CAROLINA CASSANO MONTE BELLO

"PADRÕES DE PIGMENTAÇÃO E INFLUÊNCIA DE FATORES HORMONAIS NA PIGMENTAÇÃO DA CORONA DE *PASSIFLORA SPP.* (PASSIFLORACEAE)"

CAMPINAS
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA CASSANO MONTE BELLO

"PADRÕES DE PIGMENTAÇÃO E INFLUÊNCIA DE FATORES HORMONAIS NA PIGMENTAÇÃO DA CORONA DE *PASSIFLORA SPP.* (PASSIFLORACEAE)"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) CAROLINA CASSANO MONTE BELLO e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestra em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

CAMPINAS,
2013

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

B417p

Bello, Carolina Cassano Monte, 1987-
Padrões de pigmentação e influência de fatores hormonais na pigmentação da corona de *Passiflora spp.* (*Passifloraceae*) / Carolina Cassano Monte Bello. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. *Passiflora*. 2. Genes myb. 3. Pigmentação. 4. Antocianinas. I. Dornelas, Marcelo Carnier, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês Pigmentation patterns and influence of hormonal factors on the pigmentation of *Passiflora spp.* (*Passifloraceae*) corona
Palavras-chave em Inglês:
Passiflora
Genes myb
Pigmentation
Anthocyanins
Área de concentração: Biologia Vegetal
Titulação: Mestra em Biologia Vegetal
Banca examinadora:
Marcelo Carnier Dornelas [Orientador]
Tamara Canto Fonseca
Claudia Regina Baptista Haddad
Data da defesa: 20-02-2013
Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 20 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Assinatura

Dra. Tamara Canto Fonseca

Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador

Assinatura

Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli

Assinatura

Sumário

RESUMO **6**

ABSTRACT **7**

1. INTRODUÇÃO **8**

1.1. Características florais: Adaptações à interação com polinizadores 8

1.2. Pigmentação floral 9

1.3. Biossíntese de antocianinas 10

1.4. Função de fatores de transcrição na regulação da biossíntese de antocianinas 13

1.5. Fatores hormonais e ambientais alteram a pigmentação das flores 15

1.6. Diversidade e pigmentação floral em Passifloraceae 24

2. OBJETIVOS **27**

2.1. Objetivo geral 27

2.2. Objetivos específicos 27

3. MATERIAL E MÉTODOS **28**

3.1. Material vegetal e estabelecimento de estágio de desenvolvimento de botões florais 28

3.2. Padrões de pigmentação da corona de *Passiflora* 30

3.3. Aplicação de fitorreguladores *in planta* 30

3.4. Aplicação de fitorreguladores *in vitro* 31

3.5. Análise da expressão do gene MYB R2R3 por RT-PCR 32

3.6. Hibridização *in situ* 33

3.7. Determinação do pH celular em tecidos da corona de *Passiflora alata* 34

4. RESULTADOS **35**

4.1. Padrões de pigmentação e estágios de desenvolvimento da corona em *Passiflora* 35

4.2. Acúmulo e distribuição de pigmento 41

4.3. Determinação do pH celular em tecidos da corona de *Passiflora alata* 43

4.4. Efeitos da aplicação de fitorreguladores *in planta* na pigmentação da corona em *Passiflora* 44

4.5. Efeitos da aplicação de fitorreguladores in vitro na pigmentação da corona em *Passiflora* 47

4.6. Identificação de um homólogo de MYB R2R3 em *P. suberosa* 51

4.7. Caracterização da expressão de MYB-R2R3 por RT-PCR 52

4.8. Caracterização da expressão de MYB-R2R3 por hibridização *in situ* 52
5. DISCUSSÃO 55
5.1. Caracterização dos padrões de pigmentação da corona em *Passiflora* 55
5.2. Determinação do pH celular em tecidos da corona de *Passiflora alata* 60
5.3. Efeito de fitorreguladores na pigmentação da corona de *Passiflora* 61
5.4. Caracterização da expressão de MYB-R2R3 64
6. CONCLUSÕES 67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

RESUMO

A grande diversidade floral presente entre as espécies de *Passiflora* é o produto de diversas adaptações à grande variedade de polinizadores. A presença de um verticilo de filamentos denominado corona, entre os verticilos de pétalas e estames, é uma das principais características florais em *Passiflora*. Estes filamentos são de fundamental importância na interação com polinizadores e suas características (tamanho, forma, cor) estão sob forte pressão de seleção. A coloração dos filamentos da corona pode ter a mesma pigmentação do perianto, ou possuir cores contrastantes. Geralmente esta pigmentação é dada pela presença de antocianinas, garantindo um grande espectro de cores para as flores. Com frequência há uma distribuição diferencial dos pigmentos ao longo dos filamentos da corona. O estudo desta distribuição diferencial dos pigmentos permitiu a identificação de pelo menos 5 tipos de padrões de pigmentação da corona em *Passiflora*, sendo eles: "*dégradée*", bandeado e ponteado, bem como pigmentação uniforme e ausência aparente de pigmentação.

Devido à grande importância da pigmentação da corona para o sucesso reprodutivo em *Passiflora*, propôs-se estudar a influência hormonal no processo de pigmentação desta estrutura. Pretendeu-se identificar o efeito da concentração de auxinas (por meio da aplicação de diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D, e um inibidor do transporte polar de auxina, o ácido naftil-ftalâmico, NPA) e de giberelinas (por meio da aplicação de diferentes concentrações de ácido giberélico, GA_3, e de um inibidor de sua síntese, o paclobutrazol, PACLO) na pigmentação de filamentos da corona em desenvolvimento das espécies de *P. edulis, P. morifolia* e *P. suberosa*, sendo os tratamentos hormonais realizados *in vitro* e *in planta*. Após as aplicações hormonais, os pigmentos florais foram analisados por espectrofotometria UV-vis. A aplicação de GA_3 causou aumento da pigmentação floral e a aplicação de um inibidor de sua síntese, PACLO, causou a redução da pigmentação. A Aplicação de auxina (2,4-D) e um inibidor do seu transporte polar (NPA) tiveram efeitos similares no sentido da redução da pigmentação. Determinou-se o padrão de expressão, mediante RT-PCR e hibridização *in situ*, do gene MYB-R2R3/PACEPS7022E07 de *P. suberosa*, potencialmente envolvido na modulação da síntese de antocianinas, e demonstrou-se que o mesmo é expresso preferencialmente em órgãos florais.

ABSTRACT

The floral diversity present in the species of *Passiflora* is the product of several adaptations to the wide variety of pollinators. The presence of a whorl of filaments called corona, between the whorls of stamens and petals, is a major floral trait in *Passiflora*. These filaments are of fundamental importance in the interaction of pollinators and their characteristics (size, shape, color) are under strong selective pressure. The pigmentation of the corona filaments might have the same color of the perianth, or have contrasting colors. Generally the pigmentation is given by the presence of anthocyanins, ensuring a wide range of colors for the flowers. Often there is a differential distribution of pigment throughout the corona filament. Studying a variety of patterns of corona pigmentation, it was established that there are at least 5 types of pigmentation patterns in *Passiflora*: "*dégradée*", stripped and dotted, as well as uniformly pigmented and non-pigmented.

Due to the great importance of the corona pigmentation for the reproductive success in *Passiflora*, we proposed to study the influence of hormones on the pigmentation process of this structure. In order to identify the effect of the application of auxins (through different doses of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D, and of the inhibitor of auxin polar transport, naphthyl ftalamic acid, NPA) and gibberellins (through the application of different doses of gibberellic acid, GA_3, and its synthesis inhibitor, paclobutrazol, PACLO) in pigmentation of corona filament developing of species *P. edulis, P. morifolia* and *P. suberosa*, and hormonal treatments performed *in vitro,* in cultured corona filaments, and *in planta* spraying floral buds. For the verification of the effect of hormone applications, the flower pigments were analyzed by spectrophotometer UV-vis where only GA_3 caused increased floral pigmentation contrary to PACLO, which caused the reduction of pigmentation. The auxin 2,4-D and an inhibitor of polar auxin transport, NPA had the same effect, reducing the floral pigmentation. We determined the pattern of expression (by RT-PCR and *in situ* hybridization) of the R2R3-MYB/PACEPS7022E07 gene of *P. suberosa*, potentially involved in the regulation of anthocyanin synthesis, demonstrating that it is expressed preferentially in floral organs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características florais: Adaptações à interação com polinizadores

Características florais como forma, tamanho e arranjo dos órgãos florais, bem como coloração do perianto, produção de néctar e aromas exigiram uma série de passos evolutivos, ao longo da história das angiospermas. Em algumas linhagens de plantas, transições evolutivas em pigmentação, forma e aroma permitiram o surgimento de espécies polinizadas por diferentes grupos de animais. A principal evidência dessas transições, segundo Rausher (2008), são os "sistemas de polinização", que determinam grupos de características florais que são mais adaptadas para receber um determinado agente polinizador, em determinada espécie.

De acordo com Shang et al. (2011), para que um polinizador retorne a uma flor visitada com sucesso, ele necessita memorizar sinais específicos como odor, morfologia floral e padrões de coloração, sendo que a ocorrência de qualquer alteração tem efeitos dramáticos na prevalência de um polinizador.

A ampla variedade de cores dos diferentes tipos florais evoluiu, portanto, de acordo com seus sistemas de polinização, sendo os pigmentos derivados de flavonóides os mais frequentes em angiospermas (Rausher 2008). Dentre estes, as antocianinas são os melhores representantes e exercem importante função fisiológica de atração de polinizadores e dispersores de sementes (Winkel-Shirley 2001; Grotewold 2006; Peel et al. 2009; Chiu et al. 2010).

1.2. Pigmentação floral

A grande diversidade de formas e cores das flores é adquirida através de processos evolutivos, a fim de garantir o sucesso da reprodução. A coloração brilhante causada pelo acúmulo de pigmentos nas flores é, na maioria dos casos, um sinal para atrair polinizadores como insetos e pássaros, quer seja diretamente, por estímulo visual, ou pelo calor refletido por estes pigmentos (Willmer et al. 2009; Miller et al. 2011; Nishihara e Nakatsuka 2011). Muitas vezes a superfície adaxial das pétalas possue células cônicas que otimizam a absorção de luz pelos pigmentos, aumentando sua capacidade de atração de polinizadores (Glover 2007).

O padrão de coloração das flores fornece guias para a localização de pólen e néctar (Lunau et al. 2006; Shang et al. 2011). Após a polinização, a senescência do perianto e a mudança de cor do mesmo ou de outros órgãos florais servem como sinais para que os polinizadores possam discriminar flores receptivas daquelas que já avançaram para as fases posteriores do desenvolvimento reprodutivo (O'Neill 1997). O processo de polinização pode induzir diversos padrões de alterações da pigmentação floral, incluindo desbotamento da cor, intensificação da pigmentação em toda a flor ou em pontos discretos, como observado em *Vanda*, *Lupinus* e *Cymbidium* (O'Neill 1997).

As antocianinas (pigmentos vermelhos e azuis) são os pigmentos mais comuns encontrados entre as plantas, mas outros pigmentos, tais com as betalaínas (vermelhos e amarelos) e os carotenóides (vermelhos, laranjas e amarelos) também podem ocorrer em flores e frutos, dependendo da linhagem de angiosperma em questão (Grotewold 2006; Tanaka et al. 2010). De acordo com Grotewold (2006) e Chiu et al. (2010), as vias de biossíntese de antocianinas estão entre as mais estudadas em plantas. A maioria das enzimas

envolvidas nestas vias e seus respectivos genes codificadores têm sido isolados e caracterizados em um grande número de espécies de plantas modelo (Lo Piero et al. 2005), tais como o milho (*Zea mays*), *Arabidopsis thaliana, Petunia, Anthurium*, macieira (*Malus domestica* e videira (*Vitis vinífera* L.) (Dixon et al. 2005; Koes et al. 2005; Pattanaik et al. 2010).

1.3. Biossíntese de antocianinas

As antocianinas são o maior grupo de pigmentos heterosídeos hidrossolúveis (pigmentos associados com açucares), encontrados no vacúolo das células de plantas expostas à luz (Tanaka et al. 2010; Lin-Wang et al. 2011; Liu et al. 2012), sendo responsáveis pela maioria das colorações vermelhas, azuis e púrpuras das flores (Ghosh e Konishi 2007; Miller et al. 2011).

De acordo com Grotewold (2006) e Chiu et al. (2010), a via de biossíntese de antocianinas é a mais estudada em plantas sendo regulada por estímulos ambientais bióticos e abióticos (Weiss 2000) e coordenada pela regulação da transcrição de vários genes, os quais têm sido isolados e caracterizados em um grande número de espécies de plantas, como as de *Nicotiana tabacum* (Pattanaik et al. 2010), *Petunia hybrida* (Quattrocchio et al. 1999), *Arabidopsis thaliana* (Burbulis e Winkel-Shirley 1999), *Zea mays* (Winkel-Shirley 2001; Grotewold 2006) e *Ipomoea nil* (Morita et al. 2006).

A primeira enzima chave da biossíntese de antocianinas (Figura 1) é a chalcona-sintase (*CHS*), a qual catalisa a reação de condensação de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula de *p*-coumaroil-CoA, para produzir naringenina chalcona (tetrahidroxichalcona), o primeiro flavonóide formado em muitas plantas (Forkmann 1991;

Davies e Schwinn 2006; Tanaka et al. 2008; He et al. 2011). Reações enzimáticas subsequentes de *CHS* para naringenina são catalisadas pela chalcona isomerase (*CHI)* (Liu et al. 2012). A chalcona fornece o precursor para todas as classes de flavonóides, entre elas, as antocianinas.

A hidroxilação da naringenina na posição 3 por flavanona 3-hidroxilase (F3H) produz dihidrokaempferol, um dihidroflavonol, que pode ser hidrolisado na posição 3' ou 5' do anel B pela flavonóide 3- hidroxilase (F3'H) ou flavonóide 3'5' hidroxilase (F3',5'H) produzindo dihidroquercetina e dihidromiricetina respectivamente (Tanaka et al. 2008; Liu et al. 2012).

Um passo importante é realizado pela enzima dihidroflavonol 4-redutase (*DFR*) a qual converte os precursores de antocianidinas produzindo as leucoantocianidinas não coloridas, provendo estrutura para biossíntese de antocianinas (Irani et al. 2003; Davies e Schwinn 2006). A conversão de leucoantocianidinas em antocianidinas é realizada por consecutivas reações catalisadas por antocianidina sintase (*ANS*) (Lo Piero et al. 2005; Grotewold 2006; Tanaka et al. 2010; Liu et al 2012). O último passo na biossíntese de antocianinas é realizado pelas enzimas GT (O-glucosiltransferases) as quais realizam a conversão de antocianidinas em diferentes moléculas de antocianinas "decoradas". As enzimas GT podem ainda ser substituídas por glucosil-, acil- ou grupos metiltrasferases (Koes et al. 2005; Aizza e Dornelas, 2011).

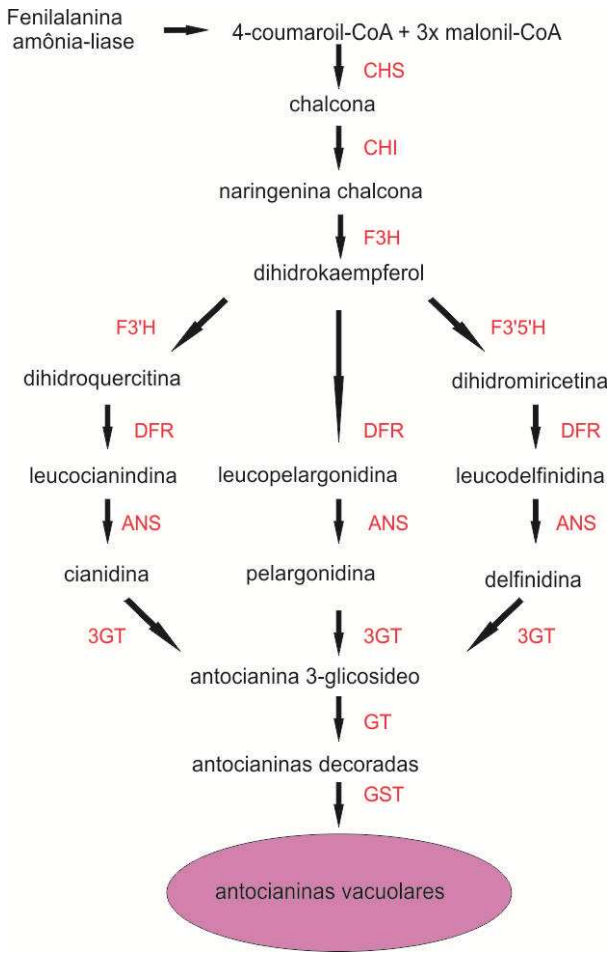

Figura 1: Esquema simplificado da via de biossíntese de antocianinas. As enzimas estão indicadas em vermelho.

Antocianidinas são moléculas sem açúcares ligados (agliconas) que fornecem a base da pigmentação floral. Todos os pigmentos de antocianinas são derivados de uma das três agliconas: cianidina, delfinidina, e pelargonidina (Tahara 2007; Ghosh e Konishi 2007; Aizza e Dornelas, 2011). Flores com os mesmos tipos e concentrações de antocianidinas podem ter diferentes intensidades de cores, dependendo da identidade e concentração dos co-pigmentos (Figueiredo et al. 1999) e do pH vacuolar (Farzad et al. 2002). Mudanças na estrutura das antocianinas, principalmente por hidroxilação e padrões de metilação, bem como o número e o tipo de açúcares no anel-B afetam a coloração das plantas. Antocianinas

tornam-se mais azuis quando aumentam os números de grupos hidroxilas no anel-B e ligações de grupos acil aromáticos (Tsuda et al. 2004).

1.4. Função de fatores de transcrição na regulação da biossíntese de antocianinas

A regulação da biossíntese de antocianinas e seu acúmulo em plantas são controlados pela expressão coordenada de genes que codificam enzimas-chave da via biossintética. Esta expressão coordenada é controlada transcricionalmente (Allan et al. 2008; Chiu et al. 2010; Shang et al. 2011). Dois grupos de genes são necessários para a biossíntese de antocianinas. O primeiro é representado por genes estruturais, codificadores de enzimas responsáveis pela produção de precursores de flavonóides e que também estão envolvidas na formação de moléculas particulares de antocianinas "decoradas". O segundo tipo inclui genes que codificam fatores de transcrição, que controlam a expressão dos genes estruturais (Winkel-Shirley 2001; Ramsay e Glover 2005; Koes et al. 2005; Grotewold 2006). Estes genes pertencem a três grandes famílias conservadas de fatores de transcrição: MYB, basic helix-loop-helix (bHLH) e WD40 (Davies 2009; Pattanaik et al. 2010; Hichri et al. 2011).

Proteínas MYB podem ser classificadas em três subfamílias dependendo do número de repetições adjacentes de domínios MYB. Assim, a subfamília MYB1R possui membros contendo apenas uma repetição, a subfamília MYB-R2R3 possui proteínas com duas repetições e, finalmente, proteínas da subfamília MYB3R possuem três repetições (Stracke et al. 2010). Uma vez que o número de repetições dos domínios MYB interfere na forma como o fator de transcrição se liga ao DNA, é provável que cada subfamília de proteínas MYB possua funções distintas (Jin e Martin 1999).

A subfamília MYB com duas repetições (R2R3) é a melhor caracterizada em plantas (Jin e Martin 1999; Stracke et al. 2001; Du et al. 2009). MYB-R2R3 regulam a expressão de genes codificadores de enzimas envolvidas na via biossintética das antocianinas (Tanaka et al. 2010; Yamagishi et al. 2010) e controlam o padrão e a intensidade da pigmentação floral. De acordo com Schwinn et al. (2006) e Chiu et al. (2010), os genes MYB-R2R3 podem ser a chave para determinar o padrão espacial e temporal da síntese de antocianinas em plantas.

O complexo formado por proteínas do tipo MYB-R2R3 e as das famílias bHLH e WD40 pode se ligar a promotores de genes estruturais de flavonóides (Feng et al. 2010). A ação combinada destes três genes fornece o controle da produção temporal de antocianinas em pétalas e os padrões complexos de distribuição espacial (Schwinn e Davies 2004). Além disso, membros da família de genes de fatores de transcrição *LBD* são relatados como reguladores negativos da biossíntese de antocianinas em *Arabidopsis* (Rubin et al. 2009).

Porém, segundo Koes et al. (2005), estes modelos devem ser vistos como hipóteses, estando propensos a modificações a partir de resultados de novas pesquisas. Em estudos realizados com *Petunia,* Koes et al. (2005) concluíram que a síntese de pigmentos é regulada por um complexo gênico intimamente ligado ao controle de vias aparentemente não relacionadas com a pigmentação das plantas, tais como desenvolvimento de tricomas, pêlos radiculares e acidificação vacuolar. Em geral, o complexo formado por WD40, bHLH e MYB exerce efeito pleiotrópico de padronização da epiderme, ou seja, um gene traduzindo vários efeitos fenotípicos, e as proteínas MYB promovem a especificidade de atuação.

1.5. Fatores hormonais e ambientais alteram a pigmentação das flores

A pigmentação de tecidos vegetais pode ser alterada por diversos fatores, como temperatura, luz, acidez vacuolar e possíveis ligações com co-pigmentos (Mol et al. 1998; Miller et al. 2011). De igual maneira, flutuações nas concentrações de hormônios vegetais ao longo do desenvolvimento influenciam a síntese e deposição de pigmentos (Loreti et al. 2008). Fatores ambientais como a exposição à luz solar podem reforçar e controlar a biossíntese de antocianinas em plantas como pereira, macieira e pessegueiro (Feng et al. 2010). Além disso, estudos realizados por Teng et al. (2005) em plantas de *A. thaliana* mostraram que a sacarose é um indutor eficaz da biossíntese de antocianinas, como observado também em corola de *Petunia hybrida* (Weiss 2000) e hipocótilo de *Raphanus sativus* (Hara et al. 2003).

A coloração das pétalas das flores é responsável pela atração de polinizadores e após a polinização, muitas espécies de plantas sinalizam que a ação dos polinizadores já não é mais necessária. Uma vez polinizadas, algumas flores alteram sua pigmentação (Brito e Sazima, 2012). Esse processo frequentemente é mediado por etileno endógeno, o principal regulador da senescência floral. Em resposta à polinização ou tratamento com etileno, algumas flores fecham a corola, enquanto outras mudam de cor (Van Doorn 1997; Van Doorn 2002; Klee e Clark 2010).

Em experimentos realizados por MacNish et al. (2010), foi observado que, durante o desenvolvimento da flor de *Nicotiana mutabilis* suas pétalas sofrem alteração marcante de cor do branco ao rosa e, finalmente, para o vermelho no início da senescência. Esta alteração está associada com o aumento do teor de antocianinas nas pétalas devido à alta concentração

de etileno. Neste caso, a quantidade de antocianinas nas pétalas é precedida por um aumento da expressão do gene *CHS*, que atua no início da via de biossíntese de antocianinas.

Além do etileno, outros hormônios têm sido sugeridos como indutores de pigmentação de tecidos vegetais. Assim, a aplicação exógena de metil jasmonato ou ácido jasmonico promove a expressão de genes da biossíntese de antocianinas e consequentemente a pigmentação (Devoto et al. 2005; Loreti et al. 2008; Shan et al. 2009). Em estudos realizados por Peng et al. (2011), foi sugerido que o acúmulo de antocianinas induzido por ácido jasmonico é reduzido por deficiência de brassinosteróide, indicando que estes cooperam na regulação positiva da indução de antocianinas.

Em plantas, os produtos derivados da via dos flavonóides podem funcionar como pigmentos e como reguladores do transporte de auxinas (Buer e Muday 2004; Devoto et al. 2005; Santelia et al. 2008; Stracke et al. 2010). Em estudos realizados até o momento em plantas de *A. thaliana* foi sugerido que flavonóides como quercetina e kaempferol sejam reguladores endógenos de transporte de auxinas, pois são capazes de bloquear ligações de inibidores de transporte de auxina, como o inibidor do transporte de auxina sintética, ácido naftil-ftalâmico (NPA) (Murphy et al. 2000; Brown et al. 2001; Buer e Muday 2004; Santelia et al. 2008). Além disso, plantas de *Arabidopsis* com mutações em genes que codificam enzimas da biossíntese de flavonóides, apresentam aumento no transporte de auxinas (Buer e Muday 2004).

Há relatos na literatura que descrevem tanto efeitos inibitórios quanto estimuladores das auxinas na biossíntese de antocianinas. Em culturas de células de morango, Mori et al. (1994) e Loreti et al. (2008) observaram um efeito indutor, enquanto aplicações *in vivo* de auxina em uvas levaram a um efeito inibidor da pigmentação (Jeong et al. 2004).

Giberelinas também exercem efeitos contraditórios sobre a síntese de antocianinas (Loreti et al. 2008). Em flores de *Petunia* (Moalem-Beno et al. 1997), *Vinca* (Ohlsson e Berglund 2001) e *Hyacinthus* spp. (Hosokawa 1999) houve um efeito indutor da aplicação exógena de giberelina, levando a um maior acúmulo ou a uma distribuição espacial mais ampla de pigmentos. No entanto, em morangos (Martínez et al. 1996), e folhas de plantas de milho (Kim et al. 2006), observou-se efeito inibidor de giberelina na biossíntese de antocianinas.

Loreti et al. (2008) realizaram experimentos de PCR em tempo real para estudar o efeito de flutuações na concentração de giberelinas na biossíntese de antocianinas em plântulas de *Arabidopsis*. Genes codificando enzimas à jusante da naringenina foram expressos em nível muito mais alto em mutantes *ga1-5* (defeituosos na síntese de giberelinas). Observou-se uma redução nesta alteração após 3 horas da aplicação de 1μM de GA_3. Estes resultados indicaram que giberelinas poderiam alterar diretamente a expressão de genes da síntese de antocianinas podendo inibir o processo de pigmentação. Este mecanismo pode ser explicado pela ação das proteínas DELLA, que são potentes inibidores de transcrição, e em resposta à giberelina são degradadas pelo complexo formado pelo receptor ativo de giberelinas (Itoh et al. 2008; Achard e Genschik 2009). A redução das proteínas DELLA, ocasiona novamente o aumento de giberelinas (Itoh et al. 2008).

Além disso, GA produzido por anteras e translocado para a corola (Shvarts et al. 1997; Weiss 2000; Loreti et al. 2008; Shan et al. 2009) induz a pigmentação da corola pela sua interação com a luz, resultando na ativação da expressão de genes da biossíntese de antocianinas, incluindo *PAL*, *CHS*, *CHI*, *DFR* e *ANS* (Weiss et al. 1995).

Foi identificada a presença de GA_1 e GA_4 em anteras e corolas de *Petunia*. Com a remoção das anteras, observou-se uma redução da transcrição de genes de algumas enzimas da biossíntese de antocianinas (Weiss 2000; Davies e Schwinn 2006). Quando as flores que tiveram suas anteras removidas foram tratadas com GA_1, GA_3 ou GA_4 exógeno, a excisão de anteras foi compensada com recuperação da atividade transcricional. Ainda em flores de *Petunia*, as giberelinas promovem a expressão dos genes *AN1* e *AN2*. O gene *AN1* codifica um fator de transcrição bHLH, que ativa a transcrição do gene estrutural de antocianinas *DFR*, e *AN*2 codifica uma proteína do tipo MYB expressa somente em pétalas (Spelt et al. 2002). Assim, tanto *AN1* quanto *AN2* regulam genes da biossíntese de antocianinas modulados por GA (Weiss 2000; Quattrocchio et al. 2006).

Outro hormônio que afeta a pigmentação floral é o ácido abscísico (ABA). Na epiderme de uvas, por exemplo, ABA aumenta a expressão dos genes responsáveis pelo acúmulo de antocianinas, enquanto a auxina sintética ANA (ácido naftalenacético) reduz a expressão dos mesmos genes (Jeong et al. 2004).

A temperatura é um dos principais fatores ambientais que influenciam o acúmulo de antocianinas em tecidos vegetais. A expressão dos genes da biossíntese de antocianinas, incluindo *PAL, CHS, DFR* e *ANS* (Martin e Gerats 1993) é induzida por baixas temperaturas, e reprimida por altas temperaturas em diversas espécies de plantas (Biran e Halevy 1974; Dela et al. 2003; Lin-Wang et al. 2011), tais como *Aster* (Shaked-Sachray et al. 2002) e rosa (Biran e Halevy 1974; Dela et al. 2003).

Lo Piero et al. (2005) observaram que laranjeiras sanguinea [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] expostas a baixas temperaturas induziram fortemente a expressão dos genes *PAL, CHS, DFR*, e *UFGT* aumentando 40 vezes o teor de antocianinas no suco dos frutos em relação às amostras controle. De forma semelhante, em epiderme de uvas da cultivar

Cabernet Sauvignon sob altas temperaturas houve redução das antocianinas totais em relação ao controle (Mori et al. 2007). As flores de *Anigozanthos sp.* possuem pigmentação mais intensa em plantas cultivadas à baixa temperatura (Ben-Tal e King 1997). Esta pigmentação floral diminuiu linearmente com a elevação da temperatura (Ben-Tal e King 1997). Além disso, folhas de *A. thaliana*, também apresentaram acúmulo de pigmentos em resposta à baixa temperatura, resultando na ativação da transcrição de genes (Leyva et al. 1995; Lin-Wang et al. 2011). Observou-se também a redução ou completa inibição da pigmentação de botões florais de rosas da cultivar "*Baccara*" quando os mesmos foram mantidos sob alta temperatura (Biran e Halevy 1974).

A temperatura pode interferir não apenas na concentração de antocianinas, mas na cor observada das antocianinas produzidas, como observado em flores de *Hibiscus mutabilis*. As flores desta espécie apresentam-se brancas durante a parte da manhã, tornando-se rosadas no período da tarde e vermelhas durante a noite (Wong et al. 2009). Flores brancas conservadas em geladeira mantêm a coloração branca, porém quando retiradas da geladeira e aquecidas, lentamente tornam-se rosadas (Ng 2006).

De acordo com Stiles et al. (2007) e Lacey e Herr (2005), o aumento da produção de antocianinas nas flores em baixas temperaturas é adaptativo por causa do efeito de aquecimento promovido pelas antocianinas. Em experimentos realizados por Mu et al. (2010) mostrou-se que a cor das pétalas de *Gentiana leucomelaena* está associada à diferença entre a temperatura ambiental e a temperatura interna da flor. Este polimorfismo na temperatura interna da flor influencia o comportamento de abertura e fechamento das pétalas, sendo que flores azuis abrem mais cedo e fecham mais tarde que as flores brancas (Mu et al. 2010). Em um experimento descrito por estes autores, flores azuis foram pintadas de vermelho e de roxo, mostrando que as flores roxas abriram mais tarde e fecharam mais

cedo que as pintadas de vermelho, além de apresentarem maior temperatura das anteras. De forma semelhante, flores de *Plantago lanceolata* são mais escuras em temperaturas mais baixas (Stiles et al. 2007). Esta modificação na pigmentação floral influencia a temperatura interna da flor e atua no desenvolvimento dos grãos de pólen e no crescimento do tubo polínico (Lacey e Herr 2005; Webber et al. 2005; Stiles et al. 2007).

A presença de luz também é reconhecidamente necessária para a síntese de antocianinas em muitas plantas, mas muito pouco se sabe sobre o papel da luz no controle da pigmentação das flores. Estudos têm demonstrado que na presença de baixas intensidades luminosas há diminuição ou até desaparecimento da cor das flores em várias espécies (Ben-Tal e King 1997; Uddin et al. 2001; Farzad et al. 2002). Em geral, o efeito da luz no aumento da produção de antocianinas é atribuído ao seu efeito sobre a fotossíntese e, portanto, ao teor de carboidratos (Biran e Halevy 1974). No entanto, estudos mais recentes apontam um papel para os fitocromos e criptocromos na influência da luz sobre a pigmentação, uma vez que a exposição à luz vermelha e à azul induz o acúmulo de antocianinas em tecidos vegetais e em células cultivadas *in vitro* (Weiss 2000).

A luz é conhecida por ser necessária para a produção de antocianinas em muitas plantas, incluindo as de milho, berinjela, mostarda e *Lisianthus.* Em *Eustoma grandiflorum*, *Petunia* e *Chrysanthemum* a baixa intensidade de luz diminui a pigmentação das flores (Ben-Tal e King 1997), da mesma maneira que em *Viola cornuta* a luz é necessária para o surgimento da coloração nas flores, mas se flores pigmentadas forem mantidas no escuro não sofrem alteração de cor (Farzad et al. 2002).

Em algumas plantas tais como *Petunia*, as folhas sob alta luminosidade mostram maior expressão de genes da biossíntese de flavonóides necessários para a produção de

antocianinas tais como os genes precoces *CHS* e *CHI*, assim como os genes tardios *DFR* e *ANS* (Farzad et al. 2002; Albert et al. 2009).

De acordo com Farzad et al. (2002), o acúmulo dos mRNAs de genes envolvidos na síntese de antocianinas induzidos pela luz tem sido relatado, e uma série de elementos sensíveis à luz foram caracterizados nos promotores de tais genes regulados por luz. Estudos realizados por Biran e Halevy (1974) em rosas, mostraram que a síntese de pigmentos das pétalas é ativada apenas após a abertura dos botões florais. Quando as pétalas que estavam em condições de escuro, devido à proteção exercida pelas sépalas, entram em contato com a luz, observou-se um aumento na intensidade da pigmentação. Além disso, Nguyen e Cin (2009) observaram o efeito da luz na cor das folhas de duas variedades de coleus (*Solenostemon scutellarioides*) cultivadas em maior ou menor intensidade de luz. A variação foliar de coleus é caracterizada principalmente por sua vasta coloração, a qual varia de vermelha a púrpura, devido à diferença de distribuição de antocianinas e clorofila ao longo da folhagem (Marcotrigiano et al. 1990). As plantas cultivadas em menor intensidade de luz tiveram a transição da coloração mais lenta do que as plantas cultivadas sob maior intensidade (Nguyen e Cin, 2009).

Em *Passiflora*, a interferência da luz pode ser facilmente observada em folhas de *Passiflora suberosa* (Barp et al. 2006). Folhas verdes expostas a pleno sol mudaram sua coloração de verde para violeta e folhas artificialmente mantidas em áreas sombreadas continuaram com a coloração verde. Cobrindo as folhas expostas ao sol com papel contendo furos, a pigmentação violeta foi induzida em regiões localizadas da folha (manchas). Os autores sugeriram que essa variação de cor foi devida a um aumento da fotoinibição do aparelho fotossintético e a correspondentes danos resultantes da incidência de luz UV,

sugerindo que o fotorreceptor relacionado com a biossíntese de antocianinas é muito sensível à incidência de luz (Barp et al. 2006).

Meng et al. (2004), utilizando inflorescências jovens de *Gerbera hybrida* mantidas no escuro, observaram bloqueio da pigmentação e inibição da expressão dos genes de *CHS* e *DFR*, confirmando o papel da *CHS* e *DFR* como enzimas fundamentais responsáveis pela biossíntese de antocianinas induzida por luz. Resultados adicionais para as diferentes qualidades de luz avaliadas indicaram que os fotorreceptores de luz azul e vermelha estão envolvidos na fotorregulação da pigmentação em *Gerbera*, onde a expressão gênica de *CHS* e *DFR* foi promovida pela luz azul, e a de *CHS* foi reforçada pela luz vermelha.

A via de biossíntese de antocianinas ocorre principalmente no citoplasma (Zhao e Dixon 2010) sendo finalizada com o depósito de antocianinas no vacúolo celular onde permanecem acumuladas e as condições permitem a plena expressão da cor do pigmento (Schwinn e Davies 2004). Esse mecanismo de transporte para o vacúolo, não é tão conhecido como a biossíntese de antocianinas.

O pH vacuolar tem grandes efeitos sobre a mudança de cor e de pigmentos das flores, pois as moléculas de antocianinas sofrem mudanças dependentes do pH (Davies 2004; Tanaka et al. 2009; Miller et al. 2011), que determinam a sua estrutura final e o seu espectro de absorção (Glover 2007). Na maioria das espécies, a coloração das flores resulta do acúmulo de antocianinas no vacúolo de células epidérmicas, assim, o pH vacuolar destas células é um fator importante para a coloração final das flores. Em ambientes com baixo pH, as antocianinas apresentam cor vermelha e em ambientes de pH neutro ou alcalino, cor azul (Yoshida et al. 2003; Tanaka et al. 2009, 2010). Isto acontece porque uma molécula de antocianina sofre rearranjos complexos em soluções aquosas, existindo em diferentes formas coloridas ou incolores, dependendo do pH do seu ambiente (Davies 2004). Em pH ácido as

antocianinas estão numa forma estável e em pH alcalino as formas são mais instáveis (Yoshida et al. 2003).

A atuação do pH pode ser observada em várias espécies, como em flores de *Aechmea* (Bromeliaceae) que mudam de rosa para azul, *Pulmonaria* (Boraginaceae) mudando de vermelho para azul, *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) de azul para rosa (Weiss 1995), e em brácteas de *Hydrangea* nas quais alterações na absorção de metais do solo, levam à mudança na cor. A adição de acidificante em solos permite a absorção de alumínio pela flor, o alumínio é sequestrado dentro dos vacúolos de células, uma vez que é tóxico, e assim verificam-se antocianinas rosa em brácteas de flores azuis (Miller et al. 2011). Em células vegetais, geralmente o vacúolo é mais ácido que o citoplasma. Em *Petuni*a, quanto mais ácido o pH vacuolar, mais vermelha a flor será. Assim, as flores de um mutante de *Petunia* que não pode acidificar o vacúolo são mais azuladas (Nguyen e Cin 2009; Miller et al. 2011). Alguns dos fatores de transcrição envolvidos na síntese de antocianinas em *Petuni*a, como os genes *AN1, AN2* e *AN11* regulam múltiplas vias, incluindo as que alteram o pH vacuolar (Spelt et al. 2002).

Em *Ipomoea tricolor* foi demonstrada a presença de uma proteína que se acredita estar envolvida no transporte de H^+ entre vacúolos (Glover 2007). Para confirmar se a alteração da cor das pétalas de *I. tricolor* de púrpura para azul, durante a abertura da flor, é devida a uma mudança no pH, Yoshida et al. (2005) trataram flores abertas com um acidificante (dióxido de carbono), resultando na redução do pH celular das pétalas e na reversão da cor de azul para púrpura. Adicionalmente, observou-se que a relação Na^+/H^+ estava mais elevada em membranas celulares das pétalas de flores maduras, azuis.

As bombas membranares de Na^+/H^+ sequestram o sódio armazenado no vacúolo em troca de prótons e, consequentemente, reduzem o gradiente de pH contribuindo para a

acidificação do vacúolo (Fukada-Tanaka et al. 2000). Entre as proteínas mais abundantes na membrana vacuolar estão as ATPase vacuolares (v-ATPase) e as pirofosfatases (PPases), bombas de prótons responsáveis por transportar prótons do citoplasma para o vacúolo e, portanto, por regular o pH vacuolar (Quattrocchio et al. 2006; Verweij et al. 2008). Yoshida et al. (2005) e Pittman (2012), sugerem que o fluxo de H^+ em troca com K^+ em vez de Na^+, aumenta o pH vacuolar e o aumento de K^+ no vacúolo pode simultaneamente contribuir para modificações osmóticas que induzem a expansão celular e, assim, coordenar a abertura da flor com a mudança de cor.

1.6. Diversidade e pigmentação floral em Passifloraceae

Há uma grande diversidade floral na natureza, com ampla variedade de formas, tamanhos e cores, resultando em diferentes fenótipos florais. As características florais possuem uma importante função adaptativa, relacionada à atração de polinizadores e ao sucesso reprodutivo (Weiss 2000; Nishihara e Nakatsuka 2011). Esta diversidade é amplamente representada no gênero *Passiflora*.

Passiflora é o maior gênero da família Passifloraceae compreendendo grande diversidade de lianas e pequenas árvores. O maior subgênero pertencente ao gênero *Passiflora é* o subgênero *Passiflora,* seguido pelo subgênero *Decaloba* (Muschner et al. 2003; Hansen et al. 2006). O gênero *Passiflora* apresenta várias características florais únicas como a presença de uma ou múltiplas séries de filamentos da corona, geralmente com cores vivas, órgãos sexuais organizados em um androginóforo e um elaborado nectário floral (Krosnick e Freudenstein 2005).

Localizada entre a coluna do androginóforo e o perianto, no interior do tubo floral, a corona forma um conjunto de estruturas (geralmente filamentos), de várias formas e tamanhos, ordenadas em séries circulares sucessivas, caracterizando cada espécie (Cervi 1997).

Segundo Ulmer e Macdougal (2004), a corona exerce um papel fundamental na atração de polinizadores, pois seus filamentos são como plataformas de pouso para abelhas e outros insetos atraídos pelo odor das flores. Além de a coloração ser responsável pela atração de polinizadores, ela exerce função estética, devido ao amplo espectro de cores, principalmente em plantas ornamentais (Grotewold 2006).

Portanto, além das razões ecológicas relacionadas com as modificações dos agentes polinizadores ao longo do processo evolutivo do gênero, relacionadas à pigmentação da corona, há ainda um apelo econômico ao estudo da pigmentação da corona de flores de *Passiflora*. *Passiflora edulis* Deg. e *Passiflora alata* são espécies comerciais, o maracujazeiro amarelo (ou maracujá azedo), e o maracujá doce, respectivamente. Possuindo importância econômica pelos frutos, consumidos em natura ou na forma de sucos concentrados.

Essa diversidade floral amplamente observada entre as espécies de *Passiflora* é caracterizada pela ampla variedade de pigmentação encontrada em filamentos de corona, devido ao acúmulo de pigmentos no vacúolo das células epidérmicas e diferentes tipos de moléculas de antocianinas, como observado para outras angiospermas (Davies 2009; Shang et al. 2011; He et al. 2011; Albert et al. 2011). Estes pigmentos florais geralmente estão presentes em uma única camada de células da epiderme (camada L1) onde se expressam os genes estruturais e regulatórios necessários para a biossíntese de pigmentos (Shang et al. 2011). Desta forma, nosso interesse em estudar os padrões de pigmentação da corona de

espécies de *Passiflora* foi ampliado pela possibilidade de estudar estes processos no nível molecular, devido à disponibilidade do banco de etiquetas de sequências expressas (ESTs) produzidas de botões florais das espécies de *Passiflora, P. edulis* Deg. e *P. suberosa* L. pelo projeto "PASSIOMA" (Dornelas et al. 2006, Cutri et al. 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

1) Estudar o padrão de pigmentação dos filamentos da corona de *Passiflora* spp.

2.2. Objetivos específicos

1) Avaliar a influência da manipulação da concentração de auxinas e giberelinas na pigmentação da corona em *Passiflora* em desenvolvimento, *in vivo* e *in vitro*, com verificação dos efeitos sobre a intensidade de pigmentação da corona e modificações no padrão de deposição de antocianinas por espectrofotometria.

2) Identificar e caracterizar o padrão de expressão de um gene codificador de fator de transcrição potencialmente envolvido na regulação de síntese de antocianinas, MYB R2R3, durante o desenvolvimento floral em *Passiflora suberosa*, mediante o uso de RT-PCR e hibridização *in situ*.

3) Verificar modificações do padrão de expressão do gene acima, mediante manipulação da concentração de auxinas e giberelinas em botões florais de *P. suberosa.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e estabelecimento de estágio de desenvolvimento de botões florais

O material vegetal utilizado neste trabalho foi proveniente de plantas mantidas no Banco de Germoplasma de *Passiflora* do Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, São Paulo, Brasil.

Para caracterizar os padrões de pigmentação da corona de *Passiflora*, botões florais das espécies *P. morifolia* Mast, *P. coccinea* Aubl., *P. alata* C., *P. suberosa* L., *P. foetida* L. var. *hirsuta*, *P. mucronata* Lam. e *P. edulis* Deg. em vários estágios de desenvolvimento foram coletados do banco de Germoplasma (Figura 2).

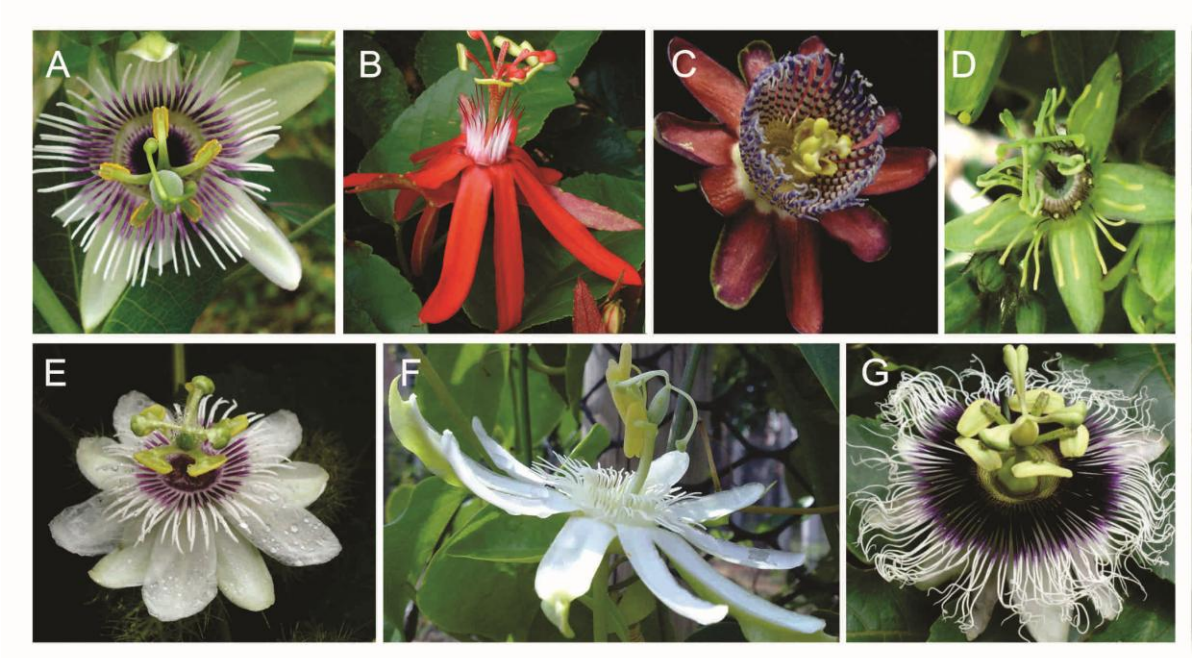

Figura 2: Flores de *Passiflora* pertencentes ao banco de Germoplasma da UNICAMP. **A:** *P. morifolia*, **B:** *P. coccinea*, **C:** *P. alata*, **D:** *P. suberosa*, **E:** *P. foetida*, **F:** *P. mucronata*, **G:** *P. edulis*.

Os estágios de desenvolvimento dos botões florais foram determinados de acordo com a posição ocupada pelo botão no ramo, determinada pelo número de folhas desdobradas e pela pigmentação dos filamentos da corona, segundo Nave et al. (2010). Neste sistema de

posicionamento, os nós de um ramo são numerados conforme a posição da folha mais madura formada, mas ainda não totalmente desdobrada, a qual se localiza a aproximadamente 13-15 nós do meristema apical caulinar, demonstrado na figura 3.

Figura 3: Esquema do sistema de posicionamento de nós em um ramo de *Passiflora edulis.* Enumeração do nó 17 a partir da primeira folha não totalmente desdobrada.

As espécies selecionadas para avaliar a influência da aplicação de fitorreguladores foram *P. edulis, P. morifolia* e *P. suberosa*, (Figuras 2A,D e G, respectivamente) sendo os tratamentos hormonais realizados *in vitro* e *in planta*. Para a análise da expressão do gene MYB-R2R3 foi utilizada a espécie *P. suberosa*, para a qual um clone de cDNA putativamente correspondente a este gene estava disponível no banco de dados do PASSIOMA. Para tal, botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados em nitrogênio líquido e devidamente armazenados a -80^{o}C até o momento de sua utilização. As amostras utilizadas para hibridização *in situ* foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 16 horas a 4°C e desidratadas em série etanólica.

3.2. Padrões de pigmentação da corona de *Passiflora*

Tanto botões florais quanto os filamentos da corona das espécies selecionadas (Figura 2) foram medidos usando um paquímetro digital (Worker Inc., USA), considerando desde a base do pedúnculo até o ápice do botão floral. As medidas iniciaram-se em botões com ausência de pigmentação nos filamentos da corona e foram finalizadas em botões em pré-antese, com filamentos totalmente desenvolvidos e pigmentados.

Os números de séries de filamentos da corona, o comprimento e a porção pigmentada dos filamentos da corona foram analisados em todas as espécies e os botões fotografados usando uma câmera SONY Cyber-shot DSC-HX100V. Pelo menos dez botões de cada espécie em diferentes estágios foram analisados.

Devido à grande disparidade em terminologia de cores, a nomenclatura de cores descritas nesse estudo seguiu o The Royal Horticultural Society Colour Chart (RHSCC) e foi comparada com ISCC-NBS (Inter- Society Color Council - United States National Institute of Standards and Technology).

3.3. Aplicação de fitorreguladores *in planta*

Durante todo período de florescimento, diariamente botões florais, em estágios adequados, das plantas de *Passiflora edulis, P. morifolia* e *P. suberosa* previamente selecionados e medidos receberam pulverização diária (duas aplicações, uma pela manhã, por volta das 9 horas e outra no período da tarde, por volta das 16 horas) com água e agente espalhante (Tween 20,0 a 0,01%; controle) ou com uma das soluções dos fitorreguladores e agente espalhante. As concentrações dos fitorreguladores utilizadas nos tratamentos foram

baseadas em dados de literatura, de experimentos semelhantes com outras espécies de plantas (Loreti et al. 2008) e foram as seguintes:

- 5; 10 e 100 micromolar de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético);
- 5; 10 e 100 micromolar de GA_3 (ácido giberélico);
- 5; 10 e 100 micromolar de NPA (ácido naftil-ftalâmico);
- 5; 10 e 100 micromolar de PACLO (paclobutrazol).

Após os tratamentos, os filamentos de corona foram coletados, fotografados e analisados. Filamentos de corona de *P. suberosa* tratados com NPA e botões florais não tratados (controle) foram macerados e utilizados para as técnicas de RT-PCR e hibridização *in situ.*

3.4. Aplicação de fitorreguladores *in vitro*

Foram utilizados botões florais de *P. edulis* com aproximadamente 1,8 cm de comprimento. Experimentos-piloto e análises preliminares revelaram que botões florais de *P. edulis* com o tamanho descrito acima não possuem corona pigmentada e que o processo de pigmentação, a partir deste estágio, dura cerca de três dias. Desta forma, os experimentos de cultivo in *vitro* foram idealizados para durar 72 horas. Após assepsia, os botões florais foram cortados e os filamentos de corona retirados e cultivados axenicamente em cultura *in vitro* em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com fitorreguladores e solidificado com 2,8 g/L de Phytagel (Sigma). Os fitorreguladores foram utilizados nas mesmas concentrações que as empregadas nas aplicações *in planta*, sendo dez botões

utilizados por tratamento, totalizando 130 botões florais. Como controle, dez amostras foram cultivadas somente em meio MS. Os filamentos de corona foram cultivados sob 16/8 horas de regime de luz/escuro com 23 μmol^{-2} s^{-1} de radiação de luz, fornecida por duas lâmpadas Gro-Lux (Sylvania, 20 W) e por uma lâmpada branca fria fluorescente (GE, 80 W). A temperatura da sala de cultura foi mantida em 26 ± 2°C.

Após 72 horas em cultura, os filamentos foram fotografados e a quantidade de pigmentação presente nos filamentos foi comparada com a de filamentos de botões florais de plantas controle. Para tal, amostras de 0,05 g de filamentos de corona foram submetidas à extração de pigmentos no escuro, em 1 mL de solução de metanol-água-ácido acético na proporção de 11:5:1 (v/v/v) por 24 horas. Após este período, os extratos foram centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos de acordo com Markham e Oftman (1993) e analisados em espectrofotômetro UV-vis Synergy™ 2 BioTek, equipado com o programa Gen 5 Data Analysis Software. Amostras-padrão de antocianinas, como cianidina-3-O-glicosideo, malvidina-3-O-glicosideo e pelargonidina-3-O-glicosideo (Sigma), foram utilizadas nas concentrações de 0,2% diluídas em solução extratora para comparação das amostras. Amostras contendo apenas a solução extratora foram utilizadas como "branco" (controle negativo), e as leituras foram realizadas em triplicatas.

3.5. Análise da expressão do gene MYB R2R3 por RT-PCR

Para a realização de RT-PCR, RNAs totais foram isolados pelo método do Trizol® (Invitrogen®) de tecidos de raiz, caule, folha, botão floral, botão floral tratado com NPA, fruto imaturo, fruto maduro, tépala, corona, androginóforo, antera e estigma de *P. suberosa.* Os tecidos foram inicialmente congelados em nitrogênio líquido e, após a extração, sofreram

tratamento com DNase®. A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit "Super Script First Strand Synthase" (Invitrogen). As fitas de cDNA obtidas foram utilizadas como molde nas reações de PCR. Foram desenhados primers específicos para o gene MYB R2R3 (clone PACEPS7022E07 selecionado do banco de dados do Projeto PASSIOMA): 5'-CCCAAAAGCTGCTGGTCTTCT-3' e 5'-CCATCGCTACAACTACGA-3') (Dornelas et al 2006). Primers para um homólogo do gene *ACTINA* (PACTINF, 5´-ACCCACAACAGAGCACAACA-3´e PACTINR: 5´-CCAGTGGTGGTGAAGGAGTAA-3´), foram utilizados para a normalização das amostras. As condições de PCR foram as seguintes: 95^{o}C por 3 min, seguidos de 30 ciclos de 20 s a 95^{o}C; 20 s a 57^{o}C; 40 s a 72^{o}C; com extensão final de 5 min a 72^{o}C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e os resultados obtidos foram documentados e analisados.

3.6. Hibridização *in situ*

Após a validação por RT-PCR, o clone PACEPS7022E07, que contém o ortólogo de MYB R2R3 em *P. suberosa* foi utilizado para a síntese de sonda para a detecção do padrão de expressão através da técnica de hibridização *in situ* em botões florais em diferentes fases de desenvolvimento. Esta análise permitiu a contextualização do padrão de expressão gênica nas estruturas anatômicas observadas, ao nível celular.

As sondas sense e antisense foram obtidas pela síntese *in vitro* de moléculas de RNA com incorporação de digoxigenina (DIG), segundo as instruções do fabricante do material de marcação (Boehringer-Mannheim). Para a hibridização *in situ*, as amostras de botões florais foram fixadas a vácuo, em 4% de paraformaldeído (p/v), por menos de 16 horas e submetidas à desidratação etanólica total e posteriormente tratadas com série de xilol. As

amostras vegetais foram emblocadas em parafina, seccionadas seriadamente (8 μm) e montadas em lâminas de vidro. A hibridização foi conduzida sob condições de estringência apropriadas no material desparafinado em xilol e submetido ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (Dornelas et al. 1999; Dornelas et al. 2000). Através de reação colorimétrica, utilizando-se anticorpos anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina, empregando NBT/BCIP como substrato (PIERCE) obteve-se a visualização do sinal. As lâminas hibridizadas foram observadas ao microscópio e fotografadas para posterior análise.

3.7. Determinação do pH celular em tecidos da corona de *Passiflora alata*

Filamentos de corona foram removidos de flores de *P. alata* em antese e divididos em duas partes, de acordo com a coloração das bandas: a parte superior da corona apresenta bandas roxas azuladas e as bandas basais variando de vermelho à purpura. Para esta análise de coloração da corona, as bandas brancas intermediárias foram excluídas. O material foi macerado em 6 mL de água destilada e o pH medido diretamente por 1 minuto, com um pHmetro digital (Micronal, modelo B474). Inicialmente os resultados de pH de cada amostra foram registrados e, posteriormente, o pH foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de potássio (KOH) para obter os valores de pH 2,5, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 de todas as amostras. Como controle negativo utilizou-se água destilada.

4. RESULTADOS

4.1. Padrões de pigmentação e estágios de desenvolvimento da corona em *Passiflora*

Os botões florais de cada espécie foram classificados em estágios de acordo com Nave et al. (2010) passando por modificações realizadas por nosso grupo concordando com estudos preliminares, baseadas na posição do botão floral em relação à extremidade do ramo, número do nó (Figura 3). Observou-se que as posições das flores em antese correspondiam, em geral, ao vigésimo quarto nó em espécies do subgênero *Decaloba*, *Passiflora suberosa,* e ao vigésimo oitavo nó em espécies do subgênero *Passiflora*, *Passiflora edulis.*

Em seguida, diferentes fases de desenvolvimento da pigmentação da corona durante o desenvolvimento floral foram estabelecidas. Dessa forma, foi utilizado um botão floral no período de pré-pigmentação (ausência de pigmentação), um botão definido como o período de estabelecimento de padrão com o início do acúmulo de pigmentos e um botão antes da antese, com padrão completamente estabelecido.

Os padrões de pigmentação observados em filamentos da corona de *Passiflora* foram organizados em cinco grupos distintos, sendo eles: padrão não pigmentado, uniforme, "pontuado", "*dégradée"* e bandeado.

Padrão não pigmentado

P. mucronata, P. galbana, P. misera e *P. vespertilio* (Ulmer e MacDougal 2004) são exemplos de espécies com coronas não pigmentadas. Em *P. mucronata* suas flores brancas têm duas séries de corona e um opérculo filiformes. Durante todas as fases de

desenvolvimento de corona, nenhum sinal de pigmentação foi observado nas células do filamento (Figura 4).

Figura 4: Caracterização dos estágios de desenvolvimento do padrão de pigmentação em botões florais de *Passiflora mucronata.* Padrão não pigmentado. Os números de 20 a 27 são referentes a posição ocupada pelo botão floral no ramo durante o período de desenvolvimento. Barra: 5 mm.

Padrão uniforme

Este padrão de pigmentação não é comumente encontrado entre espécies de *Passiflora*, mas pode ser visto, por exemplo, em *P. edmundoi,* que pertence ao subgênero *Passiflora* exibindo pigmentação da corona uniforme na cor púrpura azul brilhante contrastando com pétalas rosa (Ulmer e MacDougal 2004).

Padrão "Ponteado"

Algumas espécies podem apresentar filamentos da corona e outras partes do perianto manchadas com pontos coloridos. Um exemplo é *P. haematostigma* do subgênero *Astrophea* (Ulmer e MacDougal 2004), cuja corona verde amarelada tem pontos vermelho escuro ao longo dos filamentos.

Padrão *"Dégradée"*

Caracterizado por um gradiente de cor nos filamentos da corona com pigmentação tendendo a ser mais intensa na porção proximal (basal), do centro da flor para fora, como observado em *P. edulis, P. foetida, P. morifolia* e *P. suberosa* (Figura 5A-D). Podendo também ser, em contraste, mais pigmentados na porção distal (terminal) como observado em flores de *P. coccinea* que apresentam pigmentação vermelha escura no ápice dos filamentos, que clareia em direção à porção basal (Figura 5E).

Em *P. edulis,* (Figura 5A) as séries externas de filamentos em botões florais com aproximadamente 1,5 cm de comprimento ainda não apresentavam pigmentação (estágio 22). Esta iniciou-se com a coloração rosa púrpura na porção basal dos filamentos, bem como na série interior reduzida e nas pontas do opérculo (estágios 23 e 24, Figura 5A). A alteração da pigmentação de rosa púrpura para púrpura escuro correspondeu a 30% da área total dos filamentos (estágio 25). No estágio de desenvolvimento 27, a área pigmentada manteve-se a mesma e a coloração permaneceu púrpura escura.

Em *P. foetida,* (Figura 5B), os botões no estágio 17 apresentaram duas séries de filamentos de corona desenvolvidos e não apresentavam pigmentação. Já em botões com 0,9 cm de comprimento observaram-se filamentos de corona ligeiramente pigmentados de roxo claro (estágio 18). Subsequentemente, a pigmentação púrpura rosa foi observada em filamentos curtos de duas séries interiores em botões com 1,0 cm de comprimento (estágio 19). Botões com 1,2 cm de comprimento exibiram filamentos completamente pigmentados, que mudaram do roxo ao violeta vívido no estágio 20 e uma pequena pigmentação foi observada nas células do opérculo.

O desenvolvimento da pigmentação de botões florais de *P. morifolia* também foi examinado (Figura 5C). No início do desenvolvimento da corona no estágio 16, a

pigmentação não estava presente. A coloração púrpura só foi detectada no estágio 17, seguindo-se um aumento na intensidade da pigmentação na região basal atingindo 57% da pigmentação dos filamentos da corona e a completa pigmentação do opérculo até o estágio 20. Em fase mais avançada a corona apresentou pigmentação púrpura vívida, correspondente a 66% do comprimento do filamento (estágios 21 e 23).

Já a corona de *P. suberosa* apresentou duas séries de filamentos, porém, somente os filamentos menores da série interna e o opérculo são pigmentados. No estágio 20, os botões apresentaram 0,4 cm de comprimento com ausência de pigmentação na corona. O início da pigmentação do opérculo foi observado em botões florais no estágio 21 e a pigmentação basal dos filamentos da corona teve início no estágio 22 com coloração vermelho púrpura moderado (Figura 5D).

Por outro lado, em flores de *P. coccinea* foi observado um exemplo do padrão de pigmentação "*dégradée"* basípeta (Figura 5E), contrário aos casos de padrão "*dégradée"* apresentados anteriormente. Não foi observada pigmentação da corona em botões florais com até 2,3 cm (estágio 21). Porém, em botões com 2,5 cm pode-se observar o acúmulo de pigmentos em pontos avermelhados na parte terminal dos filamentos externos continuando até o estágio 25 em botões com 4,7 cm de comprimento aproximadamente. Botões florais com 5,2 cm e 6,7 cm (estágios 26 e 27, respectivamente) apenas apresentaram intensificação da pigmentação vermelha vívida.

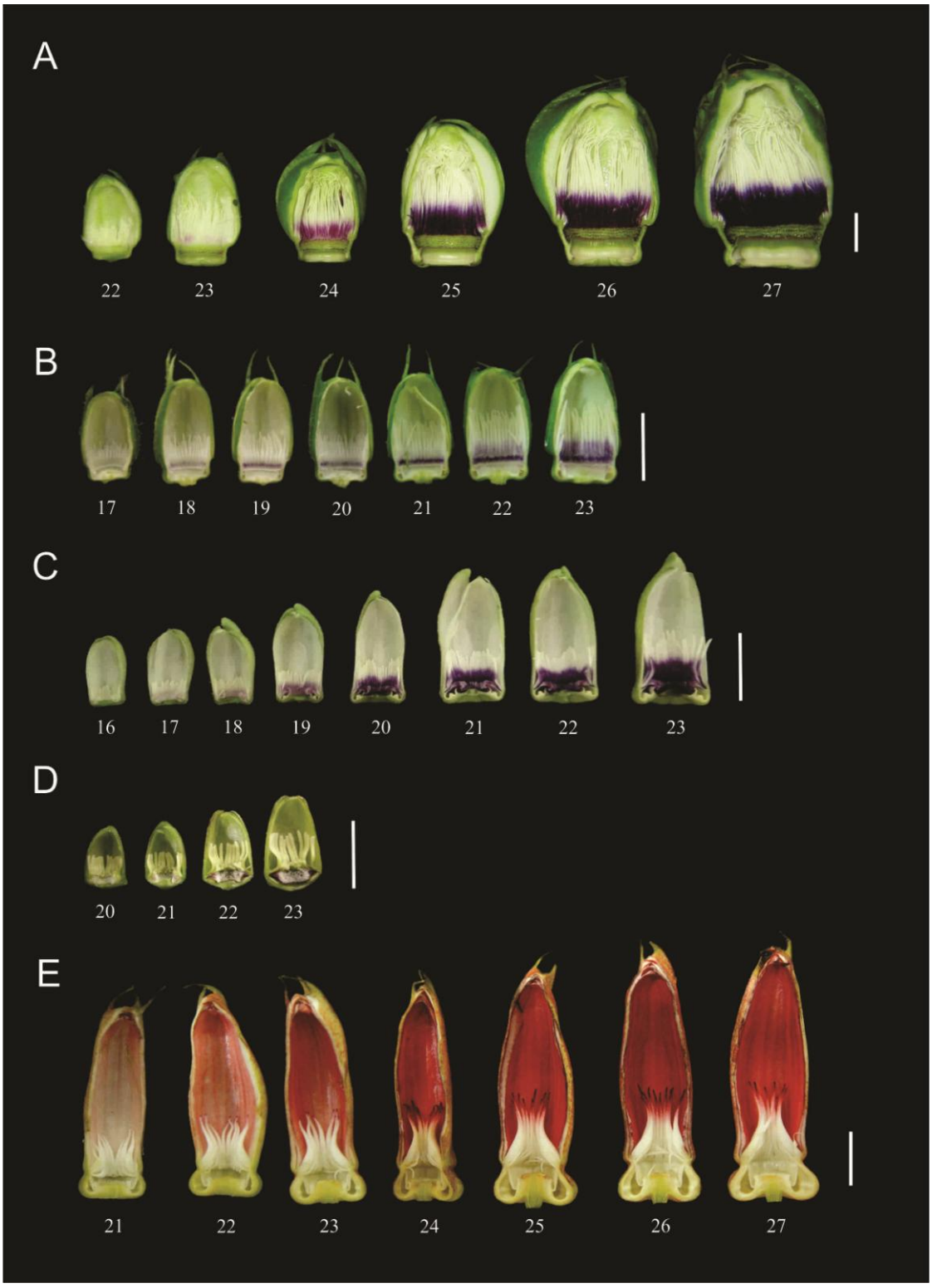

Figura 5: Caracterização dos estágios de desenvolvimento do padrão de pigmentação "*dégradée"* em botões florais de *Passiflora.* **A:** *P. edulis* **B:** *P. foetida* **C:** *P. morifolia* **D:** *P. suberosa.* e **E:** *P. coccínea.* Os números abaixo dos botões indicam a posição ocupada pelo mesmo no ramo durante o período de desenvolvimento. Barra: 5 mm.

Padrão "Bandeado"

Observado em um grande número de espécies como *P. alata* (Figura 6), *P. gibertii, P. platyloba, P. amethystina e P. cincinata* (Ulmer e MacDougal 2004) este padrão é caracterizado pela pigmentação "bandeada" dos filamentos da corona. Geralmente há variação na intensidade da coloração das bandas ao longo dos filamentos.

Em *P. alata* (Figura 6), os filamentos da corona de botões florais com 1,5 cm de comprimento estavam em estágio de pré-pigmentação (estágio 21). O primeiro estágio de desenvolvimento da pigmentação teve início com a presença de listras de cor rosa clara visível em botões com 1,7 cm de comprimento (estágio 22). Subsequentemente, uma banda adicional rosa clara desenvolveu-se na região basal nos filamentos de botões com 2,0 cm de comprimento (estágio 23). Quatro bandas foram identificadas nos botões florais com 2,3 cm de comprimento, onde a mais distal apresentou coloração azul clara (estágio 24). Nos botões com 2,5 cm de comprimento foram observados filamentos com cinco bandas e início da sexta na parte basal do filamento (estágio 25). Desta forma, bandas sucessivas foram adicionadas na base dos filamentos com o progresso do desenvolvimento da corona até o estágio 27, quando o padrão foi estabelecido apresentando filamentos de corona com bandas em coloração vermelha púrpura intensa (porção basal), rosa púrpura profunda (porção mediana), azul arroxeado pálido (porção superior) e as pontas brancas levemente onduladas. Além disso, até o último estágio de desenvolvimento o opérculo permaneceu não pigmentado.

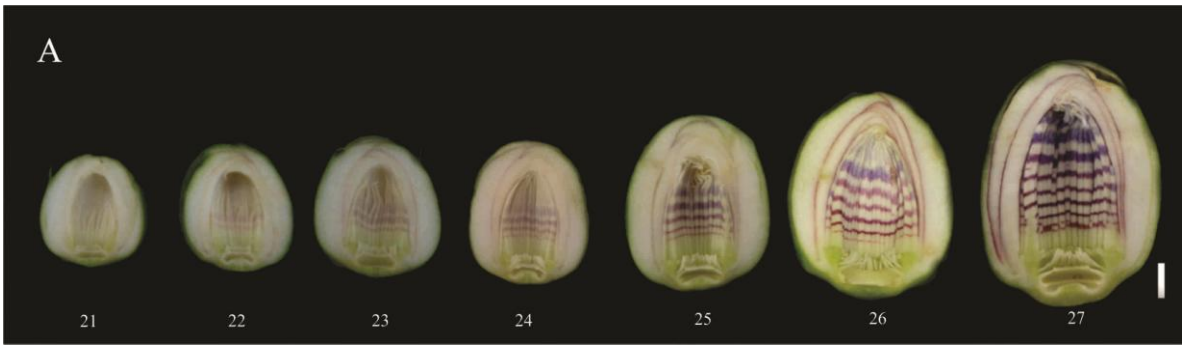

Figura 6: Caracterização dos estágios de desenvolvimento do padrão de pigmentação bandeado em botões florais de *Passiflora alata.* Os números de 21 a 27 são referentes a posição ocupada pelo botão floral no ramo durante o período de desenvolvimento. Barra: 5 mm.

4.2. Acúmulo e distribuição de pigmento

Os padrões de pigmentação observados em diferentes espécies de *Passiflora* estão provavelmente relacionados à quantidade de pigmentos produzidos e ao acúmulo e distribuição destes pigmentos ao longo das células da epiderme da corona. Para uma melhor caracterização, filamentos de corona de flores de *P. alata* e *P. coccinea* em antese foram examinados em maior detalhe (Figura 7).

Secções longitudinais e transversais de filamentos de corona *P. alata* apresentaram pigmentos exclusivamente nas células da epiderme (Figuras 7B-C). Além disso, foi possível verificar que o acúmulo de pigmentos ocorre apenas em um determinado grupo de células em diferentes regiões dos filamentos, de acordo com o padrão de pigmentação de cada espécie observada.

Não foi possível identificar diferenças morfológicas ou estruturais de limites entre células pigmentadas e não pigmentadas de ambas as espécies (Figuras 7D-I e 7M-O). Geralmente, em uma área pigmentada da corona, há presença de células que contêm pigmento ou não (Figuras 7F e 7I).

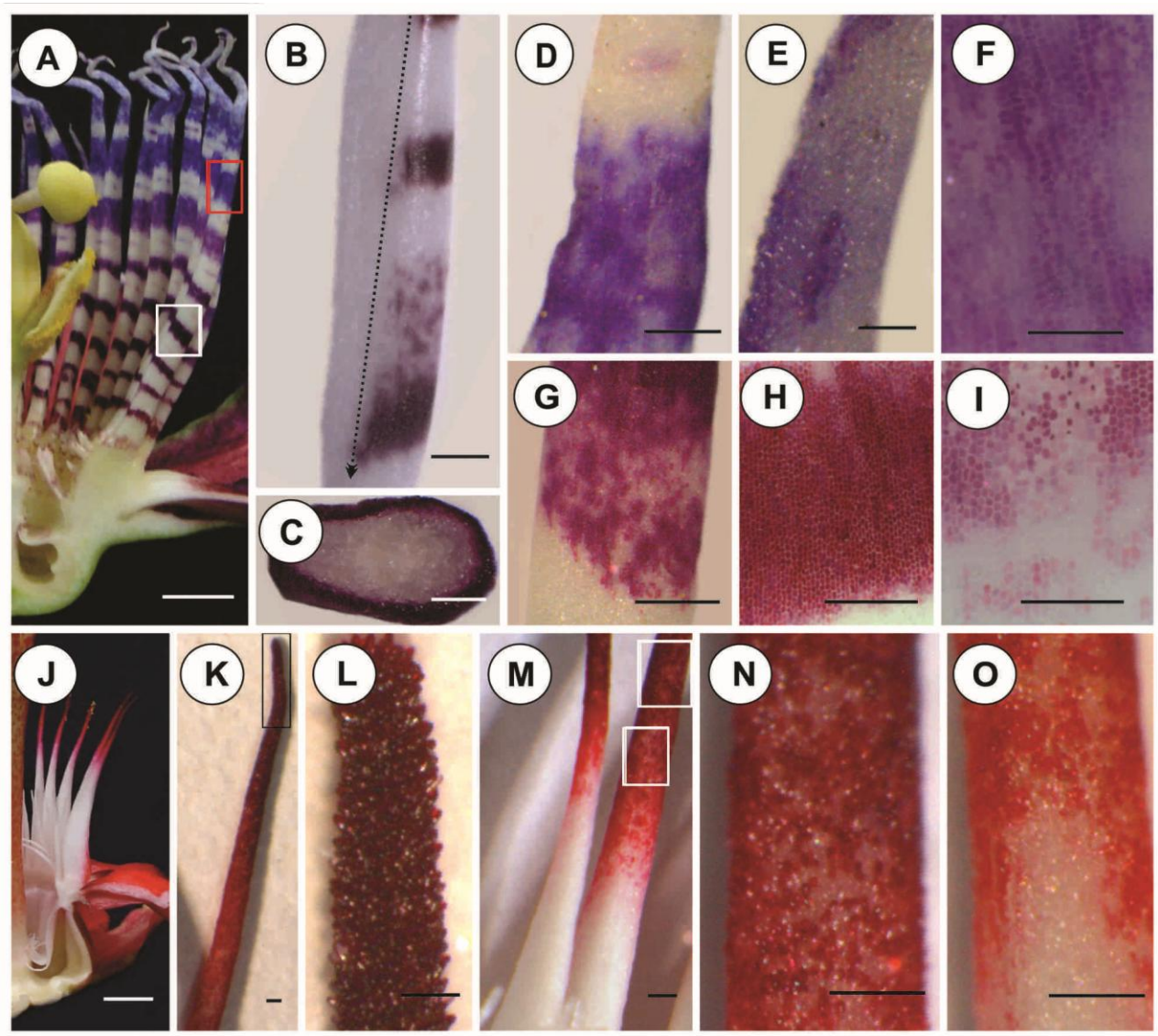

Figura 7: Padrão de pigmentação da corona em *Passiflora.* **A:** flor de *P. alata* em corte longitudinal. A região no inserto vermelho é mostrada em detalhes em D e a região do inserto branco em H; **B:** Secção longitudinal e **C:** transversal de filamentos de corona de *P. alata* com acúmulo de pigmentos nas células da epiderme; **D-I** distribuição irregular de pigmentos em *P. alata*. **J:** Flor de *P. coccinea* em corte longitudinal*;* **K:** Filamento da corona de *P. coccinea;* o inserto em K é mostrado em L. **L:** Detalhe da pigmentação mais intensa no ápice do filamento; **M:** distribuição irregular de pigmentos em filamentos da corona de *P. coccinea*; O inserto mais apical é mostrado em N e o mais basal da região pigmentada é mostrado em O. **N:** Detalhe da pigmentação na região superior do filamento; **O:** Detalhe da pigmentação na região inferior do filamento. Barras: A e J: 1cm; B, D, G, H, I, K, L, M, N, O: 0,1 cm; E-F: 0,07 mm e C: 0,5 cm.

O padrão de pigmentação "*dégradée"* ilustrado na figura 3 observado em flores de *P. coccinea* apresenta quantidade e distribuição de pigmentos vermelhos que variam entre

diferentes regiões, tendo nas pontas dos filamentos células com elevada quantidade de pigmentos, distribuídos uniformemente, contribuindo para a coloração vermelha escura, como observado nas figuras 7L-O. O tipo de pigmento encontrado nas células é sempre o mesmo, porém, a quantidade de células pigmentadas diminui na direção da base do filamento até não apresentar nenhuma célula pigmentada, dando a aparência de que a coloração vermelha está mais clara (Figura 7O).

4.3. Determinação do pH celular em tecidos da corona de *Passiflora alata*

A fim de determinar se a variação de cores observada no padrão bandeado dos filamentos da corona de *P. alata* é devida a uma alteração no pH celular, determinou-se o pH de extratos celulares das regiões coloridas da corona. Bandas superiores de cor azul arroxeada pálida apresentaram extratos celulares com pH 5,45 (Figura 8A). Já as bandas basais dos filamentos, que possuíam coloração variando de vermelho púrpura vívido para rosa púrpura profundo, apresentaram pH de 5,18 (Figura 8B). Quando foram adicionados ácido clorídrico ou hidróxido de potássio aos extratos celulares, visando a modificação de pH para 2,5, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12, (Figura 8) ambas as amostras mostraram variação de coloração (Figura 8), porém não foi possível retornar a coloração inicial nos valores de A e B. O pH da água destilada utilizada como controle negativo e como diluente foi de 7,5.

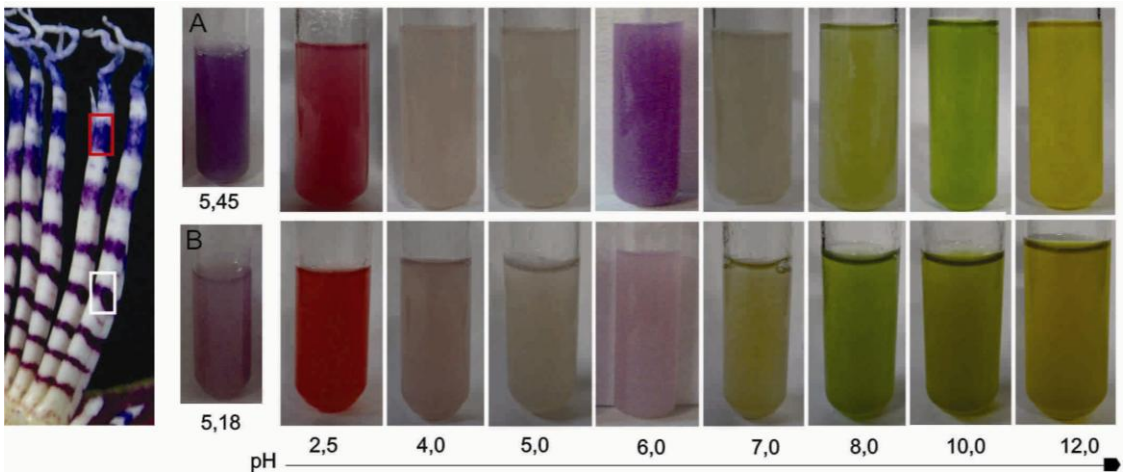

Figura 8: Análise do pH de extratos celulares de filamentos de corona de *P. alata*. A imagem da direita mostra um corte longitudinal de uma flor de *P. alata*. O extrato de bandas similares à mostrada no inserto vermelho é mostrado em A com valor do seu pH 5,45 abaixo. O extrato de bandas similares à mostrada no inserto branco é mostrado em B e abaixo o valor do seu pH 5,18. O pH dos dois tipos de extrato foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de potássio (KOH) para obter os valores de pH 2,5, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12.

4.4. Efeitos da aplicação de fitorreguladores *in planta* na pigmentação da corona em *Passiflora*

Dentre os quatro fitorreguladores aplicados em ramos de *P. suberosa* e *P. morifolia*, obtivemos resultados visíveis apenas com os fitorreguladores NPA e PACLO nas concentrações de 100 µM. A aplicação de PACLO causou apenas a redução do tamanho das flores (Figura 9). Além do efeito de redução da pigmentação floral, a aplicação de NPA também causou retardamento no desenvolvimento dos botões florais e redução do tamanho das flores (Figura 10).

Com a aplicação de 2,4-D e GA_3 nas doses empregadas, não foi possível visualizar efeito, pois em todas as concentrações testadas os fitorreguladores causaram o aborto de 100% dos botões.

Figura 9: Efeito da aplicação de paclobutrazol a 100 µM (PACLO) em flor de *P. morifolia*. Barra: 10 mm.

Em *P. suberosa* observou-se uma redução de 90% da área pigmentada do androginóforo e, em menor proporção, nos filamentos da corona (Figura 10D) com a aplicação de 100 µM de NPA. Em botões florais de *P. morifolia* observou-se a redução da pigmentação roxa apenas na base dos filamentos da corona, com o mesmo tratamento (Figuras 10F e H).

Figura 10: Efeito da aplicação de ácido naftil-ftalâmico a 100 µM (NPA) na pigmentação de flores de *P. suberosa* e *P. morifolia*. **A e C:** Flor de *P. suberosa* sem aplicação de fitorregulador (controle); **B** e **D**: tratamento com 100 µM de NPA. **E** e **G**: Flor de *P. morifolia* sem aplicação de fitorregulador (controle); **F** e **H**: flor tratada com 100 µM de NPA. Barras: A-D: 5mm; E-H: 10 mm.

4.5. Efeitos da aplicação de fitorreguladores in vitro na pigmentação da corona em *Passiflora*

O efeito dos fitorreguladores 2,4-D, GA_3, NPA e PACLO foi analisado em filamentos de corona de *P. edulis* em cultura *in vitro*. A presença de antocianinas nas amostras de extratos celulares dos filamentos foi avaliada por espectrofotometria UV-vis.

De acordo com os resultados obtidos, os picos de absorção de amostras-padrão de antocianinas estão localizados na região de comprimento de onda de 510 a 530 nm (Figuras 11 e 12). As antocianinas utilizadas como padrão foram: cianidina-3-O-glicosideo (λ máx. absorção 530 nm), malvidina-3-O-glicosideo (λ máx. absorção 540 nm), pelargonidina-3-O-glicosideo (λ máx. absorção 510 nm) e apresentaram, respectivamente, coloração rosa claro, rosa escuro e laranja.

O tratamento com auxina (2,4-D) causou a inibição da pigmentação dos filamentos *in vitro* em todas as concentrações estudadas (Figura 13). O tratamento com o inibidor de transporte polar de auxinas, NPA, gerou uma coloração adicional nos filamentos da corona (Figura 13), com uma possível presença de antocianinas, principalmente pelargonidina-3-O-glicosideo no tratamento com 100 μM, de acordo com a análise espectrofotométrica na região de 450 a 600 nm (Figura 11).

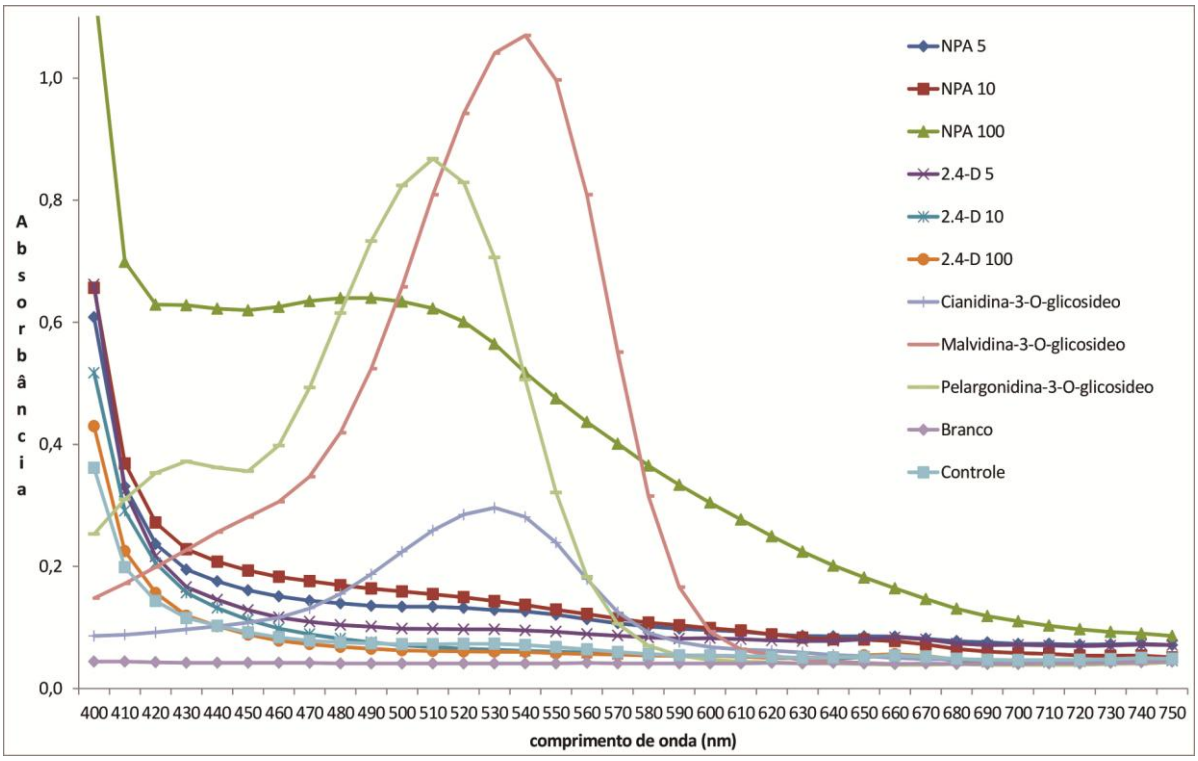

Figura 11: Análise de varredura entre os comprimentos de ondas de 400 a 750 nm, por espectrofotometro UV-vis em extratos de filamentos da corona de *P. edulis* tratados com fitorreguladores NPA e 2,4-D em doses de 5, 10 e 100 µM. Além de padrões de antocianinas, amostras controle e branco.

O tratamento com GA_3 apresentou aumento da pigmentação em filamentos de *P. edulis* (Figura 13). Observou-se um maior efeito com a aplicação de 5 µM de GA_3 com um pico de absorção a 540 nm indicando a possível presença de cianidina-3-glicosideo, de acordo com a comparação com padrão respectivo. Tratamentos com concentrações superiores de GA_3 não apresentaram efeito indutor claro. Apesar da presença de uma pigmentação nas amostras de corona sob tratamento com PACLO (Figura 13) as análises espectrofotométricas não permitiram a identificação de presença significativa de antocianinas (Figura 12).

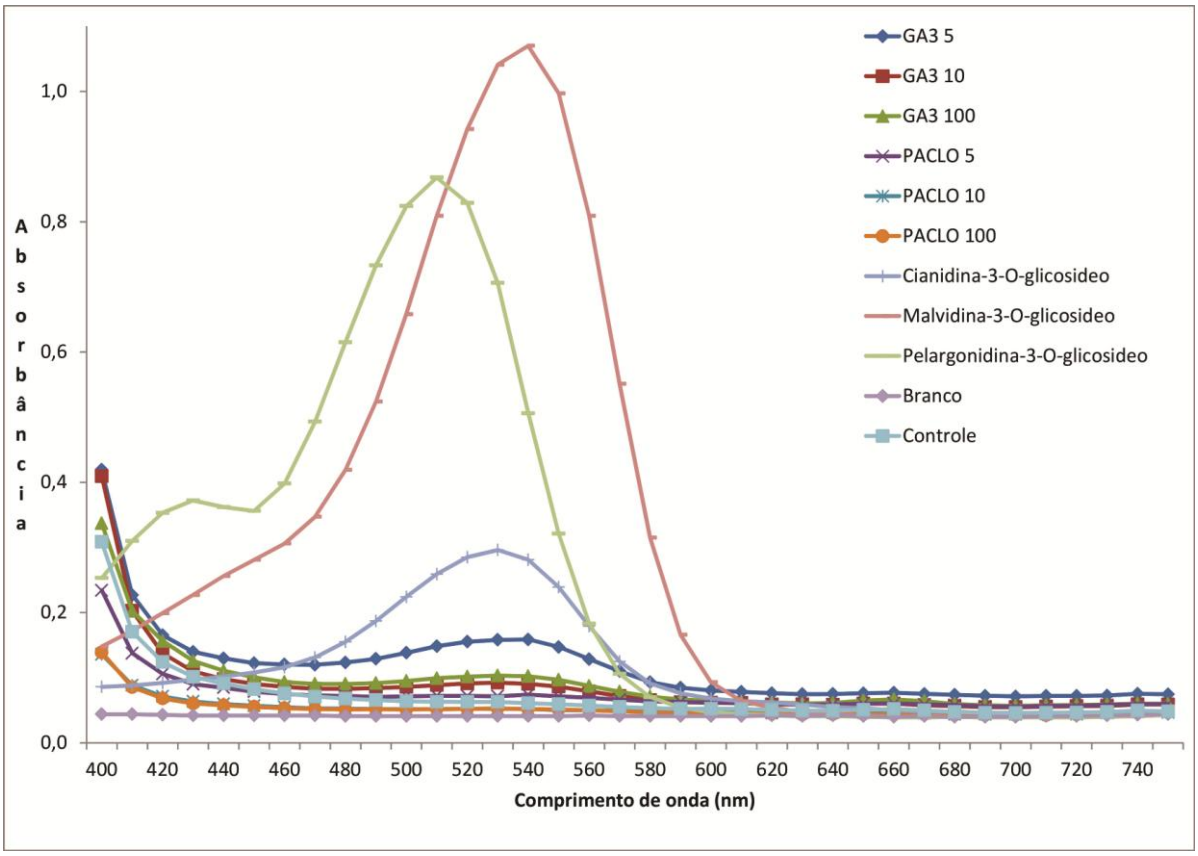

Figura 12: Análise de varredura entre os comprimentos de ondas de 400 a 750 nm, por espectrofotometro UV-vis em extratos de filamentos da corona de *P. edulis* tratados com fitorreguladores GA_3 e PACLO em doses de 5, 10 e 100 µM. Além de padrões de antocianinas, amostras controle e branco.

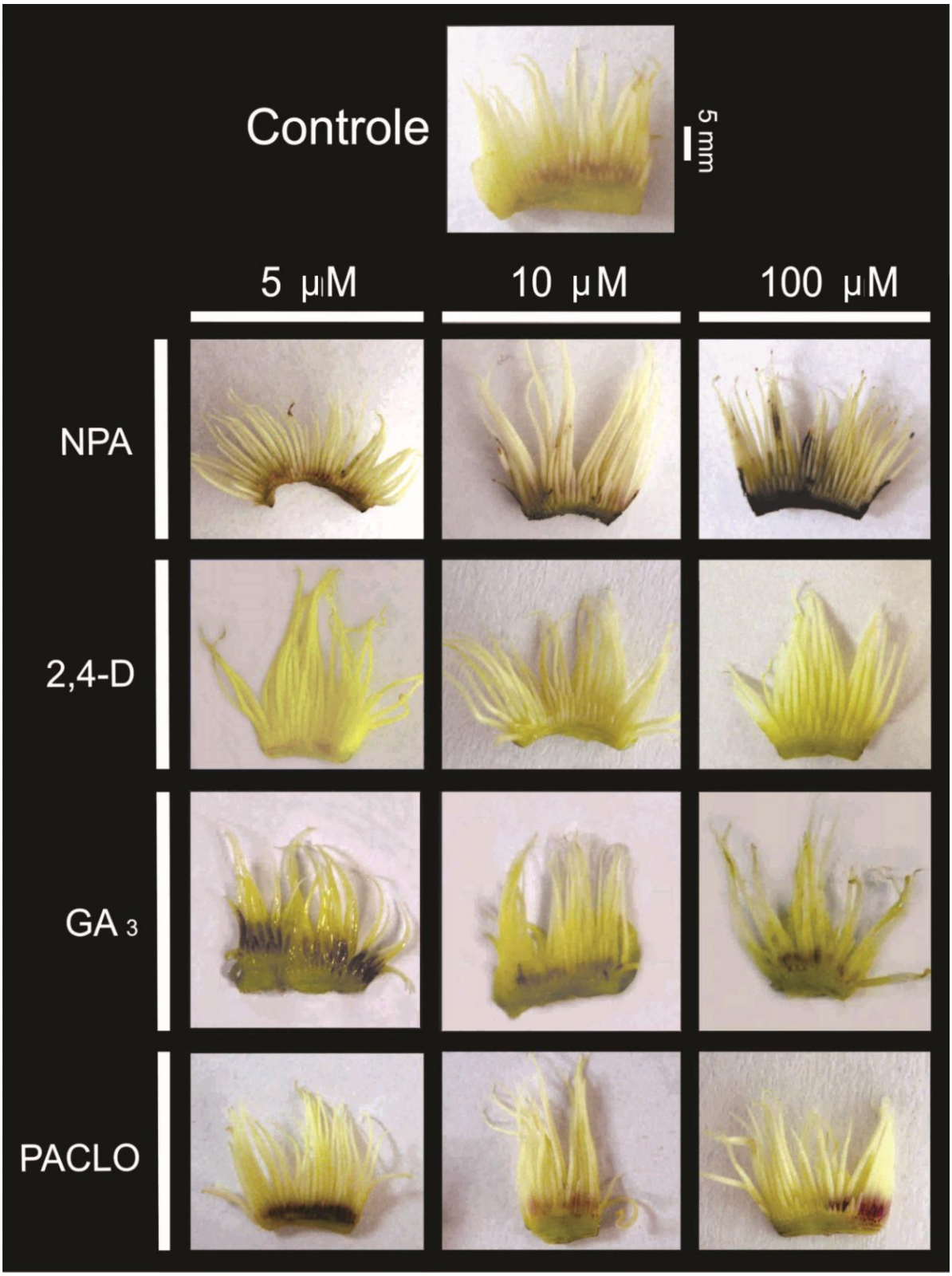

Figura 13: Filamentos de corona de *P. edulis* cultivados *in vitro* com os fitorreguladores NPA, 2,4-D, GA_3 e PACLO, nas doses de 5, 10 e 100 µM.

4.6. Identificação de um homólogo de MYB R2R3 em *P. suberosa*

Uma investigação do banco de dados do projeto PASSIOMA (Dornelas et al 2006) com a ferramenta BLAST e utilização da palavra-chave ¨MYB¨, revelou a presença de 14 resultados positivos, indicando a presença putativa de 14 genes codificadores para proteínas MYB expressos durante o desenvolvimento floral em *Passiflora*. Uma análise mais detalhada destes resultados indicou que duas destas sequências não correspondem a genes MYB. Alternativamente, a sequência de aminoácidos de uma proteína MYB-R2R3 de *Petunia* foi comparada com as sequências na base de dados PASSIOMA utilizando o tBLASTN, módulo que compara sequências de aminoácidos consenso com uma sequência de nucleotídeos na base de dados de nucleotídeos traduzidos. Esta investigação detectou a presença do clone de cDNA de *P. suberosa* PACEPS7022E07. A análise de BLAST desta sequência com o banco de dados público GenBank indicou uma maior similaridade desta sequência de *Passiflora* com homólogos de *Populus* e *Ricinus*. Estes dois gêneros pertencem à ordem Malpighiales, a mesma que *Passiflora*, o que pode explicar a similaridade de sequencias. Estes resultados indicaram que o clone PACEPS7022E07 contém uma sequência codificadora de um homólogo putativo de MYB-R2R3 em *P. suberosa*. De forma concordante, o clone de cDNA de *P. suberosa* PACEPS7022E07 codifica uma proteína de 132 aminoácidos mostrando 91% de similaridade com MYB-R2R3 de *Ricinus communis*. Assim, no restante do texto indicaremos o gene MYB-R2R3/PACEPS7022E07 apenas como MYB-R2R3.

4.7. Caracterização da expressão de MYB-R2R3 por RT-PCR

A expressão temporal do gene MYB-R2R3 foi analisada em cDNAs sintetizados a partir de amostras de RNA total de diferentes tecidos de *P. suberosa,* pela técnica de RT-PCR. Um homólogo do gene *ACTINA* de *P. suberosa* foi utilizado como controle positivo da reação de PCR.

Os resultados de RT-PCR revelaram que o gene MYB-R2R3 expressa-se preferencialmente em tecidos de antera e estigma (bandas mais fortes), além da corona e tépala (bandas mais fracas, Figura 14).

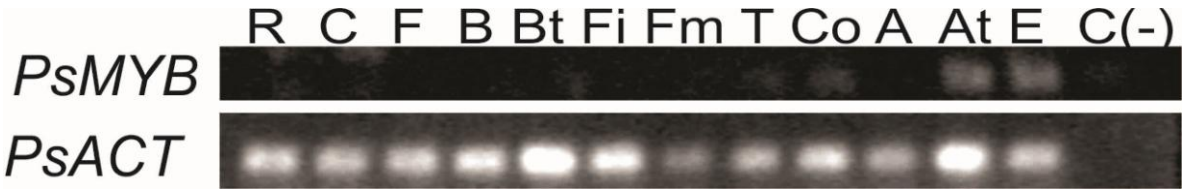

Figura 14: RT-PCR do gene MYB-R2R3. Análise da expressão temporal em amostras de cDNA de tecidos de *P. suberosa.* Raiz (R), caule (C), folha (F), botão floral (B), botão floral tratado com NPA (Bt), fruto imaturo (Fi), fruto maduro (Fm), tépala (T), corona (Co), androginóforo (A), antera (At), estigma (E) e controle negativo (C(-)) através da técnica de RT-PCR. Um homólogo do gene *ACTINA* de *P. suberosa* foi utilizado para padronização dos dados.

4.8. Caracterização da expressão de MYB-R2R3 por hibridização *in situ*

Nos estágios iniciais do desenvolvimento dos botões florais, os transcritos de MYB-R2R3 foram encontrados principalmente na camada de células epidérmicas e subepidérmicas dos primórdios dos filamentos externos da corona de *P. suberosa* (Figuras 15 A e B), e em toda região central do androginóforo e estigma, incluindo óvulos e pólen, sendo que a expressão nestes tecidos manteve-se ao longo de todo desenvolvimento dos botões florais (Figuras 15 C, D, E e F). No entanto, a expressão de MYB-R2R3 nas tépalas

diminuiu ao longo do desenvolvimento, até não ser mais observada nos botões florais em estágios mais avançados (Figura 15F). Em estágio inicial da formação da corona (Figura 15B), observa-se a expressão do gene na camada externa de células que formam o primórdio de corona e opérculo, além de estar expresso também na região que originará o nectário floral.

A expressão do gene começa a se restringir apenas para o ápice de cada órgão em desenvolvimento, e o sinal expresso torna-se mais intenso na figura 15 C. Com os órgãos já formados a expressão de MYB-R2R3 permanece na camada externa das células dos filamentos externos e internos da corona, sendo mais intensa na parte superior dos filamentos internos da corona, esta parte denominada martelo, e expressa intensamente em todas as células do opérculo e nectário floral (Figuras 15 E e F).

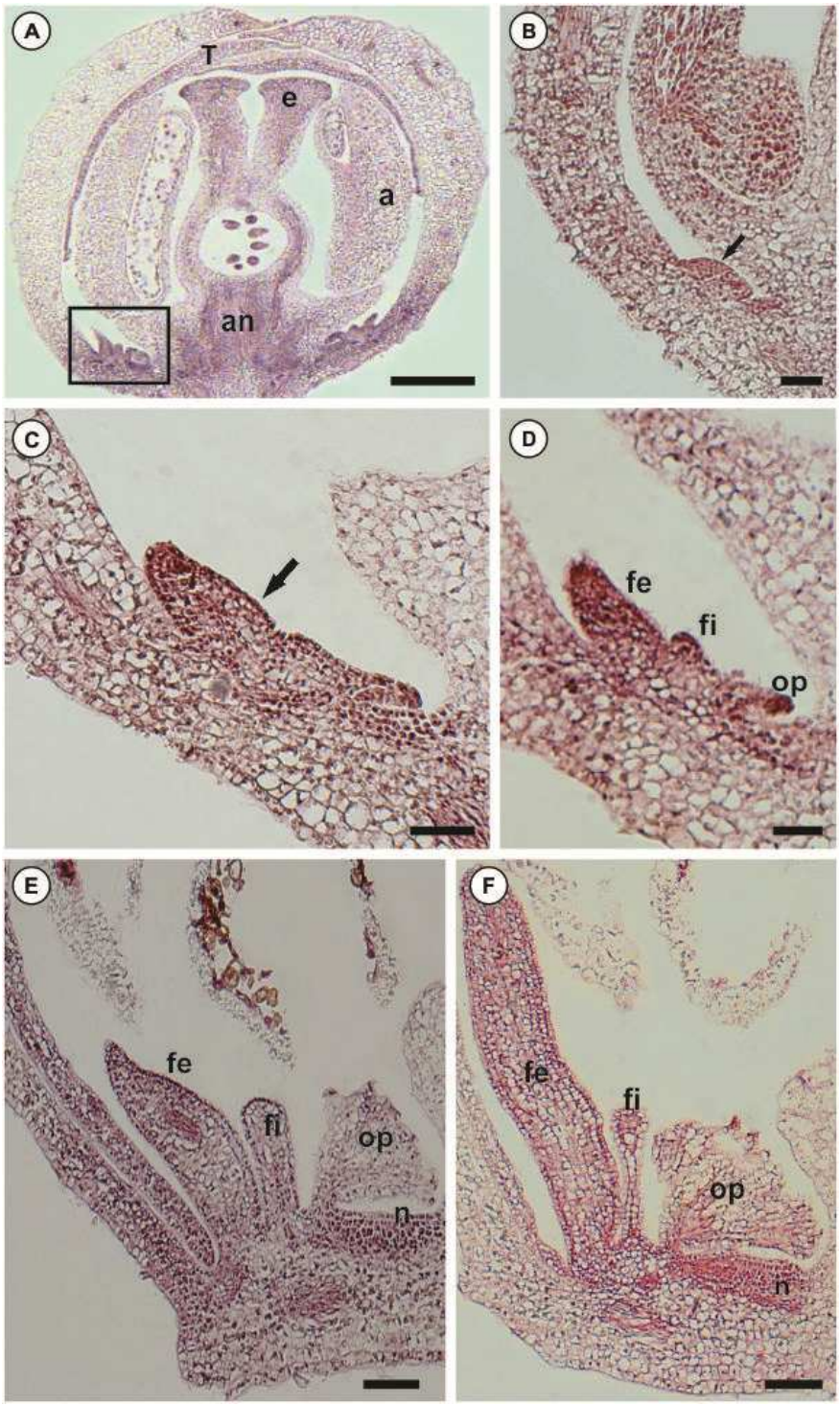

Figura 15: Hibridização *in situ* para o gene MYB-R2R3 em botões florais de *P. suberosa* em diferentes estágios de desenvolvimento. A: Visão geral do botão em desenvolvimento. **B:** início da formação dos primórdios de corona e opérculo (seta). **C:** Botão floral durante a diferenciação de corona e opérculo (seta). **D e E:** Diferenciação dos primórdios de filamentos internos e externos da corona e opérculo. **F:** Corona totalmente desenvolvida. **a**: antera, **T**: tépala, e: estigma, **an**: androginóforo, **co**: corona, **op**: opérculo, **n**: nectário, **fe**: filamentos externos, **fi**: filamentos internos. Barras: 50 µm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos padrões de pigmentação da corona em *Passiflora*

De acordo com nossas observações, espécies de *Passiflora* podem apresentar cinco padrões de pigmentação florais diferentes encontrados exclusivamente nos filamentos da corona: 1) completa ausência de pigmentação, 2) inteiramente de uma única cor, 3) manchas pigmentadas ("pontilhado"), 4) *"dégradée"* e 5) múltiplas faixas transversais ("bandeado"). Em geral, os padrões de pigmentação florais são conservados entre os subgêneros, onde filamento de corona "bandeado" e *"dégradée"* são comumente encontrados em *Passiflora* e *Decaloba*, considerados os dois subgêneros mais ricos em espécies. Por outro lado, padrões de pigmentação uniforme e pontilhado são considerados menos comuns nestes dois subgêneros, mas são particularmente comuns entre espécies do subgênero *Astrophea* (Ulmer e MacDougal 2004).

A grande diversidade de pigmentação da corona observada nas espécies *Passiflora* é devida ao acúmulo diferencial de pigmentos (antocianinas) nos vacúolos das células epidérmicas. A presença de antocianinas como componentes principais da pigmentação floral é comum na maioria das angiospermas (Thomas et al. 2009; Toleno et al. 2010; Albert et al. 2011). A biossíntese de antocianinas está sob controle espacial e temporal rigoroso, coordenada pela regulação da transcrição de vários genes que codificam as enzimas envolvidas em sua via biossintética (Castellarin e Di Gaspero 2007; Pourcel et al. 2010; Yamagishi et al. 2010; Martin et al. 2010).

Padrões de pigmentação distintos encontrados principalmente em pétalas e outras estruturas florais observados em *Passiflora* são devidos a combinações de diferentes antocianinas, à localização espacial e à proporção relativa destes pigmentos entre as células.

Com ajuda dos métodos cromatográficos, antocianinas com várias hidroxilações diferentes e padrões de metilação, bem como ligações com diferentes tipos de açúcar foram identificadas nos filamentos da corona de algumas espécies de *Passiflora* (Aizza e Dornelas 2011). Padrões de pigmentação são importantes para a atração de polinizadores, devido ao fato de cada pigmento floral refletir diferentes comprimentos de onda de luz, proporcionando aos polinizadores sinais específicos dentro da flor e funcionando como guias para auxilia-los na obtenção de alimento, de modo que realizem uma polinização eficaz (Glover e Martin 1998; Miller et al. 2011).

As espécies de *Passiflora* estudadas, *P. alata, P. edulis, P. foetida, P. morifolia* e *P. suberosa* mostraram características florais frequentemente associadas com polinização por abelhas, como longos filamentos da corona, de coloração azulada e roxa e, principalmente, padrões "bandeados" ou "*dégradée*", que reforçam a função da corona como uma estrutura especializada para a orientação do polinizador ao néctar e de plataforma de pouso para explorar a flor (Janzen 1968; Koschnitzke e Sazima 1997; Varassin et al. 2001).

Certamente, muitas das transições de polinizadores encontradas durante a história evolutiva das espécies de *Passiflora* são acompanhadas por modificações morfológicas e fisiológicas, mais especificamente relacionadas à função de atração e sinalização da corona e às preferências dos polinizadores (MacDougal 1994).

Observações anteriores sugerem que *P. coccinea* é adaptada à polinização por beija-flores com bicos longos. Suas flores são caracterizadas por filamentos externos de corona altamente reduzidos em tamanho, com coloração vermelha nas extremidades, longo androginóforo e ausência de superfície de pouso (Fischer e Leal 2006). Estas modificações florais provavelmente contribuíram para exclusão de insetos visitando estas flores e a

redução da corona é provavelmente devida à perda da função, não sendo mais necessária para o pouso dos insetos.

Existem duas explicações para as transições evolutivas na coloração das flores. A primeira é a inativação de uma ou mais enzimas envolvidas na biossíntese de antocianinas, com maior número de grupos hidroxila ligados e, consequentemente um aumento da mudança de cor de azul ou púrpura para vermelho. A segunda explicação é a ocorrência de mutações de "perda de função" em genes estruturais e em fatores de transcrição envolvidos na biossíntese de antocianinas, levando à menor concentração de pigmentos e, como consequência, mudando a cor da flor ou mais notavelmente a transição das flores pigmentadas para flores brancas. Essa é uma hipótese possível para explicar a evolução da polinização noturna (Holton e Cornish 1995; Mol et al. 1998; Quattrocchio et al. 1999; Schwinn et al. 2006; Rausher 2008; Streisfeld e Rausher 2009).

Supomos que muitas das enzimas envolvidas na biossíntese de antocianinas são provavelmente induzidas precocemente no desenvolvimento do botão floral, quando está ausente a pigmentação. Esta indução está sob controle temporal e espacial da expressão de genes. Além disso, a expressão diferencial desses genes da biossíntese de pigmentos pode controlar a formação de padrões complexos durante as fases de desenvolvimento seguintes, uma vez que a pigmentação tenha sido iniciada. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento do padrão de pigmentação e sua evolução em *Passiflora* são desconhecidos.

Baseados em certas suposições sobre observações morfológicas e de desenvolvimento, sugerimos alguns modelos para explicar os elaborados padrões de pigmentação gerados durante o desenvolvimento da corona em *Passiflora*.

Há pelo menos duas hipóteses possíveis que explicariam a formação do padrão "*dégradée*" independentemente de ser do tipo basípeto ou acrópeto: 1) Há um aumento progressivo entre a proporção da área de células com pigmento em relação à área total do filamento (Figura 16A) e 2) há uma proporção fixa entre a área contendo células pigmentadas e a área total do filamento, mas há um acúmulo gradual de pigmentos (intensificação da coloração) nas células da área pigmentada. (Figura 16B).

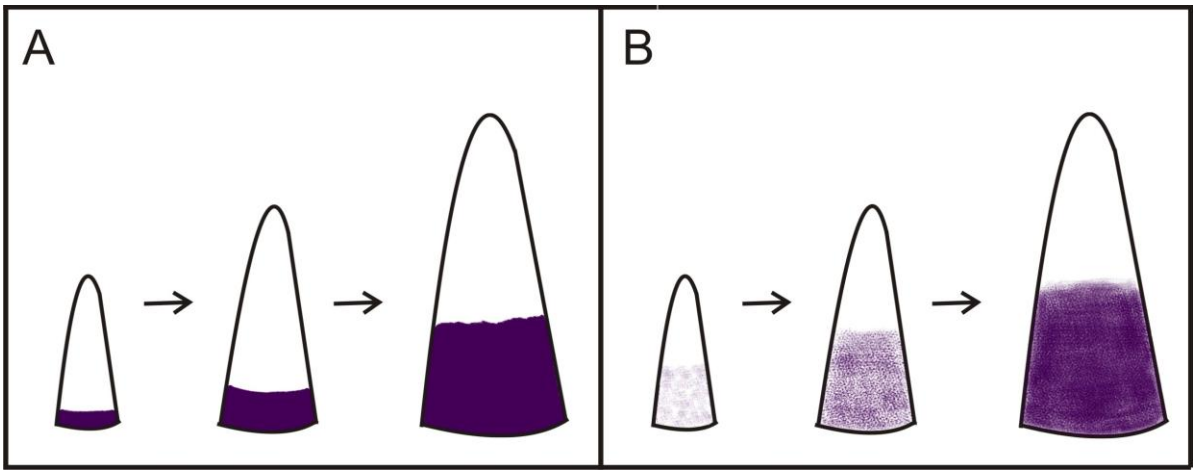

Figura 16: Modelos hipotéticos de padrões de pigmentação "*dégradée"* em filamento de corona de *Passiflora.* **A:** aumento do número de células pigmentadas durante o desenvolvimento. **B:** aumento da quantidade de pigmentos nas células durante o desenvolvimento.

Pelas análises dos resultados da formação do padrão "*dégradée*" em 5 espécies de *Passiflora* (ver Figura 5) foi descartada a primeira hipótese e confirmada a segunda hipótese.

Por outro lado, o fenótipo "bandeado" observado em *P. alata* é aparentemente o resultado da localização espacial diferencial dos pigmentos, principalmente com base na ordem de aparecimento de listras. O esquema mostrado na figura 17 representa quatro hipóteses que poderiam explicar a formação deste padrão de pigmentação. Na primeira hipótese sugere-se a formação basípeta das bandas. Uma primeira banda apical seria formada, seguida da formação sucessiva de bandas mais basais (Figura 17A). Na segunda

hipótese propõe-se que todas as bandas originam-se simultaneamente com o aumento gradual da intensidade da pigmentação (Figura 17B). Na terceira hipótese sugere-se que as bandas podem surgir da base dos filamentos em direção ao ápice dos mesmos (Figura 17C). E na quarta e última hipótese propõe-se que bandas novas podem se desenvolver gradualmente entre as bandas pré-existentes (Figura 17D).

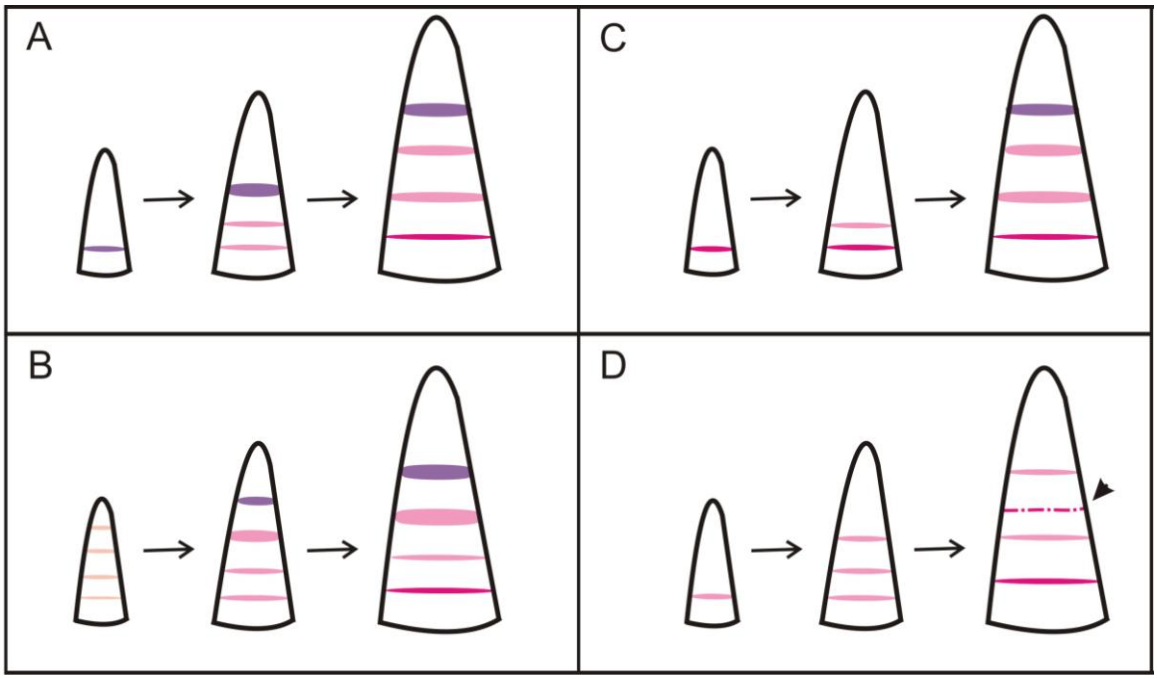

Figura 17: Modelos hipotéticos de padrões de pigmentação "bandeados". **A:** Formação basípeta de bandas; **B:** Formação simultânea de bandas; **C:** Formação acrópeta de bandas; **D:** bandas novas desenvolvendo-se gradualmente entre as bandas pré-existentes (nova banda indicada pela ponta de seta).

Observações durante a formação da pigmentação da corona em *P. alata* indicaram que as bandas apareceram a partir da base de filamentos, tendo se desenvolvido no sentido basípeto, correspondente à primeira hipótese (modelo A). No entanto, a última hipótese (modelo D) não pode ser totalmente descartada devido à observação da formação de novas bandas, entre bandas anteriormente formadas, nos estágios finais do desenvolvimento do

botão floral (Figura 6). Assim, o padrão de pigmentação bandeado pode ser explicado por uma associação das hipóteses A e D.

5.2. Determinação do pH celular em tecidos da corona de *Passiflora alata*

Nossa hipótese inicial para explicar as diferentes cores observadas em filamentos de corona de *P. alata* foi baseada em um efeito do pH. De acordo com a literatura, uma propriedade interessante das antocianinas é apresentar cores diferentes, devido ao seu espectro de absorção, que depende em grande parte da acidez ou alcalinidade do meio, o que resulta em mudanças estruturais na molécula de antocianina (Mol et al. 1998; Yoshida et al. 2005). O pH vacuolar das células epidérmicas pode afetar a coloração final das flores (Whitney e Glover 2007).

Os resultados obtidos com nossos experimentos estão em concordância com esta propriedade, uma vez que a mudança de cor azul arroxeada pálida para rosa púrpura profundo correlacionou-se com uma diminuição no pH celular. Estas observações assemelham-se às reportadas para flores de *Ipomoea* e *Petunia*, nas quais a acidificação do vacúolo de células das pétalas resulta em coloração vermelha, enquanto o aumento do pH vacuolar mostra a mudança de coloração de vermelho púrpura para azul (Quattrocchio et al. 1999; Grotewold 2006).

Uma vez que o pH celular pode afetar grandemente a coloração final da flor, testou-se a mudança de cor de ambos os extratos iniciais. Quando o extrato alcalino foi acidificado, o mesmo apresentou coloração igual a do extrato ácido. No entanto, tentando manipular o pH celular na direção inversa (alcalinização), não foi possível voltar para a coloração original. Uma explicação possível é que em condições ácidas antocianinas essencialmente

existem em forma estável, mas dependendo do pH, estas moléculas sofrem complexas alterações estruturais, bem como uma ruptura do anel heterocíclico da molécula e a reação torna-se irreversível (de Pascual-Teresa e Sanchez-Ballesta 2008).

Com base nestes resultados, supomos que as diferenças observadas na coloração dos filamentos da corona em *P. alata* podem ser atribuídas, ao menos parcialmente, à influência do pH celular. Não podemos descartar, no entanto, a hipótese de que moléculas de antocianinas diferentes também estejam presentes em cada extrato. Apenas análises mais detalhadas (e.g. espectrometria de massas) poderão esclarecer este aspecto.

5.3. Efeito de fitorreguladores na pigmentação da corona de *Passiflora*

A relação entre pigmentação floral e fitorreguladores vegetais foi verificada em botões florais de *Passiflora edulis, P. suberosa* e *P. morifolia*, como observada para outras plantas como em espécies de *Petunia* que apresentam uma relação direta entre a fertilização da flor e a indução de genes da biossíntese de antocianinas, através da influência do ambiente e da liberação de ácido giberélico, resultando na ativação da expressão diferencial de genes desta via (Weiss et al. 1990; Weiss et al. 1995).

Botões florais de espécies de *Passiflora* pulverizados *in planta* com concentrações diferentes de NPA e PACLO não apresentaram total inibição da pigmentação da corona, porém, NPA, um inibidor de transporte de auxina, foi capaz de reduzir visivelmente a pigmentação floral em *P. suberosa* e *P. morifolia,* não sendo possível observar alteração em *P. edulis.* Já em *P. suberosa,* além da redução da pigmentação dos filamentos de corona, ocorreu redução de 90% na pigmentação roxa do androginóforo, ficando a pigmentação concentrada na base do órgão. Por meio de análise espectrofotométrica foi possível obter

uma varredura dos comprimentos de onda absorvidos diferencialmente por extratos metanol-água-ácido acético 11:5:1 (v/v/v) de corona e de androginóforo, mostrando maior concentração de antocianinas em extrato de flores tratadas com NPA. A hipótese que pode explicar o acúmulo de antocianinas é a de que o tratamento com NPA provavelmente bloqueou o transporte de auxina, mas não sua síntese. Assim, bloqueando o transporte, a auxina possivelmente não foi conduzida até o ápice do androginóforo, concentrando-se em na base da estrutura (androginóforo em *P. suberosa* e filamentos da corona em *P. morifolia*).

Uma vez que os botões florais foram pulverizados com fitorreguladores em condições de campo, pode-se considerar que fatores ambientais como luz e temperatura tenham interferido na quantidade de pigmentação, já que estes fatores ambientais afetam o processo de pigmentação floral em muitas espécies de plantas (Mori et al. 2007; Weiss 2000; Davies 2009). Por exemplo, flores de *Petunia* que se desenvolvem em temperaturas médias de 17/12°C contêm mais pigmentos que as crescidas em altas temperaturas, 32/27°C (Shvarts et al. 1997). Altas temperaturas igualmente reduzem a pigmentação de rosas da cultivar "Jaguar" (Dela et al. 2003) e de uvas cv. Cabernet Sauvignon, que reduzem à metade a quantidade de antocianinas presentes (Mori et al. 2007).

Nos experimentos realizados *in planta,* observou-se elevada taxa de aborto dos botões florais, provavelmente devido ao acúmulo de etileno levando à senescência do botão floral, ou mesmo devido à aplicação exógena de fitorreguladores, como 2,4-D o qual induz resposta semelhante à aplicação de etileno em diversas plantas tal como tomateiro (Morgan e Hall, 1962).

Entretanto, botões florais mantidos em cultura *in vitro* suplementados com fitorreguladores apresentaram resultados isentos de interferência ambiental, uma vez que luz e temperatura foram controladas. Porém, a alta taxa de oxidação dos botões *in vitro,*

dificultou a observação da pigmentação dos filamentos. O início da pigmentação em filamentos da corona de *P. edulis* ocorreu em botões florais com tamanho superior a 2,0 cm, sendo possível assim introduzir em meio de cultura apenas os filamentos da corona sem o restante dos tecidos do botão floral. Já a pigmentação da corona em *P. morifolia* e *P. suberosa* iniciou-se em botões florais com o comprimento médio de 0,6 cm e 0,3 cm respectivamente, impossibilitando a montagem de experimentos com amostras destas espécies similares às obtidas para *P. edulis*.

A influência da aplicação exógena de fitorreguladores sobre o acúmulo de pigmentos florais não é totalmente compreendida e um mesmo tipo de fitorregulador pode apresentar efeitos diferentes (muitas vezes opostos) em espécies vegetais diferentes (Loreti et al. 2008). Desta forma, em flores de *Petunia* (Weiss et al. 1995; Moalem-Beno et al. 1997), *Vinca* (Ohlsson e Berglund 2001) e em sépalas de *Hyacinthus* (Hosokawa 1999), o tratamento com giberelinas (GA_3), tem o efeito de intensificar a pigmentação floral, como observado para *P. edulis*. Nessa espécie, observou-se um aumento da pigmentação roxa da corona proporcional à concentração de GA_3. De forma concordante, nessa mesma espécie, com a aplicação de um inibidor de síntese de giberelina, o paclobutrazol, observou-se um resultado inverso, ou seja, um gradiente decrescente da pigmentação dos filamentos quanto maior a concentração de PACLO aplicada.

De forma similar ao observado para giberelinas, a aplicação de auxinas sobre a síntese de pigmentos florais também leva a resultados conflitantes (Mori et al. 1994). Em *P. edulis,* a aplicação de um inibidor de transporte de auxina, NPA, nos filamentos da corona, causou a oxidação na região basal dos filamentos, apresentando-se mais escura na concentração de 100 µM. Aplicando a auxina sintética 2,4-D, o resultado obtido foi a total inibição da pigmentação dos filamentos da corona, concordando com os resultados obtidos

nos experimentos de aplicação *in planta*, onde a aplicação de NPA provavelmente inibiu o transporte polar de auxina levando à redução da concentração de antocianinas.

5.4. Caracterização da expressão de MYB-R2R3

Em *P. suberosa,* a análise de uma sequência deduzida de aminoácidos da etiqueta de sequência expressa PACEPS7022E07, obtida do banco de dados do PASSIOMA confirmou a presença de um domínio conservado MYB-R2R3 nesta sequência e também de um segundo domínio conservado necessário para interação entre MYB e fatores de transcrição bHLH, além de apresentar um motivo conservado em R3, também envolvido na regulação da via de biossíntese de antocianinas (Aizza e Dornelas 2011).

A expressão do clone PACEPS7022E07 do gene MYB-R2R3 observada através da técnica de hibridização *in situ* em botões florais de *P. suberosa* em desenvolvimento, foi bastante generalizada, sendo expressa em óvulos, pólen, androginóforo, tépalas, corona, opérculo e nectário floral. Este amplo padrão de expressão dos genes tipo MYB-R2R3 já foi relatado em outras espécies vegetais, uma vez que estes genes são responsáveis por controlar muitos aspectos da regulação como o metabolismo secundário das plantas, o controle da morfogênese celular, a regulação da formação de meristema e o ciclo celular (Jin e Martin 1999), além de estarem envolvidos no controle da identidade e do destino das células vegetais (Stracke et al. 2001) e nas respostas das plantas ao estresse ambiental (Du et al. 2009). Assim, os diferentes MYB-R2R3 PhMYB1 (*Petunia hybrida*) e AmMYBMIXTA (*Antirrhinum majus*) atuam no desenvolvimento de células cônicas das pétalas. Genes AtMYBGL1 (*Arabidopsis thaliana*) e CotMYBA (*Gossypium hirsutum*), atuam no desenvolvimento de tricomas e, principalmente, as proteínas: ZmMYBC1, ZmMYBPL e

ZmMYB1 (*Zea mays*), GAMYB (*Hordeum vulgare*), PhMYBAN2 e PhMYB3 (*Petunia hybrida*) e MYBROSEA (*Antirrhinum majus*) agem no controle da biossíntese de antocianinas (Jin e Martin 1999). PhPH4 expressa-se na epiderme e ativa a acidificação vacuolar de pétalas em *Petunia* (Quattrocchio et al. 2006). Estes genes que codificam produtos semelhantes podem exercer funções similares na regulação da biossíntese de antocianinas, mas ainda não se sabe com precisão quais genes-alvo são regulados por eles (Du et al. 2009).

Apesar de semelhanças funcionais existirem entre proteínas MYB-R2R3, que estão intimamente relacionadas estruturalmente, existem diferenças significativas na forma como estas proteínas muito semelhantes funcionam em diferentes espécies (ortólogos) e também dentro do mesmo organismo (parálogos). Assim, apesar do grande número de proteínas MYB-R2R3 em plantas, é improvável que muitas sejam precisamente redundantes em suas funções, sendo mais provável que suas ações se sobreponham (Jin e Martin 1999). A preferência de local de ligação e afinidade de proteínas MYB pode ser influenciada por outros fatores de proteínas que interagem com elas (Du et al. 2009).

Uma árvore filogenética de fatores de transcrição MYB-R2R3 de plantas selecionadas, incluindo a sequência PACEPS7022E07, de *P. suberosa* foi construída pelo nosso grupo (Aizza e Dornelas 2011), utilizando o alinhamento das repetições conservadas R2R3. A sequência de *Passiflora* foi colocada dentro do clado incluindo ZMC1 (*Zea mays*), PhPH4 (*Petunia hybrida*), VvMYB5a e VvMYB5b (*Vitis vinifera*), que são conhecidos por estarem envolvidos na regulação da biossíntese de antocianinas nestas espécies (Grotewold et al. 2000; Deluc et al. 2008).

A técnica de RT-PCR permitiu a detecção de transcritos do gene MYB-R2R3 de *P. suberosa* em diferentes órgãos de flores na antese, como antera e estigma, além de corona e

tépala (Figura 11), sugerindo que este gene é preferencialmente expresso em tecidos reprodutivos e em alguns órgãos florais em particular. Esta observação está de acordo com o fato de que os tecidos reprodutivos de *P. suberosa* produzem quantidades significativas de antocianinas. Consideramos a hipótese de que o gene MYB-R2R3 de *P. suberosa* regula a via da biossíntese de antocianinas nas fases iniciais do desenvolvimento floral. A partir dos dados obtidos por hibridização *in situ* observamos que a expressão de MYB-R2R3 foi alta em fases iniciais do desenvolvimento do botão floral (Figura 15B), permanecendo alta nas fases intermediárias de desenvolvimento (Figura 15 C, D e E) e declinando rapidamente em botões no estágio final de desenvolvimento (Figura 15F). A análise dos padrões de expressão de MYB-R2R3 de *P. suberosa* por hibridização *in situ* também permitiu identificar a presença preferencial de transcritos no androginóforo, em grãos de pólen (micrósporos), ovário e corona, sendo a presença de sinal de hibridização particularmente mais baixa em tépalas. Portanto, os resultados apresentados sugerem que a expressão preferencial de PACEPS7022E07 nas flores pode ser um mecanismo de regulação tecido especifico de produção de antocianinas em *P. suberosa.*

6. CONCLUSÕES

Foram estabelecidos ao menos 5 tipos de padrões de pigmentação da corona em *Passiflora*, os quais podem estar relacionados à atração preferencial de certas classes de polinizadores. As espécies estudadas com mais detalhes neste trabalho, apresentaram padrão "*dégradée*" observado em *P. edulis, P. morifolia* e *P. suberosa* e padrão bandeado, observado em *P. alata*. Análises do efeito de fitorreguladores sobre a pigmentação de filamentos de corona com padrão "*dégradée*" em *Passiflora* permite concluir que a aplicação exógena de giberelina, GA_3, causou aumento da pigmentação floral ao contrário a aplicação de um inibidor de sua síntese, PACLO, causou redução. Já a aplicação de uma auxina sintética, 2,4-D e de um inibidor do transporte polar de auxinas, NPA, tiveram efeito inibidor na pigmentação.

Nas análises realizadas em *P. alata*, padrão "bandeado", ao longo dos filamentos de corona constatou-se a existência um gradiente de pH, sendo que na porção apical dos filamentos o pH é ácido e diminui ficando mais ácido na porção basal. Porém, necessita-se de outras análises para comprovar se a variação do pH é devida a rearranjos na estrutura molecular ou à presença de antocianinas diferentes.

Com relação ao gene MYB-R2R3/PACEPS7022E07, demonstrou-se que este é expresso preferencialmente em órgãos florais pigmentados de *P. suberosa,* como androginóforo, corona e opérculo.

Este trabalho abre outras possíveis abordagens em estudos da influência de fatores hormonais e ambientais na pigmentação da flor de *Passiflora* spp.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achard P, Genschik P. **2009**. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1085–1092.

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

Albert NW, Lewis DH, Zhang H, Irving LJ, Jameson PE, Davies KM. **2009**. Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2191–2202.

Albert NW, Lewis DH, Zhang H, Schwinn KE, Jameson PE, Davies KM. **2011**. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *The Plant Journal* **65**: 771–784.

Allan AC, Hellens RP, Laing WA. **2008**. MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science* **13**: 99–102.

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.

Ben-Tal Y, King RW. **1997**. Environmental factors involved in colouration of flowers of Kangaroo Paw. *Scientia Horticulturae* **72**: 35–48.

Biran I, Halevy AH. **1974**. Effects of varying light intensities and temperature treatments applied to whole plants, or locally to leaves or flower buds, on growth and pigmentation of "Baccara" roses. *Physiologia Plantarum* **31**: 175–179.

Brito VLG, Sazima M. **2012**. *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae): reproductive biology of a tree species at two sites of an elevational gradient in the Atlantic rainforest in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1271–1279.

Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer Wendy A, Taiz L, Muday GK. **2001**. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 524–535.

Buer CS, Muday GK. **2004**. The *transparent testa4* mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *The Plant Cell* **16**: 1191–1205.

Burbulis IE, Winkel-Shirley B. **1999**. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 12929–12934.

Castellarin SD, Di Gaspero G. **2007**. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology* **7**: 1–10.

Cervi AC. **1997**. *Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero Passiflora L. subgênero Passiflora* (SL Cyanus, Ed.). Madrid.

Chiu L-W, Zhou X, Burke S, Wu X, Prior RL, Li L. **2010**. The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor. *Plant Physiology* **154**: 1470–1480.

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

Davies K. **2004**. *Plant pigments and their manipulation* (KM Davies, Ed.). Oxford: Blackwell Publishing.

Davies KM. **2009**. *Anthocyanins* (C Winefield, K Davies, and K Gould, Eds.). New York, NY: Springer New York.

Davies KM, Schwinn KE. **2006**. Developmental Control and Biotechnology of Floral Pigmentation. In: Jordan BR, ed. *The Molecular Biology and Biotechnology of Flowering*. Cambridge: CABI Publishing, 404.

de Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT. **2008**. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews* **7**: 281–299.

Dela G, Or E, Ovadia R, Nissim-Levi A, Weiss D, Oren-Shamir M. **2003**. Changes in anthocyanin concentration and composition in "Jaguar" rose flowers due to transient high-temperature conditions. *Plant Science* **164**: 333–340.

Deluc L, Bogs J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon J-M, 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.

Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang H-S, Chilcott C, Zhu T, Turner JG. **2005**. Expression profiling reveals *COI1* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**: 497–513.

Dixon RA, Xie D-Y, Sharma SB. **2005**. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *The New Phytologist* **165**: 9–28.

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. *The Plant Journal* **21**: 419–429.

Dornelas MC, Tsai SM, Rodrigrez 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.

Du H, Zhang L, Liu L, Tang X-F, Yang W-J, Wu Y-M, Huang Y-B, Tang Y-X. **2009**. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry* **74**: 1–11.

Farzad M, Griesbach R, Weiss MR. **2002**. Floral color change in *Viola cornuta* L. (Violaceae): a model system to study regulation of anthocyanin production. *Plant Science* **162**: 225–231.

Feng S, Wang Y, Yang S, Xu Yuting, Chen X. **2010**. Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a R2R3-MYB transcription factor PyMYB10. *Planta* **232**: 245–255.

Figueiredo P, George F, Tatsuzawa F, Toki K, Saito Norio, Brouillard R. **1999**. New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. *Phytochemistry* **51**: 125–132.

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

Forkmann G. **1991**. Flavonoids as flower pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breeding* **106**: 1–26.

Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T, Saito N, Iida S. **2000**. Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* **407**: 581–582.

Ghosh D, Konishi T. **2007**. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* **16**: 200–208.

Glover BJ. **2007**. *Understanding flowers and flowering*. New York, NY: Oxford.

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

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 of the United States of America* **97**: 13579–13584.

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

Hansen KA, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi A C, Jansen RK. **2006**. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany* **31**: 138–150.

Hara M, Oki K, Hoshino K, Kuboi T. **2003**. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Science* **164**: 259–265.

He Q, Shen Y, Wang M, Huang M, Yang R, Zhu S, Wang L, Xu Yanjun, Wu R. **2011**. Natural variation in petal color in Lycoris longituba revealed by anthocyanin components. *PloS One* **6**: e22098 1-8.

Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V. **2011**. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2465–2483.

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

Hosokawa K. **1999**. Cell Layer-Specific Accumulation of Anthocyanins in Response to Gibberellic Acid in Tepals of *Hyacinthus orientalis*. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry* **63**: 930–931.

Irani NG, Hemandez JM, Grotewold Erich. **2003**. Regulation of anthocyanin pigmentation. In: Romeo JT, ed. *Intergrative Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology*. Elsevier, 329.

Itoh H, Miyako UT, Makoto M. 2008. Molecular biology of gibberellins signaling in higher plants. *International review of cell and molecular biology* **268**:191-221.

Janzen DH. **1968**. Reproductive Behavior in the Passifloraceae and Some of Its Pollinators in Central America. *Behaviours* **32**: 33–48.

Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M. **2004**. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* **167**: 247–252.

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

Kim J, Lee B, Kim S, Oh K, Cho KY. **2006**. Responses to Environmental and Chemical Signals for Anthocyanin Biosynthesis in Non-Chlorophyllous Corn (*Zea mays* L.) Leaf. *Journal of Plant Biology* **49**: 16–25.

Klee HJ, Clark DG. **2010**. Ethylene Signal Transduction in Fruits and Flowers. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* New York, NY: Springer, 802.

Koes R, 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, Sazimai M. **1997**. Biologia floral de cinco espécies de Passiflora L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. *Revista Brasileira de Botânica* **20**: 119–126.

Krosnick SE, Freudenstein JV. **2005**. Monophyly and Floral Character Homology of Old World Passiflora (Subgenus Decaloba: Supersection Disemma). *Systematic Botany* **30**: 139–152.

Lacey EP, Herr D. **2005**. Phenotypic plasticity, parental efects, and parental care in plants? I. An examination of spike reflectance in *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *American journal of botany* **92**: 920–930.

Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM. **1995**. Low temperature induces the accumulation of *phenylalanine ammonia-lyase* and *chalcone synthase* mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* **108**: 39–46.

Lin-Wang K, Micheletti D, Palmer J, Volz R, Lozano L, Espley R, Hellens RP, Chagnè D, Rowan DD, Troggio M, Iglesias I, Allan AC. **2011**. High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex. *Plant, Cell & Environment* **34**: 1176–1190.

Liu X-J, Chuang Y-N, Chiou C-Y, Chin D-C, Shen F-Q, Yeh K-W. **2012**. Methylation effect on chalcone synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium* orchid cultivars. *Planta* **236**: 401–409.

Lo Piero AR, Puglisi I, Rapisarda P, Petrone G. **2005**. Anthocyanins accumulation and related gene expression in red orange fruit induced by low temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 9083–9088.

Loreti E, Povero G, Novi G, Solfanelli C, Alpi A, Perata P. **2008**. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in Arabidopsis. *The New Phytologist* **179**: 1004–1016.

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). *Die Naturwissenschaften* **93**: 325–328.

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

Macnish AJ, Jiang C-Z, Negre-Zakharov F, Reid MS. **2010**. Physiological and molecular changes during opening and senescence of *Nicotiana mutabilis* flowers. *Plant Science* **179**: 267–272.

Marcotrigiano M, Boyle TH, Morgan PA, Ambach KL. **1990**. Leaf color variants from coleus shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**: 681–686.

Markham KR, Oftman DJ. **1993**. *Lisianthus* flavonoid pigments and factors influencing their expression in flower colour. *Phytochemistry* **34**: 679–685.

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

Martin C, Ellis N, Rook F. **2010**. Do transcription factors play special roles in adaptive variation? *Plant Physiology* **154**: 506–511.

Martínez GA, Chaves AR, Anón MC. **1996**. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidade activities during ripening of strawberry fruit (Fragaria x ananassa Duch.). *Journal of Plant Growth Regulation* **15**: 139–146.

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.

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

Moalem-Beno D, Tamari G, Leitner-dagan Y, Borochov A, Weiss D. **1997**. Sugar-dependent gibberellin-Induced chalcone synthse gene expression in *Petunia* corollas. *Plant Physiology* **113**: 419–424.

Mol J, Grotewold E, Koes R. **1998**. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* **3**: 212–217.

Morgan PW, Hall WC. 1962. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. *Physiologia Plantarum* **15**:420-427.

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

Mori T, Sakurai M, Seki M, Furusaki S. **1994**. Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cell. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **65**: 271–276.

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.

Mu J, Li G, Sun S. **2010**. Petal color, flower temperature, and behavior in an alpine annual herb, *Gentiana leucomelaena* (Gentianaceae). *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **42**: 219–226.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:472-497.

Murphy A, Peer WA, Taiz L. **2000**. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Plant* **211**: 315–324.

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

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

Ng FSP. 2006. Tropical horticulture and gardening. Clearwater publications, Kuala Lumpur, Malaysia.

Nguyen P, Cin VD. **2009**. The role of light on foliage colour development in coleus (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd). *Plant Physiology and Biochemistry: PPB/Société Française de Physiologie Végétale* **47**: 934–945.

Nishihara M, Nakatsuka T. **2011**. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letters* **33**: 433–441.

Ohlsson AB, Berglund T. **2001**. Gibberellic acid-induced changes in glutathione metabolism and anthocyanin content in plant tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **64**: 77–80.

O'Neill SD. **1997**. Pollination regulation of flower development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 547–574.

Pattanaik S, Kong Q, Zaitlin D, Werkman JR, Xie CH, Patra B, Yuan Ling. **2010**. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco. *Planta* **231**: 1061–1076.

Peel GJ, Pang Y, Modolo LV, Dixon RA. **2009**. The LAP1 MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **59**: 136–149.

Peng Z, Han C, Yuan Libing, Zhang K, Huang H, Ren C. **2011**. Brassinosteroid enhances jasmonate-induced anthocyanin accumulation in Arabidopsis seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**: 632–640.

Pittman JK. **2012**. Multiple transport pathways for mediating intracellular pH homeostasis: The contribution of H(+)/ion exchangers. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1-11.

Pourcel L, Irani NG, Lu Y, Riedl K, Schwartz S, Grotewold Erich. **2010**. The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Molecular Plant* **3**: 78–90.

Quattrocchio F, Wing J, van der 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. *The Plant Cell* **11**: 1433–1444.

Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R. **2006**. *PH4* of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *The Plant Cell* **18**: 1274–1291.

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 of Plant Sciences* **169**: 7–21.

Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K, Scheible W-R. **2009**. Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 3567–3584.

Santelia D, Henrichs S, Vincenzetti V, Sauer M, Bigler L, Klein M, Bailly A, Lee Y, Friml J, Geisler M, Martinoia E. **2008**. Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 31218–31226.

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

Schwinn KE, Davies KM. **2004**. Flavonoids. In: Davies KM, ed. *Plant Pigments and their manipulation*. Oxford: Blackwell Publishing, 352.

Shaked-Sachray L, Weiss D, Reuveni M, Nissim-Levi A, Oren-Shamir M. **2002**. Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. *Physiologia Plantarum* **114**: 559–565.

Shan X, Zhang Y, Peng W, Wang Z, Xie D. **2009**. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3849–3860.

Shang Y, Venail J, Mackay S, Bailey PC, Schwinn KE, Jameson PE, Martin CR, Davies KM. **2011**. The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of Antirrhinum. *The New Phytologist* **189**: 602–615.

Shvarts M, Borochov 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 J, Koes R. **2002**. *ANTHOCYANIN1* of *Petunia* controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *The Plant Cell* **14**: 2121–2135.

Stiles EA, Cech NB, Dee SM, Lacey EP. **2007**. Temperature-sensitive anthocyanin production in flowers of *Plantago lanceolata*. *Physiologia Plantarum* **129**: 756–765.

Stracke R, Jahns O, Keck M, Tohge T, Niehaus K, Fernie AR, Weisshaar B. **2010**. Analysis of *PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES*-dependent flavonol glycoside accumulation in Arabidopsis thaliana plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation. *New Phytologist* **188**: 985–1000.

Stracke R, Werber M, Weisshaar B. **2001**. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Signalling and Gene Regulation*: 447–456.

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

Tahara S. **2007**. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**: 1387–1404.

Tanaka Y, Brugliera F, Chandler S. **2009**. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 5350–5369.

Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N, Katsumoto Y, Chandler S. **2010**. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: Practical perspectives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 1760–1769.

Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. **2008**. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* **54**: 733–749.

Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S. **2005**. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis requires the *MYB75/PAP1* gene. *Plant Physiology* **139**: 1840–1852.

Thomas MM, Rudall PJ, Ellis AG, Savolainen V, Glover BJ. **2009**. Development of a complex floral trait: The pollinator-attracting petal spots of the beetle daisy, *Gorteria diffusa* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **96**: 2184–2196.

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.

Tsuda S, Fukui Y, Nakamura N, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Ohira K, Ueyama Y, Ohkawa H, Holton T A, Kusumi T, Tanaka Y. **2004**. Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnology* **21**: 377–386.

Uddin JAFM, Hashimoto F, Kaketani M, Shimizu K, Sakata Y. **2001**. Analysis of light and sucrose potencies on petal coloration and pigmentation of lisianthus cultivars *in vitro*. *Scientia Horticulturae* **89**: 73–82.

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

Van Doorn WG. 2002. Does ethylene treatment mimic the effects of pollination on floral lifespan and attractiveness? *Annals of Botany* **89**: 375–383.

Van Doorn WG. **1997**. Effects of pollination on floral attraction and longevity. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1615–1622.

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.

Verweij W, Spelt C, Sansebastiano GD, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, Koes R, Quattrocchio F. 2008. An H^+ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. *Nature Cell Biology* **10**: 1456-1462.

Webber J, Ott P, Owens J, Binder W. 2005. Elevated temperature during reproductive development affects cone traits and progeny performance in *Picea glauca* x *engelmannii* complex. *Tree Physiology* 25:1219-1227.

Whitney HM, Glover BJ. 2007. Morphology and development of floral feature recognised by pollinators. *Arthropod-Plant Interactions* **1**:147-158.

Weiss D, van Tunen AJ, Halevy AH, Mol JN, Gerats AG. **1990**. Stamens and gibberellic acid in the regulation of flavonoid gene expression in the corolla of *Petunia hybrida*. *Plant Physiology* **94**: 511–515.

Weiss D, Luit A van der, Knegt E, Vermeer E, Mol JNM, Kooter JM. **1995**. Identification of endogenous gibberellins in Petunia flowers. *Plant Physiology* **107**: 695–702.

Weiss D. **2000**. Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiologia Plantarum* **110**: 152–157.

Weiss MR. **1995**. Floral color change: A widespread functional convergence. *American Journal of Botany* **82**: 167–185.

Willmer P, Stanley DA, Steijven K, Matthews IM, Nuttman CV. **2009**. Bidirectional flower color and shape changes allow a second opportunity for pollination. *Current Biology* **19**: 919–923.

Winkel-Shirley B. **2001**. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**: 485–493.

Wong SK, Lim YY, Chan EWC. **2009**. Antioxidant properties of *Hibiscus*: Species variation, altitudinal change, coastal influence and floral colour change. *Journal of Tropical Forest Science* **21**: 307–315.

Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K. **2010**. Two R2R3-MYB genes, homologs of *Petunia AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. *Plant & Cell Physiology* **51**: 463–474.

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, Toyama-Kato Y, Kameda K, Kondo T. **2003**. Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant & Cell Physiology* **44**: 262–268.

Zhao J, Dixon RA. **2010**. The “ins” and “outs” of flavonoid transport. *Trends in Plant Science* **15**: 72–80.