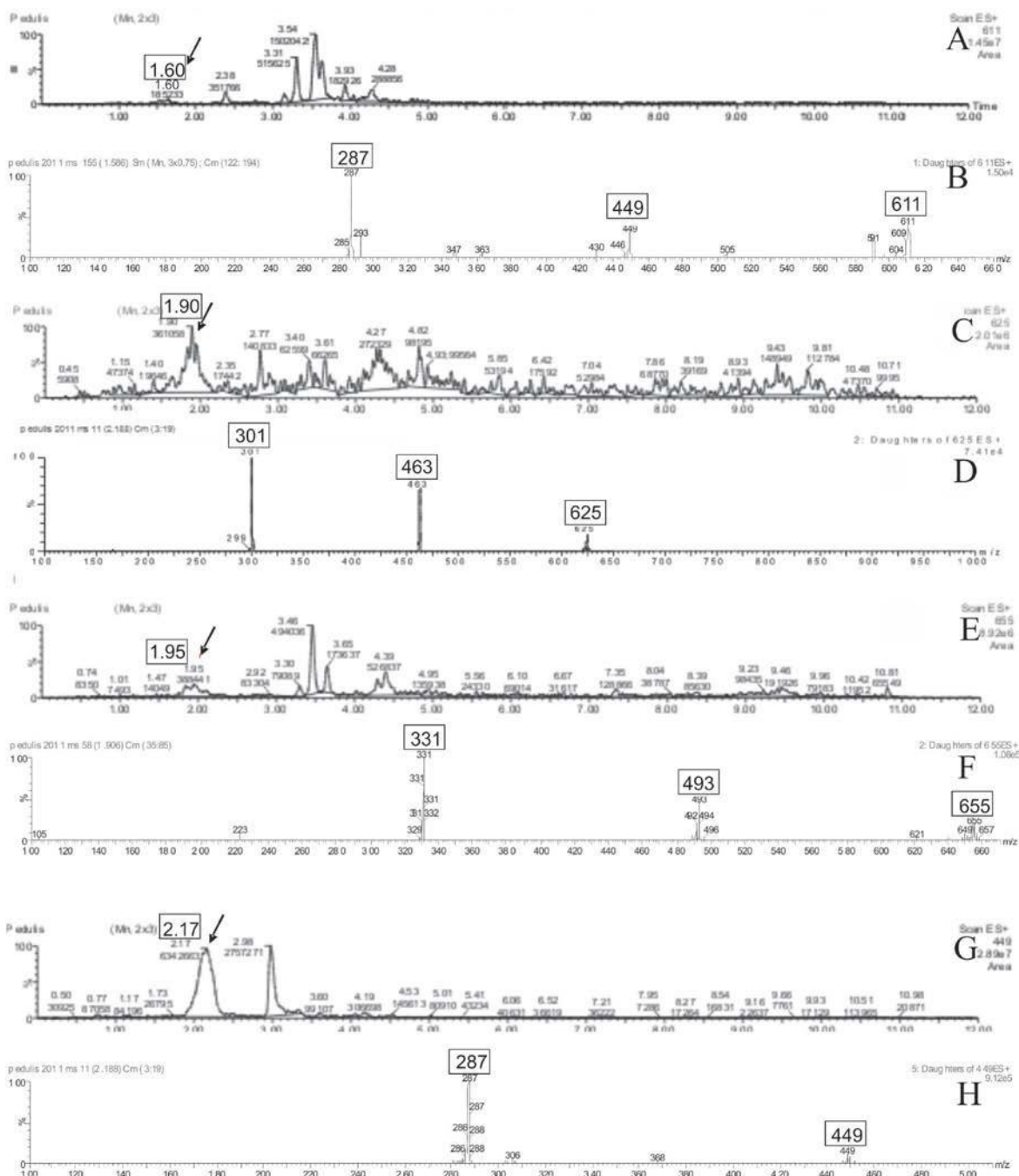
Anexo III. Antocianinas identificadas nos extratos de ameixa: cianidina 3-O-glicosídeo (A) MS/MS, cianidina 3-O-rutinosídeo (B) MS/MS, peonidina 3-O-glicosídeo (C) MS/MS. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



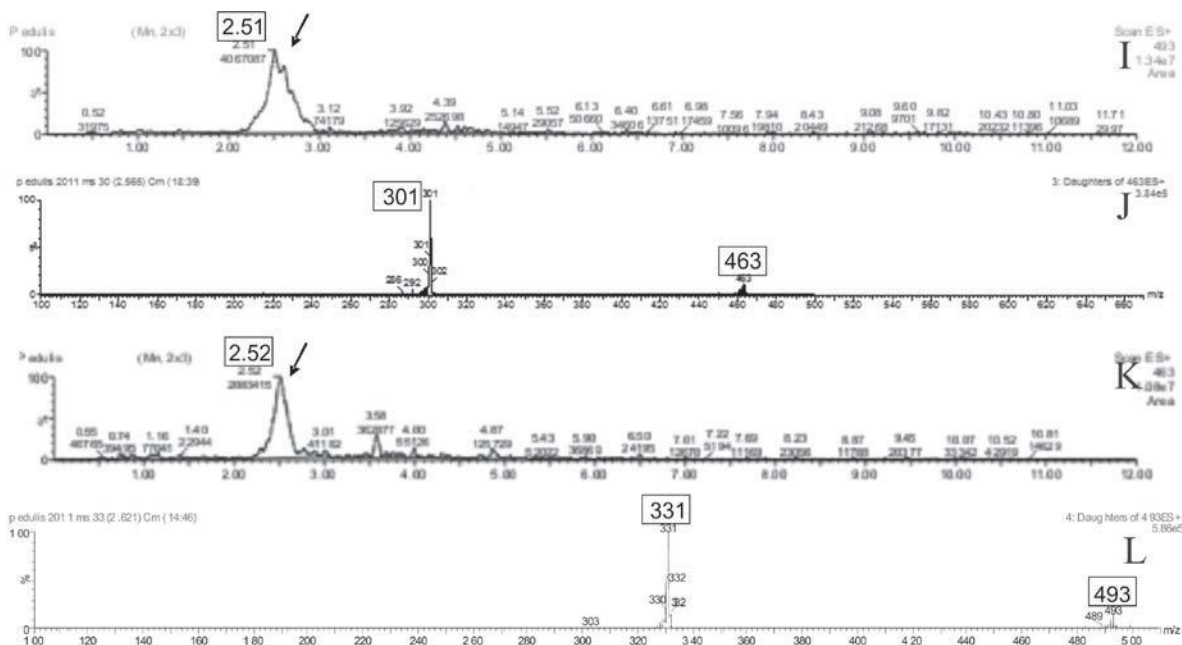
Anexo IV. Antocianinas identificadas nos extratos de jussara: cianidina 3-O-glicosídeo (A) MS/MS e cianidina 3-O-rutinosídeo (B) MS/MS. Pelargonidina 3-O-glicosídeo (C,D) MS/MS em morango e amora, respectivamente. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



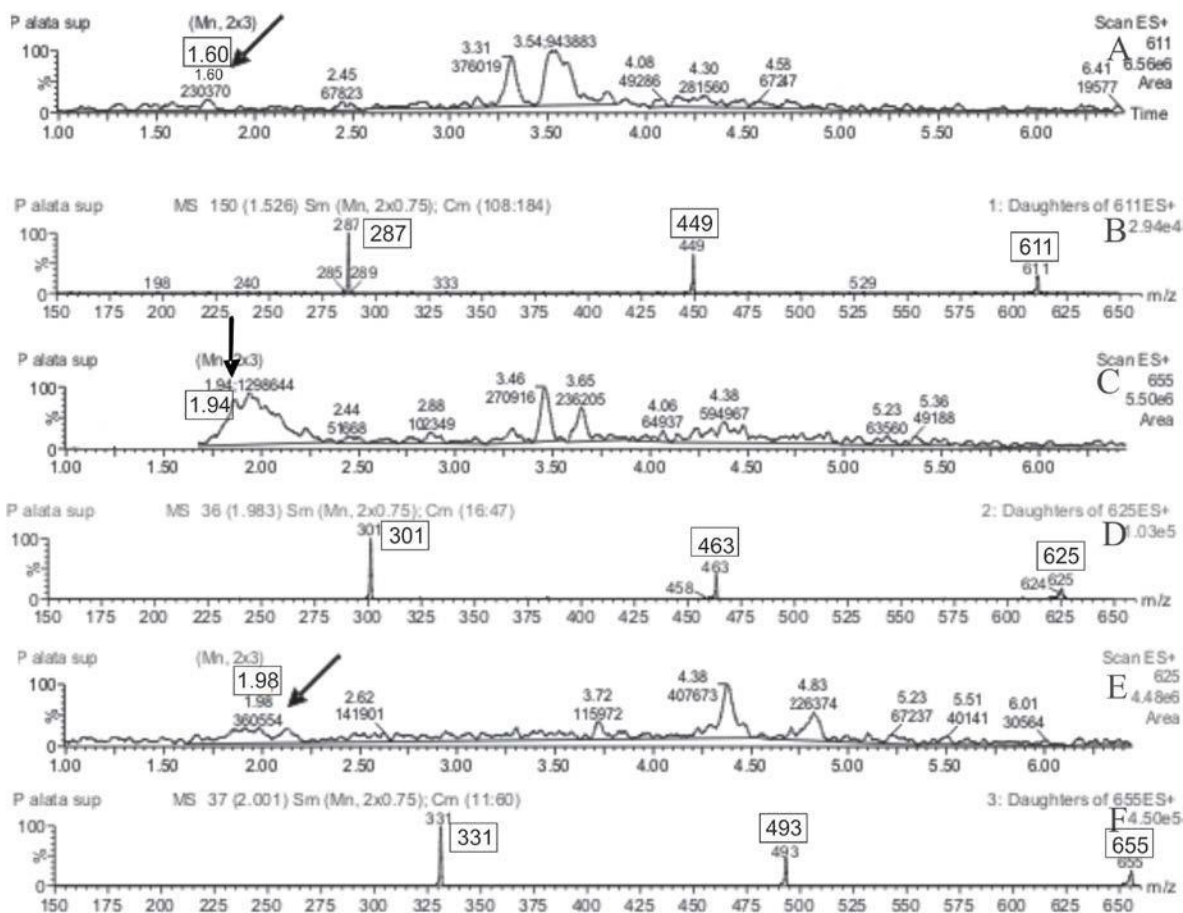
Anexo V. Padrões autênticos de antocianinas: cianidina 3-O-glicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, cianidina 3,5-O-diglicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS, malvidina 3-O-glicosídeo (E) cromatograma e (F) MS/MS, malvidina 3,5-O- diglicosídeo (G) cromatograma e (H) MS/MS. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



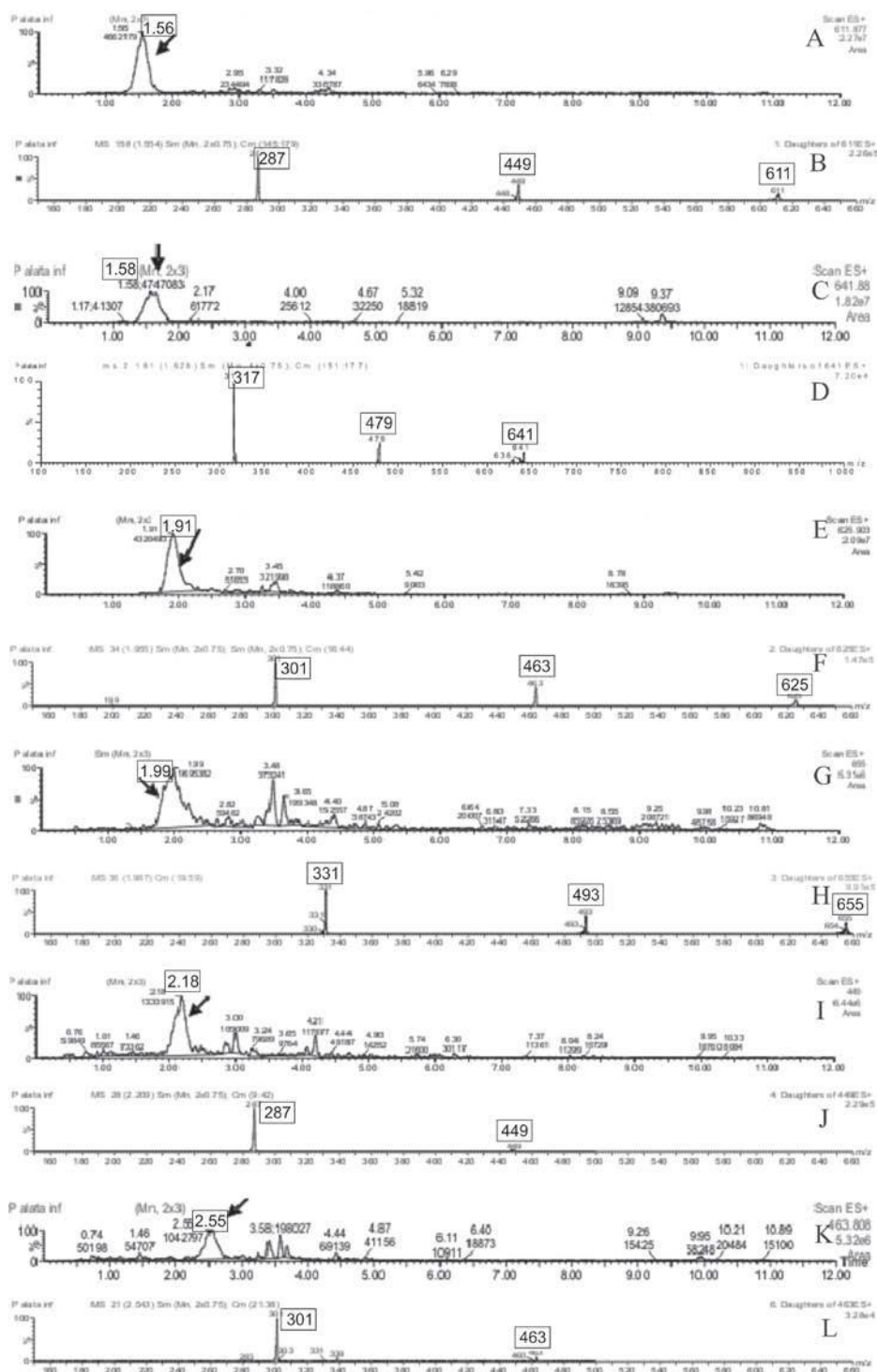
Anexo VI. Antocianinas identificadas em *P. edulis*: cianidina 3,5-O-diglicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, peonidina 3,5-O-diglicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS, malvidina 3,5-O-glicosídeo (E) cromatograma e (F) MS/MS, cianidina 3-O-glicosídeo (G) cromatograma e (H) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



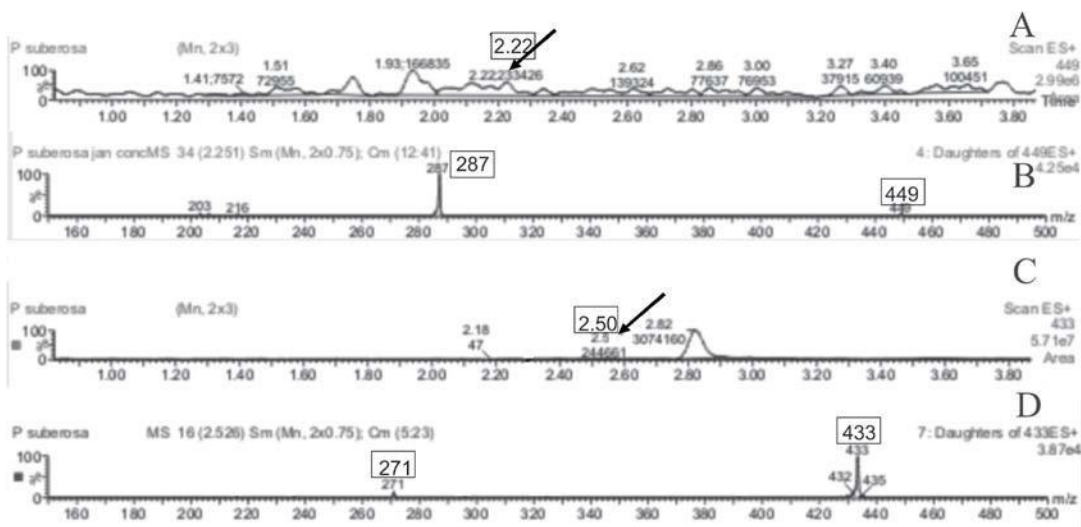
Anexo VI (continuação). Antocianinas identificadas em *P. edulis*: peonidina 3-O-glicosídeo (I) cromatograma e (J) MS/MS, malvidina 3-O-glicosídeo (K) cromatograma e (L) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



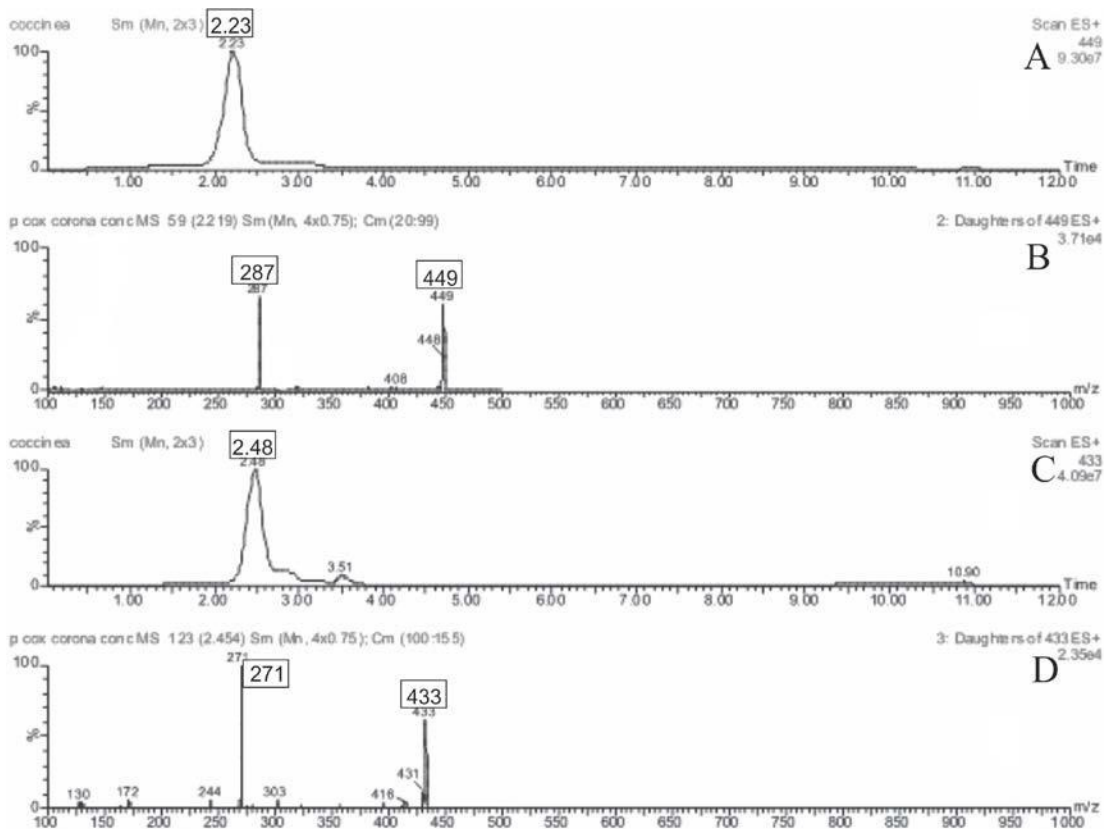
Anexo VII. Antocianinas identificadas na região superior dos filamentos da coroa de *P. alata*: cianidina 3,5-O-diglicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, peonidina 3,5-O-diglicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS, malvidina 3,5-O-diglicosídeo (E) cromatograma e (F) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



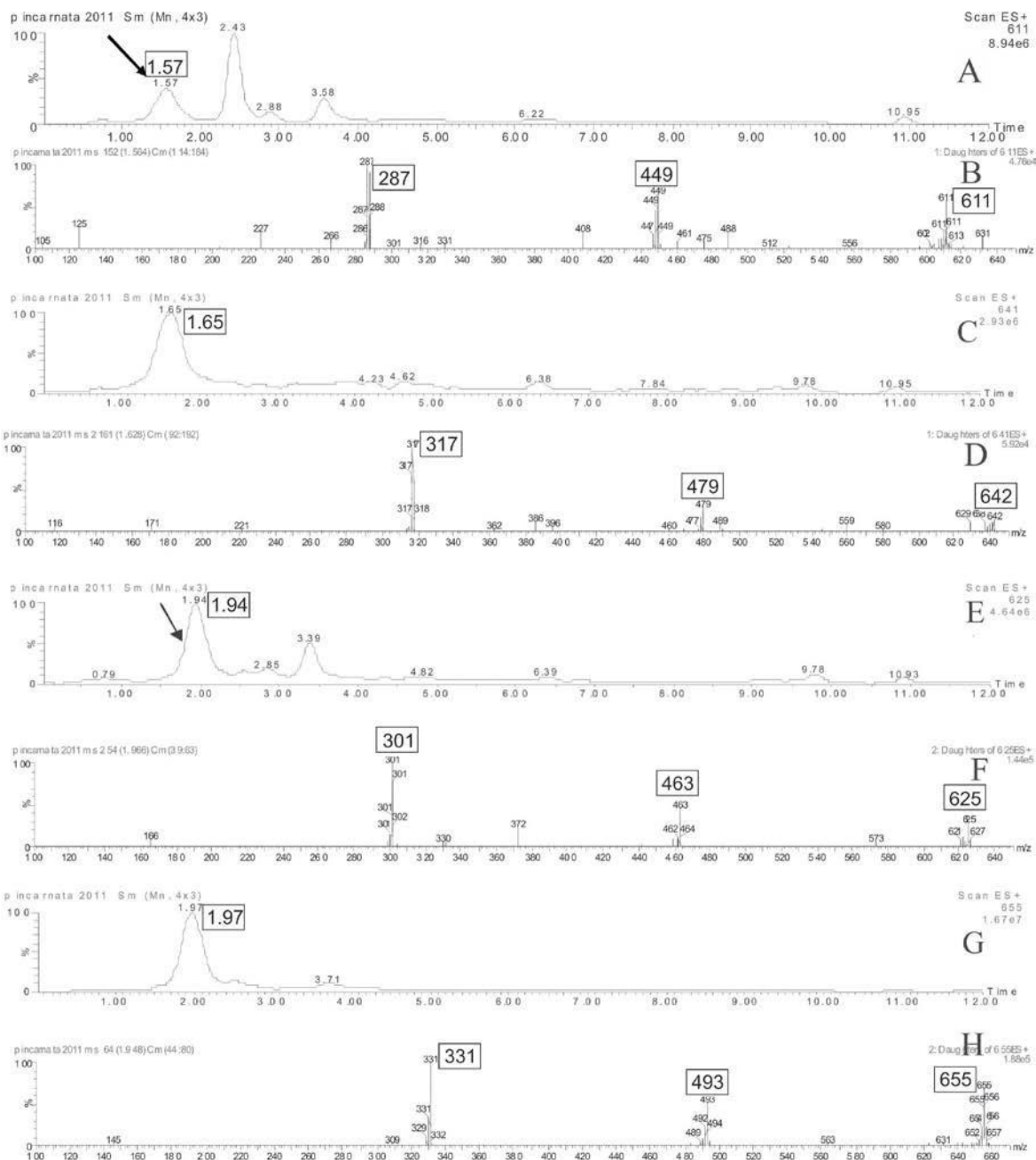
Anexo VIII. Antocianinas identificadas na região inferior dos filamentos da coroa de *P. alata*: cianidina 3,5-O-diglicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, petunidina 3,5-O-diglicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS, peonidina 3,5-O-diglicosídeo (E) cromatograma e (F) MS/MS, malvidina 3,5-O-diglicosídeo (G) cromatograma e (H) MS/MS, cianidina 3-O-glicosídeo (I) cromatograma e (J) MS/MS, peonidina 3-O-glicosídeo (K) cromatograma e (L) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



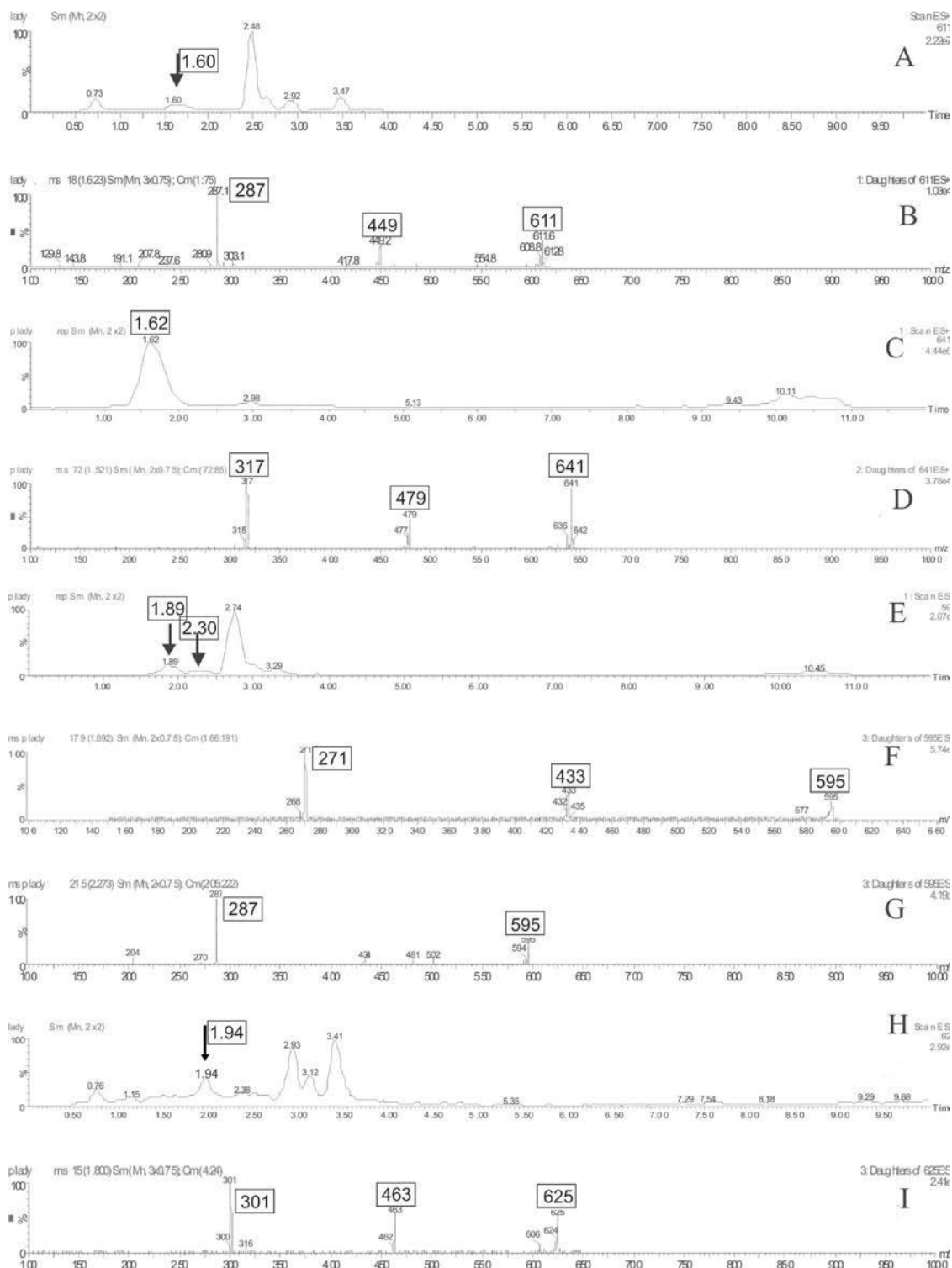
Anexo IX. Antocianinas identificadas em *P. suberosa*: cianidina 3-O-glicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, pelargonidina 3-O-glicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



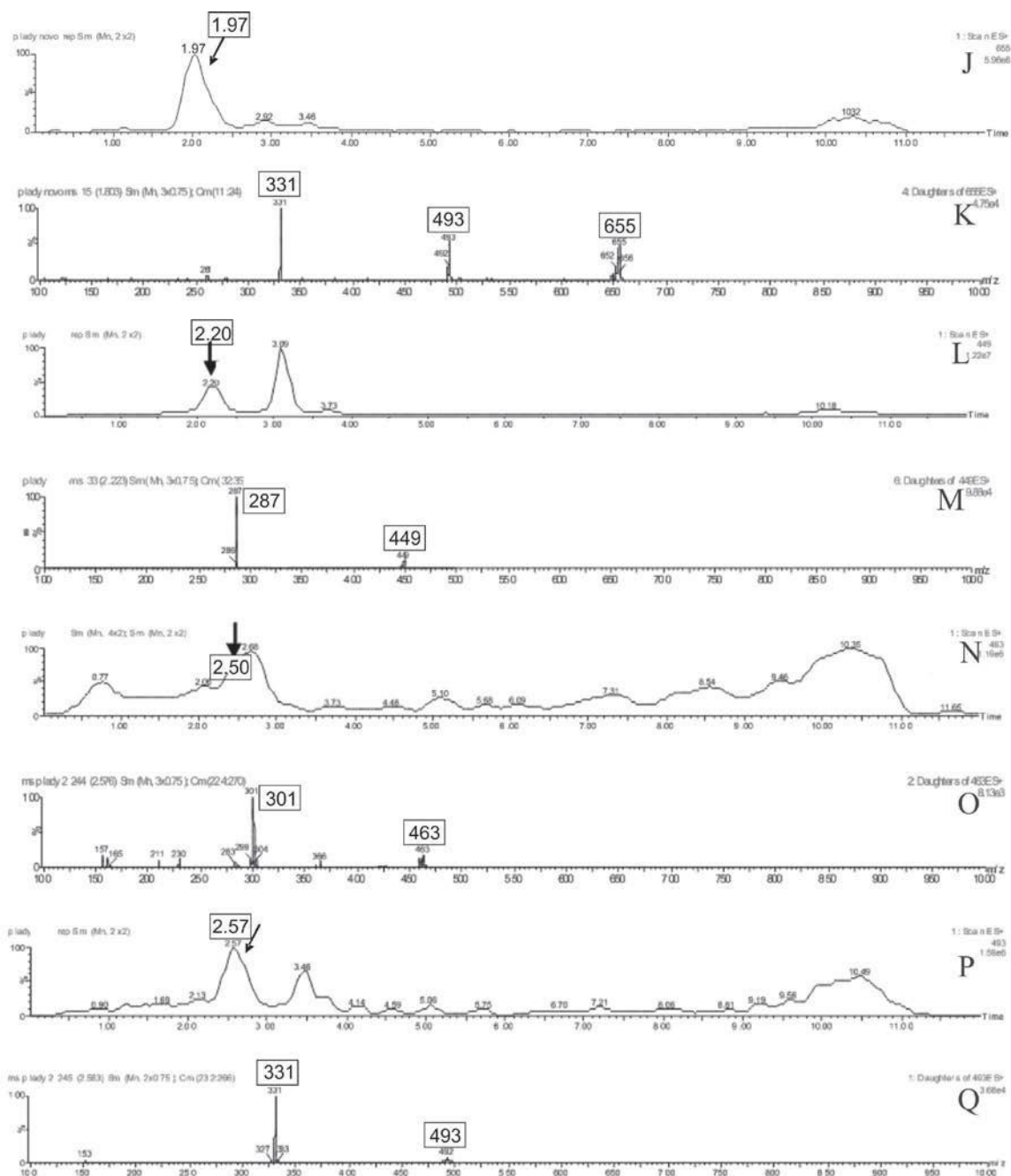
Anexo X. Antocianinas identificadas em *P. coccinea*: cianidina 3-O-glicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, pelargonidina 3-O-glicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



Anexo XI. Antocianinas identificadas em *P. incarnata*: cianidina 3,5-O-diglicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, petunidina 3,5-O-diglicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS, peonidina 3,5-O-diglicosídeo (E) cromatograma e (F) MS/MS, malvidina 3,5-O-diglicosídeo (G) cromatograma e (H) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



Anexo XII. Antocianinas identificadas no híbrido *P. 'Lady Margaret'*: cianidina 3,5-O-diglicosídeo (A) cromatograma e (B) MS/MS, petunidina 3,5-O-diglicosídeo (C) cromatograma e (D) MS/MS, pelargonidina 3,5-O-diglicosídeo (E) cromatograma e (F) MS/MS, cianidina 3-O-rutinosídeo (E) cromatograma e (G) MS/MS, peonidina 3,5-O-diglicosídeo (H) cromatograma e (I) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.



Anexo XII (continuação). malvidina 3,5-O-diglicosídeo (J) cromatograma e (K) MS/MS, cianidina 3-O-glicosídeo (L) cromatograma e (M) MS/MS, peonidina 3-O-glicosídeo (N) cromatograma e (O) MS/MS, malvidina 3-O-glicosídeo (P) cromatograma e (Q) MS/MS. As setas nos cromatogramas indicam os picos que resultaram na fragmentação de antocianinas O-glicosiladas. Os números destacados representam uma cópia ampliada dos valores dos tempos de retenção e dos íons resultantes da fragmentação MS/MS.

Anexo XIII. Código do GenBank das proteínas usadas na Figura 9.

CHALCONA SINTASE (CHS)

Espécie	Proteína	Código do GenBank
<i>Synechococcus</i> sp.	SyPKS	NP_897086
<i>Pinus radiata</i>	PrCHS	AAB80804
<i>Oryza sativa</i>	OsCHSL	AAL59036
<i>Hypericum perforatum</i>	HpCHSL	ABP98922
<i>Nicotiana benthamiana</i>	NbCHS	ABN80439
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtCHS	AAK49457
<i>Nicotiana glauca</i>	NsCHSL	CAA74847
<i>Hordeum vulgare</i>	HvCHSL	AAV49989
<i>Triticum aestivum</i>	TaCHSL	CAJ15412
<i>Aegilops tauschii</i>	AtCHSL	CAJ13966
<i>Arabidopsis halleri</i>	AhCHSL	AAZ23686
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AthCHS	CAI30411
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AthCHSL1	NM_100085
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AthCHSL2	NM_119651
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AthCHSL3	AAM63363
<i>Vitis vinifera</i>	VvCHSL	CAO47307
<i>Silene latifolia</i>	SlCHSL	BAE80096
<i>Equisetum arvense</i>	EaCHS	AB030004
<i>Psilotum nudum</i>	PnCHS	AB022682
<i>Populus trichocarpa</i>	PtCHS1	ABK95168
<i>Populus trichocarpa</i>	PtCHL1	XP_00230548
<i>Populus trichocarpa</i>	PtCHL2	XP_002326830
<i>Medicago sativa</i>	MsCHS	P30074
<i>Pinus sylvestris</i>	PsCHS	X60754
<i>Rheum palmatum</i>	RpCHS	DQ205352
<i>Zea mays</i>	ZmCHS	CAA42763
<i>Oryza sativa</i>	OsCHS2	BAA19186
<i>Oryza sativa</i>	OsCHS	BAB39764
<i>Physcomitrella patens</i>	PpCHS01	XP_001756277
<i>Physcomitrella patens</i>	PpCHS10	ABU87504
<i>Physcomitrella patens</i>	PpCHS11	XP_001781520
<i>Petunia hybrida</i>	PhCHSa	P08894
<i>Petunia hybrida</i>	PHCSHj	P22928

Anexo XIV. Código do GenBank das proteínas usadas na Figura 11.

DIHIDROFLAVONOL 4-REDUTASE (DFR)

Espécie	Proteína	Código do GenBank
<i>Antirrhinum majus</i>	AmDFR	X15536
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtDFR	AB033294
<i>Bromheadia finlaysoniana</i>	BfDFR	AF007096
<i>Callistephus chinensis</i>	CcDFR	Z67981
<i>Camellia sinensis</i>	CsDFR	AB018686
<i>Cymbidium hybrid</i>	ChDFR	AF017451
<i>Daucus carota</i>	DcDFR	AF18427
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DicDFR	Z67983
<i>Forsythia x intermedia</i>	FiDFR	Y09127
<i>Fragaria x ananassa</i>	FaDFR	AF029685
<i>Gentiana triflora</i>	GtDFR	D85185
<i>Gerbera hybrida</i>	GhDFR	Z17221
<i>Hordeum vulgare</i>	HvDFR	S69616
<i>Ipomoea nil</i>	InDFRA	AB006793
<i>Ipomoea purpurea</i>	IpDFRA	AB011667
<i>Lilium hybrid</i>	LhDFR	AF169801
<i>Lotus corniculatus</i>	LcDFR3	AF117263
<i>Lotus japonicus</i>	LjDFR1	AB162109
<i>Lotus japonicus</i>	LjDFR2	AB162110
<i>Lotus japonicus</i>	LjDFR3	AB162111
<i>Lotus japonicus</i>	LjDFR4a	AB162112
<i>Lotus japonicus</i>	LjDFR5	AB162114
<i>Solanum lycopersicon</i>	SiDFR	Z18277
<i>Malus domestica</i>	MdDFR	AF117268
<i>Medicago truncatula DFR1</i>	MtDFR1	AY38934
<i>Medicago truncatula DFR2</i>	MtDFR2	AY389347
<i>Oryza sativa</i>	OsDFR	AB003496
<i>Perilla frutescens</i>	PfDFR	AB002817
<i>Petunia x hybrida</i>	PhDFR	AF233639
<i>Populus trichocarpa DFR1</i>	PtDFR1	XM_00230072
<i>Populus trichocarpa DFR2</i>	PtDFR2	XP_00230766
<i>Rosa hybrida</i>	RhDFR	D85102
<i>Solanum tuberosum</i>	StDFR	AF449422
<i>Torenia hybrida</i>	ThDFR	AB012924
<i>Triticum aestivum</i>	TaDFR	AAQ77347
<i>Triticum monococcum</i>	TmDFR	AF434703
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	VmDFR1	AF483835
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	VmDFR2	AF483836
<i>Vitis vinifera</i>	VvDFR	Y11749

Anexo XV. Código do GenBank das proteínas usadas na Figura 12.

GLICOSILTRANSFERASE

Espécie	Proteína	Código do GenBank
<i>Glycine Max</i>	UGT78K1	GU434274
<i>Glycine Max</i>	GmIF7GT	AB292164
<i>Clitoria ternatea</i>	Ct3GT-A	AB185904
<i>Arabidopsis thaliana</i>	UGT78D2	NM_121711
<i>Verbena x hybrida</i>	HGT8	AB013598
<i>Perilla frutescens</i>	PfUA5GT	AB013596
<i>Gentiana triflora</i>	GtUF3GT	D85186
<i>Gentiana triflora</i>	Gt5GT7	AB363839
<i>Vitis vinifera</i>	VvGT1	AF00037
<i>Iris hollandica</i>	Ih3GT	AB161175
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DicGT1	AB191245
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DicGT2	AB191246
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DicGT3	AB191247
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DicGT4	AB191248
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DicGT5	AB191249
<i>Rosa hybrid</i>	RhGT1	AB201048
<i>Rosa hybrid</i>	RhGT2	AB201049
<i>Rosa hybrid</i>	RhGT3	AB201050
<i>Solanum sogarandinum</i>	Ssci17	AY033489
<i>Fragaria x ananassa</i>	FaGT1	AY663784
<i>Fragaria x ananassa</i>	FaGT6	DQ289587
<i>Fragaria x ananassa</i>	FaGT7	DQ289588
<i>Fragaria x ananassa</i>	FaUF3GT	AY695815
<i>Medicago truncatula</i>	UGT73C8	DQ875459
<i>Medicago truncatula</i>	UGT88E1	DQ875460
<i>Medicago truncatula</i>	UGT88E2	DQ875461
<i>Medicago truncatula</i>	UGT71G1	AAW56092
<i>Medicago truncatula</i>	UGT78G1	DQ875464
<i>Citrus x paradisi</i>	Cp1UF3GT	GQ141630
<i>Citrus x paradisi</i>	Cp2UF3GT	GQ141631
<i>Forsythia x intermedia</i>	FiUF3GT	AF127218
<i>Malus x domestica</i>	MdUF3GT	DQ156906
<i>Perilla frutescens</i>	PfUF3GT	AB002818
<i>Solanum tuberosum</i>	StUF3GT	AY954034
<i>Scutellaria baicalensis</i>	SbUF7GT	AB031274
<i>Beta vulgaris</i>	BvFGT	AY526080
<i>Beta vulgaris</i>	BvFGT2	AY526081
<i>Arabidopsis thaliana</i>	UGT73C6	NM_129234
<i>Oryza sativa</i>	UGT707A3	BAC83989
<i>Oryza sativa</i>	UGT709A4	BAC80066
<i>Crocus sativus</i>	CsGT45	FJ194947
<i>Populus trichocarpa</i>	PtFGT1	EEE95837
<i>Populus trichocarpa</i>	PtFGT2	EEE74119

Anexo XVI. Código do GenBank das proteínas usadas na Figura 13.

GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

Espécie	Proteína	Código do GenBank
<i>Vitis vinifera</i>	VvGST1	AAN85826
<i>Vitis vinifera</i>	VvGST2	EF088687
<i>Vitis vinifera</i>	VvGST3	EF469244
<i>Vitis vinifera</i>	VvGST4	AY971515
<i>Vitis vinifera</i>	VvGST5	EF140721
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPM239	P42769
<i>Papaver somniferum</i>	PsGST1	AAF22517
<i>Zea mays</i>	ZmBz2	AAA50245
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtGST5	BAA07917
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPM24	CAA53051
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtERD11	BAA04553
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtTT19	NP_197224
<i>Glycine Max</i>	GmGST26-A	AAA33973
<i>Solanum tuberosum</i>	Stprp-1	AAA68430
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtGNT1	CAA39709
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtGNT35	CAA39710
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtGNT103	CAA39704
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtparA	BAA14243
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtparB	BAA01394
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtparC	CAA45740
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nt114	AAA67894
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nt107	CAA39707
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DcGST1	AAA72320
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DcGST2	AAA5145
<i>Dianthus caryophyllus</i>	DcpSR8	AAA33277
<i>Silene vulgaris</i>	SvGST	AAA33930
<i>Petunia x hybrida</i>	PhAn9	CAA68993
<i>Triticum aestivum</i>	TaGST1A	CAA39487
<i>Zea mays</i>	ZmGSTI	CAA29929
<i>Zea mays</i>	ZmGSTIII	CAA27957
<i>Zea mays</i>	ZmGSTIV	AAA20585
<i>Populus alba x Populus tremula</i>	PtGST18	BAD91094
<i>Populus trichocarpa</i>	PtGST	AAT98377
<i>Ricinus communis</i>	RcGST	XP_002509785

Anexo XVII. Código do GenBank das proteínas usadas na Figura 15.

MYB-R2R3

Espécie	Proteína	Código do GenBank
<i>Vitis vinifera</i>	VvMYBA1	AB242302
<i>Vitis vinifera</i>	VvMYBA2	BAD18978
<i>Vitis vinifera</i>	VvMYBA3	BAD18979
<i>Vitis vinifera</i>	VvMYB5a	AAS68190
<i>Vitis vinifera</i>	VvMYB5b	AAX51291
<i>Petunia x hybrida</i>	PhAN2	AAF66727
<i>Petunia x hybrida</i>	PhPH4	AAV51377
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPAP1	AAG42001
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPAP2	AAG42002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MYB113	NP_176811
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MYB114	NP_176812
<i>Antirrhinum majus</i>	AmRosea1	ABB83826
<i>Antirrhinum majus</i>	AmRosea2	ABB83827
<i>Antirrhinum majus</i>	AmRosea3	ABB83828
<i>Lilium hybrid</i>	LhMYB6	BAJ05399
<i>Lilium hybrid</i>	LhMYB12	AB534586
<i>Zea mays</i>	ZmC1	AAA33482

Anexo XVIII. Código do GenBank das proteínas usadas na Figura 17.

WD 40

Espécie	Proteína	Código do GenBank
<i>Petunia x hybrida</i>	PhAN11	AAC18914
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtTTG1	CAB45372
<i>Gossypium hirsutum</i>	GhTTG1	AAM95641
<i>Gossypium hirsutum</i>	GhTTG3	AAM95645
<i>Perilla frutescens</i>	PfWD	BAB58883
<i>Zea mays</i>	ZmPAC1	AAM76742
<i>Vitis vinifera</i>	VvWD	XP_002270777
<i>Populus trichocarpa</i>	PtWD	XP_002318500
<i>Oryza sativa</i>	OsWD	BAF09665
<i>Ricinus communis</i>	RcWD	XP_002512788
<i>Ipomoea nil</i>	InWDR1	BAE94398
<i>Ipomoea purpurea</i>	IpWDR1	BAE94396

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Caracterização molecular da pigmentação dos filamentos da coroa no gênero *Passiflora* (Passifloraceae)"

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2006/03, Instituição: Instituto de Biologia/ Departamento de Biologia Vegetal

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Aluno: Lilian Cristina Baldon Aizza

Orientador: Marcelo Carnier Dornelas

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornes
Depto. Biologia Vegetal/IIB
Matricula Unicamp 08901-7

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido ☐ Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura