

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

SYLVIA RODRIGUES DA SILVEIRA

**Desenvolvimento embrionário e do arilo em maracujá azedo
(*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e maracujá doce
(*Passiflora alata* L.)**

Piracicaba

2014

SYLVIA RODRIGUES DA SILVEIRA

**Desenvolvimento embrionário e do arilo em maracujá azedo
(*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e maracujá doce
(*Passiflora alata* L.)**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Pinheiro Martinelli

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silveira, Sylvia Rodrigues da

Desenvolvimento embrionário e do arilo em maracujá azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e maracujá doce (*Passiflora alata* L.) / Sylvia Rodrigues da Silveira; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - - Piracicaba, 2014.

60 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Anatomia vegetal 2. Embriogênese 3. Microscopia 4. Morfologia vegetal 5. Ontogenia 6. Passifloracea 7. Sementes I. Título

CDU 581.3 : 582.681.41

À memória de minha avó Ignez Ramos da Silveira que infelizmente, de forma repentina, não pôde acompanhar a conclusão dessa etapa, mas que sempre apoiou e incentivou com todo o amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências, pela oportunidade da realização do curso de mestrado e pela infraestrutura e recursos disponíveis.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, pela oportunidade de realizar esse projeto sob sua orientação, por todas as demais oportunidades que compartilhou, por me dar autonomia, pela confiança depositada em mim, pelo incentivo, pela contribuição com minha formação acadêmica desde a iniciação científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado (2011/16228-5).

À Embrapa Mandioca Fruticultura (Cruz das Almas- BA), representada pelo pesquisador Onildo Nunes de Jesus, por disponibilizar seus campos experimentais para a realização de experimentos, em especial à Dra. Taliane Leila Soares e à estagiária Sidnara Ribeiro Sampaio, pelo auxílio nas atividades de campo e pela realização de polinizações, coletas e envio de material vegetal.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por permitir que se utilizasse uma área da Estação Experimental de Genética – Anhumas. À pós-graduanda Lourdes Pérez por ceder flores e frutos da bordadura de seu experimento, para polinizações e coletas e ao Eng. Agrônomo Cláudio Segatelli, responsável pela área experimental do departamento.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura pela permissão da utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai por disponibilizar o Laboratório de Biologia Celular e Molecular para a realização das atividades utilizando o microscópio LMD 7000.

À Dra. Érica Duarte Silveira pelo treinamento em isolamento de células a partir de cortes histológicos para extração de RNA total por microdissecção a laser.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação do CENA/USP, Daiane Vieira, Fábio Oliveira e Neuda Fernandes de Oliveira, pela disponibilidade, atenção e eficiência e também aos membros da Comissão de Pós-Graduação do CENA-USP.

Aos funcionários do CENA/USP que direta ou indiretamente colaboraram com a realização desse trabalho em especial à bibliotecária Marília Ribeiro Garcia Henyei, da Seção Técnica de Biblioteca, e à secretária Suzineide Manesco, da Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos pela convivência, atenção e suporte.

À bióloga Mônica Lanzoni Rossi pelo apoio técnico durante as atividades práticas, pela obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura, pelo constante incentivo, amizade e convívio.

Aos membros da Comissão Organizadora do V Simpósio Científico dos Pós-Graduandos no CENA/USP, por compartilharem a realização desse evento que acrescentou muito à minha experiência profissional.

Aos companheiros dos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal e Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, Dra. Eveline Tavano, Dra. Fabiana Muniz, Camila *Jataí* Heuser, Karina Salomão, Lígia Erpen, Tatiana Moraes pela troca de experiências, agradável convivência durante o trabalho e momentos de confraternização. Aos estagiários Bianca Aluisi, Fernando Paffaro, Isabela Barbeiro, Luana Manarim, Mayra Camargo e Nathalia Brancalleão, pelo convívio. Ao Dr. Everton Hilo de Souza pelo carinho, troca de ideias e por, junto à sua família, ter me acolhido durante minha estadia na Bahia. À Carol Rossi e Renata Cruz pelo companheirismo em sala de aula, parceria nos trabalhos e estudo, amizade e inúmeras conversas e conselhos. Ao Leonardo Soriano pela amizade, pela troca de ideias, por dividir bons momentos. Ao Marcelo *Bida* Correa e Sandra Santa Rosa por transcenderem o convívio e amizade no laboratório e por terem sido as pessoas mais presentes nos frequentes e mais distintos momentos e situações que passei nos últimos dois anos e meio.

À Camila Rossetti, pelo carinho, conversas e momentos de descontração. Ao Fabrício *K-roço* Oliveira por ter crescido comigo, por sempre me encorajar e pelo respeito às minhas decisões. Ao Adelino *Sandi* de Santi Jr. por todos os momentos compartilhados e pela amizade que supera a falta de convívio. Às amigas de infância Carol Espanha, Carlinha Moura e Mari Valente pelo carinho e por compreenderem minha ausência.

Aos meus familiares que apoiam minhas decisões e vibram com minhas conquistas, em especial ao meu tio *Phuro* Rodrigues por sempre se interessar pelo meu trabalho e à vó Ignez por, além de tudo, ter participado ativamente confeccionando os saquinhos para a cobertura de flores e frutos.

À minha segunda família República Marikota, e a todas suas antigas, atuais e mais recentes integrantes, por me ensinarem e aprenderem comigo, por me superestimarem tanto e assim me encherem de confiança e por proporcionarem momentos inesquecíveis nesses oito anos, principalmente àquelas que mais estiveram presentes nesse período do mestrado, *Salina*, *Ec-ncial*, *Banderas*, *Fabi*, *Tirô*, *Parkinson*, *Siga-bem*, *K-(r)²im*, *Triler*, *Buatos*, *Pleta*, *Brã-k*, *K-zadim*, *Da-mãe* e *Pãπli*. Em especial à *Nrt* por ter iniciado essa história comigo e *Flexas* por ser um exemplo em tantos aspectos.

À minha mãe, Maghali Rodrigues, pelo colo e dedicação infinita e ao meu pai Ruy Bueno da Silveira por estimular desde cedo meu gosto pela ciência. E sobretudo a ambos, por todas as abdições feitas em nome da minha formação e conforto, pelo apoio, exemplo e amor.

“C'est le temps que tu a perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante”

Antoine de Saint-Exupéry

“Um passo à frente e você já não está mais no mesmo lugar”

Chico Science

RESUMO

SILVEIRA, S. R. **Desenvolvimento embrionário e do arilo em maracujá azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e maracujá doce (*Passiflora alata* L.)**. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

O gênero *Passiflora* é o maior gênero da família Passifloraceae, que compreende mais de 500 espécies, a maioria originária de regiões neotropicais, sendo centenas distribuídas pela América Latina. Algumas dessas espécies apresentam importância econômica na produção de fruta in natura, suco concentrado, uso ornamental e medicinal com propriedades sedativas. Estudos do desenvolvimento reprodutivo e do fruto de espécies de *Passiflora* são fundamentais para melhor compreensão de aspectos do desenvolvimento que possam contribuir para a produção agrônômica e compreensão da evolução de estruturas florais presentes em espécies desta família. A importância das sementes para a sua propagação, para estudos taxonômicos e a presença do arilo, estrutura de interesse fundamental para a comercialização de frutos e produção de suco em espécies desse gênero, estimulou a elaboração de um estudo comparativo entre duas espécies de interesse comercial, *P. edulis* e *P. alata*, associando o estudo de características morfoanatômicas e moleculares. O presente projeto teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento do embrião zigótico e arilo de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Curtis. Flores foram manualmente polinizadas e amostras coletadas periodicamente após a polinização, visando à obtenção de sementes em diferentes fases do desenvolvimento embrionário e do arilo. Primórdios do arilo são observados em pré-antese, quando o saco embrionário é organizado. Células epidérmicas na base do funículo sofrem divisões periclinais formando uma borda em torno da rafe. O desenvolvimento do primórdio do arilo é interrompido, observando-se a reativação de divisões celulares e o arilo recomeça o desenvolvimento em uma estrutura multicelular ao redor da semente em desenvolvimento. Aos 14 dias após a polinização o arilo já cobre dois terços da semente, crescendo rapidamente até a semente ser recoberta totalmente, desde o funículo, até o polo calazal. O endosperma é nuclear e seu desenvolvimento se inicia logo após a fertilização, através de divisões sucessivas, formando um sincício ao redor do proembrião, simultaneamente à diminuição tamanho do nucelo. A celularização do endosperma, com a deposição de paredes celulares é observada aproximadamente 20 dias após a polinização. A embriogênese se inicia com a primeira divisão do zigoto, observada aos 7 dias após a polinização. Essa primeira divisão é transversal dividindo o zigoto em duas células, assimetricamente. A célula apical sofre sucessivas divisões que levam a estádios subsequentes de desenvolvimento do embrião, tais como, 4-8 células, globular, coração e torpedo. Aproximadamente 30 dias após a polinização o embrião atinge o estágio cotiledonar e a partir de então apenas aumenta em tamanho consumindo o endosperma e

ocupando seu espaço na semente. Essas observações permitiram que fossem definidos dois estádios específicos do desenvolvimento do arilo para futura captura por microdissecção a laser. A caracterização anatômica do desenvolvimento do embrião e do arilo em ambas as espécies subsidia o estabelecimento de estádios específicos do desenvolvimento que podem servir como alvos para estudos moleculares nessas espécies de *Passiflora*.

Palavras-chave: Embriogênese zigótica. Morfoanatomia. Microdissecção a laser. Ontogênese. Passifloraceae. Semente.

ABSTRACT

SILVEIRA, S. R. **Embryo and aril development in yellow passionfruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) and sweet passionfruit (*Passiflora alata* L.)** 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Passiflora is the largest genus in Passifloraceae and most of the commercially used species develop an aril around the seed, which is commercially important for fresh fruit consumption, and concentrate juice. Reproductive developmental studies associating morphoanatomical and molecular characteristics are essential for a better understanding of particularities of this genus. The present project aimed to characterize the development of *Passiflora edulis* Sims and *Passiflora alata* Curtis zygotic embryo and aril. Pollination of flowers were done manually, fruits and ovaries were collected at regular intervals after pollination and processed for scanning and light microscopy, for analysis of embryos and aril in different stages of development. Aril primordium is observed in pre-anthesis when the embryo sac is organized. Epidermic cells at the base of the funiculus undergo periclinal divisions forming a rim surrounding the raphe. Aril development is arrested until after fertilization when cell divisions are reactivated and the aril resume development into a multicellular structure surrounding the developing seed from the funicle towards the chalazal end. At approximately 14 days after pollination the aril already covers two thirds of the seed, and grows rapidly until the whole seed is covered. The endosperm is nuclear and starts developing soon after fertilization through successive divisions forming a syncytium mostly at the chalazal region, and around the developing embryo, replacing the nucellus. Cell walls are formed and the endosperm begins cellularization approximately 20 days after pollination. Embryogenesis initiates with the first division of the zygote, approximately 7 days after pollination. This first cell division is transversal and asymmetrical; the apical cell undergoes successive divisions leading to the subsequent stages of embryo development such as 4- and 8-celled, globular, heart-shaped, torpedo. Approximately 30 days after pollination, the embryo reaches the cotyledonary stage and thereafter grows only in size, consuming the endosperm and occupying its space in the seed. The first division of the zygote was observed around seven days after pollination (DAP), with the mature embryo formed approximately 30 DAP. Initial development of the aril primordium is observed at the ovule basal region, before anthesis/pollination. Embryo and aril development occurs simultaneously. These observations allowed for the definition of two specific stages of aril development for laser-capture-microdissection and further molecular analysis aiming at the evaluation of the molecular basis of aril differentiation in *Passiflora*. The morphoanatomical characterization of embryo and aril development in these species will serve as a source of information for the definition of specific developmental stages, which can be targets for molecular studies in *Passiflora*.

Keywords: Morphoanatomy. Laser microdissection. Ontogeny. Passifloraceae. Seed. Zygotic embryogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 O gênero <i>Passiflora</i>	15
3.2 Importância econômica e usos do maracujazeiro.....	17
3.3 Desenvolvimento vegetal com ênfase ao desenvolvimento embrionário e do arilo	19
3.3.1 Desenvolvimento da semente e embrião zigótico	19
3.3.2 Desenvolvimento do arilo.....	23
3.3.3 Caracterização molecular do desenvolvimento	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de embriões zigóticos e do arilo por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura	27
4.2 Microdissecção a Laser	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de embriões zigóticos em <i>Passiflora edulis</i> e <i>Passiflora alata</i>	32
5.2 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento do arilo em espécies comerciais de <i>Passiflora</i>	39
5.3 Captura por microdissecção a laser	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da semente se inicia após a polinização com o processo de dupla fertilização que ocorre no óvulo (GOLDBERG; PAIVA; YADEGARI; 1994) e após diversas transformações gera o embrião, que se desenvolve dentro da semente, sendo o início de uma nova geração da planta e a forma na qual um indivíduo se dispersa na natureza (BEWLEY; BLACK, 1994). O arilo forma-se ao redor da semente, ocorrendo neste um acúmulo de substâncias, sendo em algumas espécies um fator de atração para animais que contribuem para a dispersão da espécie (BEWLEY; BLACK, 1994). Anatomicamente, o arilo é uma estrutura que se desenvolve a partir do funículo, como um terceiro tegumento, sendo este considerado o verdadeiro arilo, diferenciando-se de outras estruturas, denominadas de ariloides, que se desenvolvem a partir de outras partes das sementes (FAHN, 1990). No caso do maracujazeiro, o arilo é onde o suco é produzido, caracterizando-se como a estrutura que dá a maior importância econômica para a espécie.

As transformações que ocorrem durante o desenvolvimento estão diretamente ligadas à expressão diferencial de genes, relacionadas às diversas etapas do desenvolvimento. Na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, diversos autores apresentam a caracterização de genes que apresentam papel fundamental no desenvolvimento da semente, seja no desenvolvimento do endosperma, tegumentos da semente, ou na diferenciação do embrião (LE et al., 2010). A maioria dos genes ativos na semente ocorre durante todo o seu desenvolvimento, havendo variações quantitativas durante esses processos, tendo sido recentemente identificados 289 genes específicos do desenvolvimento da semente, incluindo-se 48 fatores de transcrição (LE et al., 2010). A compartimentalização da expressão desses genes tem sido possível pela associação de estudos moleculares com métodos histológicos e mais particularmente pelo uso de metodologias de microdissecção a laser (DAY; GROSSNIKLAUS; MACKNIGHT, 2005; LE et al., 2007, 2010).

Informações a respeito dos aspectos morfológicos e anatômicos do desenvolvimento das sementes e dos frutos em *Passiflora* são praticamente inexistentes, mesmo sendo espécies de grande interesse comercial. O conhecimento destes, associado aos fatores que proporcionam o desenvolvimento e a fisiologia dos processos, são fundamentais para o estabelecimento de estratégias

para a melhor produtividade e também para a conservação das espécies. Com a recente obtenção de um banco de sequências gênicas expressas no desenvolvimento floral em *Passiflora* (CUTRI; DORNELAS, 2012) há atualmente, a oportunidade ímpar de se estudar aspectos do desenvolvimento reprodutivo deste gênero de forma comparativa, utilizando-se conhecimentos morfológicos e em nível molecular. Os conhecimentos gerados com a execução deste trabalho podem trazer subsídios morfoanatômicos para estudos moleculares direcionados ao melhoramento das espécies em estudo, podendo contribuir para um incremento na produtividade e qualidade dessas fruteiras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o desenvolvimento embrionário e do arilo em sementes de duas espécies de *Passiflora*, *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. alata*, com ênfase nos aspectos morfoanatômicos.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o desenvolvimento do embrião zigótico e do arilo em *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. alata*.
2. Identificar fases específicas na ontogênese e desenvolvimento do arilo em *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. alata*, para posterior isolamento de células por microdissecção a laser, para análises de transcriptoma.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* é o maior gênero da família Passifloraceae e compreende mais de 500 espécies, a maioria originária de regiões neotropicais, das quais centenas são distribuídas pela América Latina (KUGLER; KIND, 2004; ULMER; MACDOUGAL, 2004) e aproximadamente 140 ocorrem no Brasil (CERVI, 2006). O gênero é conhecido por sua morfologia complexa e diversificada, composto por plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas. Segundo a descrição de Cervi (1997), possuem caule cilíndrico, anguloso ou subanguloso, folhas de forma muito variável, podendo apresentar pecíolos providos de glândulas nectaríferas. Suas flores são actinomorfas, andróginas, geralmente isoladas ou aos pares e muito vistosas, possuem cinco pétalas, nascendo na margem do tubo do cálice de cor branca, esverdeada ou colorida; possuem também verticilos adicionais contendo o órgão mais característico do gênero, a corona filamentosa entre o perianto e os estames (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Os filamentos da corona aparecem em uma ou várias séries, com comprimentos, formas e coloração variados (CERVI, 1997). Apresentam cinco estames e o carpelo é composto por três estiletos livres no extremo superior e unidos na base, ovário súpero, unilocular, multiovulado (CERVI, 1997).

Os frutos do maracujazeiro são produzidos em ramos anuais e são do tipo baga, ovais ou oblongos, às vezes redondos de casca dura, grossa e muito lisa (LORENZI; MATOS, 2002), com frutos normalmente indeiscentes com polpa mucilaginosa em seu interior. As sementes são mais ou menos comprimidas, alveoladas, foveoladas, reticuladas ou sulcadas transversalmente e envolvidas por um arilo mucilaginoso (CERVI, 1997). A morfologia do gênero é característica e apresenta estruturas exclusivas tais como corona, androginóforo e arilo abundante, originado de células do funículo do óvulo (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

A propagação das Passifloráceas é feita principalmente por meio de sementes (PEREIRA; DIAS, 2000), a variedade encontrada entre os diferentes tipos de frutos do gênero está relacionada a esse mecanismo, já que o arilo que circunda a semente neste gênero, funciona como recompensa para seus agentes dispersores

(ULMER; MACDOUGAL, 2004). Como as estruturas características desse grupo são as reprodutivas, estão diretamente relacionadas ao sucesso reprodutivo dessas espécies (FENSTER et al., 2004) e à dispersão das sementes.

Passiflora apresenta quatro subgêneros: *Astrophaea*, *Decaloba*, *Deldamiodes* e *Passiflora*. O maior subgênero é *Passiflora*, com mais de 200 espécies, dentre elas o maracujá azedo, *Passiflora edulis*, e o maracujá doce, *Passiflora alata*, espécies comercialmente mais importantes no Brasil. Apesar de o nome *P. edulis* Sims ser proposto como a forma taxonômica correta de citar o maracujá azedo independente da cor dos frutos (BERNACCI et al., 2008), no Brasil, devido à importância comercial dada à cor amarela da casca dos frutos, ainda usa-se *P. edulis* f. *flavicarpa* referindo-se ao maracujá azedo de frutos amarelos. *P. alata* apresenta folhas inteiras, ovaladas; pétalas carmim; corona em quatro séries filamentosas de coloração branca e roxa; ovário oblongo ou obovalado; fruto obovóide ou piriforme, de cor alaranjada quando maduro; sementes cordadas ou cordado-oblongas, foveoladas (MONDIN; CERVI; MOREIRA, 2011) (Figura 1A). *P. edulis* apresenta folhas trilobadas; pétalas brancas; corona em quatro ou cinco séries filamentosas de coloração púrpura, violácea e branca; ovário globoso; fruto globoso, de cor amarela, amarelo-esverdeada ou púrpura quando maduro; Sementes obovóideas, foveoladas (MONDIN; CERVI; MOREIRA, 2011) (Figura 1B).



Figura 1: Flores na antese, aspecto externo e corte longitudinal de frutos maduros e sementes maduras de *Passiflora alata* (A) e *P. edulis* var. *flavicarpa* (B). Barras: frutos = 3 cm; sementes = 2 mm.

3.2 Importância econômica e usos do maracujazeiro

Estima-se que no Brasil existam mais de 200 espécies do gênero *Passiflora* (MELETTI et al., 2005). Algumas dessas espécies apresentam importância econômica na produção de fruta *in natura*, suco concentrado, uso ornamental e medicinal com propriedades sedativas (GUZZO et al., 2004).

O maracujá-amarelo ou maracujá-azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) é uma espécie nativa do Brasil, e destaca-se como a mais importante do gênero. Sua importância econômica colocou o país em posição de destaque no cenário internacional, sendo o maior produtor mundial, responsável por 70% da produção mundial, que atualmente é de 923.035 toneladas (AGRIANUAL, 2013). Em 2012 a área colhida foi de 61.842 ha distribuída principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. (IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2012). A região Nordeste tem liderado a produção brasileira, respondendo por mais da metade da produção nacional, seguida pelas Regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul (IBGE, 2012), sendo a Bahia e o Ceará os maiores produtores nacionais com rendimentos de 10,72 e 22,04 t/ha respectivamente. (IBGE, 2012).

Mais recentemente, outra representante do gênero *Passiflora* nativa do Brasil, *P. alata* ganhou destaque no mercado. O maracujá-doce ocorre em todo o território nacional (MELETTI; BERNACCI; SOARES-SCOTT, 2003), sendo encontrado também no Peru, Paraguai e Argentina (BERNACCI; MELETTI; SOARES-SCOTT, 2003). A maior parte de sua produção encontra-se no Vale do Ribeira no Estado de São Paulo e o volume comercializado em 2002 chegou a 1,7 toneladas (KAVATI; PIZA JUNIOR, 2002).

Diversas partes da planta como ramos, casca, sementes e flores têm sido utilizadas além da alimentação humana, no uso medicinal, cosmético, ornamental e ração animal. Porém, ainda são os frutos os mais interessantes para o mercado. Os frutos do maracujá azedo podem ser consumidos ao natural ou industrializados. Seu suco destaca-se entre os produzidos com frutas tropicais, é rico em vitaminas, cálcio e fósforo (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004) e tem grande aceitação entre os consumidores, representando uma boa porcentagem dos sucos exportados (IBGE, 2012). O maracujá doce é menos rico em suco e apresenta menor acidez, portanto é comercializado principalmente para o consumo *in natura* (MANICA, 2005) apesar de também ser utilizado na produção de medicamentos fitoterápicos (ZERAİK; YARIWAKE, 2010), enquanto o maracujá azedo apresenta um maior leque de utilização, tanto para o consumo de mesa e uso doméstico, como na indústria, para produção de polpa e suco concentrado.

As sementes do maracujá podem ser boas fontes de carboidratos, proteínas, minerais e óleos de sabor e odor agradáveis e valor nutritivo (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004), evidenciando um potencial para aproveitamento, tanto na alimentação humana e animal, quanto no uso para a indústria de cosméticos (ZERAİK; YARIWAKE, 2010). Ferrari, Colussi e Ayub. (2004), verificaram elevado teor de ácidos graxos insaturados no óleo extraído das sementes de maracujá, além de grande teor proteico e de fibras no farelo das sementes moídas. Tais fibras podem ter propriedade hipocolesterolêmica na alimentação humana (CHAU; HUANG, 2005). Características específicas das sementes, como o número de sementes por fruto e a massa de suco por semente, estão correlacionadas ao número de grãos de pólen na polinização e apresentam interesse econômico por estarem também relacionadas ao rendimento de suco (AKAMINE; GIROLAMI, 1959; SANTOS, et al., 2009). Segundo Santos et al. (2009), apesar do aumento no número de sementes no

fruto resultar em menor quantidade de suco por semente, verifica-se um aumento no rendimento de suco por fruto.

3.3 Desenvolvimento vegetal com ênfase ao desenvolvimento embrionário e do arilo

O desenvolvimento vegetal é caracterizado pelo crescimento contínuo ao longo da vida da planta e pela diferenciação de tecidos (SRIVASTAVA, 2002) e é uma sequência de eventos que progressivamente levam à formação do organismo (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2001). O crescimento é resultado de divisão e alongamento celular, enquanto que a diferenciação se dá pela modificação da função celular (SRIVASTAVA, 2002). Diferentemente dos animais, o desenvolvimento vegetal é quase totalmente pós-embrionário, ou seja, as estruturas que compõe uma planta adulta, como brotos, raízes, folhas, flores e frutos são produzidas após a germinação, a partir de grupos de células indiferenciadas, chamados meristemas (WOLPERT, et al., 2007). O desenvolvimento embrionário vegetal é caracterizado principalmente pelo estabelecimento de dois meristemas apicais a partir dos quais tem origem todos os órgãos da planta. Desde o zigoto até a planta adulta ocorre uma série de eventos de diferenciação e morfogênese, a formação dos meristemas, diferenciação de tecidos fundamentais, de revestimento e vasculares primários e secundários, bem como a formação dos órgãos vegetativos e reprodutivos (WAREING; PHILLIPS, 1978).

Os mecanismos de formação dos padrões de desenvolvimento são gerados por divisões celulares coordenadas, que por sua vez são controladas pela expressão diferencial de genes tecido-específicos que codificam proteínas responsáveis por funções específicas de uma célula ou tecido, demarcando regiões de desenvolvimento de novos destinos celulares e órgãos (SRIVASTAVA, 2002).

3.3.1 Desenvolvimento da semente e embrião zigótico

Segundo Bhatnagar e Johri (1972) a semente pode ser definida como um óvulo fertilizado e maduro. O desenvolvimento da semente se inicia com a dupla fertilização, quando há a união de um dos núcleos gaméticos do grão de pólen com o núcleo da oosfera do saco embrionário, resultando no zigoto (RAVEN; EVERT;

EICHORN, 2001), enquanto, simultaneamente, o outro núcleo se une à célula central, fusão que dará origem ao endosperma (GEHRING; CHOI; FISCHER, 2004). Na maioria das espécies, o zigoto não se divide imediatamente após a fertilização, passa por um período de repouso até que seja formado endosperma suficiente para que ocorram estímulos hormonais e nutricionais (LERSTEN, 2004). A partir de então, o embrião se desenvolve à medida que consome o endosperma, enquanto os tegumentos do óvulo se diferenciam para formar os envoltórios da semente (GEHRING; CHOI; FISCHER, 2004).

A semente é basicamente constituída por envoltório, endosperma e embrião. O endosperma é formado após repetidas divisões do núcleo do endosperma primário e seu desenvolvimento pode acontecer de três formas, nuclear, celular e helobial (BHATNAGAR; JOHRI, 1972), porém todos os tipos de endosperma têm como função a nutrição do embrião em desenvolvimento, permanecendo presente na semente madura, em alguns casos (LERSTEN, 2004). Os tegumentos do envoltório, por sua vez, têm origem na diferenciação dos tegumentos do óvulo, cujas células aumentam em tamanho e sofrem divisões periclinais e anticlinais (BEECKMAN et al., 2000). Em espécies bitegumentadas o tegumento interno dá origem ao tégmen e o tegumento externo origina a testa (CORNER, 1976), formando o envoltório da semente madura. Beeckman et al. (2000), estudando o desenvolvimento desse envoltório em *Arabidopsis*, detectaram três fases distintas durante este processo, as quais envolvem eventos como, a deposição e desaparecimento de pigmentos, acúmulo de amido, produção de mucilagem, redução de camadas celulares, sendo que estas fases ocorrem de forma coordenada com determinados estádios da embriogênese.

As características da embriogênese podem variar de acordo com a espécie, porém, em angiospermas, algumas espécies são utilizadas como modelo para descrever esse processo, por terem sido amplamente estudadas, como é o caso de *Arabidopsis thaliana* e *Capsella bursa-pastoris* (BOWMAN, 1994). Em *A. thaliana* a primeira divisão do zigoto é assimétrica, dando origem a duas células de destinos diferentes, uma basal, que formará o suspensor; outra apical, que formará o embrião propriamente dito. A célula apical sofre duas divisões longitudinais seguidas de uma divisão transversal, formando um proembrião de oito células (BOWMAN, 1994). Nas dicotiledôneas a fase de proembrião se inicia com a formação do zigoto, até o início

da formação dos cotilédones (LERSTEN, 2004). Os estádios da embriogênese foram definidos de acordo com o número de células derivadas da célula apical ou as formas que o embrião assume ao longo do desenvolvimento (BOWMAN, 1994). Na sequência, o proembrião apresenta uma série de divisões coordenadas em diferentes planos até atingir o estágio globular (BOWMAN, 1994) (Figura 2). Ao longo das divisões, as células se diferenciam e o embrião adquire sua estrutura, com a diferenciação da protoderme, procâmbio e meristema fundamental (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2001). As células da protoderme darão origem à epiderme, enquanto o meristema fundamental e procâmbio são derivados das células mais centrais (BOWMAN, 1994). Após atingir o estágio globular as divisões se tornam menos sincronizadas (LAU et al., 2010) e algumas divisões periclinais levam ao início da formação dos cotilédones (WEST; HARADA, 1993). Tais divisões ocorrem rapidamente e levam ao estágio cordiforme, durante o qual a expansão e divisões celulares causam o alongamento dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula levando ao formato de torpedo (BOWMAN, 1994). Na seguinte fase os cotilédones continuam a se alongar podendo até curvar-se, quando há restrição de espaço, e os meristemas primários se mantêm durante o crescimento do embrião (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2001). De acordo com Bowman (1994), em *arabidopsis*, o meristema apical radicular começa a se formar durante o estágio cordiforme, enquanto que o meristema apical caulinar surge durante o estágio de torpedo. No estágio de torpedo, os elementos embrionários básicos do corpo da planta já estão estabelecidos (JURGENS et al., 1991) e as células centrais do hipocótilo se diferenciam formando o tecido vascular primário (BOWMAN, 1994). O crescimento subsequente se dá principalmente por expansão celular (BOWMAN, 1994). Em *arabidopsis*, o alongamento continua até o estágio cotiledonar curvado (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2001).

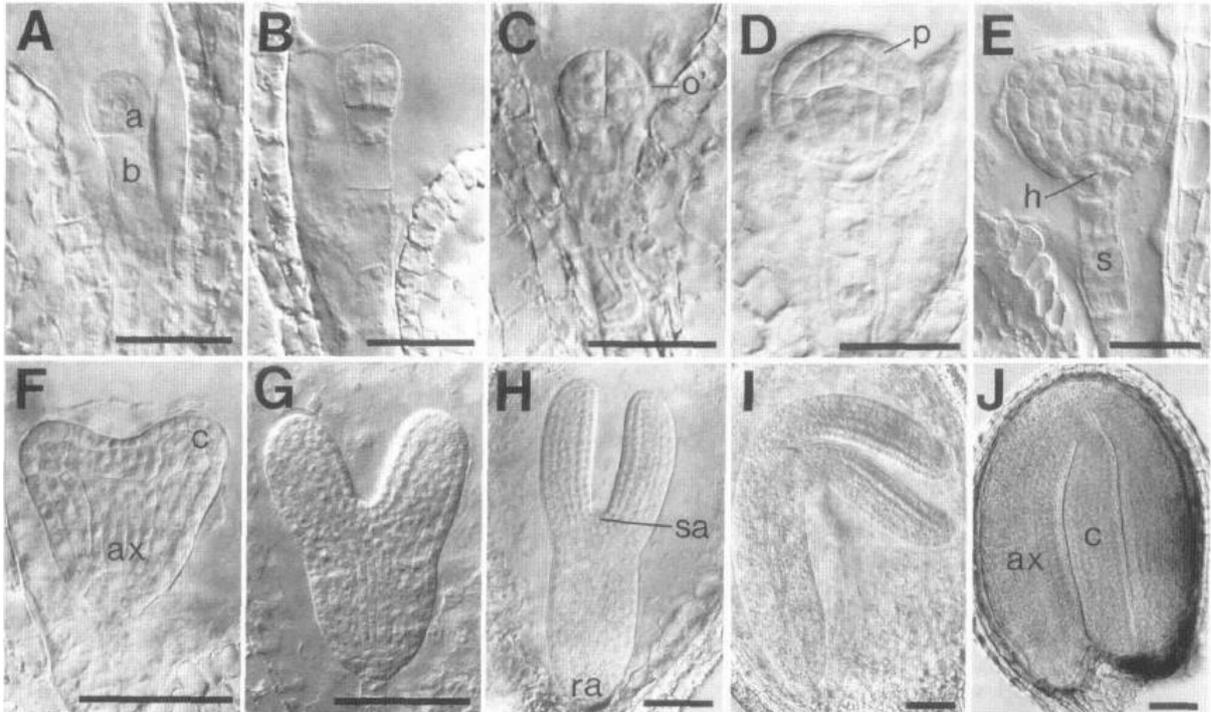


Figura 2: Fases da embriogênese zigótica em *Arabidopsis thaliana* observada por microscopia de contraste de interferência diferencial. Proembrião após a primeira divisão (A). Embrião com 2 ou 4 células (B). Estádio de octante (C). Início do estágio globular (D). Estádio de transição (E). Início do estágio de coração (F). Estádio de coração tardio (G). Estádio cotiledonar linear (H) Estádio cotiledonar curvado (I) Embrião maduro (J). a = célula apical; sa = ápice caulinar; ax = eixo embrionário; b = célula basal; c = cotilédone; h = hipófise; O' = embrião no estágio de octante; p = protoderme; ra = ápice radicular; s = suspensor. Barras: 25 μ m (A-E); 50 μ m (F-J) (Modificado de WEST; HARADA, 1993).

A embriogênese zigótica é um processo essencial no ciclo de vida dos vegetais (THOMAS, 1993), por ser o processo no qual o zigoto sofre uma série de mudanças morfológicas e celulares que resultam na formação de um embrião maduro (WEST; HARADA, 1993) e conferindo característica multicelular à planta a partir de uma única célula reprodutiva (LAU et al., 2010). É, também, ao longo do desenvolvimento do embrião que se estabelece a polaridade, com o estabelecimento dos meristemas apicais caulinar e meristema apical radicular, em polos opostos (BATYGINA, 2005), inicialmente com o estabelecimento do eixo apical-basal, seguido pelo eixo radial, estabelecendo a simetria bilateral. (DE SMET et al., 2010).

A descrição anatômica e morfológica do processo de desenvolvimento da semente, formação dos tegumentos, endosperma, embriogênese e suas fases em diversas espécies vegetais, se associa a estudos enfocando as bases moleculares envolvidas nesses processos. Diversos genes especificamente expressos na formação da semente, regulando o desenvolvimento dos tegumentos, do

endosperma e a formação de padrão do embrião, têm sido descritos (LE et al., 2010; HUANG et al., 2011). De acordo com Casson et al. (2005) diferentes estudos demonstram que para o processo de embriogênese ocorrer corretamente é necessária a expressão coordenada de genes.

3.3.2 Desenvolvimento do arilo

Algumas estruturas diferenciadas são associadas aos óvulos e às sementes, como por exemplo o arilo, ariloide, carúncula e sarcotesta. Tais estruturas são atrativos para animais, principalmente pássaros, desta forma apresentando importância na dispersão de sementes (BHATNAGAR; JOHRI,1972). Durante o desenvolvimento da semente, acredita-se que o arilo tenha origem logo após a fertilização a partir do funículo. Svoma (1998), descrevendo o desenvolvimento de sementes em algumas espécies de Annonaceae, observou uma excrescência do tegumento externo na região micropilar, a qual denominou arilo. Dentre as espécies estudadas a origem dessa estrutura difere no tocante à camada da testa da qual ela surge e em alguns casos aparece em uma forma reduzida (SVOMA, 1998). Estes estudos também enfatizam a importância de se estudar esse aspecto do desenvolvimento, pois a origem do arilo, sua presença, ausência ou forma reduzida são úteis para estudos filogenéticos.

O uso do termo arilo é bastante controverso na literatura. Segundo a classificação de Corner (1976) o termo define uma estrutura que varia de consistência carnosa a mais ou menos dura, que se desenvolve a partir de parte do óvulo, ou do funículo, depois da fertilização, e envolve a semente parcial ou totalmente. Pijl (1972), preferiu o termo ariloide e distinguiu terminologias de acordo com o local a partir do qual a estrutura se originou, sendo estrofiolo quando originado da rafe; carúncula quando se forma próximo à micrópila; arilódio ou falso arilo para protuberância ao redor do exostômio; e arilo verdadeiro quando se origina do funículo. O arilo também foi considerado por alguns autores como um terceiro integumento (KAPIL; VASIL, 1963; MAHESHWARI,1950). Para Endress (2011) o verdadeiro arilo é originado do funículo e pode ser descrito como um terceiro envelope da semente. Uma das características que define o arilo é sua consistência suculenta, mas a característica mais importante é como a estrutura se inicia e como ela se desenvolve (ZHANG; ZHANG; STÜTZEL, 2011), fazendo-se necessários mais

estudos sobre a ontogenia desta estrutura e estudos moleculares que poderão definir os genes que determinam a identidade do arilo, podendo-se avaliar evolutivamente o desenvolvimento dessas estruturas em diferentes espécies.

Os frutos das espécies de *Passiflora* apresentam polpa ácida e mucilaginoso em forma de arilo que recobre as sementes (CERVI, 1997). Em *Passiflora* o arilo é oriundo de divisões de células do funículo, inicialmente formando um anel ou colar próximo à micrópila, chegando a cobrir totalmente a semente em algumas espécies. O desenvolvimento do arilo foi observado em *P. foetida* (RAJU, 1956; SINGH, 1962), *P. calcarata* (RAJU, 1956) *P. caerulea* e *P. edulis* (DATHAN; SINGH, 1972) e descrito em maiores detalhes em *P. suberosa* (KLOOS; BOUMAN, 1980), no qual foi observado em dois momentos, pré-fertilização e pós-fertilização. Após a diferenciação e crescimento dessa estrutura, suas células passam a aumentar em tamanho e alterar sua função para reserva de lipídios e proteínas (RODRIGUEZ-RIÑÓ; VALUTEÑA; ORTEGA-OLIVENCIA, 2006).

Poucos relatos descrevem o desenvolvimento do arilo no que se refere às bases moleculares que controlam o processo. Lovisetto et al. (2012), investigando a origem de frutos carnosos, sugerem que genes MADS-box, também estão envolvidos na formação das estruturas carnosas desenvolvidas ao redor das sementes de gimnospermas e observaram que *AGAMOUS*, *AGL6*, e *TM8-like* são fortemente expressos no óvulo e no primórdio do arilo de *Taxus baccata*, sugerindo sua função no desenvolvimento dessa estrutura. Schneitz (1999) afirmam que genes como *AINTEGUMENTA* e *INNER NO OUTER*, são necessários para o início da formação dos integumentos. Brambilla, Kater e Colombo (2008), propuseram um modelo no qual interações entre *BELL1* e os genes da família MADS-box *AGAMOUS*, *SEEDSTICK*, *SHATTERPROOF 1* e *2* controlam o desenvolvimento e a determinação da identidade dos integumentos do óvulo em *arabidopsis*. *SEEDSTICK* também é requerido para o desenvolvimento normal do funículo (PINYOPICH, 2003). Gross-Hardt, Lenhard e Laux (2002) sugeriram que *WUSCHEL* é necessário para a formação de integumentos, pois quando ectopicamente expresso na região da calaza sob o controle do promotor de *AINTEGUMENTA* foi capaz de produzir estruturas semelhantes a integumentos na região do funículo. Estudando a embriogênese em maracujá-azedo, Cazoto (2012) verificou, no início da formação do arilo, a expressão do gene *YABBY1* (*PeYAB1*), a qual foi reduzida

nos estádios posteriores, sugerindo a participação desse gene especificamente na determinação da identidade dessa estrutura.

Apesar do desenvolvimento do arilo ocorrer principalmente após a fertilização, concomitante ao desenvolvimento do embrião e semente, os primórdios do arilo surgem como um terceiro integumento, a partir do funículo e o início de sua diferenciação é observada ainda durante o desenvolvimento do óvulo, o que sugere que estudos dos genes envolvidos no desenvolvimento do óvulo podem também elucidar na compreensão das bases moleculares que controlam o desenvolvimento do arilo, estrutura fundamental para a produção de suco em *Passiflora*.

3.3.3 Caracterização molecular do desenvolvimento

Considerando que o desenvolvimento e a diferenciação vegetal são controlados pela ativação de genes específicos, para a compreensão desses processos é necessário o conhecimento das bases moleculares e genéticas desses mecanismos de variação do desenvolvimento. Diversos estudos moleculares têm empregado diferentes técnicas para identificar os genes responsáveis pela diferenciação celular e de tecidos que ocorrem ao longo do desenvolvimento de plantas. Com o aumento da disponibilidade de sequências de genomas inteiros em bancos de dados, estudos visando a identificação e caracterização de função de genes em biologia incluem além das abordagens típicas, como a caracterização de proteínas, determinação de sequências de peptídeos e identificação das sequências de DNA correspondentes, são adotadas também técnicas mais recentes envolvendo etiquetas de sequências expressas, microarranjos, perfil de transcriptoma e bioinformática (ALBA et al., 2004).

A associação de estudos morfoanatômicos e técnicas de microscopia com estudos de biologia molecular e ferramentas relacionadas, também é amplamente utilizada nesses estudos, pois gera informações temporais e espaciais dos padrões de expressão gênica, o que ajuda a elucidar as vias regulatórias que levam à diferenciação celular e morfogênese ao longo do desenvolvimento.

Técnicas como imunolocalização, hibridização *in situ* e observações de genes repórteres têm sido as mais utilizadas para analisar perfis de expressão em células específicas (TEIXEIRA; PERIRA, 2010). Trabalhos visando o estudo de genes envolvidos no desenvolvimento de óvulos e sementes têm utilizado a metodologia de

hibridização *in situ* (ANGENENT et al., 1995; JOFUKU et al., 1994; KOEHLER et al., 2003; LOVISETTO et al., 2012). O método permite a localização de sequências específicas de ácidos nucleicos em secções histológicas de um tecido através de uma reação de hibridização entre um nucleotídeo marcado e a sequência alvo complementar (JIN; LLOYD, 1997).

Outra técnica que une a morfoanatomia à biologia molecular é a captura por microdissecção a laser (LMD). Esta metodologia possibilita o isolamento de um conjunto de células de um tecido complexo, normal ou alterado, ou de células individuais de regiões microscópicas específicas, baseado em sua identificação visual ao microscópio e sua localização diferenciada (NELSON et al., 2006; SAIEG, 2009). A metodologia consiste na captura da área de interesse, em cortes histológicos, em uma lâmina contendo uma membrana, através de um corte fino pelo feixe de laser (Figura 2). As áreas microdissecadas selecionadas, são coletadas para posterior processamento para extração de DNA, RNA, proteínas ou metabólitos para análises moleculares (OHTSU et al., 2007), o que é possível, pois a morfologia das células e seu material genético são preservados (IHLASEH, et al. 2007). Le et al. (2007), utilizaram a técnica para identificar os genes necessários para a formação da semente, isolando regiões específicas, como endosperma, suspensor e epiderme em sementes de soja. Também foi realizada a análise do perfil de expressão de genes durante o desenvolvimento do megagametófito de braquiária apomítica e sexual visando caracterizar genes associados à apomixia (SILVEIRA, 2009). Casson et al. (2005) fizeram uso de LMD para comparar o perfil de expressão de diferentes grupos de células durante a embriogênese em *Arabidopsis*. A eficácia desse método na construção de bibliotecas de cDNA de células específicas foi comprovada por Asano et al. (2002), isolando células do floema em folhas de arroz. Recentemente a técnica foi associada a análises de PCR quantitativo em tempo real *in situ* no estudo dos padrões de expressão espacial de genes responsivos a infestação de larvas do bicudo-do-algodoeiro em duas regiões distintas do botão floral de *Gossypium hirsutum* (Artico et al., no prelo)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de embriões zigóticos e do arilo por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização do desenvolvimento embrionário zigótico e do arilo, polinizações controladas e coletas de amostras para ambas as espécies foram realizadas nos campos experimentais da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas, BA, no período de setembro a novembro de 2012; polinizações e coletas de *P. edulis* na mesma localidade no período de novembro de 2013 a janeiro de 2014; e polinizações e coletas de *P. alata* na Estação Experimental de Genética – Anhumas em Piracicaba, SP, do Departamento de Genética da ESALQ-USP de novembro de 2013 a fevereiro de 2014.

Foram realizadas polinizações manuais controladas em flores de ambas as espécies (Figura 3), coletando-se as anteras de uma flor e depositando-se delicadamente os grãos de pólen sobre o estigma de outra flor da mesma espécie oriunda de outra planta, já que as flores dessas espécies são autoincompatíveis. As flores foram marcadas para possibilitar o controle das polinizações realizadas.

Flores e frutos oriundos dessas polinizações controladas foram coletados no campo para posterior processamento das amostras e realização das análises morfoanatômicas do desenvolvimento embrionário. Ovários coletados de flores não polinizadas e recém-polinizadas foram medidos, assim como frutos em diferentes estádios após a fecundação (Figura 3). Os frutos maiores foram descascados e sementes tiveram um pedaço do tegumento retirado na lateral anteriormente à fixação para facilitar a penetração dos produtos utilizados nas etapas de fixação, desidratação e infiltração.

As amostras foram fixadas em solução fixadora contendo glutaraldeído (2% p/v), paraformaldeído (2% p/v) e 5 mM de cloreto de cálcio, utilizando-se vácuo (60mmHg) por 30 minutos, permanecendo sob refrigeração durante 24 horas. Em seguida foram desidratadas em série etílica (35 a 70 %), com trocas em intervalos de 2h cada, sob refrigeração, sendo conservadas em etanol (70 %), sob refrigeração, para posterior processamento para análises microscópicas. Tais amostras conservadas tiveram partes coletadas para as análises em microscopia de

luz enquanto o restante permaneceu armazenado para posterior utilização para análises em microscopia eletrônica de varredura.

Após a fixação, o processamento para realização de análises através de cortes histológicos constou de três metodologias de desidratação e infiltração dependendo da amostra: 1- desidratação em série etílica (75 a 100%) e infiltração em solução crescente de etanol: meio de infiltração (Historesina, Leica); 2- desidratação em metil-celolve, seguida de etanol, propanol e butanol, todos a 100%, e infiltração em solução crescente de butanol: meio de infiltração; 3- desidratação em série etílica (75 a 100%), seguida de propanol e butanol (100%) e infiltração em solução crescente de butanol: meio de infiltração. Todas as etapas foram realizadas sob refrigeração e as trocas na desidratação foram feitas a cada 2 horas. O intervalo entre as trocas das soluções de meio de infiltração variou de acordo com o tamanho e rigidez de cada amostra, com o processo de infiltração ocorrendo em no mínimo uma semana, ou períodos maiores para amostras maiores e mais difíceis de infiltrar. A última etapa de infiltração em todos os casos foi a transferência para meio de infiltração puro.

Depois de infiltradas as amostras foram emblocadas em historesina, com a polimerização ocorrendo à temperatura ambiente. Cortes histológicos foram realizados em micrótomo rotativo Leica (RM 2155), a 3 ou 5 μm , sendo os cortes colocados em lâminas histológicas contendo água filtrada e secas em chapa aquecedora (40°C). Os cortes foram então corados com fucsina ácida (0,05 %), seguido de azul de toluidina (0,1 %) e secagem à temperatura ambiente, para observações estruturais. Em seguida as lâminas foram cobertas com Entellan® Merck Millipore, seguido de lamínula para tornar as lâminas permanentes, sendo analisadas em microscópio de luz transmitida. Essas atividades foram realizadas nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal, Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas e Biologia Celular e Molecular, todos no CENA, USP.

Para análises através de microscopia eletrônica de varredura, as amostras fixadas foram desidratadas em série etílica (75 a 100%), secas ao ponto crítico através de CO₂ líquido, montadas em suportes metálicos, metalizadas com ouro (60 nm) e observadas ao microscópio eletrônico de varredura. Tais observações foram realizadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária NAP/MEPA-ESALQ/USP.

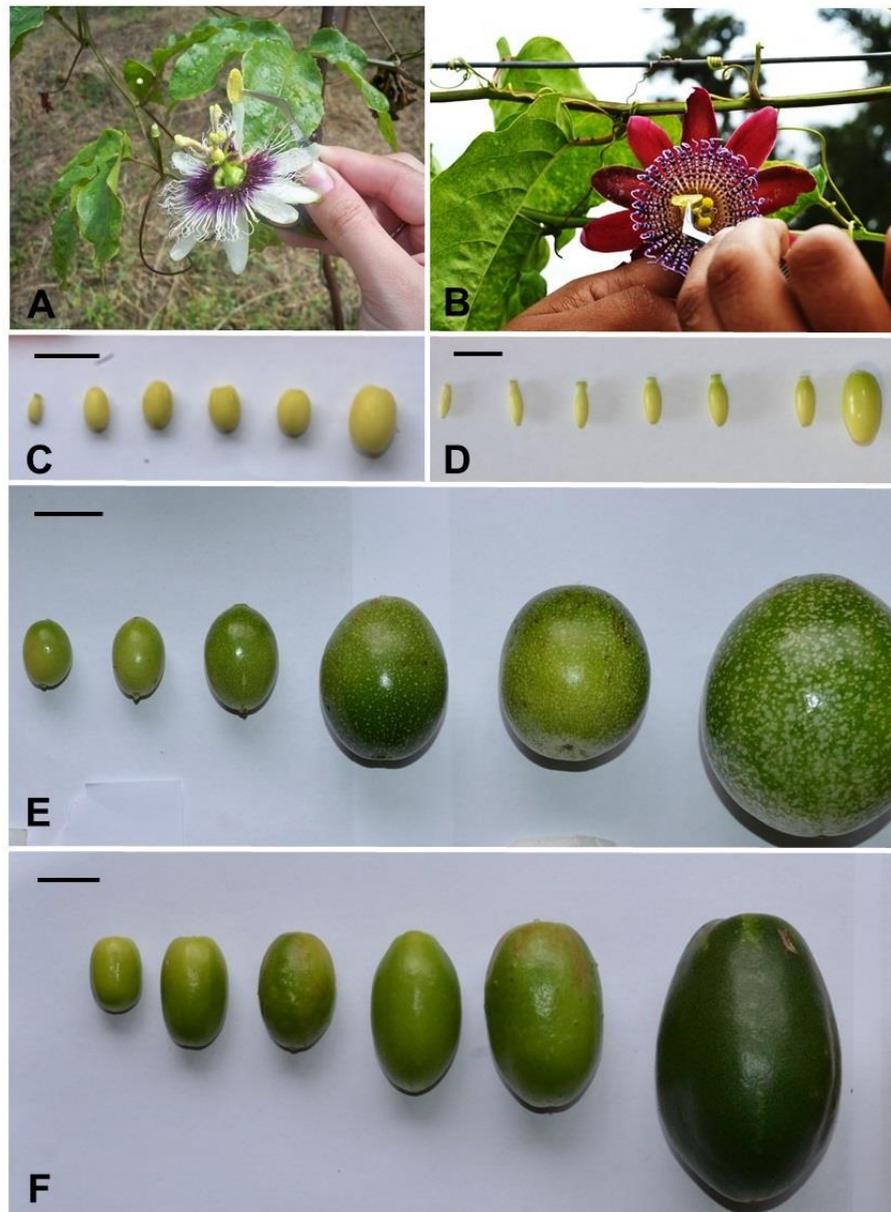


Figura 3: Polinização manual de flores de *Passiflora edulis* (A) e *Passiflora alata* (B). Ovários de flores de *P. edulis* (C) e *P. alata* (D) em diferentes estádios de desenvolvimento coletados para análises microscópicas. Frutos de *P. edulis* (E) e *P. alata* (F) em diferentes estádios de desenvolvimento. Barras: C-D = 1 cm; E-F = 2 cm.

4.2 Microdissecção a Laser

As etapas de preparo do material até os cortes histológicos foram realizadas seguindo protocolos modificados de Silveira (2009) e Artico, et al. (no prelo) e as capturas por microdissecção utilizando o microscópio Leica LMD7000. Amostras de *P. alata* foram utilizadas para essa etapa do trabalho.

Flores em estádios pré-antese e frutos com 7 a 12 dias após a polinização foram coletados em campo, isolados os ovários e imediatamente imersos em fixador. O fixador foi preparado uma hora antes do uso, composto de solução de etanol (100%) e ácido acético (3:1) e mantido em caixa de isopor com gelo. As amostras foram mantidas no fixador, sob refrigeração, por aproximadamente 4 horas, o fixador foi então trocado e foi aplicado vácuo (400 mmHg) por 15 minutos, por duas vezes e em seguida armazenadas em fixador a 4°C, durante a noite. Posteriormente, o material foi lavado três vezes, a cada 30 min, em etanol refrigerado (75% v/v, em água Milli-Q), para retirada do excesso de fixador, e em seguida armazenado a 4°C até o início da etapa de desidratação.

A desidratação consistiu em lavagens de 1h cada, em série etílica (85%, 95% e 100%), sendo a última lavagem em etanol (100%), repetida por mais duas vezes de 30 min. Após as lavagens o material foi deixado em etanol absoluto a 4°C durante a noite.

No dia seguinte sob agitação, as amostras foram submetidas a concentrações crescentes de xilol: etanol (1:3, 1:1, 3:1), a 4°C, durante 45 min cada, seguido de xilol (100%), a 4°C. O procedimento foi realizado sem interrupção, em capela de exaustão.

Para a infiltração, aproximadamente $\frac{1}{4}$ do volume de xilol foi substituído por pastilhas de Paraplast X-Tra™, sob agitação, em estufa à temperatura de 54 a 55°C, aumentando-se a concentração de parafina com pastilhas, ou parafina líquida (Paraplast X-Tra™ derretida a 58 °C em frascos livres de RNAses), até a saturação da solução por um período de 24h. Em seguida as amostras foram transferidas para Paraplast X-Tra™ líquido puro para emblocagem.

As amostras foram cuidadosamente distribuídas em placas de Petri descartáveis contendo Paraplast X-Tra™ líquido, sobre chapa aquecedora, à temperatura de 62°C. Após o endurecimento da parafina as placas foram armazenadas em dessecador a 4°C, até a montagem dos blocos para realização das secções histológicas. O material foi desenformado e cubos foram cortados, ao redor de cada amostra, utilizando-se lâmina grossa. Com o auxílio de lamparina, cada cubo foi fixado em blocos de madeira com a própria parafina e em seguida o bloco foi desbastado em formato de trapézio para facilitar a formação das fitas durante a obtenção dos cortes histológicos.

Todo o material e equipamentos utilizados durante a realização dos cortes histológicos foram limpos com solução de NaOH 0.1N e SDS 0.2% (p/v). Em micrótomo Leica (RM 2155), utilizando navalha de aço, foram inicialmente obtidas secções de maior espessura (20µm) até a identificação, com auxílio de microscópio estereoscópico, do tecido de interesse nos óvulos. A partir de então, foram obtidas secções de 10 µm de espessura para o preparo das lâminas. As fitas formadas foram posicionadas em lâminas de vidro Leica para microdissecção (Glass PEN foil slide, Leica Microsystems), contendo água DEPC livre de RNase, por sua vez posicionadas em placa aquecida a 42°C, para secagem completa, por cerca de 2 horas, e em seguida armazenadas a 4°C, em dessecador, até a realização do procedimento de microdissecção.

Antes da microdissecção, os cortes foram desparafinizados em xilol duas vezes, por cinco minutos cada, lavados em água DEPC livre de RNase e deixados à temperatura ambiente em capela de exaustão até a secagem.

Após vários testes utilizando diferentes parâmetros para microdissecção ao LMD7000, as regiões de interesse foram identificadas e microdissecadas. A microdissecção foi realizada sob as seguintes condições: magnitude de 20X e 40X, força de 70 a 85 mW, velocidade 7-10. O laser apresenta um comprimento de onda de 349 nm, 10-5000 Hz de frequência de pulso, podendo atingir 120 µJ de energia de pulso (LEICA MICROSYSTEMS). Foram isoladas células de duas regiões distintas de cada um dos estádios: (A) região do primórdio do arilo antes da polinização; (B) região do funículo controle, antes da polinização; (C) região do arilo em desenvolvimento após fertilização; (D) região do funículo controle, após a fertilização.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período analisado as amostras observadas variaram de ovários de cor amarela de 2 mm de diâmetro por 5 mm de comprimento, oriundos de flores em pré-antese a frutos de 50 mm de diâmetro por 70 mm de comprimento ainda verdes, contendo embriões maduros. O desenvolvimento do arilo foi caracterizado a partir de uma semana antes da antese até os 14 dias após a polinização, já o desenvolvimento do embrião foi caracterizado de 12 a 28 dias após a polinização. A caracterização morfoanatômica do desenvolvimento da semente em maracujá dependeu fortemente do sucesso da infiltração das amostras. À medida que o estágio de desenvolvimento avançou, com lignificação dos tecidos da semente, o tempo necessário para infiltração aumentou, e mesmo assim em muitos casos não foi possível a observação dos tegumentos, mas apenas dos tecidos mais internos, mais tenros. Embriões e arilos foram fixados e infiltrados com sucesso, permitindo a visualização de suas células e estruturas, porém os intervalos adotados entre as coletas, de 5 a 7 dias, não permitiram registro de todos os estádios característicos de desenvolvimento do proembrião.

5.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de embriões zigóticos em *Passiflora edulis* e *Passiflora alata*

Os óvulos e, subsequentemente, as sementes se apresentam-se conectados à parede do ovário pelo funículo ao longo de todo o desenvolvimento embrionário. A partir do funículo se diferencia uma estrutura chamada arilo, cujo desenvolvimento será descrito posteriormente. Os embriões se formam na região da micrópila e ao longo do desenvolvimento se alongam em direção ao polo calazal.

Aos 7 dias após a polinização foi possível observar rastros deixados pelo tubo polínico na região da micrópila e no saco embrionário (Fig. 4A), confirmando a provável fertilização, e dificultando a observação do zigoto. Esses resíduos foram também observados em estádios posteriores ao redor do zigoto e embrião. Williams et al. (1984) observaram a retenção de traços de calose ao redor do zigoto em espécies de *Rhododendron* até dois dias depois da fertilização, o mesmo não foi observado em óvulos de flores não fertilizadas. Em outras espécies de *Passiflora* foram relatados casos em que o tubo polínico permaneceu na região

da micrópila durante o desenvolvimento da semente de *P. foetida* e *P. leschenautii* (RAJU, 1952), *P. foetida* (SINGH, 1962) e *P. edulis* (CAZOTO, 2012)

Aos 12 dias foi possível observar a primeira divisão do zigoto, a qual foi assimétrica e deu origem a duas células distintas, uma célula apical de menor tamanho e uma célula basal maior e vacuolizada (Fig. 5A). A célula apical se dividiu formando o proembrião que após as divisões subsequentes atinge a fase globular. Segundo Dumas e Rugowsky (2008), a polaridade é claramente estabelecida com a primeira divisão do embrião, devido a diferenças citológicas evidentes, entre a célula rica em citoplasma e outra vacuolizada, porém muito se discute sobre a origem da polaridade apical-basal, se esta é estabelecida *de novo* no embrião ou se é herdada da célula-mãe (DUMAS; ROGOWSKY, 2008). Segundo Bowman e Floyd (2008), a polaridade apical-basal em *Arabidopsis* está relacionada à polaridade do saco embrionário, apesar de haver indícios de que essa polaridade possa ser autônoma, independente da influência materna, já que embriões somáticos se formam normalmente livres da influência do gametófito feminino (BOWMAN; FLOYD, 2008). Também foi demonstrada a importância da parede celular na manutenção da polaridade do zigoto (BAKOS, et al. 2009). A expressão do gene *GNOM* e dos fatores de transcrição *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* são importantes para o estabelecimento da polaridade apical-basal, (MAYER; BUETTNER; JÜRGENS, 1993; UEDA; LAUX, 2012).

Aos 14 dias após a polinização já é possível a observação do embrião zigótico multicelular no início da fase globular (Figura 4B; 5B), em ambas as espécies estudadas, sendo possível distinguir o suspensor do embrião propriamente dito. É ao longo dessa fase que divisões periclinais das células mais periféricas delimitam uma camada mais externa de células (Figura 4C), a protoderme, a qual dará origem ao primeiro tecido do embrião, a epiderme (DE SMET, et al., 2010; MEINKE, 1991; WEST; HARADA, 1993). Segundo Jürgens e Mayer (1994), no início do estágio globular distinguem-se quatro células apicais que darão origem ao meristema caulinar. Nas observações do presente estudo, em *P. alata* e *P. edulis*, não foi possível a identificação clara das divisões que deram origem aos meristemas e estes só foram evidentes no estágio de coração. Em *Daucus carota*, Lackie e Yeung (1996), também não puderam definir claramente as linhagens celulares e a origem exata dos meristemas devido à falta de um perfil de células distinto, a

estrutura dos meristemas se apresentou mais organizada ao final do estágio de coração.

Nesta fase observa-se também o endosperma ainda não celularizado na região terminal do embrião (Figuras 4B; C; 5B). O endosperma é nuclear e começa a se desenvolver logo após a fertilização, previamente ao início do desenvolvimento do embrião, como descrito por Lersten (2004). O núcleo da célula inicial se divide repetidamente sem a formação de parede celular, o que resulta em um endosperma cenocítico no qual os núcleos são distribuídos na periferia de uma única célula muito grande ao redor de um grande vacúolo (LERSTEN, 2004). O tipo de desenvolvimento cenocítico/multicelular do endosperma é o mais comum, sendo típico dos cereais como *Hordeum vulgare*, *Zea mays* e *Oryza sativa* (LOPES; LARKINS, 1993). Em dicotiledôneas, ocorre na espécie modelo *A. thaliana* (MANSFIELD; BRIARTY, 1993) e foi descrito também para alface (*Lactuca sativa*) (JONES, 1974) e beterraba (*Beta vulgaris*) (JASSEM, 1973). Endosperma inicialmente não celular, constituído por diversos núcleos originados a partir de divisões de uma célula primária, que surge após a dupla fertilização, também foi observado em outras espécies do gênero *Passiflora* (COOK, 1909; DATHAN; SINGH, 1972 RAJU, 1956; SINGH, 1962). O embrião e o endosperma se desenvolvem paralelamente para formar a semente, mas pouco se sabe sobre a coordenação entre os dois processos e também de ambos com o tegumento da semente em desenvolvimento (DUMAS; RUGOWSKY, 2008).

Divisões localizadas continuam a ocorrer, aumentando mais intensamente o número de células em duas regiões do ápice do embrião, resultando em duas protuberâncias que conferem o formato de coração ao embrião, o que caracteriza o início da emissão dos cotilédones (Figuras 4D; 5C). Em arabidopsis, o final do estágio globular se dá com divisões periclinais de células nos flancos do embrião, as quais resultam na emergência dos cotilédones e o meristema caulinar, visível entre os cotilédones em crescimento (BOSCÁ; KNAUER; LAUX, 2011).

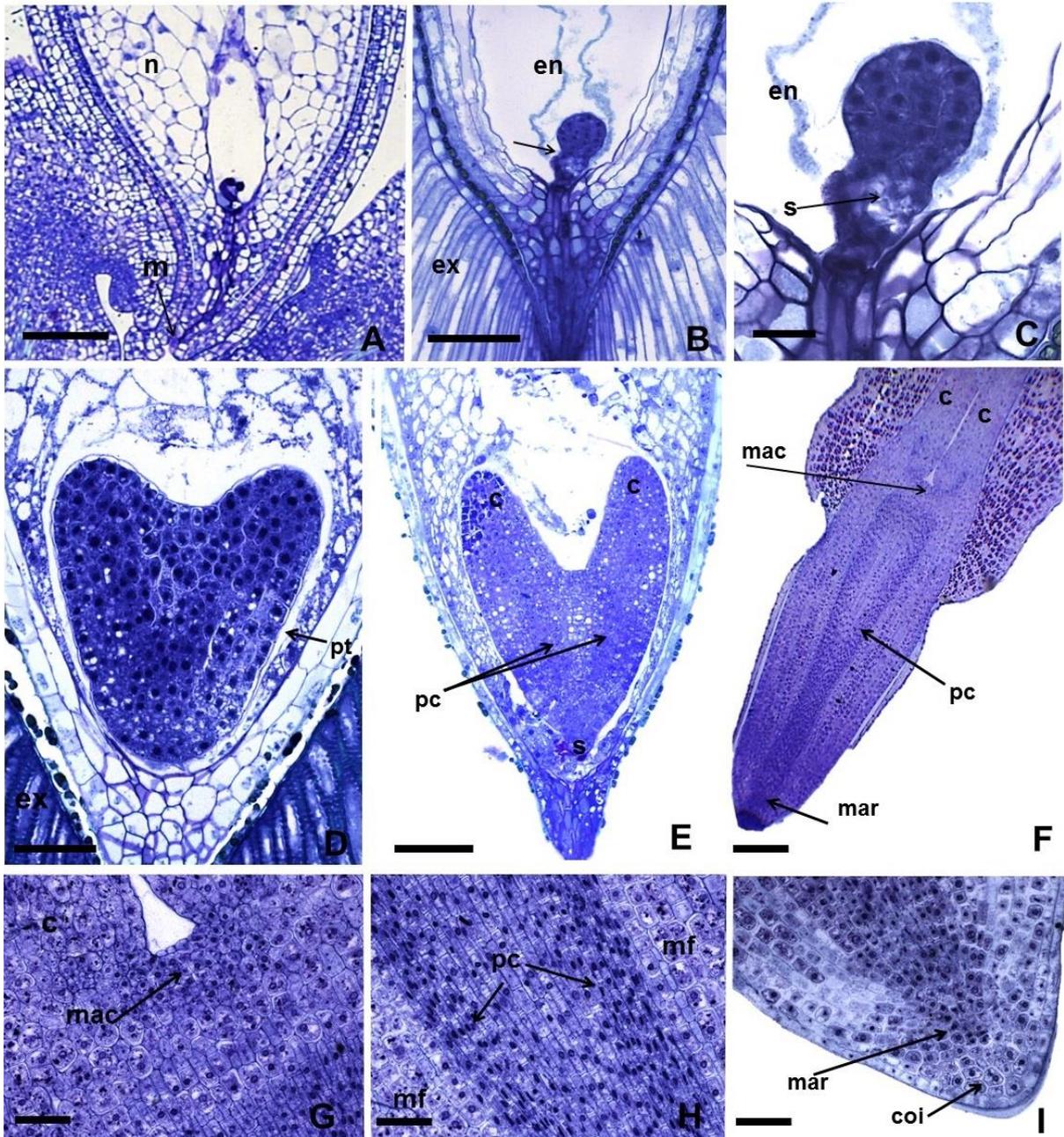


Figura 4: Estádios da embriogênese zigótica em *P. edulis*. Zigoto circundado por rastros deixados pelo tubo polínico no saco embrionário 7 dias após a polinização (A). Embrião na fase inicial do estágio globular rodeado por endosperma nuclear (B) a seta indica a distinção entre suspensor e o embrião propriamente dito. Detalhe do suspensor e embrião globular com organização em células mais periféricas e células mais centrais (C). Embrião em estágio de coração 21 dias após a polinização com protoderme formada e endosperma multicelular ao redor (D). Embrião no estágio inicial de torpedo (E). Embrião no estágio cotiledonar aos 28 dias após a polinização (F). Detalhe da região do meristema apical caulinar de embrião cotiledonar (G). Detalhe do procâmbio de embrião cotiledonar (H) Detalhe da região do meristema apical radicular de embrião cotiledonar (I) c= cotilédone; coi= coifa; en= endosperma nuclear; ex= exotégmen; m= micrópila; mac= meristema apical caulinar; mar= meristema apical radicular; mf= meristema fundamental; n= nucelo; pc= procâmbio; pt = protoderme; s = suspensor; Barras = 100μm (A, B, E); 25 μm (C); 50 μm (D, G, H, I); 250 μm (F).

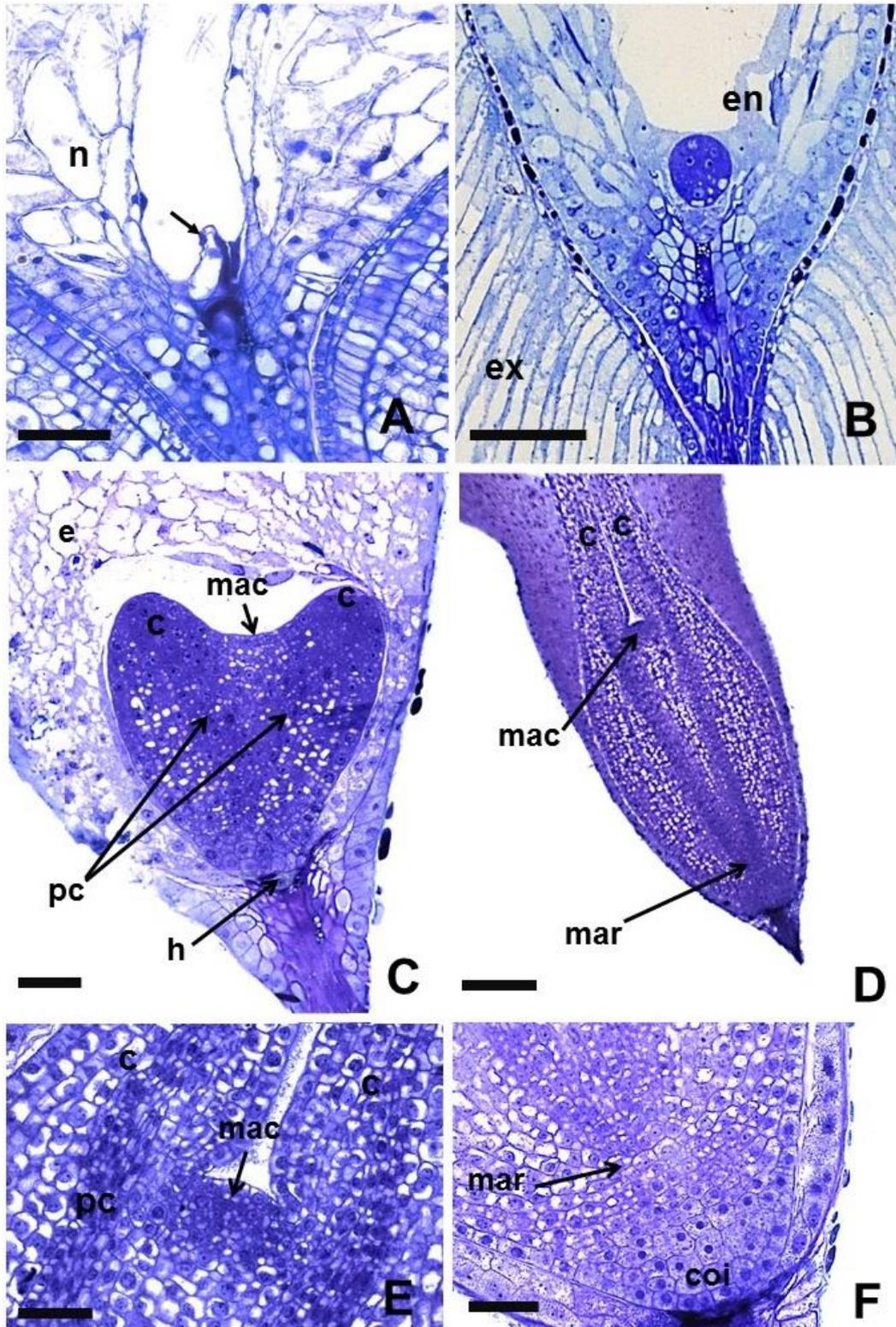


Figura 5: Estádios da embriogênese zigótica em *P. alata*. Primeira divisão do embrião (seta) originando células apical e basal aos 12 dias após a polinização (A). Embrião na fase inicial do estágio globular rodeado por endosperma nuclear (B) Embrião no estágio de coração circundado por endosperma multicelular (C). Embrião no estágio cotiledonar aos 28 dias após a polinização (D). Detalhe da região do meristema apical caulinar de embrião cotiledonar (E). Detalhe da região do meristema apical caulinar de embrião cotiledonar (F). Detalhe da região do meristema apical radicular de embrião cotiledonar (G) c = cotilédone, coi = coifa; en = endosperma mac = meristema apical caulinar, mar = meristema apical radícula, ex = exotegmen, n = nucelo, pc = procâmbio. Barras: 50 μ m (A, C, E, F); 100 μ m (B); 250 μ m (D).

De maneira bastante semelhante em ambas as espécies estudadas, observa-se aumento em volume e alongamento dos cotilédones em direção ao polo calazal e o embrião passa da fase de coração para torpedo (Figura 4E). Já é possível distinguir uma região mais fortemente corada composta por células mais alongadas e densas, que se concentram na região central do embrião, o que caracteriza o início da organização do procâmbio (Figuras 4F; 5C). É possível distinguir a célula na base do embrião, que corresponde à hipófise, e células logo acima desta, mais basais em relação às do procâmbio, com organização diferenciada com maior volume, formando a região que dará origem à coifa (5C, E). Os meristemas apicais caulinar e radicular são claramente definidos. O mesmo foi observado em embriões de *D. carota* (LACKIE; YEUNG, 1996), nos quais ao final do estágio de coração, a região do meristema caulinar apresenta duas camadas de células de tamanho e formato regular dividindo-se principalmente no sentido anticlinal em relação à superfície, as células abaixo dessa camada são mais desordenadas. O procâmbio se forma na região central do eixo embrionário e suas células convergem em direção ao polo radicular, próximo a um grupo de células isodiamétricas que darão origem à coifa, sendo as células entre o procâmbio e a coifa as iniciais do meristema radicular (LACKIE; YEUNG, 1996). Scheres et al. (1994), baseando-se em análise histológica, propuseram que as iniciais do meristema radicular em *arabidopsis* são definidas durante o estágio de coração.

Nessa fase o endosperma apresenta característica multicelular e é progressivamente absorvido pelo embrião (Figuras 4E; 5C). Na mesma fase os embriões de *D. carota* se encontravam imersos em células de endosperma degenerado, que por sua vez eram rodeadas de endosperma intacto (LACKIE; YEUNG, 1996). Em *Beta vulgaris*, a celularização do endosperma também se inicia entre os estádios globular e coração e se completa durante o estágio cotiledonar; simultaneamente o embrião absorve o endosperma até consumi-lo por completo e na semente madura o embrião é envolvido pelo perisperma, tecido com origem a partir de células nucelares (JASSEM, 1973). O endosperma desempenha papel importante no desenvolvimento e manutenção de um meio adequado para o crescimento do embrião, fornecendo nutrientes e outras condições essenciais para o crescimento e diferenciação a partir do zigoto. No entanto, em muitas espécies o endosperma se degenera enquanto a semente amadurece (LESTER; KANG, 1998).

Lafon-Placette e Köhler (2014), afirmam que o sucesso no desenvolvimento do embrião depende do desenvolvimento concomitante do endosperma e requer sinalização molecular entre ambos.

A partir de então os três meristemas primários tornaram-se mais claramente visíveis. Células meristemáticas são células indiferenciadas capazes de se renovar, proliferar e gerar um grande número de células que se diferenciarão e darão origem a tecidos e órgãos com funções específicas, essa diferenciação é guiada pela expressão diferencial de genes, levando a diferenças funcionais (SINGH; BHALLA, 2006). O evento mais importante que ocorre durante a embriogênese em plantas é a diferenciação dos meristemas apicais e a iniciação de suas atividades na organogênese (KAPLAN; COOKE, 1997)

Aos 28 dias após a polinização o embrião já atingiu o estágio cotiledonar e todos os elementos de um embrião maduro estão bem evidentes (Figuras 4F; 5D), cotilédones, hipocótilo, protoderme, meristema apical caulinar em forma de domo localizado entre os cotilédones (Figuras 4G; 5E), procâmbio contínuo ao longo do eixo hipocotiledonar e nos cotilédones, cercado por meristema fundamental e composto por células mais estreitas e alongadas (Figura 4H) meristema apical radicular localizado entre procâmbio e um conjunto de células de maior volume que dará origem à coifa (Figuras 4I; 5F).

Foi observada uma diferença em relação ao tamanho do embrião das espécies estudadas ao final do estágio cotiledonar, os embriões de *P. edulis* ocupavam mais da metade da semente, já os embriões de *P. alata*, apesar de também apresentarem morfologia semelhante ao do embrião maduro, eram menores. Para ambas as espécies, no período que segue, o embrião apenas se alonga até ocupar toda a extensão da semente. Ao contrário do que ocorre no sistema modelo *A. thaliana*, os cotilédones dessa espécie não se curvam. Além do alongamento, nenhuma diferenciação estrutural ou histológica foi observada no embrião a partir dessa fase até o amadurecimento do fruto. A semente madura apresenta embrião em forma de espátula com dois cotilédones finos, foliáceos e justapostos e uma região hipocótilo-radícula curta em relação aos cotilédones.

De acordo com Goldberg (1994), o desenvolvimento inicial do embrião é marcado por três eventos principais, a aquisição da polaridade apical basal, a diferenciação da epiderme e a formação dos meristemas. Esses três momentos

foram identificados no desenvolvimento das espécies aqui estudadas (Figuras 4B; E; 5A; C)

Kaplan e Cooke (1997), descreveram estádios da embriogênese em dicotiledôneas com ênfase nos eventos morfogênicos e não nos formatos adquiridos pelo embrião em casa fase. O modelo propõe que após a fertilização o embrião passa por uma fase em que seu crescimento é linear seguida da formação de um parênquima tridimensional no polo distal do embrião, que diferencia o embrião propriamente dito do suspensor na região proximal. Ainda na fase globular são definidos os meristemas apicais em polos opostos do embrião e simultaneamente ocorre diferenciação dos três tecidos meristemáticos primários, protoderme, procâmbio e meristema fundamental. Nas duas espécies de *Passiflora* estudadas no presente trabalho, a diferenciação dos meristemas e tecidos foi mais conspícua quando embrião apresentava o formato de coração. Com os meristemas caulinar e radicular diferenciados, ocorre o primeiro evento organogênico no desenvolvimento da planta, o início da formação dos cotilédones (KAPLAN; COOKE, 1997), caracterizado pela divisão celular localizada que gera dois apêndices nas laterais do meristema caulinar. Ocorre também o início da formação da coifa (KAPLAN; COOKE, 1997), como foi observado no estágio de coração nas espécies de *Passiflora* aqui estudadas, no qual uma zona de células logo acima da hipófise se diferencia dando início à formação dessa estrutura (Figura 5C). A partir daí o embrião pode apresentar além do crescimento subsequente e alongamento dos cotilédones e hipocótilo, a organogênese de primórdios foliares, a transformação dos tecidos primários em epiderme, tecido vascular e córtex processos que continuaram ao longo de todo o desenvolvimento pós-embriônico da planta (KAPLAN; COOKE, 1997).

5.2 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento do arilo em espécies comerciais de *Passiflora*

O desenvolvimento do arilo foi semelhante em ambas as espécies estudadas. Apesar dessa estrutura ser descrita como um apêndice da semente e assim seu desenvolvimento como um evento pós-fertilização, Kloos e Bouman (1980) e Rodriguez-Riaño; Valuteña e Ortega-Olivencia (2006) demonstraram duas fases no desenvolvimento do arilo, pré e pós-fertilização, em *P. suberosa* e *Turnera ulmifolia*

e duas espécies de *Cytisus*. Essas duas fases também foram observadas no presente trabalho em *P. edulis* e *P. alata*, sendo que na primeira fase observa-se o início do desenvolvimento do primórdio do arilo, com divisões celulares na epiderme e na camada subepidérmica do funículo no óvulo, na altura da micrópila no óvulo anátropo. Após o desenvolvimento inicial, o desenvolvimento do primórdio do arilo é suspenso, sendo reiniciado apenas após a fertilização, quando reinicia-se a atividade meristemática nessa região e seu desenvolvimento é reativado.

Ao final do desenvolvimento do óvulo e organização do saco embrionário, regiões na epiderme do funículo, próximas à micrópila, passam a apresentar intensa divisão celular (Figura 6A). Raju (1956), também observou primórdios do arilo ainda durante o desenvolvimento do óvulo em *P. calcarata*; na fase de tétrade do megásporo os primórdios surgem do funículo logo abaixo da região micropilar do óvulo anátropo. Silvério, Tormes e Mariath (2009), observaram as primeiras divisões celulares periclinais na camada dérmica do rudimento seminal maduro, formando uma pequena projeção circular na base do funículo, contornando a rafe em *P. suberosa*. No período que segue até a antese observa-se nessa região a ocorrência de divisões periclinais subepidérmicas, formando uma protuberância ao redor do funículo (Figura 6B) com a formação de novas camadas de células nessa região. As divisões passam a aumentar (Figura 6C) e também ocorrem de forma anticlinal na epiderme, porém poucas mudanças são observadas em relação ao tamanho da estrutura, cujo número de camadas de células não excede três. Pouco antes da antese é possível observar, claramente, essa protuberância em cortes longitudinais (Figura 6D). Rodriguez-Riaño, Valuteña e Ortega-Olivencia (2006) observaram redução da atividade meristemática na região do arilo nesse mesmo período, assim como no período seguinte, após a polinização. A duração do período entre a polinização e a fertilização varia de acordo com a espécie, no trabalho com duas espécies de leguminosas. Rodriguez-Riaño, Valuteña e Ortega-Olivencia (2006), observaram uma duração de 3 a 4 dias após a polinização para *Cytisus striatus* e de 4 a 5 para *C. multiflorus*. No presente trabalho esse período variou de 9 a 12 dias.

Após a fertilização, o arilo cresce gradualmente ao redor do funículo em direção ao polo calazal da semente em desenvolvimento. As células do primórdio do arilo voltam a sofrer divisões e a estrutura aumenta em espessura e comprimento. A porção do arilo voltada para o lado da rafe sofre mais divisões tornando-se mais

espessa em relação à porção voltada para o lado da micrópila (Figura 6E). Essa retomada no desenvolvimento deve-se ao fato da reativação de atividade meristemática (RODRIGUEZ-RIAÑO; VALUTEÑA; ORTEGA-OLIVENCIA, 2006). Nos dias subsequentes o arilo cresce em direção ao polo calazal rapidamente (Figuras 6F-H) e aos 14 dias após a fertilização o arilo passa a cobrir dois terços da semente (Figura 6I) sendo mais espesso, 7-8 camadas de células na região proximal, afunilando-se para 3-4 camadas na região distal do arilo (Figuras 6J-L). As células da camada interna (voltada para o óvulo/semte) do arilo são mais vacuolizadas que as células da camada externa, ao contrário do observado por Rodriguez-Riaño, Valuteña e Ortega-Olivencia (2006), que identificaram três regiões distintas no arilo de *Cytisus*, sendo a mais externa com células maiores e a interna com células pequenas. Nessa fase observa-se expansão celular, levando ao aumento do tamanho da estrutura até cobrir totalmente a semente, ao redor de 35 dias após a polinização (Figura 6M). A partir de então, nenhuma diferenciação da estrutura foi observada além do crescimento. Kloos e Bouman (1980) também observaram que em *P. suberosa*, na fase final do desenvolvimento do arilo, seu crescimento se dá exclusivamente por aumento do tamanho celular. As células passam a adquirir um aspecto de células de reserva, com um grande vacúolo central e núcleo periférico, e o arilo se torna suculento, passando a acumular água, lipídeos e amido (DATHAN; SINGH, 1972; RAJU, 1956).

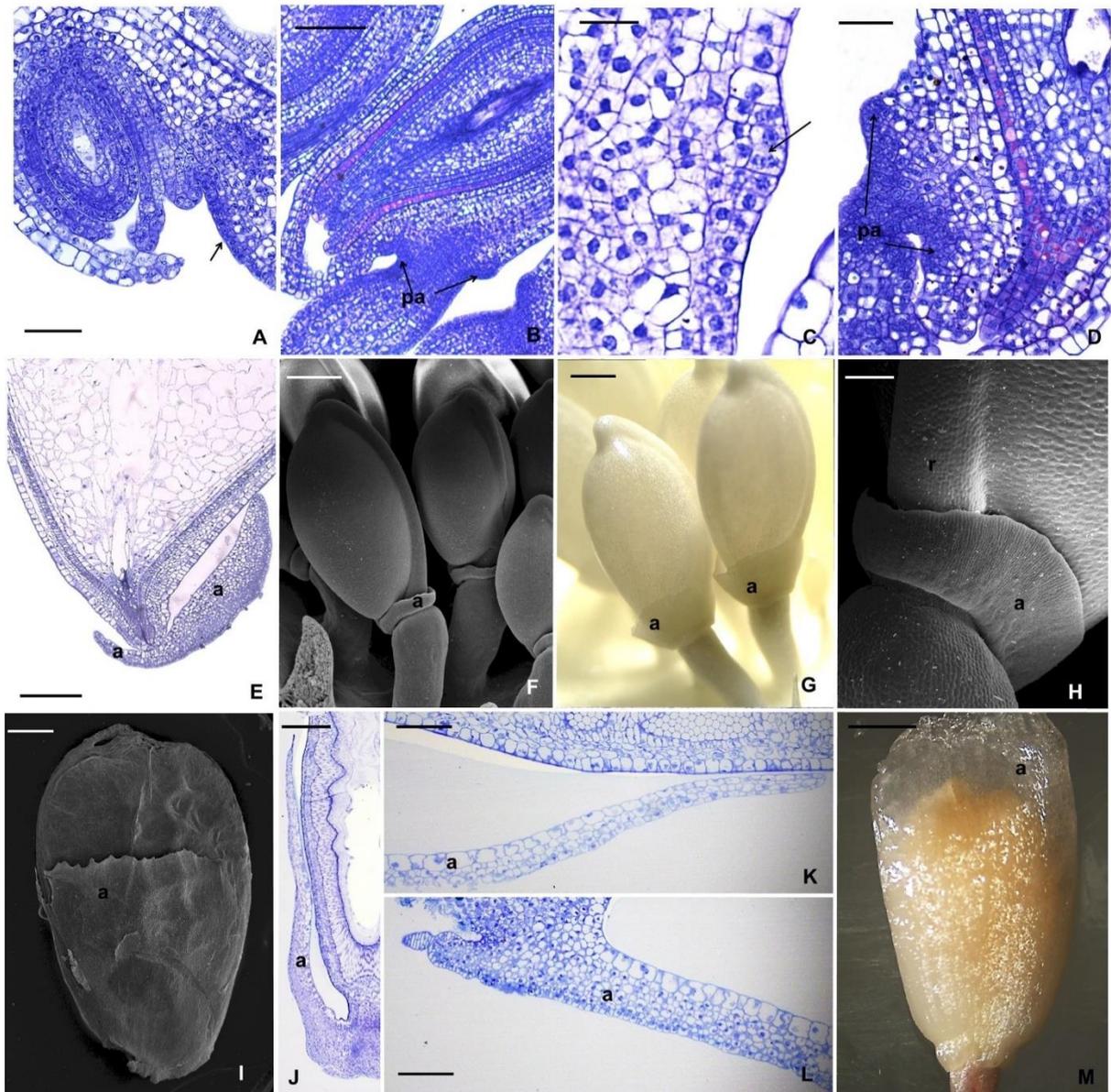


Figura 6: Desenvolvimento do arilo em espécies de *Passiflora*. Uma semana antes da antese, a seta indica região do funículo que dará origem ao arilo (A). Secção longitudinal do óvulo mostrando as primeiras divisões que dão início ao desenvolvimento do arilo ao final da megagametogênese (B). Detalhe das primeiras divisões celulares na região do primórdio do arilo (C). Primórdio do arilo na antese (D). Segunda fase de desenvolvimento após a fertilização em óvulos sete dias após a polinização vista em secção longitudinal (E) e por microscopia eletrônica de varredura (F). Sementes em desenvolvimento onde se observa o arilo se desenvolvendo e cobrindo a região da micrópila, 10 dias após a polinização (G, H). Arilo encobrendo 2/3 da semente aos 14 dias após a polinização, observada por microscopia eletrônica de varredura (I) e de luz (J). Detalhe do arilo menos espesso no ápice (K) e mais espesso na base (L). Arilo cobrindo totalmente a semente aos 35 dias após a polinização (M). a = arilo; pa = primórdio de arilo; r = rafe. Barras = 50µm (A, D); 100µm (B); 25µm (C); 200µm (E, K, L); 0,5mm (F, J); 1mm (G, I); 150µm (H); 2mm (M).

Existem diversos tipos de apêndices associados aos óvulos e sementes, tais como alas, carúnculas, pelos, elaiossomos, espinhos, estrofiolos, arilos (KOZLOWSKI; GUNN, 1972; PIJL, 1972), os quais geralmente auxiliam na dispersão das sementes sendo relacionados aos vários tipos de síndromes de dispersão (DICKIE; STUPPY, 2013). Muitas vezes essas estruturas são carnosas e comestíveis, como é o caso dos ariloides, e por isso atraem animais sendo associadas à dispersão por zoocoria. (DICKIE; STUPPY, 2013).

Encontra-se em muitos casos na literatura o termo arilo definindo qualquer estrutura carnosa ou suculenta associada à semente, independentemente de qual parte do óvulo em desenvolvimento se deu sua origem, rafe, calaza, hilo, funículo ou micrópila, por exemplo (CORNER, 1976; DICKIE; STUPPY, 2013; EAMES, 1961). No entanto, alguns autores restringem essa denominação de acordo com a origem da estrutura, sendo o verdadeiro arilo, aquele originado a partir do funículo como um terceiro integumento (ENDRESS, 2011; ZHANG; ZHANG; STÜTZEL, 2011; MAHESHWARI, 1950). De acordo com Endress (2011), é incerto até que ponto a estrutura denominada como arilo e aquelas consideradas como um terceiro integumento são homólogos.

As gimnospermas, grupo que não possui ovários e conseqüentemente frutos, muitas vezes apresentam estruturas carnosas que ajudam na dispersão de suas sementes e de acordo com Lovisetto et al. (2012), o estudo dessas estruturas pode ajudar a rastrear a origem dos frutos carnosos ao longo da evolução das angiospermas. Genes da família MADS-box de mesmo tipo foram associados ao desenvolvimento de estruturas carnosas de origens anatômicas diferentes em duas espécies de gimnospermas (LOVISETTO et al., 2012), no entanto, genes específicos podem estar ligados à especificidade anatômica das regiões que originam essas estruturas (LOVISETTO et al., 2013).

Dessa forma, estudos ontogenéticos que distingam de quais células, tecidos e camadas se originam estes apêndices semelhantes ao arilo no que diz respeito tanto à sua localização no óvulo e semente, quanto à sua presença, ausência ou presença da forma reduzida, podem ser úteis para estudos filogenéticos e taxonômicos (SVOMA et al., 1997).

Baseado na revisão de Endress (2011), essas observações demonstram que a estrutura suculenta que envolve as sementes das espécies estudadas é um

verdadeiro arilo, pois se desenvolve a partir de células do funículo na região logo abaixo do tegumento externo e cujas células não apresentam nenhuma conexão física com células da micrópila ou rafe em nenhum momento do desenvolvimento.

Nesse contexto, para que fossem realizadas as coletas e capturas por microdissecção a laser, visando no futuro avaliar os genes que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do arilo, as observações realizadas em relação ao arilo de maracujá azedo e doce, permitiram que fossem distinguidas a região a partir da qual o arilo dessas espécies se desenvolve, bem como duas fases específicas do desenvolvimento, nas quais provavelmente ocorre expressão diferencial de genes que determinam a identidade do arilo.

5.3 Captura por microdissecção a laser

Os cortes histológicos obtidos para essa etapa do trabalho apresentaram tecidos com boa conservação, demonstrando a eficiência dos métodos de fixação e infiltração utilizados, permitindo distinguir e isolar os distintos tipos celulares de interesse. Células da região onde ocorre a diferenciação das células iniciais do arilo foram isoladas com sucesso para extração de RNA total (Figura 7).

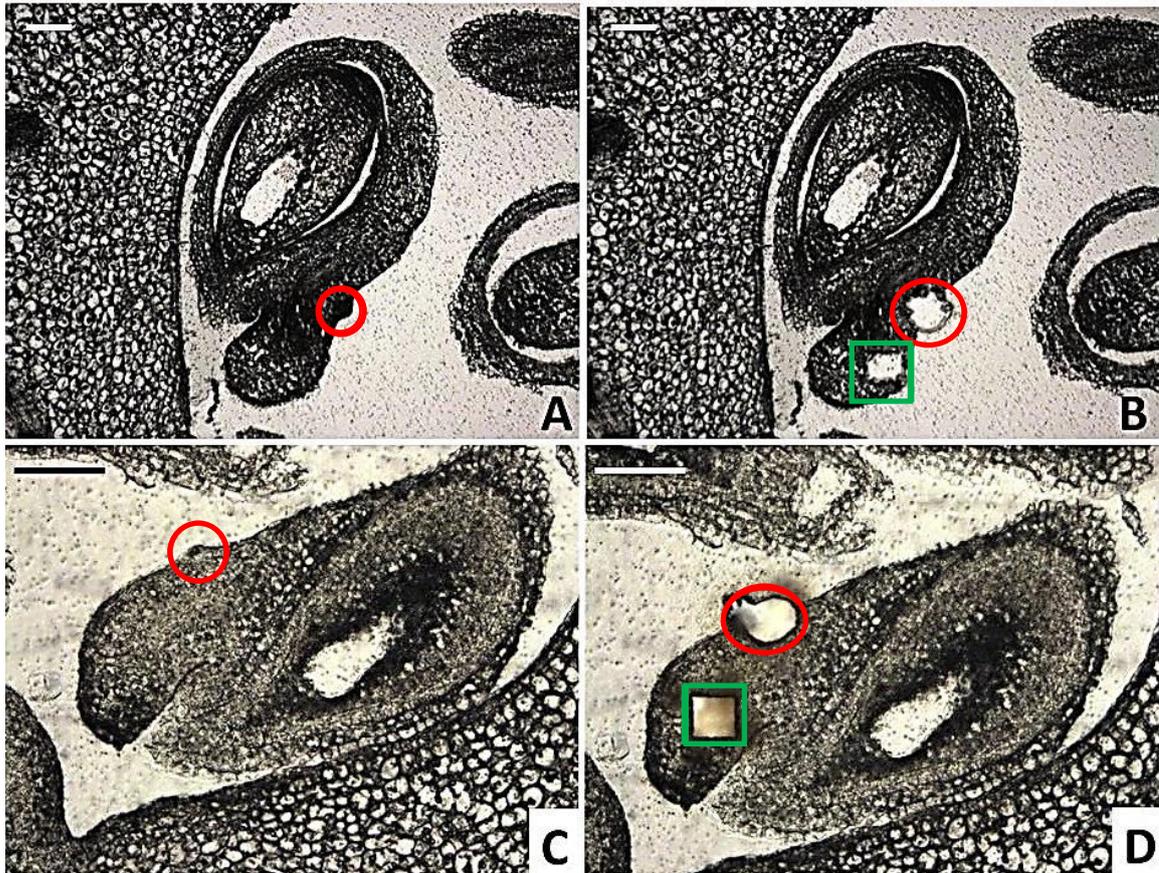


Figura 7: Isolamento de tecidos específicos do ovário de *Passiflora alata* por microdissecção a laser. Ovário antes da polinização: antes (A) e depois da microdissecção (B). Ovário depois da fertilização: antes (C) e depois da microdissecção (D). Regiões em vermelho indicam as células dos primórdios do arilo e regiões em verde indicam células do funículo microdissecadas como tecido controle. Barras= 100 μ m

Nas etapas subsequentes, pretende-se quantificar e verificar a qualidade do material genético isolado e extraído, utilizando o instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent), para posterior sequenciamento e análises de transcriptoma e comparação com genes depositados em bancos de dados públicos, visando obter resultados sobre a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do arilo.

Segundo Teixeira e Pereira (2010) as plantas são materiais adequados para o uso de microdissecção a laser por apresentarem organização celular regular e paredes celulares, permitindo a fácil identificação de diferentes tecidos.

De acordo com Day, Grossniklaus e Macknight (2005), a preparação das amostras é a chave para o sucesso da técnica de microdissecção, sendo as etapas de fixação e infiltração as mais críticas. Para a preparação de amostras para microdissecção a laser os fixadores mais utilizados são os aldeídos e os coagulantes (TEIXEIRA; PEREIRA, 2010), além da criofixação, sem o uso de fixadores. Nakazono et al. (2003), obtiveram morfologia mais conservada em cortes de

amostras fixadas com FAA (formalina, ácido acético e álcool), porém o rendimento dos ácidos nucleicos extraídos foi maior quando utilizado fixador de Farmer (etanol: ácido acético). Kerk et al. (2003) obtiveram quantidades de duas a três vezes maiores de RNA de células fixadas com o fixador de Farmer quando comparado ao FAA. Takahashi et al. (2010) mostram que diferentes composições de fixadores coagulantes (75% etanol/25% ácido acético; 60% etanol/40% ácido acético; 100% etanol; 100% acetona) são mais adequadas para a conservação da morfologia dos tecidos e integridade do RNA, dependendo do tipo de tecido e das espécies estudadas. Silveira (2009) e Artico et al. (no prelo), verificaram a eficácia da fixação com etanol: ácido acético na manutenção da integridade do tecido, assim como no presente trabalho, no isolamento de ovário de *Brachiaria brizantha* e regiões de botões florais de *Gossypium hirsutum*, respectivamente, com obtenção de RNA de qualidade e quantidade suficiente para análises subsequentes.

Em relação à infiltração Casson et al. (2005), afirma que para tecidos vegetais, cortes histológicos de melhor qualidade são obtidos utilizando infiltração em parafina. A criosecção de amostras congeladas, também já foi testada e é utilizada em muitos trabalhos com tecidos vegetais (ABBOTT, et al., 2010; CASSON et al., 2005; NAKAZONO et al., 2003; SCHAD et al., 2005), no entanto, apesar do método propiciar obtenção de melhor qualidade e rendimento dos ácidos nucleicos extraídos de tecidos animais (GILLESPIE, et al. 2002), pode não ser adequado em estudos de plantas por prejudicar a integridade citológica do material, devido à formação de cristais de água nos vacúolos pelo congelamento (DAY; GROSSNIKLAUS; MACKNIGHT, 2005; TAKAHASHI et al., 2010). O congelamento compromete a identificação das células de acordo com sua aparência histológica (KERK, 2003), dificuldade que foi superada com pré-tratamento das amostras com soluções de sacarose antes do congelamento (NAKAZONO, et al., 2003). Além da superioridade na identificação de tipos celulares oferecida pelo método, quantidades razoáveis de RNA podem ser obtidas a partir de amostras infiltradas em parafina (INADA; WILDERMUTH, 2005; KERK, et al., 2003). Kerk et al. (2003) demonstraram que a infiltração em parafina também favoreceu a preservação e armazenamento de blocos e lâminas a 4°C mantendo-os adequados para secções por algumas semanas após seu preparo.

O método de microdissecção a laser tem se mostrado eficaz em estudos moleculares do desenvolvimento, sendo uma ferramenta interessante na identificação de genes responsáveis pelo desenvolvimento embrionário e isolamento de células ou tecidos mais específicos como o arilo, no momento da diferenciação das células.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de embrião e arilo em *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* é simultâneo.

A primeira divisão do embrião nas duas espécies estudadas ocorre aproximadamente entre sete e dez dias após a polinização (DAP) e o embrião maduro é completamente formado aproximadamente aos 30 DAP.

O desenvolvimento do arilo ocorre em duas fases. O início se dá antes da antese na região do funículo e o desenvolvimento é retomado após a fertilização. Ao final de seu desenvolvimento, o arilo de *P. edulis* e *P. alata* cobre a semente madura por completo.

Essas observações permitiram que fossem definidos dois estádios específicos do desenvolvimento do arilo para a captura por microdissecção a laser visando o estudo das bases moleculares da diferenciação dessa estrutura de importância ecológica e econômica as espécies.

A caracterização anatômica do desenvolvimento do embrião e do arilo em ambas as espécies subsidia o estabelecimento de estádios específicos do desenvolvimento que podem servir como alvos para estudos moleculares em *Passiflora*.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, E.; HALL, D.; HAMBERGER, B.; BOHLMANN, J. Laser microdissection of conifer stem tissues: Isolation and analysis of high quality RNA, terpene synthase enzyme activity and terpenoid metabolites from resin ducts and cambial zone tissue of white spruce (*Picea glauca*). **BMC Plant Biology**, London, v. 10, n. 106, 2010

AGRIANUAL, Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. (2013) São Paulo, Argos Comunicação. p. 371-372.

AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, G. Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. **Hawaiian Agricultural Experiment Station**, Makiki, p. 144, 1959.

ALBA, R.; FEI, Z.; PAYTON, P.; LIU, Y.; MOORE, S. L.; DEBBIE, P. COHN, J.; D'ASCENZO, M.; GORDON, J. S.; ROSE, J.K. C.; MARTIN, G.; TANKSLEY, S. D.; BOUZAYEN, M.; JAHN, M. M.; GIOVANNONI, J. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 697–714, 2004.

ANGENENT, G. C.; FRANKEN, J.; BUSSCHER, M.; VAN DIJKEN, A.; VAN WENT, J. L.; DONS, H. J. M.; VAN TUNENA, A. J. A Novel Class of MADS Box Genes is Involved in Ovule Development in *Petunia*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1569-1582, 1995.

ARTICO, S.; RIBEIRO-ALVES, M.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MACEDO, L. L. P.; SILVEIRA, S. GROSSI-DE-SA, M. F.; MARTINELLI, A. P.; ALVES-FERREIRA, M. Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. **BMC Genomics**, London. No prelo 2014.

ASANO, T.; MASUMURA, T.; KUSANO, H.; KIKUCHI, S.; KURITA, A.; SHIMADA, H.; KADOWAKI, K.; Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. **The Plant Journal**, Oxford v. 32, p. 401–408, 2002.

BAKOS, F.; SZABÓ, L.; OLMEDILLA, A.; BARNABÁS, B. Histological comparison between wheat embryos developing in vitro from isolated zygotes and those developing in vivo. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 22, p. 15–25, 2009.

- BATYGINA, T. Sexual and asexual processes in reproductive systems of flowering plants. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Cracow, v. 47, n. 1, p. 51–60, 2005.
- BEECKMAN, T.; RYCKE, R.D. VIANE, R.; INZÉ, D. Histological Study of Seed Coat Development in *Arabidopsis thaliana* **The Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 113, p. 139-148, 2000.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.
- BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, T.N.V.; PASSOS, I.R.S.; MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of other colors) **Revista Brasileira de Fruticultura** Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 566-576, 2008.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed .Plenum Press, New York 1994, 45p.
- BHATNAGAR, S.P.; JOHRI, A.M. Development of Angiosperms seeds. In: KOZLOWSKI, T.T. **Seed Biology**, Wisconsin, Volume I. 1972 416p. (Physiological Ecology: A Series of Monographs, Texts, and Treatises) p. 77-149.
- BOSCÁ, S.; KNAUER, S.; LAUX, T. Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. **Frontiers in Plant Science**, Tucson, v. 2, n. 93, p. 6, 2011.
- BOWMAN, J. L.; FLOYD, S. K. Patterning and Polarity in Seed Plant Shoots. **The Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 67–88, 2008.
- BRAMBILLA, V.; KATER, M.; COLOMBO, L. Ovule integument identity determination in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 3, n. 4, p. 246-247, 2008.
- CAI, S.; LASHBROOK, C.C. Laser capture microdissection of plant cells from tape-transferred paraffin sections promotes recovery of structurally intact RNA for global gene profiling. **The Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 628-637, 2006.

CASSON, S.; SPENCER, M.; WALKER, K.; LINDSEY, K. Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 111-123. 2005.

CAZOTO, J.L. **Expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário zigótico e somático em *Passiflora edulis***. 2012 76f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CERVI, C.A. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, Washington, v. 45, n. 1, p. 1-92, 1997.

CERVI, C.A. O gênero *Passiflora* L. (Passifloracea) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**, Madrid, v. 16, p. 1-5, 2006.

CHAU, C.F.; HUANG, Y.L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output **Nutrition & Food Research, Weinheim**, v. 49, p. 786-790, 2005.

CHIMGE, N.O.; RUDDLE, F.; BAYARSAIHAN, D. Laser-assisted microdissection (LAM) in developmental biology. **Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution**, Austin, v. 308, n. 2, p. 113-118, 2007.

COOK, M. T. Notes on the Embryo-Sac of *Passiflora adenophylla*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 36, n. 5, p. 273-274, 1909.

CORNER, E.J.H. **The seeds of dycotyledons**. v.2 Cambridge: Cambridge University Press, v. 2, 1976. 552p.

CURTIS, W. *Passiflora alata*. **Botanical Magazine**, London, v. 2, p. 66. 1788.

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

DATHAN, A.S.R.; SINGH, D. Development and structure of seed in *Tacsonia* Juss. and *Passiflora* L. **Proceedings of the Indian Academy Of Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 5-18, 1972.

DAY, R.C.; GROSSNIKLAUS, U.; MACKNIGHT, R.C. Be more specific! Laser-assisted microdissection of plant cells. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, p. 397-406, 2005.

DE SMET, I.; LAU, S.; MAYER, U.; JURGENS, G. Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 959–970, 2010.

DICKIE, J. B.; STUPPY, W. H. Seed and Fruit Structure: significance in seed conservation operations. In: SMITH, R.D.; DICKIE, J.B.; LININGTON, S.H.; PRITCHARD, H.W. Seed conservation: turning science into practice. **Royal Botanic Gardens**, Kew, 1023p. 2003, p. 253-279.

DUMAS, C.; ROGOWSKY, P. Fertilization and early seed formation **The Comptes rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 715–725, 2008.

EAMES, A. J. **Morphology of the Angiosperms**. New York: McGraw-Hill Book Co. 1961, 477p.

ENDRESS, P.K. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. **Annals of Botany**, Oxford, v. 107, p. 1465–1489, 2011.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. Pergmon Press, London. 4th ed. 1990, 588p.

FENSTER, C.B.; ARMBRUSTER, W.S.; WILSON, P.; DUDASH, M.R.; THONSON, J.D. Pollination syndromes and floral specialization. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 35, p. 375-403, 2004.

FERRARI, R.A.; COLUSSI, F.; AYUB, R.A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - Aproveitamento das Sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n. 1, p. 101-102, 2004.

GEHRING, M.; CHOI, Y.; FISCHER, R. L. Imprinting and Seed Development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 203–213, 2004.

GILLESPIE, J.W.; BEST, C. J. M.; BICHSEL, V. E.; COLE, C. A.; GREENHUT, S.F.; HEWITT, S.M.; AHAM, M.; GATHRIGHT, Y. B.; MERINO, M. J.; STRAUSBERG, R. L.; EPSTEIN, J. I.; HAMILTON, S. R.; GANNOT, G.; BAIBAKOVA, G. V.; CALVERT, V. S.; FLAIG, M.J.; CHUAQUI, R. F.; HERRING, J. C.; PFEIFER, J.; PETRICOIN, E. F.; LINEHAN, W. M.; DURAY, P. H.; BOVA, G. S.; EMMERT-BUCK, M. R. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 160, n. 2, p. 449–457, 2002.

GOLDBERG, R.B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: Zygote to seed. **Science**, Washington, v. 266, p. 605–614, 1994.

GROSS-HARDT, R.; LENHARD, M.; LAUX, T. WUSCHEL signaling functions in inter-regional communication during Arabidopsis ovule development. **Genes & Development**, Woodbury NY, v. 16, p. 1129–1138, 2002.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREATTA, F.; LEVI, M.; In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species **Scientia Agricola, Piracicaba**, v. 61, p. 108–113, 2004.

HUANG, J.Y.; JIE, Z.J.; WANG, L.J.; YAN, X.H.; WEI, W.H. Analysis of the differential expression of the genes related to *Brassica napus* seed development. **Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 38, p. 1055–1061, 2011.

INADA, N.; WILDERMUTH, M.C. Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of Arabidopsis mature leaf. **Planta**, Berkeley, v. 221, p. 9–16, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA 2012. **Produção agrícola municipal**. Disponível em:

< http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default_pdf.shtm. Acesso em: 20 fev. 2014.

IHLASEH, S.M.; OLIVEIRA, M.L.C.S.; SILVA, G.N.; FRANCHI, C.A.S.; CAMARGO, J.L.V. Microdissecção e captura a laser na investigação do gene TP53 em tecidos incluídos em parafina **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 61-67. 2007.

JASSEM, M. Endosperm development in diploid, triploid and tetraploid seed of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Genetica Polon**, v. 14, p. 297–303, 1973.

JIN L.; LLOYD, R. V. In Situ Hybridization: Methods and Applications. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 11, p. 2–9, 1997.

JOFUKU, K. D.; BOER, B. G. W.; Montagu M. V.; OKAMURO, J. K. Control of Arabidopsis Flower and Seed Development by the Homeotic Gene *APETALA2*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1211-1225, 1994.

JONES, R. L. The structure of the lettuce endosperm. **Planta**, Berkeley, v. 121, p. 132–146, 1974.

JÜRGENS, G. Apical-basal pattern formation in Arabidopsis embryogenesis. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 20, p. 3609–16, 2001.

JÜRGENS, G.; MAYER, U. Arabidopsis. In **Embryos. Colour Atlas of Development** (ed. J. B. L. Bard) , 1994 pp. 7-21. London: Wolfe Publishing.

KHANG, I. H.; STEFFEN, J. G.; PORTEREIKO, M. F.; LLOYD, A.; Drews, G. N. The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, p. 635-647, 2008.

KAPIL, R.N., VASIL, I.K. Ovule. In: Maheshwari P. ed. Recent advances in the embryology of angiosperms. **International Society of Plant Morphologists**, Delhi, 41–67. 1963

KAPLAN, D. R.; COOKE, T. J. Fundamental Concepts in the Embryogenesis of Dicotyledons: A Morphological Interpretation of Embryo Mutants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1903-1919, 1997.

KAVATI, R.; PIZA JUNIOR, C.T. Cultura do maracujá-doce. **Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)** (Boletim Técnico, 244), Campinas, p. 10-12, 2002.

KERK, N. M.; TAUSTA, T. C. S. L.; SUSSEX, I. M.; NELSON, T. M. Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. **Plant Physiology**, Waterbury VT, v. 132, p. 27-35, 2003.

KLOOS, A; BOUMAN, F. Case studies in aril development *Passiflora suberosa* L. and *Turnera ulmifolia* L. **Beitrage zur Biologie der Pflanzen**, Berlin, v. 55, p. 49–66. 1980.

KOËHLER, C.; HENNING, L.; BOUVERET, R.; GHEYSELINCK, J.; GROSSNIKLAUS, U.; GRUISSEM, W. Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed Development. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 22, n. 18, p. 4804-4814, 2003.

KOZLOWSKYI, T.T.; GUNN, C. R. Importance and characteristics of seeds In: KOZLOWSKI, T.T. **Seed Biology**. V I. Wisconsin, 1972 416p. (Physiological Ecology: A Series of Monographs, Texts, and Treatises) p.1-18.

KUGLER, E.E.; KING, L.A. A brief history of the passionflower. In: ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora: passionflowers of the World**. Portland: Timberp. 2004, p. 15-26.

LACKIE, S.; YEUNG, E. C. Zygotic embryo development in *Daucus carota*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 990-998, 1996.

LAU, S; EHRISMANN, J.S.; SCHLERETH, A.; TAKADA, S.; MAYER, U.; JURGENS, G. Cell-cell communication in *Arabidopsis* early embryogenesis. **European Journal of Cell Biology**, Amsterdam, v. 89, p. 225–230, 2010.

LE, B.H.; WAGMAISTER, J.A.; KAWASHIMA, T.; BUI, A.Q.; HARADA, J.J.; GOLDBERG, R.B. Using Genomics to Study Legume Seed Development **Plant Physiology**, Waterbury VT, v. 144 n. 2, p. 562–574, 2007

LE, B.H.; CHENG, C.; BUI, A.Q.; WAGMAISTER, J.A.; HENRY, K.F.; PELLETIER, J.; KWONG, L.; BELMONTE, M.; KIRKBRIDE, R.; HORVATH, S.; DREWS, G.N.; ROBERT, L.; FISCHER, R.L.; OKAMURO, J.K.; HARADA J.J.; GOLDBERG, R.B. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 107, n. 18, p. 8063-8070, 2010

LEICA MICROSYSTEMS. **Laser Microdissection Systems Leica LMD6500 & LMD7000**. Disponível em: < <http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/life-science-research/laser-microdissection/details/product/leica-lmd7000/>>. Acesso em: 20 mai. 2012.

LERSTEN, N.R. **Flowering Plant Embryology**. 1st ed. Iwoa: Blackwell Publishing, 2004. 212p.

LAFON-PLACETTE, C.; KÖHLER, C. Embryo and endosperm, partners in seed development Current Opinion in **Plant Biology**, Stuttgart, v. 17, p. 64–69, 2014.

LESTER, R. N.; KANG, J. H. Embryo and Endosperm Function and Failure in *Solanum* Species and Hybrids **Annals of Botany**, Oxford UK, v. 82, p. 445-453, 1998.

LOPES, M. A.; LARKINS, B. A. Endosperm Origin, Development, and Function **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1383-1399, 1993.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum** - Nova Odessa, 2002, 512p.

LOTAN, T.; OHTO, M.; YEE, K.; WEST, M.; LO, R.; KWONG, R.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, R.; GOLDBERG, R.; HARADA, J. J. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**, Cambridge, v. 93, n. 7, p. 1195-1205, 1998.

LOVISETTO, A.; GUZZO, F.; TADIELLO, A.; TOFFALI, K.; FAVRETTO, A.; CASADORO, G. Molecular Analyses of MADS-Box Genes Trace Back to Gymnosperms the Invention of Fleshy Fruits **Molecular Biology and Evolution**, Oxford UK, v. 29, n. 1, p. 409–419, 2012.

LOVISETTO, A.; GUZZO, F.; BUSATTO, N.; CASADORO, G. Gymnosperm B-sister genes may be involved in ovule/seed development and, in some species, in the growth of fleshy fruit-like structures. **Annals of Botany**, Oxford UK, v. 112, p. 535–544, 2013.

MANICA, I. Maracujá do Brasil. In: MANICA, I.; JOSÉ, A.R.S.; BRUCKNER, C.H.; HOFFMANN, N. (Ed.). **Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco continentes, 2005. p.11-26.

MANSFIELD, S.G.; BRIARTY, L.G. Endosperm development In **Arabidopsis, an Atlas of Morphology and Development**. Edited by J Bowman. Berlin: Springer-Verlag; 1993 p.385-397.

MAHESHWARI, P. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms**. (New York: McGraw-Hill). 1950.

MAYER, U.; BUETTNER, G.; JÜRGENS, G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the gnom gene. **Development**, Cambridge, v. 117, p. 149–162, 1993.

MEINKE, D. W. Perspectives on Genetic Analysis of Plant Embryogenesis **The Plant Cell**, Baltimore. v. 3, p. 857-866, 1991.

MEINKE, D. W. Molecular Genetics of Plant Embryogenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto. v. 46, p. 369-394, 1995.

MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 275-278, 2003.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R. Melhoramento Genético do Maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Org.). **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, v. 1, p. 155-78, 2005.

MONDIN, C.A.; CERVI, A.C.; MOREIRA, G.R.P. Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil **A Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p. 3-27, 2011.

NAKAZONO, M.; QIU, F.; BORSUK, L.A.; SCHNABLE, P.S. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 583-596, 2003.

NELSON, T.; TAUSTA, S.L.; GANDOTRA, N.; LIU, T. Laser microdissection of plant tissue: What You See Is What You Get. **The Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 181-201, 2006.

OHTO M. A.; FLOYD, S. K.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. Effects of *APETALA2* on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 22, p. 277–289, 2009.

OHTSU, K.; TAKAHASHI, H.; SCHABLE, P.S.; NAKAZONO, M. Cell Type-Specific Gene Expression Profiling in Plants by Using a Combination of Laser Microdissection and High- Throughput Technologies. **Plant Cell and Physiology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 3-7. 2007.

PARK, S.; HARADA, J. J. Arabidopsis Embryogenesis. In: SUÁREZ, M.F.; BOZHKOVA, P. Plant Embryogenesis Humana Press, 2008, 184p. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 426 p. 3-16.

PEREIRA, K.J.C.; DIAS, D.C.F.S. Germinação e vigor de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) submetidas a diferentes métodos

de remoção da mucilagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 288-291, 2000.

PIJL, L. van der. **Principles of Dispersal in Higher Plants**, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag. 1972.

PINYOPICH, A.; DITTA, G.S.; SAVIDGE, B.; LILJEGREN, S.J.; BAUMANN, E.; WISMAN, E.; YANOFISKY, M.F. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. **Nature**, London, v. 424, p. 85-88, 2003.

RAJU, M.V.S. Embryology of the Passifloraceae. **Current Science**, Bangalore, v. 10, p. 288-289, 1952.

RAJU, M.V.S. Embryology of the Passifloraceae. I. Gametogenesis and seed development of *Passiflora calcarata* Mast. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 35, p. 126–138, 1956.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. E.; EICHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 872 p.

RODRIGUEZ-RIAÑO, T.; VALUTEÑA, F.J.; ORTEGA-OLIVENCIA, A. Megasporogenesis, Megagametogenesis and Ontogeny of the Aril in *Cytisus striatus* and *C. multiflorus* (Leguminosae: Papilionoideae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 777–791, 2006.

SAIEG, M.T.A. **Estudo comparativo da composição das partículas ambientais depositadas e retidas nos pulmões e linfonodos hilares pulmonares**. 2009-Tese (Doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SANTOS, C.E.M.; BRUCKNER, C.H.; CRUZ, C.D.; SIQUEIRA, D.L.; PIMENTEL, L.D. Passion fruit physical traits in function of the genotypes and fruit weight. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1102-1110, 2009.

SCHAD, M.; MUNGUR, R.; FIEHN, O.; KEHR, J. Metabolic profiling of laser microdissected vascular bundles of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Methods**, London, v. 1, n. 2, 2005.

SCHERES, B.; WOLKENFELT, H.; WILLESMSSEN, V.; TERLOUW, M.; LAWSON, E.; DEAN, C.; WEISBEEK, P. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. **Development**, v. 120, p. 2475–2487, 1994.

SCHNEITZ, K. The molecular and genetic control of ovule development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 13–17, 1999.

SCHRUFF, M.C.; SPIELMAN, M.; TIWARI, S.; ADAMS, S.; FENBY, N.; SCOTT, R.J. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. **Development**, Cambridge, v. 133 p. 251–261, 2006.

SILVEIRA, E.D. **Identificação de genes relacionados ao desenvolvimento reprodutivo apomítico e sexual em *Brachiaria brizantha***. 2009 -Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SILVÉRIO, A.; TORMES, S. B. F. A.; MARIATH, J. E. A. O processo da ginosporigênese e ginogametogênese de *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 15-22, 2009.

SIMS, J. *Passiflora edulis*. **The Botanical Magazine** - Londres, v. 45, 1818.

SINGH, D. The structure and development of ovule and seed of *Passiflora foetida*. **Agra University Journal of Research**, Agra, v. 11, p. 99–111, 1962.

SINGH, M. B.; BHALLA, P. L. Plant stem cells carve their own niche. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 5, p. 241-246, 2006.

SRIVASTAVA, L. M. **Plant Growth and Development - Hormones and Environment**. Elsevier Science, USA, 2002. 772p.

SVOMA, E. Seed development and function in *Artabotrys hexapetalus* (Annonaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 207, p. 205-223, 1997.

SVOMA, E. Seed morphology and anatomy in some (Annonaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 209, p. 177-204, 1998.

TAKAHASHI, H.; KAMAMURA, H.; SATO, Y.; SHIONO, K.; ABIKO, T.; TSUTSUMI, N.; NAGAMURA, Y.; NISHIZAWA, N. K.; NAKAZONO, M. A method for obtaining high quality RNA from paraffin sections of plant tissues by laser microdissection. **The Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 123, p. 807–813, 2010.

TEIXEIRA, R.T.; PEREIRA, H. Laser Microdissection applied to plants. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. **Science, Technology, Applications and Education**, 4th ed. Spain: Formatex, (Microscopy Series) v. 3, 2010, 617p. p. 986-992

THOMAS, T.L. Gene Expression during Plant Embryogenesis and Germination: An Overview. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1401-1410, 1993.

UEDA, M.; LAUX, T. The origin of the plant body axis. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 15, p. 578–584, 2012.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora: passionflowers of the world**. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 2004.

WAREING P. F.; PHILLIPS I. D. J. **The Control of Growth and Differentiation in Plants**. 2nd ed. *Pergamon Press*, Oxford, 1978, 308p.

WEST, M.A.L.; HARADA, J.J. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1361-1369, 1993.

WILLIAMS, E.G.; KNOX, R.B.; KAUL, V.; ROUSE, J.L. Post-pollination callose development in ovules of *Rhododendron* and *Ledum* (Ericaceae): Zygote special wall. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 69, p. 127–135, 1984.

WOLPERT, L.; JESSEL, T. M. LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; ROBERTSON, E.; SMITH, J. **Principles of development** 3rd ed, New York : Oxford University Press, 2007, 551p.

WOLTERS, H.; ANDERS, N; GELDNER, N.; GAVÍDIA, R.; JURGENS, G. Coordination of apical and basal embryo development revealed by tissue-specific GNOM functions. **Development**, Cambridge, v. 138, p. 117-126, 2011.

ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **The Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 86-91, 2010.

ZHANG, X; ZHANG, Z; STÜTZEL, T. Aril development in Celastraceae. **Feddes Repertorium**, Berlin, v. 122, n. 7–8, p. 445– 455, 2011.