

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**SYLVIA RODRIGUES DA SILVEIRA**

**Caracterização morfoanatômica e padrão de expressão  
de genes relacionados ao desenvolvimento do arilo em fruteiras de  
interesse comercial**

**Piracicaba**

**2019**



SYLVIA RODRIGUES DA SILVEIRA

Caracterização morfoanatômica e padrão de expressão  
de genes relacionados ao desenvolvimento do arilo em fruteiras de  
interesse comercial

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia  
Nuclear na Agricultura da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de Doutora em  
Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura  
e no Ambiente

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Pinheiro  
Martinelli

Piracicaba

2019

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)

**Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Silveira, Sylvia Rodrigues da

Caracterização morfoanatômica e padrão de expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do arilo em fruteiras de interesse comercial / Sylvia Rodrigues da Silveira; Adriana Pinheiro Martinelli - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

106 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

1. Arilo 2. Biologia molecular vegetal 3. Desenvolvimento vegetal 4. Evolução vegetal 5. Expressão gênica 6. Morfogênese vegetal 7. Ontogenia 8. Sarcotesta 9. Sementes I. Título

CDU 581.14 : 577.218

**Elaborada por:**

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (USP), ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e aos seus professores e funcionários pelo papel fundamental que desempenham em minha formação acadêmica.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PRPG/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (PPG/CENA-USP) pela oportunidade da realização do curso e do projeto de doutorado, pela infraestrutura e recursos disponíveis, em especial pelo apoio financeiro para a realização do estágio de curta duração na Ohio State University (OSU).

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana P. Martinelli pela oportunidade de realizar esse projeto sob sua orientação e pelo constante incentivo desde a minha iniciação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão do primeiro ano de bolsa de doutorado (CAPES-PROEX) e bolsa de doutorado sanduíche (CAPES-NUFFIC) \*.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação (CENA) em especial à Cleide Lopes, pela disponibilidade, atenção e eficiência.

À Suzi Manesco, Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos (DVPROD-CENA), pela convivência, atenção e suporte.

À Marília R. G. Henyei, Seção Técnica de Biblioteca (CENA), pelo auxílio na editoração e normalização técnica desta tese e do artigo resultante deste trabalho.

À Mônica L. Rossi, do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Estrutura Vegetal (LabDEV), pela aquisição das imagens de microscopia eletrônica de varredura e pelo apoio e incentivo durante a realização do projeto.

Ao Marcelo F. Correa, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV), pelo apoio nas atividades de biologia molecular, auxílio nos experimentos de RT-qPCR e companheirismo no dia a dia do laboratório.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA-ESALQ-USP) pela permissão da utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM-CENA-USP) pela permissão do uso de sua infraestrutura para a realização da microdissecção a laser e experimentos de RT-qPCR.

Ao Prof. Dr. Christopher Taylor (OARDC/OSU) pela oportunidade de realização de estágio em seu laboratório e à Dr<sup>a</sup> Gina Pengue (OARDC/OSU) pelo treinamento na técnica de microdissecção a laser em criossecções.

Aos Profs. Drs. Gerco Angenent e Richard Immink (Wageningen University & Research- WUR) pela oportunidade de realizar o estágio sanduíche junto ao grupo Plant Developmental Systems (PDS).

*To all the members of the PDS group for the receptivity and pleasant coexistence, for sharing scientific experience and for making me feel like I belonged, especially Sam for trusting me with an important part of his project and for making a great lab partner.*

Ao Prof. Dr. Marcelo Dornelas (Departamento de Biologia Vegetal- IB-UNICAMP) pelas colaborações com nosso grupo e constante disponibilidade e didática ao compartilhar seu conhecimento.

A todos os companheiros dos LBV e do LabDEV (CENA-USP), pela convivência, troca de experiências e momentos de confraternização, em especial à Andréa Koehler e à Tatiana S. Moraes pela parceria nos experimentos de hibridização *in situ*.

Aos amigos Carolina, Elcio, Leo, Raquel, Renata, Sandra e Tati pelo companheirismo e amizade que ultrapassaram o ambiente de trabalho.

Às minhas amigas de infância, Carol, Carlinha e Mari e à República Marikota por todo o carinho e por compreenderem minha ausência em tantos momentos.

Aos amigos Tânia, Parks, Siga, Xuleta, Brãk e Bida pela amizade e convívio diário e em especial por ajudarem a tornar os últimos meses mais leves.

Aos meus pais, Maghali e Ruy por terem me dado tanto raízes quanto asas.

---

\*O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - processos 140002/2016-2; 165388/2018-8; 168710/2018-8; 140095/2019-5 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (PROEX e CAPES-NUFFIC- 000355/2016-00).

“In nature we never see anything isolated, but everything in connection with something else which is before it, beside it, under it, and over it.”

**Johann Wolfgang von Goethe**

“Biology is the study of complicated things that have the appearance of having been designed with a purpose.”

**Richard Dawkins**



## RESUMO

SILVEIRA, S. R. **Caracterização morfoanatômica e padrão de expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do arilo em fruteiras de interesse comercial**. 2019. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Ao longo do curso da evolução estruturas carnosas diferenciadas nas sementes, comumente denominadas como “arilo”, são descritas em diversas espécies e podem ser consideradas tegumentos supranumerários. Além de funcionarem como atrativos para agentes dispersores e representarem uma característica relevante para classificação botânica, tais estruturas podem apresentar propriedades de valor agrônomo em algumas espécies. Botanicamente, a nomenclatura dessas estruturas é definida de acordo com as distintas origens anatômicas que apresentam e pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos no surgimento das mesmas uma vez que são ausentes nas espécies modelo mais estudadas até o momento. Maracujá (*Passiflora edulis*) e romã (*Punica granatum*) são conhecidas por seu valor medicinal e nutritivo. Ambas apresentam estruturas carnosas conspícuas, nas quais ocorre o acúmulo de suco, tornando-as importantes culturas no setor agroindustrial. O presente trabalho caracterizou o desenvolvimento morfoanatômico das estruturas carnosas presentes nas sementes de *P. edulis* e *P. granatum*, as quais possuem origens anatômicas e formação distintas, apesar de apresentarem a mesma função biológica. Adicionalmente, para o melhor entendimento do controle molecular da identidade e formação do arilo em *P. edulis*, analisou-se o padrão de expressão de genes candidatos, conhecidamente cruciais para o desenvolvimento do óvulo e de seus tegumentos em *Arabidopsis*, através das técnicas de hibridização *in situ* e RT-qPCR. A associação de estudos morfoanatômicos e estudos de moleculares é fundamental, pois gera informações temporais e espaciais sobre os padrões de expressão gênica, o que auxilia a elucidar as vias regulatórias que levam à diferenciação celular e morfogênese ao longo do desenvolvimento. A detecção dos ortólogos de *INO*, *PHB* e *WUS* ao longo do desenvolvimento dos óvulos e sementes de *P. edulis* indicou a conservação dos mecanismos moleculares descritos em espécies modelo. Mais importante, a presença de transcritos destes genes no arilo, indica que os ortólogos em *P. edulis* estão envolvidos na determinação de sua identidade e que seu desenvolvimento envolve mecanismos também presentes no desenvolvimento de tegumentos, dando indícios de homologia entre essas estruturas. Juntamente com as informações e recursos moleculares disponíveis para algumas espécies de *Passiflora*, os resultados obtidos neste trabalho,

evidenciam o potencial da utilização destas espécies como modelo para estudos do desenvolvimento do arilo. Adicionalmente, servem de subsídio para estudos futuros, incluindo, por exemplo, a transformação genética utilizando os genes analisados neste trabalho, entre outros, visando melhor caracterizar suas funções em *Passiflora* e contribuir com estudos filogenéticos e evolutivos dessas inovações morfológicas.

**Palavras-chave:** Estruturas carnosas. Hibridização *in situ*. *Passiflora edulis*. *Punica granatum*. Sarcotesta.

## ABSTRACT

SILVEIRA, S. R. **Morphoanatomical characterization and expression pattern of genes related to aril development in tropical fruits of commercial interest.** 2019. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

During the course of evolution fleshy structures differentiated from seeds and are commonly referred to as "aril". These are described in several species and can be considered as supernumerary teguments. In addition to its role in attracting seed dispersal agents and representing a relevant characteristic for botanical classification, such structures may present properties of agronomic value in some species. Botanically, the nomenclature of these structures is defined according to their anatomical origins and little is known about the molecular mechanisms involved in their initiation, since these are absent in the currently most studied model species. Passion fruit (*Passiflora edulis*) and pomegranate (*Punica granatum*) are known for their medicinal and nutritional values. Both species present conspicuous fleshy structures that are responsible for the production of juice, which makes them agriculturally important crops. The present work characterized the morphoanatomical development of the fleshy structures present in the seeds of *P. edulis* and *P. granatum*, which have different anatomical origins and formation, despite the same biological function. In addition, for the better understanding of the molecular control of aril identity and formation in *P. edulis* the expression patterns of candidate genes, known to be crucial for ovule and integument development in *Arabidopsis*, was analysed by *in situ* hybridization and RT-qPCR. The association of morphoanatomical and molecular studies is of great importance since it generates spatio-temporal information about gene expression patterns, helping to elucidate the regulatory pathways that lead to cell differentiation and morphogenesis throughout development. The detection of *INO*, *PHB* and *WUS* orthologs during ovule and seed development in *P. edulis* indicates the conservation of molecular mechanisms described in model species. More importantly, the presence of transcripts of these genes in arils indicates that the orthologs in *P. edulis* are involved in determining aril identity and that its development involves the same mechanisms present in the development of integuments, suggesting a homology between the structures. Along with the information and molecular resources available for some species of *Passiflora*, the results obtained with this work show the potential of these species as a model for studies of aril development. Additionally, these

support future studies, such as genetic transformation using the genes analysed in this work, aiming to better characterize their functions in *Passiflora* and contribute with phylogenetic and evolutionary studies of these morphological innovations.

**Keywords:** Fleshy structures. *In situ* hybridization. *Passiflora edulis*. *Punica granatum*. Sarcotesta.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
3.1 Caracterização e importância das espécies estudadas.....	17
3.1.1 O gênero <i>Punica</i> e a importância da romã.....	17
3.1.2 O gênero <i>Passiflora</i> e a importância do maracujá.....	20
3.2 Origem e importância de estruturas carnosas associadas às sementes .....	22
3.3 Controle molecular do desenvolvimento do óvulo .....	25
3.4 Caracterização do desenvolvimento vegetal.....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Material vegetal .....	33
4.2 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de estruturas carnosas .....	33
4.3 Identificação de genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento do arilo .....	35
4.3.1 Obtenção de RNA por captura de tecidos específicos por microdissecção a laser.....	35
4.3.2 Busca de genes candidatos na bibliografia e em banco de dados.....	37
4.4 Análises do padrão de expressão de genes candidatos .....	38
4.4.1 Desenho de primers .....	38
4.4.2 Isolamento de RNA e síntese de cDNA .....	39
4.4.3 Análise do padrão de expressão por RT-qPCR .....	40
4.4.4 Análises de padrão de expressão por hibridização <i>in situ</i> .....	41
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de estruturas carnosas .....	45
5.1.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento da sarcotesta em <i>Punica granatum</i> .....	45
5.1.2 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento do arilo em <i>Passiflora edulis</i> .....	48
5.2 Identificação de genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento do arilo .....	54
5.2.1 Obtenção de RNA por captura de tecidos específicos por microdissecção a laser.....	54
5.3 Análise do padrão de expressão dos genes selecionados.....	57
5.3.1 Padrão de expressão dos genes selecionados por RT-qPCR .....	58

5.3.2	Padrão de expressão dos genes selecionados por hibridização <i>in situ</i> .....	60
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
6.1	Características morfoanatômicas do desenvolvimento do arilo em <i>Passiflora edulis</i> e sarcotesta em <i>Punica granatum</i> .....	69
6.2	Padrão de expressão de <i>WUS</i> , <i>PHB</i> e <i>INO</i> durante o desenvolvimento do arilo em <i>Passiflora edulis</i> .....	72
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>95</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>
	Anexo A - Outras atividades realizadas durante o período do doutorado .....	105
	A.1 - Estágios em Universidades do exterior.....	105
	Anexo B - Artigos publicados durante o doutorado .....	106
	B.1 - Artigo resultante de parte da presente tese de doutorado e apresentado no exame de qualificação .....	106
	B.2 - Artigos resultantes de participação em colaboração durante o estágio “sanduíche” ....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A grande diversidade morfológica encontrada entre as espécies vegetais é resultado da expressão diferencial de genes que controlam o desenvolvimento de novas características que garantiram adaptação e sucesso reprodutivo durante sua evolução. Um exemplo disso é a produção de estruturas diferenciadas associadas às sementes de diversas espécies, como por exemplo, as alas, plumas ou estruturas carnosas, as quais são relacionadas à proteção e à dispersão das sementes (HERRERA, 1989). As características do desenvolvimento dessas estruturas as tornam interessantes para a classificação taxonômica e filogenética de espécies, uma vez que sua presença, ausência, forma, origem e função variam entre táxons. Algumas espécies de gimnospermas e angiospermas desenvolveram o hábito de envolver suas sementes com tecidos carnosos, que de acordo com alguns autores, se desenvolvem como um terceiro tegumento (MAHESHWARI, 1950; KAPIL; VASIL, 1963). Em muitas espécies esses tecidos acumulam água, açúcar e substâncias que não só atraem animais dispersores, conferindo à estrutura um papel biológico semelhante ao de frutos (KOZLOWSKI; GUNN, 1972; HERRERA, 1989), como despertam o interesse comercial para consumo humano.

Na literatura existe muita controvérsia em relação à nomenclatura destas estruturas, sendo o termo arilo muitas vezes usado para designar qualquer parte carnosa da semente, no entanto, encontram-se outras denominações botânicas, tais como carúncula, estrofíolo, sarcotesta, arilóide e arilo, designando as estruturas de acordo com sua origem anatômica (CORNER, 1956; VAN DER PIJL, 1972).

A divergência encontrada na nomenclatura se deve à carência de estudos descrevendo a ontogenia e os aspectos morfológicos da formação do arilo durante o desenvolvimento do óvulo e da semente. São ausentes também estudos sobre as bases moleculares envolvidas na formação do arilo e considerando que a diferenciação de tecidos vegetais é controlada pela expressão diferencial de genes específicos, tais estudos são necessários para a compreensão dos processos de desenvolvimento e se os mesmos são conservados nos diferentes tipos de estrutura, havendo ou não homologia entre arilo e as demais estruturas e entre arilo e os tegumentos do óvulo, por exemplo. As espécies vegetais utilizadas atualmente como modelo do desenvolvimento em plantas, como *Arabidopsis thaliana*, não apresentam arilo, o que dificulta o estudo de seu desenvolvimento e evidencia a necessidade de novas espécies como modelo para estudo do desenvolvimento de estruturas específicas.

Os gêneros *Punica* e *Passiflora* contêm excelentes representantes de espécies com estruturas carnosas bem conspícuas, as quais, na literatura, são comumente chamadas de arilo apesar de terem origens distintas, e nas quais ocorrem produção e acúmulo de água e outras substâncias como óleos, compostos ricos em sabor, aroma, nutrientes e açúcares. Tais características conferem a algumas espécies destes gêneros importância no setor agroindustrial com potencial para diversos usos como o consumo in natura, produção de suco e fármacos, como é o caso de *Passiflora edulis* (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004) e *Punica granatum* (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2013). O desenvolvimento do arilo é condição imprescindível para a produção de suco nas duas espécies citadas, o que demonstra a importância do conhecimento sobre a origem e desenvolvimento do arilo e mais especificamente o potencial dessas espécies como objeto de estudo. Os estudos dos mecanismos responsáveis pela formação de padrão e diferenciação celular que levam à formação das estruturas vegetais têm evoluído e abrangido diversas espécies, principalmente devido à disponibilidade de sequências genômicas e transcritômicas inteiras ou parciais em bancos de dados, o que é o caso de *P. granatum* (CHEN et al., 2017; YUAN et al., 2018) e *P. edulis* (CUTRI; DORNELAS, 2012; SANTOS et al., 2014; CAUZ-SANTOS et al., 2017).

Adicionalmente, os processos que levam à formação do óvulo, semente e seus tegumentos são amplamente estudados e estão bem caracterizados em diversas espécies, sendo descritos tanto os aspectos morfológicos, quanto mecanismos moleculares, os quais podem ser utilizados como pistas iniciais para investigar o desenvolvimento do arilo, uma vez que o mesmo é um apêndice relacionado morfoanatomicamente a óvulos e sementes.

Estudos dos aspectos morfoanatômicos da origem de novas estruturas e órgãos associados às ferramentas moleculares disponíveis e análises de genes envolvidos nas vias regulatórias que levam à diferenciação celular e morfogênese vegetal, permitem uma caracterização mais detalhada da ontogênese de inovações morfológicas. Estudos mais aprofundados com detalhada caracterização do desenvolvimento do arilo no que se refere às suas características anatômicas e moleculares podem gerar informações temporais e espaciais dos padrões de expressão gênica durante o processo e, conseqüentemente, contribuir não só com estudos filogenéticos e evolutivos, mas também com a elaboração de estratégias biotecnológicas visando primeiramente à melhor compreensão da função de genes no desenvolvimento reprodutivo das espécies estudadas e, posteriormente, espera-se contribuir com o conhecimento gerado, para o aumento de produtividade e qualidade dos produtos agrícolas gerados por elas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar o desenvolvimento de estruturas carnosas associadas às sementes de duas fruteiras de interesse comercial, com ênfase nos aspectos morfoanatômicos, e moleculares, identificando fatores de transcrição potencialmente envolvidos neste processo e analisando seus padrões de expressão.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento das estruturas carnosas associadas às sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) e em romã (*Punica granatum*);
- Identificação de fatores de transcrição potencialmente envolvidos no desenvolvimento do arilo em *P. edulis*;
- Análise do padrão de expressão de alguns fatores de transcrição eleitos através de hibridização *in situ* e RT-qPCR.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Caracterização e importância das espécies estudadas

##### 3.1.1 O gênero *Punica* e a importância da romã

O gênero *Punica*, anteriormente classificado como único gênero pertencente à família Punicaceae, após estudos filogenéticos realizados através de caracterização morfológica e da análise de genes cloroplastidiais (GRAHAM et al., 2005), é considerado pertencente à família Lythraceae e compreende duas espécies, *Punica protopunica* e *Punica granatum* (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2013), a romã. De acordo com Melgarejo e Martínez (1992), pode-se encontrar na literatura uma terceira espécie, *Punica nana*, que é considerada por alguns autores como uma variedade da romã, *P. granatum* var. *nana*, planta anã e de uso ornamental.

A romã teve sua origem na região central da Ásia (VERMA; MOHANTY; LAL, 2010) se espalhando para outras regiões geográficas, como o Mediterrâneo, Índia e China (MELGAREJO; MARTÍNEZ, 1992). Devido ao seu potencial adaptativo a diferentes condições de solo e climáticas, atualmente, pomares de romã têm sido cultivados principalmente em países da bacia do Mediterrâneo, mas também em outras regiões de clima tropical e subtropical, como Ásia, Estados Unidos, particularmente na Califórnia, Chile, África do Sul, Austrália, Argentina e Brasil (MARS, 2000; JBIR, et al., 2008; HOLLAND; HATIB; BAR-YA'AKOV, 2009; VERMA; MOHANTY; LAL, 2010).

Os frutos de *P. granatum* são carnosos, indeiscentes, do tipo baga (WATSON; DALLWITZ, 1992) apresentam formato globoso acompanhado de cálice rígido que persiste no fruto maduro (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2013) preenchidos por sementes originadas dos numerosos óvulos anátropos (WATSON; DALLWITZ, 1992). As sementes são angulares (HOLLAND; HATIB; BAR-YA'AKOV, 2009), sendo cada uma envolta por uma camada suculenta e comestível desenvolvida a partir de células epidérmicas da testa que se alongam radialmente (FAHN; WERKER, 1972).

Segundo Seeram, Schulman e Heber (2006) são cultivados aproximadamente 100 mil hectares de romã em todo mundo, com produção anual de 800 mil toneladas, sendo a Espanha o maior produtor mundial com produção superior a 36 mil toneladas no ano de 2012

(ESPANHA, 2013). No Brasil a produção desta fruta é ainda incipiente e seu cultivo tem sido introduzido em regiões do semiárido (EMBRAPA, 2011). Há poucos dados sobre a produção nacional de romã, porém informações do censo agropecuário demonstram que a produção quase triplicou em 10 anos, sendo que em 2006 foram produzidas 129 toneladas (IBGE, 2012) subindo para mais de 370 toneladas em 2017 (IBGE, 2017); De acordo com dados do CEGAESP a comercialização do fruto, somente no estado de São Paulo, aumentou de 232 toneladas em 2002 para 618 toneladas em 2017, incluindo frutos produzidos no Brasil e importados principalmente da Espanha e Estados Unidos (CEAGESP, 2010; 2017).

A romã é conhecida desde a antiguidade (MELGAREJO; MARTÍNEZ, 1992) e foi uma das primeiras espécies fruteiras a ser domesticada (VERMA; MOHANTY; LAL, 2010). Sua utilização está incorporada na história da humanidade e é encontrada em várias culturas tanto como alimento quanto como planta medicinal (HOLLAND; HATIB; BAR-YA'AKOV, 2009). Diversos autores relatam a importância do suco e outros produtos derivados da romã, com usos no tratamento de diversas condições relacionadas à saúde humana (SEERAM, SCHULMAN; HEBER, 2006; LANSKY; NEWMAN, 2007; BASU; PENUGONDA, 2008; HOLLAND; HATIB; BAR-YA'AKOV, 2009; PATRAS et al., 2010). O fruto é rico em compostos fenólicos, principalmente antocianinas, um importante antioxidante. O óleo extraído da semente também tem atraído a atenção de pesquisadores, por apresentar potenciais efeitos biológicos benéficos na prevenção de tumores (CALIGIANI et al., 2010). Vroegrijk et al. (2011), destacam os efeitos desse óleo, rico em ácido púnico, em fatores relacionados à obesidade e resistência à insulina. Os potenciais anti-inflamatório, anti-infeccioso e antioxidativo de seus extratos foram revisados por Ismail, Sestili e Akhtar (2012), apresentando as diversas propriedades farmacológicas de seus componentes, punicalagina e ácido elágico, contra alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e o possível efeito na prevenção contra gripes.

A romã é uma espécie muito estudada em relação às suas propriedades nutritivas e medicinais, porém poucos estudos buscam caracterizar o desenvolvimento de romã de forma completa, com análises morfoanatômicas e moleculares de fruto e semente. A maioria dos estudos do desenvolvimento morfoanatômico de romã focam em flores e óvulos, por exemplo, Wetzstein et al. (2011a), caracterizaram os tipos florais observados em romã, incluindo o desenvolvimento do óvulo anteriormente à polinização. Também já foi demonstrada a importância da posição das flores nos ramos e sua influência no desenvolvimento do óvulo (WETZSTEIN et al., 2013). As informações disponíveis a respeito de frutos e sementes focam em aspectos hortícolas, principalmente características

morfológicas macroscópicas, como por exemplo, tamanho, peso e cor. Mais especificamente em relação a sementes e arilo são descritas características dos frutos, incluindo aspectos que correlacionam o tamanho e volume do fruto e do arilo (WETZSTEIN et al., 2011b), características morfológicas e propriedades químicas e organolépticas das sementes incluindo a parte comestível (MARTÍNEZ, et al., 2006) ou padrão de lignificação da testa das sementes (SARIKHANI; VALIPOU; CHEHREGANI, 2015). No entanto, os estudos se concentram em sementes maduras havendo carência de informações completas sobre desenvolvimento da semente e do arilo.

Mais recentemente estudos envolvendo o sequenciamento do genoma e transcrito de romã (*P. granatum*, associado à análise de genes diferencialmente expressos, permitiu que fossem identificados genes candidatos, potencialmente envolvidos em diversas vias regulatórias, como a biossíntese da punicalagina terpeno e antocianina, no desenvolvimento dos tegumentos (QIN et al., 2017; YUAN et al., 2018), no metabolismo de celulose, hemicelulose e lignina (QIN et al., 2017; XUE et al., 2017; YUAN et al., 2018), bem como genes envolvidos no desenvolvimento de ovários e óvulos (CHEN et al., 2017).

Protocolos de transformação genética e regeneração e cultivo *in vitro* representam, também, recursos úteis para o estudo do desenvolvimento. A micropropagação de variedades de romã, utilizando diferentes tipos de explantes e a partir de regeneração direta e indireta, tem sido relatada na última década (SINGH et al., 2010; NAIK; CHAND, 2010; CHAUHAN; KANWAR, 2012; TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2013). No entanto, a aplicação destes protocolos na produção de variedades transgênicas, ainda é ineficiente. Os poucos protocolos de transformação genética de romã publicados relatam baixa eficiência de transformação e ocorrência de escapes (KANWAR; DEEPIKA; CHAUHAN, 2008; TERAOKAMI et al., 2007; VALIZADEH KAJI; ERSHADI; TOHIDFAR, 2014). Mais recentemente, Valizadeh Kaji e Abbasifa (2017) relataram sucesso na obtenção de plantas transgênicas de um cultivar de *P. granatum* a partir da transformação, via *Agrobacterium tumefaciens*, de calos oriundos de segmentos internodais, indicando avanço no uso de transformação genética no melhoramento genético de romã.

Em vista da importância ecológica e econômica da porção comestível das sementes de romã e da recente disponibilidade de dados moleculares da espécie, um aprofundamento no conhecimento sobre o desenvolvimento dos frutos, desde a polinização e mais especificamente o desenvolvimento da semente e sua estrutura comestível, são de fundamental importância tanto para estudos taxonômicos quanto para a definição de estratégias para o aumento da produção do suco.

### 3.1.2 O gênero *Passiflora* e a importância do maracujá

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; KING, 2004; ULMER; MACDOUGAL, 2004) e aproximadamente 140 ocorrem no Brasil (CERVI, 2006). *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.

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. As sementes são mais ou menos comprimidas, alveoladas, faveoladas, reticuladas ou sulcadas transversalmente e envolvidas por um arilo mucilaginoso (CERVI, 1997). A propagação de Passifloraceae é realizada principalmente por meio de sementes (PEREIRA; DIAS, 2000) e o arilo que as circunda funciona como recompensa para seus agentes dispersores (ULMER; MACDOUGAL, 2004), estando diretamente relacionado ao sucesso reprodutivo dessas espécies (FENSTER 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, produzindo atualmente mais de 550 mil toneladas, o que representa 70% da produção mundial (IBGE, 2017). De acordo com o CEAGESP, em 2017 foram comercializadas 55 mil toneladas só no estado de São Paulo (CEAGESP, 2017).

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 utilizados comercialmente. Os frutos do maracujá azedo podem ser consumidos ao natural ou industrializados. Seu suco destaca-se entre os produzidos a partir de frutas tropicais, é rico em vitaminas, cálcio e fósforo (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). O suco de maracujá tem grande aceitação entre os consumidores, representando uma boa porcentagem dos sucos exportados (IBGE, 2017), utilizado tanto para o consumo de mesa e culinária, como na indústria, para produção de polpa e suco concentrado. O suco, extraído do fruto, tem origem no arilo que envolve a semente, desta forma a eficiência na produção de suco está relacionada à produção de sementes.

A literatura mostra que 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 como um todo (SANTOS et al., 2009), o que sugere uma diferença de tamanho de arilo, que seria inversamente proporcional à quantidade de sementes.

O arilo se mostra uma estrutura de interesse particular quando se trata do maracujá, uma vez que, além de apresentar importância ecológica, na dispersão de frutos e agrônômica na produção de suco, mostra-se também como uma estrutura de destaque em passifloráceas, sendo o maracujá frequentemente citado na literatura como o exemplo de espécie cuja semente apresenta um arilo verdadeiro (CORNER, 1976; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006; BEWLEY; BLACK; HALMER, 2006). Deste modo, espécies de *Passiflora* se tornam interessantes objetos para o estudo do desenvolvimento do arilo, associando os aspectos morfoanatômicos e moleculares.

Apesar de nenhuma espécie de *Passiflora* ter seu genoma completamente sequenciado e disponibilizado, muitas informações sobre o gênero, em nível molecular, estão disponíveis em bibliotecas de dados genômicos e transcritômicos específicos, como o banco de dados de sequências expressas (ESTs) de bibliotecas obtidas a partir de botões florais de *P. edulis* e *P. suberosa* (CUTRI; DORNELAS, 2012); uma biblioteca de cromossomo artificial de bactéria (BAC) para *P. edulis* (SANTOS et al., 2014), que foi posteriormente comparada a genomas de referência, de espécies modelo, para a seleção de clones para sequenciamento completo (MUNHOZ et al, 2018) e, mais recentemente, o genoma cloroplastidial completo de *P. edulis* (CAUZ-SANTOS et al., 2017). Além disso, estudos visando melhor compreensão de mecanismos de defesa e tolerância a estresses bióticos e abióticos, geraram informações que também podem ser úteis em estudos de desenvolvimento, como são os casos da biblioteca de cDNA enriquecida por transcritos diferencialmente expressos, gerada por hibridização subtrativa por supressão, durante a interação de *P. edulis* com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (MUNHOZ et al, 2015) e das bibliotecas geradas após o sequenciamento e montagem *de novo* do transcrito de duas variedades de *P. edulis*, uma tolerante e outra suscetível ao frio (LIU et al., 2017).

Outro recurso importante para o avanço nos estudos de desenvolvimento é a disponibilidade de protocolos de transformação genética (MANDERS et al., 1994; ALFENAS et al., 2005; TREVISAN et al., 2006; MONTEIRO-HARA et al., 2011; CORREA et al., 2015) e regeneração e organogênese *in vitro* de espécies de *Passiflora*, conforme revisado por Vieira e Carneiro (2004) e Otoni et al. (2013), em sua maioria advindos de estudos visando o melhoramento genético do maracujá.

Tais bibliotecas e metodologias são recursos importantes para estudos genômicos visando entender a função de genes em processos de diferenciação de caracteres morfológicos, como o arilo.

### **3.2 Origem e importância de estruturas carnosas associadas às sementes**

O surgimento e desenvolvimento de sementes e frutos representam dois eventos evolutivos muito significativos para o sucesso reprodutivo das plantas vasculares, sendo os frutos o principal meio pelo qual as angiospermas dispersam suas sementes no ambiente.

Os frutos são derivados do ovário e desenvolvidos a partir de modificações nos carpelos (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2007), podendo ser carnosos ou secos (ESAU, 1997). Os frutos carnosos geralmente são comestíveis e apresentam cores atrativas para animais frugívoros (LOVISETTO et al., 2012), assim auxiliando na dispersão das sementes. Algumas estruturas se desenvolvem associadas aos óvulos e às sementes, muitas vezes constituindo diásporos, unidades de dispersão das plantas, em sua maioria relacionadas com a respectiva síndrome de dispersão. Essas estruturas incluem alas, arilos, carúnculas, sarcotesta, espinhos, pelos e elaiossomos (KOZLOWSKI; GUNN, 1972; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Apesar da evidente relação entre tais estruturas e agentes dispersores, estudos evolutivos sugerem a hipótese de que esses tecidos surgiram primeiramente com função de defesa da semente e do embrião, independente de sua função na dispersão (MACK, 2000).

As gimnospermas, grupo que não produz flores, portanto não apresenta ovários que se modificam em frutos, produzem estruturas semelhantes a frutos a partir de diferentes regiões anatômicas (LOVISETTO et al., 2012), cujo tecido carnosos é funcionalmente equivalente aos frutos de angiospermas (HERRERA, 1989). Porém, o hábito de envolver sementes com tecidos carnosos não é restrito a gimnospermas (LOVISETTO et al., 2012). Os frutos carnosos de muitas angiospermas se originam não do ovário modificado e sim a partir dessas estruturas acessórias (VAN DER PIJL, 1972). Portanto, diferenças anatômicas entre os diásporos carnosos de angiospermas e gimnospermas são também encontradas entre as próprias angiospermas (HERRERA, 1989).

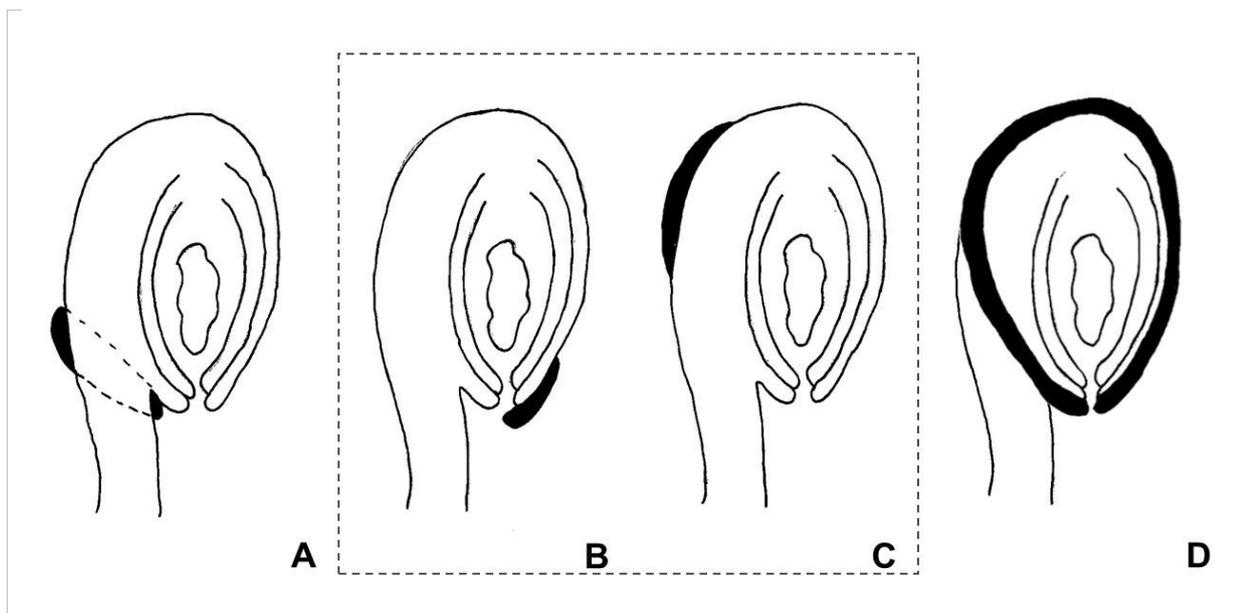
Diversos tipos de apêndices carnosos podem ser desenvolvidos nas sementes, como por exemplo, o arilo, ariloide, carúncula estrofiolo e sarcotesta, cujos primórdios podem estar presentes no óvulo mesmo antes da fertilização (APPEZZATO-DA-GLÓRIA;

CARMELLO-GUERREIRO, 2006). O termo elaiossomo, que por definição é um apêndice da semente, rico em lipídios e que contém células que armazenam óleo (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2007; DICKIE; STUPPY, 2013) é utilizado por alguns autores como termo genérico para designar qualquer estrutura carnosa e comestível de sementes dispersadas por formigas. (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006; DICKIE; STUPPY, 2013).

O termo arilo é controverso na literatura, sendo muitas vezes usado para designar qualquer parte carnosa da semente, até mesmo a sarcotesta. 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. Van der Pijl (1972) distinguiu terminologias de acordo com o local a partir do qual a estrutura se originou, sendo estroffolo quando originado da rafe; ariloide, se a origem ocorre ao redor do poro micropilar e envolve parcial ou totalmente a semente; carúncula quando pequena e formada próximo à micrópila a cima do tegumento externo; e arilo verdadeiro quando apêndice do funículo, carnoso, polposo e relacionado à zoocoria (**Figura 1**). Outro importante tipo de estrutura carnosa envolvendo sementes e geralmente associada à zoocoria é a sarcotesta, desenvolvido quando há falta de lignificação na testa ou na camada mais externa da mesma, formando um tecido polposo, suculento e comestível (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006; DICKIE; STUPPY, 2013) (**Figura 1**). O arilo também foi considerado por alguns autores como um terceiro tegumento (MAHESHWARI, 1950; KAPIL; VASIL, 1963). Para Endress (2011), o verdadeiro arilo é originado do funículo e pode ser descrito como um terceiro envelope da semente.

Tais envelopes adicionais, mencionados por Endress (2011), podem ou não ser considerados tegumentos e para melhor compreender se há relação entre estas estruturas deve-se levar em consideração os aspectos evolutivos do desenvolvimento dos tegumentos. A teoria aceita atualmente cita origens evolutivas diferentes para os tegumentos interno e externo encontrados em Angiospermas (ENDRESS, 2011), neste grupo o tegumento externo seria derivado da cúpula, estrutura côncava envolvendo os óvulos, presente em diversas gimnospermas (GASSER; BROADHVEST; HAUSER, 1998) enquanto que o tegumento interno é considerado homólogo ao único tegumento encontrado nas gimnospermas (REINHEIMER; KELLOGG, 2009). Os tegumentos do óvulo podem ou não dar origem aos apêndices que exercem função na dispersão de sementes, citados anteriormente.

**Figura 1:** Origem anatômica de diferentes apêndices carnosos em sementes. Áreas em preto representam as estruturas carnosas. **(A)** Arilo verdadeiro - se desenvolve a partir do funículo. **(B)** Carúncula - se desenvolve a partir da região micropilar do tegumento. **(C)** Estrofiolo - tem origem na rafe. **(D)** Sarcotesta - se desenvolve pela diferenciação da camada mais externa do tegumento externo. **(B, C)** estruturas consideradas arilóides



Fonte: SILVEIRA; DORNELAS; MARTINELLI, 2016

A diversidade observada em relação à origem e desenvolvimento dessas estruturas, funcionalmente semelhantes em diferentes linhagens vegetais, sugere que os vários apêndices de semente podem ter evoluído convergentemente (LENGYEL et al., 2010), fazendo-se necessários estudos ontogênicos e uma análise evolutiva do desenvolvimento dessas estruturas em diferentes espécies.

O desenvolvimento do arilo já foi descrito em algumas leguminosas como *Eriosema glaziovii* (GREAR; DENGLER, 1976), *Cytisus striatus*, and *C. multiflorus* (RODRIGUEZ-RIAÑO; VALUTEÑA; ORTEGA-OLIVENCIA, 2006). Em Passifloraceae, foi descrito por Raju, (1956), Singh (1962) e Dathan e Singh (1973) e posteriormente descrito em maiores detalhes em *Passiflora suberosa* e *Turnera ulmifolia* (KLOOS; BOUMAN, 1980). O desenvolvimento de uma estrutura “ariloide” também foi descrito em Celastraceae, no entanto, observou-se que a mesma não derivava do funículo e os autores a definiram como “carúncula” (ZHANG; ZHANG; STUTZEL, 2011). Tais estudos observam desenvolvimento do arilo durante o desenvolvimento do óvulo, contudo, a maioria dos trabalhos não deixa claro em que estágio do desenvolvimento do óvulo o arilo tem início. Muitas espécies

tropicais e subtropicais possuem arilos que podem acumular entre outras substâncias, óleos (e.g., *Ricinus communis*), compostos ricos em sabor e aroma (*Myristica fragrans*), nutrientes e açúcares (*Passiflora edulis* e *Punica granatum*), o que confere às mesmas características de interesse econômico.

Apesar da evidente importância filogenética, ecológica e econômica do arilo, estudos descrevendo a ontogenia e os aspectos morfológicos de sua formação, associados ao desenvolvimento do óvulo, são escassos, razão provável para a existência de controvérsia na nomenclatura dessas estruturas carnosas. Outro fator que influencia a escassez de informações a respeito do desenvolvimento do arilo, principalmente em nível molecular, é a ausência dessa estrutura em espécies comumente utilizadas como plantas-modelo.

### 3.3 Controle molecular do desenvolvimento do óvulo

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 a diferenciação se dá pela modificação da função celular (SRIVASTAVA, 2002), produzindo assim novos tecidos e órgãos. A formação de novos órgãos vegetais é garantida pela existência dos meristemas, grupos de células indiferenciadas que se mantêm constantemente em divisão celular, eventualmente, algumas dessas células podem se diferenciar e ser recrutadas para a formação dos primórdios dos novos órgãos (SABLOWSKI, 2011). 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), sendo responsáveis pelo surgimento de inovações morfológicas durante a evolução das espécies.

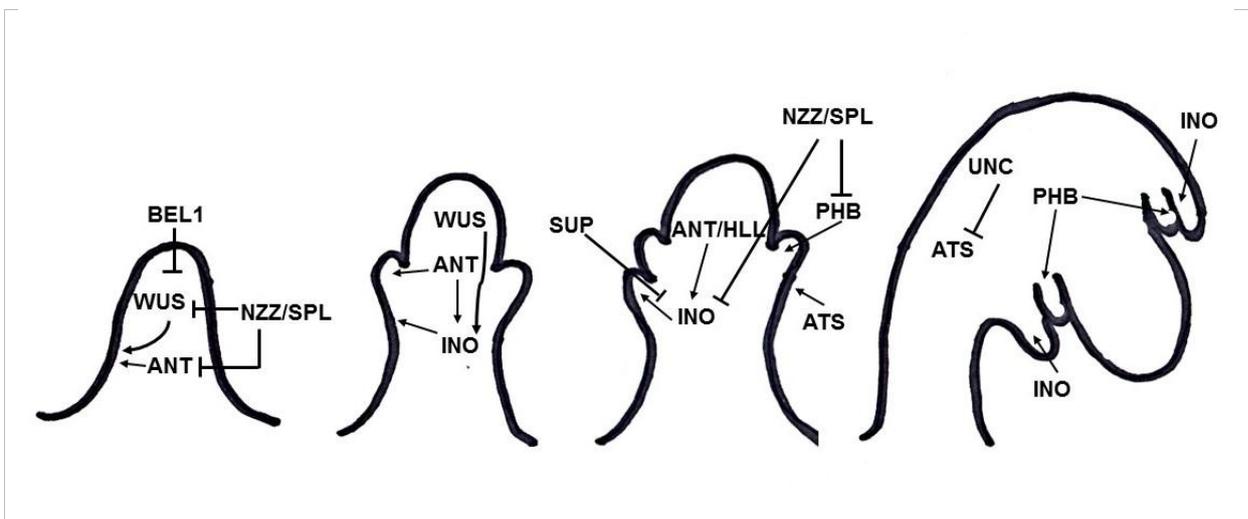
O arilo pode ser considerado uma inovação morfológica associada às sementes de algumas espécies, mas seus primórdios podem surgir em momento anterior, ainda durante o desenvolvimento do óvulo e seus tegumentos, portanto, para melhor compreensão de seu desenvolvimento, óvulos e tegumentos também devem ser estudados. Schneitz, Hülskamp e Pruitt (1995), dividiram o desenvolvimento do óvulo de *Arabidopsis* em quatro estádios, (I)

fase inicial, com o surgimento e alongamento do primórdio; (II) megaesporogênese, com a formação do megásporo e surgimento dos tegumentos; (III) megagametogênese, com a formação do saco embrionário, alongamento dos tegumentos e início da curvatura do óvulo; (IV) eventos após a fertilização. Basicamente os óvulos das angiospermas têm origem como uma pequena protrusão a partir de divisões subepidérmicas da placenta (GASSER; BROADHVEST; HAUSER, 1998). No primórdio são estabelecidas três regiões morfológicas distintas ao longo do eixo proximal-distal, funículo, calaza e nucelo. No nucelo, a partir de uma célula arquesporrial, se desenvolve a célula mãe do megásporo, que após divisões celulares dará origem ao saco embrionário (BOUMAN, 1984). Um ou dois tegumentos surgem a partir da calaza, como um anel ao redor da circunferência do primórdio do óvulo (GASSER; BROADHVEST; HAUSER, 1998) e seu início se dá por proliferação de células epidérmicas e subepidérmicas na região entre o funículo e o nucelo, a calaza. No caso de óvulos bitégmicos, o tegumento interno surge anteriormente ao externo (GASSER; BROADHVEST; HAUSER, 1998). Os tegumentos crescem ao redor do nucelo e após a fertilização dão origem a testa e tégmen, que revestem a semente (SCHNEITZ, 1999). O surgimento dos tegumentos, mais especificamente o crescimento assimétrico entre os tegumentos, marca o estabelecimento de um novo eixo de polaridade adaxial-abaxial (MCABEE, 2006; COLOMBO; BATTAGLIA; KATER, 2008).

Através de caracterização de mutantes, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do óvulo vêm sendo estudados há mais de duas décadas e foram identificados e descritos detalhadamente em espécies modelo como, por exemplo, *Arabidopsis* (GASSER; BROADHVEST; HAUSER, 1998; SCHNEITZ, 1999) e *Petunia* (ANGENENT; COLOMBO, 1996). Os resultados obtidos a partir de caracterização de mutantes, padrão de expressão gênica e análises transcritômicas, permitiram a identificação de redes regulatórias que controlam a iniciação e desenvolvimento dos tegumentos. Envolvidos nessas redes estão diversos fatores de transcrição, os quais interagem regulando a morfogênese do tegumento. Tais mecanismos moleculares foram extensivamente revisados (GROSSNIKLAUS; SCHNEITZ, 1998; GASSER; BROADHVEST; HAUSER, 1998; SCHNEITZ, 1999; SKINNER; HILL; GASSER, 2004; COLOMBO; BATTAGLIA; KATER, 2008; KELLEY; SKINNER; GASSER, 2009; CUCINOTTA; COLOMBO; ROIG-VILLANOVA, 2014) e serão resumidos aqui aqueles considerados os principais responsáveis pelo desenvolvimento dos tegumentos do óvulo (**Figura 2**).

*WUSCHEL* (*WUS*) pertence à família *WUS-RELATED* homeobox (*WOX*) e codifica um fator de transcrição (homeodomínio) expresso no primórdio de meristemas apicais caulinar e floral regulando os destinos celulares durante sua formação e a manutenção de sua integridade estrutural e funcional (LAUX et al., 1996; MAYER et al., 1998; HAECKER et al., 2003; VAN DER GRAAFF; LAUX; RENSING, 2009). Durante o desenvolvimento do óvulo a expressão de *WUS* foi observada no nucelo em primórdios de óvulos (GROSS-HARDT; LENHARD; LAUX, 2002). O fator de transcrição putativo *NOZZLE/SPOROCTELESS* (*NZZ*) é necessário para a manutenção da expressão de *WUS* (**Figura 2**; SIEBER et al., 2004). Outro fator que restringe a expressão de *WUS* no nucelo é a interação existente entre a proteína homeodomínio *BELL1*, com o dímero formado por *AGAMOUS-SEPPALLATA3* (*AG-SEP* confere identidade de tegumento), reprimindo *WUS* na região da calaza e ativando *INNER NO OUTER* (*INO*) para o desenvolvimento do tegumento externo (**Figura 2**; BRAMBILLA; KATER; COLOMBO, 2008). Por sua vez, *WUS* é suficiente para induzir a formação do tegumento a partir do tecido calazal adjacente, já que envia sinais a jusante, induzindo atividade meristemática mesmo em tecidos onde não é expresso (GROSS-HARDT; LENHARD; LAUX, 2002). Evidenciando essa ideia está o fato de que quando expresso ectopicamente na calaza, sob o controle do promotor de *AINTEGUMENTA* (*ANT*), *WUS* induz a formação de estruturas semelhantes a tegumentos no funículo (GROSS-HARDT; LENHARD; LAUX, 2002).

**Figura 2:** Resumo das principais interações gênicas durante o início do desenvolvimento dos tegumentos, nos estádios iniciais do desenvolvimento do óvulo



Fonte: Silveira, Dornelas e Martinelli (2016), adaptado de Skinner, Hill e Gasser (2004)

Além disso, *NZZ* ainda é conhecido por restringir a expressão, tanto do gene *PHABULOSA (PHB)*, na região abaxial da calaza, onde o tegumento interno se inicia (SIEBER et al., 2004), quanto *INO*, que é responsável pela diferenciação do tegumento externo (**Figura 2**; SCHNEITZ et al., 1997; VILLANUEVA et al., 1999). A relação antagônica entre *INO* e *PHB* é responsável pelo estabelecimento de um padrão abaxial/adaxial nos tegumentos do óvulo. *PHB*, assim como demais membros da família HD-ZIP Classe III, é expresso na região adaxial de órgãos laterais (MCCONNELL et al., 2001; EMERY et al., 2003). Em óvulos, estes genes estão envolvidos no desenvolvimento dos tegumentos, sendo expressos na região adaxial do tegumento interno (KELLEY; SKINNER; GASSER, 2009; SIEBER et al., 2004).

O gene *INO* é um dos seis membros da família YABBY, a qual codifica fatores de transcrição contendo dois domínios conservados (C2C2 zinc finger-like e helix-loop-helix) e expressos de maneira polar promovendo abaxialidade em órgãos laterais produzidos pelos meristemas caulinar e floral (SIEGFRIED et al., 1999; SIEBER et al., 2004; BOWMAN; SMYTH, 1999; BOWMAN, 2000). O único membro da família expresso em óvulos é *INO*, e sua expressão polar é necessária para o desenvolvimento do tegumento externo e responsável por seu desenvolvimento assimétrico (VILLANUEVA et al., 1999). O controle espacial da expressão de *INO* na região abaxial do tegumento externo é feito por *WUS* e *SUPERMAN (SUP)*, sendo que o último reprime sua expressão na região adaxial do tegumento, causando assim o crescimento assimétrico observado no tegumento externo (**Figura 2**; MEISTER et al., 2002). Outras relações antagonistas que controlam a polaridade do tegumento envolvem, direta ou indiretamente, *BEL1*, *ANT* e *HUELLENLOS (HLL)* regulando negativamente a expressão de *INO* em determinados tecidos (VILLANUEVA et al., 1999).

Um mutante que desperta interesse por apresentar uma estrutura considerada extranumerária é *unicorn (ucn)*. Tal mutação resulta no surgimento de uma protuberância no tegumento externo (SCHNEITZ, 1997). O gene *UNICORN (UCN)* codifica uma AGC VIII quinase, que reprime diretamente *ABERRANT TESTA SHAPE (ATS)*, um fator de transcrição da família *KANADI* (**Figura 2**; ENUGUTTI et al., 2012; ENUGUTTI; SCHNEITZ, 2013), sugerindo que a expressão ectópica de *ATS* pode representar outro mecanismo envolvido no surgimento e crescimento de tecidos e estruturas associados aos tegumentos.

Por estarem também presentes em gimnospermas exercendo funções análogas às de frutos, estruturas carnosas que envolvem sementes foram investigadas quanto ao envolvimento de genes MADS-box em seu desenvolvimento. Devido a sua importância na formação de estruturas reprodutivas, a expressão de genes MADS-box foi analisada em *Ginkgo biloba* e *Taxus baccata*, espécies de gimnospermas (LOVISETTO et al., 2012; 2013, 2015a), e em *Magnolia grandiflora*, uma angiosperma basal (LOVISETTO et al., 2015b). Os resultados mostraram que *AGAMOUS* (*AG*), *AGAMOUS-LIKE 6* (*AGL6*) e *TOMATO MADS 8-like* (*TM8-like*) estão envolvidos no desenvolvimento das estruturas carnosas tanto na sarcotesta de *Ginkgo* quanto no arilo de *Taxus* (LOVISETTO et al., 2012). Adicionalmente, Lovisetto et al. (2013) avaliaram o padrão de expressão de uma subfamília de MADS-box, os genes *B-sister*, considerados necessários para a correta formação de óvulos e sementes, nessas mesmas gimnospermas, observando diferenças dependentes da origem da estrutura carnosas, sendo menor a expressão no arilo de *Taxus*. Na sarcotesta em sementes de *Magnolia*, também foi detectada a expressão de *AG*, *AGL6*, *SEPALLATA* e *B-sister* (LOVISETTO et al., 2015b). Estes estudos analisaram sementes em estádios mais tardios do desenvolvimento, fases em que as estruturas carnosas já apresentam acúmulo de substâncias e passam por um processo semelhante ao amadurecimento que ocorre em frutos, sendo informações úteis para a compreensão de processos tardios no desenvolvimento do arilo.

O conjunto destas informações com o conhecimento das já mencionadas redes regulatórias para a iniciação e desenvolvimento dos tegumentos e o fato de serem mecanismos conservados entre diferentes taxa, possibilita identificar pistas iniciais para a melhor compreensão das bases moleculares do desenvolvimento do arilo.

### **3.4 Caracterização do desenvolvimento vegetal**

Há duas décadas a biologia do desenvolvimento vegetal tem utilizado abordagens moleculares a fim de identificar e caracterizar os mecanismos responsáveis pelos processos de formação de padrão e diferenciação celular que levam à formação das estruturas vegetais que compõe uma planta. Tais estudos evoluíram principalmente após o aumento da disponibilidade de sequências de genomas inteiros em bancos de dados e seguem progredindo com o surgimento de novas ferramentas e abordagens.

As abordagens tipicamente utilizadas para a identificação e caracterização de genes, envolviam coleções de mutantes em espécies-modelo, caracterização de proteínas, determinação de sequências de peptídeos e identificação das sequências de DNA correspondentes. Posteriormente passaram a englobar o estudo de etiquetas de sequências expressas (ESTs), microarranjo de DNA, clonagem de cDNA em larga escala, associados às tecnologias de bioinformática (ALBA et al., 2004; BOUCHEZ; HOFTE, 1998; WELLMER; RIECHMANN, 2005).

A caracterização molecular do desenvolvimento, além de ser ferramenta para estudos evolutivos também se tornou interessante para o melhoramento de plantas. Estudos associando o sequenciamento de RNA e a análise de expressão gênica estão sendo utilizados para identificar as bases transcricionais de características de interesse e os genes identificados podem ser alvos no melhoramento de culturas utilizando, por exemplo, a transformação genética, visando aumento de produção (MATHAN; BHATTACHARYA; RANJAN, 2016).

O surgimento do sequenciamento de nova geração propiciou uma visão compreensiva da estrutura transcricional, assim como do nível de expressão dos transcritos (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010; METZKER, 2010). Tecnologias como a do RNAseq, têm sido muito utilizadas no estudo de transcritomas tanto de espécies consideradas modelo, quanto de outras, incluindo aquelas cujos dados de sequenciamento genômico não estão disponíveis (BRAUTIGAM et al., 2011; SIMSEK; DONMEZ; KACAR, 2017; WU et al., 2010; ZHANG et al., 2015). Apesar de auxiliarem a desvendar muito sobre a função de genes e como seus produtos interagem durante o desenvolvimento, as análises de expressão gênica, em geral são realizadas em plantas e órgãos vegetais como um todo (SCHNABLE; HOCHHOLDINGER; NAKAZONO, 2004) sem muita especificidade espaço-temporal, tecidual ou celular das mudanças encontradas na expressão de determinados genes.

Visto que a determinação de destino celular e a formação de padrões durante o desenvolvimento vegetal são processos controlados por padrões de expressão gênica em regiões de células específicas e em determinadas fases do desenvolvimento, é necessário estudar esses fatores em nível tecido específico, em estádios de desenvolvimento distintos. A técnica de microdissecação a laser possibilita o isolamento de um grupo de células de um tecido ou de células individuais de regiões microscópicas específicas, através da identificação visual ao microscópio (DAY; GROSSNIKLAUS; MACKNIGHT, 2005; NELSON et al., 2006; HONAAS et al., 2013). Os tecidos microdissecados são coletados para posterior processamento para extração de DNA, RNA, proteínas ou metabólitos, para análises

moleculares (OHTSU et al., 2007), o que torna a associação da técnica ao RNAseq, por exemplo, muito promissora para análises transcritômicas de regiões específicas. A eficácia dessa técnica na construção de bibliotecas de cDNA de células específicas foi comprovada por Asano et al. (2002), isolando células do floema em folhas de arroz. Mais especificamente para o estudo do desenvolvimento de óvulos e sementes, o método foi utilizado na identificação de genes necessários para a formação da semente, isolando regiões específicas, como endosperma, suspensor e epiderme em sementes de soja (LE et al., 2007) e genes, ainda não caracterizados, diferencialmente expressos durante o desenvolvimento do óvulo, em arroz (KUBO, et al., 2013). No entanto, a preparação de lâminas histológicas para a captura a laser conta com etapas críticas para a preservação do RNA (DAY; GROSSNIKLAUS; MACKNIGHT, 2005), e a metodologia escolhida para cada uma das etapas deve levar em consideração um balanço entre a preservação morfoanatômica e a das moléculas de interesse (TEIXEIRA; PEREIRA, 2010).

Outra técnica que une análises histológicas à análise de expressão gênica, possibilitando a visualização espaço-temporal de padrões de expressão gênica, é a hibridização *in situ*. O método permite a detecção de mRNA alvo em secções histológicas de um tecido pela hibridização com uma sonda “*anti-sense*” marcada e obtida por transcrição *in vitro* do gene de interesse (JIN; LLOYD, 1997). Trabalhos visando o estudo do desenvolvimento de óvulos utilizaram a hibridização *in situ* em diversas investigações, como na expressão de genes homeóticos durante o desenvolvimento floral em *Arabidopsis* (JOFUKU et al., 1994) e petúnia (ANGENENT et al., 1995); na avaliação da expressão de genes nos tegumentos em óvulo unitégmicos e bitégmicos (LORA; HORMAZA; HERRERO, 2015); na investigação do padrão de expressão de genes ortólogos em óvulos de tomate e ervilha (GONÇALVES et al., 2015); elucidando aspectos da evolução de famílias gênicas em gimnospermas (FINET et al., 2016), entre outros. A hibridização *in situ* também pode ser utilizada para validar dados transcritômicos obtidos através de outras técnicas (KELLEY; SKINNER; GASSER, 2009).

A associação de estudos morfoanatômicos e estudos moleculares se mostra uma excelente ferramenta para o estudo dos fatores que levam à diferenciação celular e morfogênese ao longo do desenvolvimento. A análise temporal-espacial da expressão de genes durante o desenvolvimento do arilo deve fornecer informações sobre a conservação de mecanismos moleculares entre as angiospermas, bem como sobre a identidade da estrutura e sua relação com a formação e desenvolvimento dos tegumentos.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Amostras de botões florais, flores e frutos das espécies estudadas foram coletados em diferentes estádios do desenvolvimento, sendo os frutos e ovários medidos. Ovários foram isolados de botões e flores e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento foram dissecados e, conforme seu tamanho e rigidez de seus tecidos foram preparados podendo ser divididos ao meio, descascados, cortados, sementes isoladas e perfuradas, para facilitar a penetração das soluções utilizadas nas etapas seguintes do processamento para microscopia.

As amostras de romã foram obtidas a partir de pomares comerciais na Califórnia, através de colaboração científica já estabelecida com a Prof<sup>a</sup>. H. Y. Wetzstein, Universidade Purdue e foram processadas apenas para análise de microscopia de luz.

O material de maracujá foi coletado em plantas existentes nos canteiros do LBV-CENA e na Fazenda Areão, estação experimental da ESALQ-USP, sendo processado primeiramente para análises de microscopia de luz e eletrônica de varredura. Uma vez determinados os estádios de maior interesse, novas coletas foram realizadas nestes estádios específicos e as amostras preparadas para análises de hibridização *in situ*, captura de tecidos por microdissecção a laser e para extração de RNA e posterior síntese de cDNA para estudos de expressão gênica por RT-qPCR.

### 4.2 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de estruturas carnosas

As amostras foram imersas em solução fixadora contendo glutaraldeído (2% p/v), paraformaldeído (2% p/v) e 5 mM de cloreto de cálcio, utilizando-se vácuo (aproximadamente 60mmHg) por 30 min a 1 h, permanecendo sob refrigeração durante 24 horas. Em seguida foram desidratadas em série etílica (35 a 70 %), com trocas em intervalos de 2 h cada, sob refrigeração, sendo conservadas em etanol (70 %), sob refrigeração, para posterior processamento e análises em microscopia de luz ou eletrônica de varredura.

Para a realização de análises através de cortes histológicos, a desidratação seguiu gradualmente até o etanol 100% seguido de propanol e butanol (100%), sob refrigeração e em

intervalos de 2 h. O processamento seguiu com a infiltração em solução crescente de butanol:meio de infiltração (Historesina, Leica), com intervalo entre as trocas das soluções variando de acordo com o tamanho e rigidez de cada amostra, ocorrendo em no mínimo uma semana, ou períodos maiores para amostras mais difíceis de infiltrar. Após 2 trocas em meio de infiltração puro as amostras foram emblocadas em historesina, com a polimerização ocorrendo à temperatura ambiente.

Cortes histológicos (3 ou 5  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos em micrótomo rotativo Leica (RM 2155), sendo estes colocados em lâminas histológicas contendo água filtrada e mantidos em chapa aquecedora (40°C) para secagem. 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. Após observação prévia, lâminas contendo secções de interesse foram cobertas com Entellan® (Merck Millipore) e lamínula, para posteriores observações e documentações 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 do 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 CO<sub>2</sub> 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.

A partir das imagens obtidas e com o auxílio do software de análise de imagens ImageJ 1.x (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) foram realizadas medidas de comprimento e diâmetro de óvulos e sementes, bem como comprimento e espessura das estruturas carnosas associadas aos mesmos e cálculo da taxa de crescimento do arilo em relação à semente, da porcentagem de cobertura do arilo sobre a semente e da contribuição da estrutura carnosa para o tamanho total da semente. O comprimento foi considerado como a distância longitudinal entre as extremidades dos polos micropilar e calazal de óvulos, sementes e arilo. Para a medida do diâmetro ( $\emptyset$ ) considerou-se um corte transversal mediano em sementes, frutos e ovários. Medidas de espessura da sarcotesta foram feitas no sentido anticlinal e na porção lateral mediana da semente. As taxas foram calculadas a partir da média de medidas de 5 amostras diferentes para cada estágio de desenvolvimento.

### **4.3 Identificação de genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento do arilo**

#### **4.3.1 Obtenção de RNA por captura de tecidos específicos por microdissecção a laser**

O processamento das amostras para microdissecção a laser foi primeiramente realizado utilizando cortes histológicos emblocados em parafina, seguindo protocolos modificados de Silveira (2009) e Artico et al. (2014) e as capturas por microdissecção utilizando o microscópio LMD7000 (Leica Biosystems, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA/USP). Posteriormente, visando obtenção de melhor qualidade de RNA, foram realizadas secções de amostras congeladas conforme protocolo descrito por Honaas et al. (2013), utilizando o sistema de transferência CryoJane® (Leica Biosystems) seguido de microdissecção a laser ao microscópio com sistema PALM MicroBeam (Zeiss, Ohio Agricultural Research and Development Center, OARDC/OSU) em estágio de curta duração no Laboratório coordenado pelo Prof. Christopher Taylor. Todas as etapas descritas a seguir foram realizadas com materiais e em superfícies tratadas livres de RNAses.

Para o preparo das secções em parafina, amostras foram fixadas em solução de etanol (100%) e ácido acético (3:1), sob refrigeração, por aproximadamente 4 h, com aplicação de vácuo (600 mmHg) por 15 min, por duas vezes. Em seguida a solução fixadora foi trocada e as amostras mantidas a 4°C, durante uma noite. No dia seguinte, as amostras foram submetidas à desidratação, sendo transferidas para etanol refrigerado (75% v/v, em água Milli-Q) (três vezes de 30 min cada troca), seguido de série etílica (85%, 95% e 100%, 1 h cada, três vezes em etanol 100%, 30 min cada). Após a desidratação as amostras foram submetidas à infiltração, em 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. Para a infiltração, aproximadamente ¼ do volume de xilol foi substituído por pastilhas de Paraplast X-Tra™, sob agitação, em estufa à temperatura de 58 a 62°C, aumentando-se a concentração de parafina com a adição progressiva de Paraplast X-Tra™ derretida, até a saturação da solução por um período de no máximo 24h. A emblocagem consistiu em distribuir as amostras imersas em parafina líquida em moldes, sobre chapa aquecedora, a 62°C. Após o posicionamento das amostras a chapa foi desligada para que a parafina solidificasse lentamente. Na sequência, os moldes foram armazenados em dessecador a 4°C, até a montagem dos blocos para realização das secções histológicas. Com o auxílio de lamparina, cada bloco foi montado em suportes 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. Em micrótomo

rotativo (Leica RM 2155), utilizando navalha de aço, foram obtidas secções de 10 µm de espessura. 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.

No preparo de criossecções, as amostras coletadas foram emblocadas em moldes de vinil contendo meio de infiltração próprio para congelamento Shandon™ Cryomatrix™ (Thermo Fisher). Após o correto posicionamento das amostras os moldes foram imediatamente congelados em N<sub>2</sub> líquido por 30 min e armazenados a -80°C até a realização dos cortes. Previamente à realização das criossecções, tanto os instrumentos a serem utilizados quanto os blocos com amostras armazenados a -80 °C foram colocados no criostato por 30 min para equilibrarem a temperatura a -20°C. Em seguida, sempre a -20°C realizou-se a criossecção nos blocos em criótomo SME (ThermoFischer Scientific) e as secções histológicas de 16 µm de espessura foram transferidas para lâminas de vidro com cobertura adesiva com auxílio de fitas adesivas utilizadas no sistema de transferência CryoJane®. Em seguida receberam o flash de UV emitido pelo sistema, para garantir a aderência dos cortes histológicos após a retirada da fita adesiva. Lâminas contendo as secções foram mantidas a -20°C até a microdissecção.

Antes da microdissecção, as secções histológicas em parafina foram desparafinizadas em xilol, duas vezes, por 5 min cada, lavados em água tratada com DEPC e deixados em temperatura ambiente em capela de exaustão até a secagem. A microdissecção foi realizada sob as seguintes condições: magnitude de 20X e 40X, força de 70 a 85 mW, velocidade 7-10 e o tecido foi coletado em tubos contendo tampão de extração.

As criossecções foram desidratadas em série etílica crescente (70, 95 e 100%), seguida por xilol (100%) a -4 °C, e secas em temperatura ambiente, por 30 min. Após a secagem as lâminas foram observadas em microscópio para seleção das áreas a serem coletadas. As amostras foram microdissecadas utilizando-se o sistema PALM (Zeiss) e capturadas via catapulta em tubos com tampa adesiva.

Em ambos os casos de microdissecção, células de diversas regiões das amostras de cada um dos estádios de desenvolvimento selecionados, foram isoladas.

O RNA total foi isolado utilizando o PicoPure RNA isolation kit (Arcturus Engineering, Mountain View, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA extraído dos tecidos microdissecados foi avaliada através do RNA 6000 Picos kit no

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), julgando o índice de integridade do RNA (RIN) calculado com o auxílio do software 2100 Expert (Agilent Technologies), algoritmo que analisa a relação entre os valores das subunidades ribossômicas 28S e 18S, e indica em índices que vão de 1 a 10, o grau de integridade da amostra de RNA analisada (SCHROEDER et al., 2006). São considerados aceitáveis para análises de RNA-seq valores de RIN acima de 6.

#### 4.3.2 Busca de genes candidatos na bibliografia e em banco de dados

A fim de selecionar genes de interesse para o estudo do desenvolvimento do arilo em *P. edulis* e, com base nos resultados de caracterização morfoanatômicas observados neste trabalho, realizou-se a revisão de literatura focando nos mecanismos moleculares do desenvolvimento reprodutivo de angiospermas. Mais especificamente buscaram-se informações sobre fatores de transcrição envolvidos em processos relacionados ao desenvolvimento de tegumentos, óvulos, ou ainda, em mecanismos de regulação gênica envolvendo estruturas que circundam sementes, principalmente em *Arabidopsis thaliana*, cujo genoma está disponível em bancos de dados públicos.

Após a revisão bibliográfica, a qual resultou na elaboração e publicação de um artigo (SILVEIRA; DORNELAS; MARTINELLI, 2016), e levantamento de diversos genes potencialmente envolvidos no processo de interesse, três genes foram selecionados para análise do padrão de expressão no presente trabalho, *WUSCHEL* (*WUS*), *PHABULOSA* (*PHB*) e *INNER NO OUTER* (*INO*). A escolha se baseou nos já conhecidos e característicos padrões de expressão dos três genes, o que confere aos mesmos a característica de marcadores de identidade tecido-específicos, *WUS* em regiões meristemáticas; *PHB* na região adaxial do tegumento interno; *INO* na região abaxial do tegumento externo.

As sequências de *PHB* e *INO* foram obtidas a partir do trabalho de Scorza (2015), que buscou as sequências homólogas em um banco de dados de sequenciamento de RNA de *P. edulis*, utilizando como “sequências-isca” as sequências de aminoácidos de *Arabidopsis* encontradas nos bancos de dados públicos (TAIR – <http://www.arabidopsis.org>) e no NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência de *WUS* foi obtida através de busca em banco de dados de EST de *Passiflora* (CUTRI; DORNELAS, 2012). As sequências traduzidas foram checadas e confirmadas em trabalhos realizados por grupo colaborador anteriormente ao presente trabalho, através de alinhamento

com sequências de aminoácidos de *Arabidopsis* e análises filogenética e de similaridade com a construção de árvores por Máxima Verossimilhança (SCORZA, 2015).

Todas as sequências de cDNA dos genes analisados e suas respectivas proteínas encontram-se no Apêndice deste documento.

#### 4.4 Análises do padrão de expressão de genes candidatos

##### 4.4.1 Desenho de primers

Uma vez selecionados os genes de interesse e com base nas sequências de nucleotídeos dos homólogos de *WUS*, *PHB* e *INO* em *P. edulis*, conforme descrito no item 4.3.2, foram desenhados primers visando tanto a utilização nas reações de RT-qPCR, quanto amplificação de regiões das sequências para clonagem e síntese de sondas para hibridização *in situ*.

O desenho dos primer foi realizado com auxílio do aplicativo Primer 3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e os primers foram analisados quanto à temperatura de melting, porcentagem de CG, estabilidade e formação de hairpins, homodímeros ou heterodímeros no programa Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.eu/analyzer/applications/Oligoanalyzer>). Os primers foram desenhados na região C-terminal dos genes alvo e foram escolhidas combinações que gerassem produtos de amplificação de no máximo 200 pb para as reações de RT-qPCR e de 400 a 600 pb para a clonagem e síntese de sondas marcadas. Para cada gene foi selecionado um primer “*forward*”, o qual foi combinado com dois primers “*reverse*” distintos, gerando duas combinações, uma combinação FW/RV para cada finalidade, RT-qPCR ou síntese de sonda (**Tabela 1**)

**Tabela 1:** Sequências de primers desenhados para análises de padrão de expressão dos genes *INO*, *PHB* e *WUS* de *Passiflora edulis*

---

Gene	Sequência	Tamanho amplificado (pb)	Finalidade
<i>PeINO</i>	FW ACCCGAACATGGCTCACAAAG		Sonda e RT-qPCR
	RV CATGTGCATCAGCGCACCAT	140	RT-qPCR
	RV ACGCTCGTTGATCAGTAGTCC	372	Sonda
<i>PePHB</i>	FW TGGCTCTTTCTATGCACAAC		Sonda
	RV GGGTTTTGCTGTTGTTGGTG	448	Sonda
	FW TGGGTTGGTGTGTGTATGGC		RT-qPCR
	RV CTGGGCTTTGGGCATTCTGT	141	RT-qPCR
<i>PeWUS</i>	FW TCCTCTAGGAGACGAACCGC		Sonda e RT qPCR
	RV GGCCTAAGCCTCCTACTGTTG	153	RT-qPCR
	RV ATGGAGTTCTGGTCCCTCGT	389	Sonda

#### 4.4.2 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

Ovários, frutos em desenvolvimento e sementes isoladas foram coletados em 9 estádios distintos, sendo eles quatro estádios pré-antese, divididos de acordo com o comprimento do botão floral, ovários de flores na antese e quatro estádios após a polinização (**Tabela 2**). As amostras vegetais foram dissecadas de acordo com tamanho e rigidez tecidual e acondicionadas em tubos de microcentrífuga e imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até a realização do isolamento de RNA.

As amostras foram maceradas em gral com pistilo de porcelana e N<sub>2</sub> líquido e o RNA foi isolado a partir deste macerado através do método do TRIzol (Invitrogen®) para a maioria das amostras. Para a lise foram utilizados 500 µL do reagente para uma quantidade equivalente a 500 µL de macerado de cada amostra, seguido de 50 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a precipitação feita com 2x o volume de etanol. Os pellets obtidos foram ressuspensos de acordo com seu tamanho em água tratada com DEPC 0,1% (de 30 a 100 µL). Para as amostras de 21 dap, a partir das quais não foi possível isolar RNA em quantidade e qualidade satisfatórias, foi utilizado o RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen).

As amostras de RNA foram quantificadas em NanoDrop™ e sua integridade verificada em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio. A síntese de cDNA foi feita utilizando 4 µg de RNA e o kit GoScript™ (Promega®), utilizando o protocolo do fabricante. O cDNA obtido de cada amostra nesta etapa foi utilizado para análises de expressão gênica através de RT-qPCR. O cDNA obtido de um “pool” com todas as amostras, foi utilizado em

reações de PCR para obtenção dos fragmentos para posterior síntese da sonda para hibridização *in situ*.

**Tabela 2:** Estádios de desenvolvimento de ovários e sementes de *Passiflora. edulis* selecionados para análise do padrão de expressão de genes selecionados

Estádio	Nome dado ao estágio de desenvolvimento	Origem da amostra
Pré-antese	Ovários 1 (ov1)	Ovários de botões de 0,9 a 1,5 cm
	Ovários 2 (ov2)	Ovários de botões de 2,0 a 2,5 cm
	Ovários 3 (ov3)	Ovários de botões de 3,0 a 3,5 cm
	Ovários 4 (ov4)	Ovários de botões de 4,0 a 4,5 cm
Pós-antese	Antese (A)	Ovários de flores na antese
	7 dap (7)	Sementes de frutos 7 dias após a polinização
	12 dap (12)	Sementes de frutos 12 dias após a polinização
	14 dap (14)	Sementes de frutos 14 dias após a polinização
	21 dap (21)	Sementes de frutos 21 dias após a polinização

#### 4.4.3 Análise do padrão de expressão por RT-qPCR

Para os experimentos de RT-qPCR foram utilizados primers gene-específicos para *WUS*, *PHB* e *INO*, desenhados conforme descrito no item 4.4.1 bem como o cDNA obtidos a partir de cada estágio de desenvolvimento como relatado no item 4.4.2. Foram utilizadas 3 replicatas biológicas para cada estágio de desenvolvimento estudado (ov1; ov2; ov3; ov4; A; 7dap; 12dap; 14dap; 21dap) e realizadas 3 replicatas técnicas para cada gene analisado. Como genes de referência (GR) utilizou-se *PeCAC* (*clathrin adaptor complex; ADAPTOR PROTEIN-2*) e *PeSAND* (*SAND family protein; MONENSIN SENSITIVITY1*) (Tabela 3), os quais apresentaram expressão mais estável nos diferentes tecidos de *P. edulis* analisados por Scorza (2015).

Cada reação de qPCR foi preparada em um volume final de 10 µL, contendo 1 µL cDNA, 0,4 µL de cada primer (10 µM), 5 µL iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) e 3,2 µL água Milli-Q autoclavada, em placa de 96 poços (Multiplate® PCR plates™ – Bio-Rad). Em cada placa, para cada gene, foram utilizadas amostras em triplicata e um controle negativo, sem DNA. As placas foram seladas com película adesiva Microseal® (Bio-Rad) e as reações de amplificação foram realizadas em um equipamento Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o programa padrão do equipamento, modo "fast". Após a determinação dos valores do ciclo threshold (Ct) para os

genes alvo e de referência calculou-se a eficiência de cada reação com o auxílio do software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os valores de eficiência obtidos foram usados para o cálculo da expressão relativa dos genes *WUS*, *PHB* e *INO* utilizando o método Pfaffl (PFAFFL, 2001) e como controle os valores de Ct das amostras de ovário na antese (para os estádios pré-antese) e sementes 21 dias após a polinização (para os estádios pós polinização). Para as análises estatísticas, calculou-se o erro padrão (SE) sendo  $SE = \text{Desvio padrão dos valores de expressão relativa das replicatas biológicas} \div \sqrt{3}$ .

**Tabela 3:** Sequências dos primers utilizados para os genes de referência

Gene	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (Gene ID)	E-value	Sequência	Tamanho amplificado (pb)	Eficiência do primer (%)
<i>PeCAC</i>	AT5G46630	3.1e <sup>-208</sup>	FW TCAAGAGGGAGTGCGTTCAC	90	99
			RV CAACCAACAGCGCCTGTAAC		
<i>PeSAND</i>	AT2G28390	5.4e <sup>-195</sup>	FW GGAGCTGCTTCTCCCCATTT	78	91
			RV AGGGCCACCAATTCCAATGA		

Fonte: SCORZA, 2014

#### 4.4.4 Análises de padrão de expressão por hibridização *in situ*.

Os genes candidatos selecionados foram analisados por hibridização *in situ*, para localização do padrão de expressão gênica nas estruturas anatômicas observadas nos estádios de desenvolvimento selecionados após a caracterização morfoanatômica.

##### 4.4.4.1 Preparo de lâminas histológicas

O material vegetal nos estádios selecionados foi coletado e dissecado conforme descrito no item 4.4.2 (**Tabela 2**) As amostras foram imersas em solução fixadora recém-preparada e refrigerada (4% paraformaldeído em tampão fosfato), sob vácuo (aproximadamente 600 mmHg) por pelo menos 1 h. Em seguida foi realizada uma troca de solução fixadora e as amostras foram acondicionadas a 4°C por no máximo 16 h (*overnight*). No dia seguinte as amostras foram brevemente lavadas em tampão para a retirada do fixador e desidratadas em série etílica (30%, 50%, 80%, 90% e 3 vezes em 100% por 30 min a 1 h cada, dependendo do tecido). Após a desidratação as amostras foram embebidas em séries

crecipientes de etanol:xilol (3:1, 1:1, 1:3 e 2 vezes de xilol puro, por 30 min cada). O procedimento foi realizado sem interrupção, em gelo, em capela de exaustão.

Para a infiltração em parafina, o xilol foi substituído gradualmente por Paraplast X-Tra™ derretida, em estufa, a 58 a 60°C. Para a maioria dos tecidos foram realizadas 2 trocas ao dia, com substituição de 1/3 do volume de xilol por Paraplast até a saturação da solução, nunca ultrapassando 72 h no total. A proporção de xilol:parafina e o intervalo de tempo entre cada troca variou de acordo com o tecido a ser processado, sendo mais rápida para tecidos mais tenros e mais lenta para tecidos rígidos. A infiltração em Paraplast puro foi repetida por até 3 vezes para garantir a eliminação de resíduos de xilol. Posteriormente foi realizada a emblocagem em moldes plásticos próprios para histologia ou produzidos artesanalmente com folhas de revista. Em chapa aquecida a 58 a 60°C, a parafina líquida contendo as amostras foi despejada nos moldes e cada amostra foi posicionada corretamente com auxílio de palitos de madeira e pinças. Após o posicionamento das amostras a chapa foi desligada para que a parafina solidificasse gradualmente até atingir a temperatura ambiente.

Os blocos foram montados em suporte de madeira e com auxílio de bisturi e lamparina foram desbastados em forma de trapézio para facilitar a formação de fitas durante a obtenção dos cortes histológicos. Secções de 5 a 8 µm foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM 2155) e posicionadas sobre lâminas silanizadas contendo gotas de água tratada com DEPC (0,1%). Para garantir secagem das lâminas e aderência das secções, as lâminas permaneceram em chapa aquecida a 42°C por pelo menos 12h.

#### **4.4.4.2 Clonagem e preparo das sondas marcadas com digoxigenina**

O cDNA obtido a partir de um *pool* de amostras, conforme descrito no item 4.4.2, foi utilizado em reações de PCR com os primers gene-específicos desenhados conforme o item 4.4.1. Aproximadamente 300 ng de cDNA foram utilizados como molde em reações de 30 ciclos com GoTaq® DNA polimerase (Promega), para cada gene (combinação de primers). Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose (1%) com brometo de etídio e posteriormente purificados de acordo com instruções do fabricante com o Purelink™ PCR Purification kit (Invitrogen). Os produtos purificados foram clonados com uso do sistema pGEMT-easy Vector (Promega), cujos produtos da reação de ligação foram introduzidos em bactérias termocompetentes (*Escherichia coli*, linhagem DH5α). As células transformadas foram selecionadas através da seleção azul-branco em meio Luria-Bertani (LB)

sólido contendo ampicilina (100 µg/mL), X-gal (80µg/ml) e IPTG (0.5mM) e posteriormente submetidas ao Purelink™ Quick plasmid Miniprep (Invitrogen) para a obtenção do DNA plasmidial. A orientação dos fragmentos foi verificada por sequenciamento com os *primers* universais SP6 e T7, para cada clone selecionado. Os clones contendo os insertos desejados foram estocados em glicerol e armazenados em ultrafreezer a -80°C. O DNA plasmidial dos clones desejados foi quantificado e linearizado com uso da enzima de restrição EcoRI. Para amplificação dos fragmentos, 10 ng de DNA plasmidial foram utilizadas em reações de PCR com os primer SP6 e T7 e 30 ciclos. O produto da reação purificado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi quantificado e 1 µg foi utilizado para a síntese das sondas marcadas com digoxigenina (DIG-dUTP) de acordo com as instruções do DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7) (Roche). Foram preparadas sondas “*anti-sense*” e “*sense*” e a marcação das sondas foi verificada por *dot blot*.

#### 4.4.4.3 Hibridização in situ

Lâminas contendo secções histológicas de interesse passaram por lavagens em cubetas de vidro visando a desparafinização. As lavagens consistiram em 2 vezes de 15 min em xilol 100%; 5 min em solução xilol:etanol (1:1); 10 min em etanol 100%; 5 min em solução etanol:água DEPC (1:1); 2 vezes de 5 min em água tratada com DEPC. Em seguida foi realizado o tratamento de pré-hibridização com Proteinase-K (1µg/mL) em câmara úmida a 37°C por 2 min seguido de 2 lavagens de 10 min em água tratada com DEPC e secagem ao ar.

Para a hibridização foi preparada uma solução contendo, para cada lâmina, 100 µL de tampão de hibridização (Tris-HCl 10mM pH 7,5; NaCl 300mM; formamida 50%; EDTA 1mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X; Dextran sulfato 50%) e 60 ng de sonda desnaturada a 80°C por 5 min e imediatamente transferida ao gelo. Após a adição de 100 µL da solução de hibridização em cada lâmina as secções foram cobertas com Parafilm® e as lâminas incubadas em câmara úmida a 42°C no escuro por no mínimo 16h. Ao fim do período de hibridização, para a retirada de ligações inespecíficas e tratamento para a detecção imunológica, as lâminas foram lavadas em tampão citrato de sódio SSC (solução 20x - NaCl 3M; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 0,3M), através de 4 lavagens sucessivas em soluções 4x, 2x, 1x e 0,5x por 20 min cada, a 42°C. Em seguida foram lavadas à temperatura ambiente em tampão 1 (0,1M Tris-HCl pH 7,5 + 0,15M NaCl) por 5 min e incubadas no escuro cobertas com Parafilm®, por 30 min, com 200 µL por lâmina de tampão de bloqueamento (BSA 2% em tampão 1).

Depois de uma nova lavagem de 5 min em tampão 1, foi aplicado 150  $\mu$ L por lâmina do anticorpo Anti-Digoxigenina AP Fab Fragments (Roche) diluído 1:1000 em tampão 1 por 1h, no escuro, coberto por Parafilm®. Após este período foram realizadas 2 lavagens de 15 min cada em tampão 1 seguida de tampão 2 (0,1M Tris-HCl pH 9,5 + 0,1M NaCl+ 0,05M MgCl<sub>2</sub>) por 5 min para equilibrar o pH alcalino. Com as lâminas ainda úmidas com o tampão 2, foram adicionados 150  $\mu$ L do agente cromogênico NBT\_BCIP (Amresco) por lâmina. As lâminas foram cobertas por lamínulas e acondicionadas no escuro durante todo o período de coloração.

O período em que as secções permaneceram na reação de coloração variou de 3h a uma noite. Após a coloração as lâminas foram lavadas com tampão 3 (0,01M Tris-HCl pH 8,0 +1mM EDTA) por 10 min para interromper a reação. Em seguida as lâminas foram lavadas brevemente em etanol (100%) e secas ao ar para a montagem das lâminas permanentes com Entellan® (Merck Millipore) e lamínulas de vidro. As secções histológicas foram observadas e fotodocumentadas em microscópio de luz (Zeiss Axioskop 40) acoplado a câmera AxioCam HRc.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de estruturas carnosas

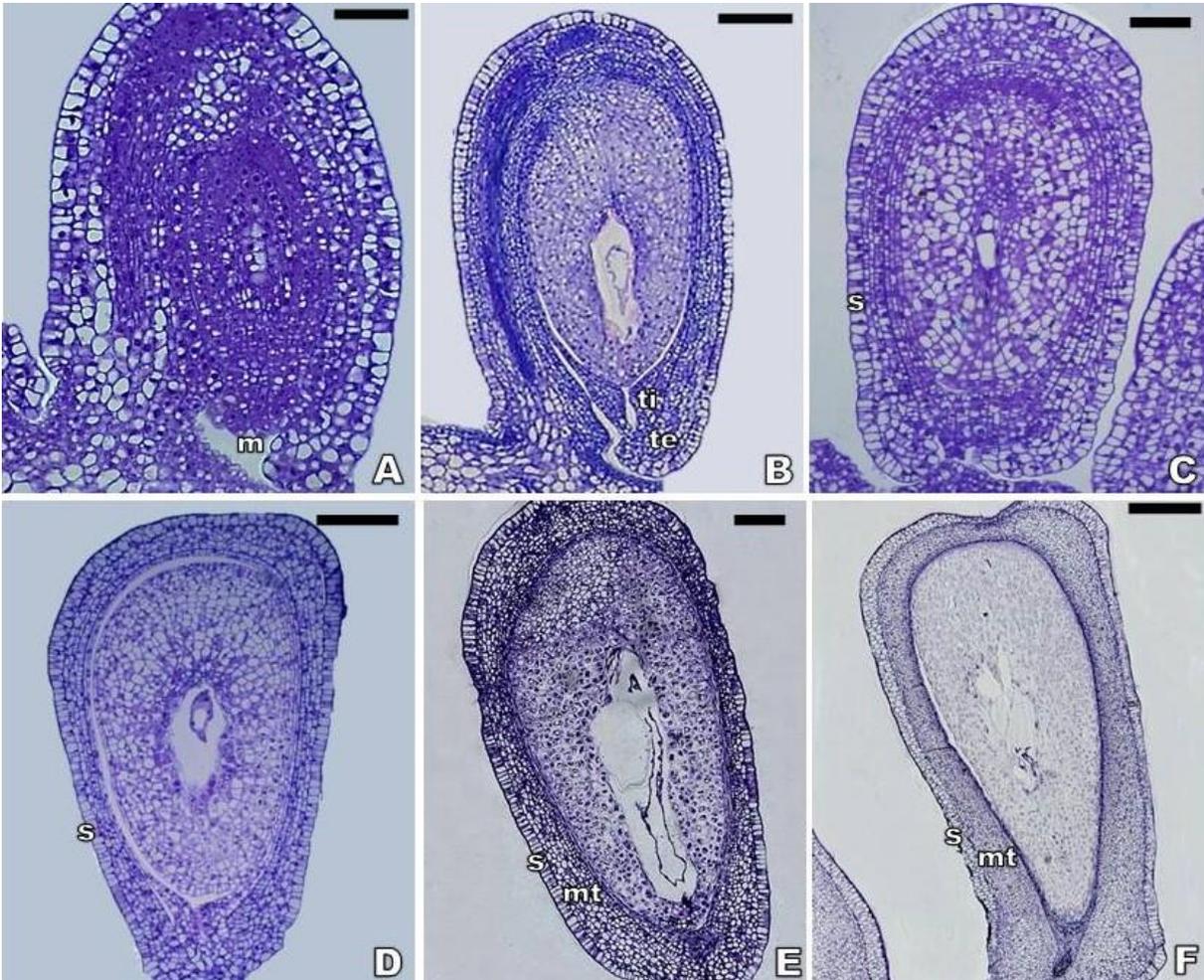
A caracterização morfoanatômica do desenvolvimento de óvulos e sementes de *P. edulis* e *P. granatum*, em diferentes estádios, permitiu que fosse caracterizado o desenvolvimento das estruturas carnosas, que circundam as sementes dos frutos de ambas as espécies, do início de sua diferenciação até a maturação.

### 5.1.1 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento da sarcotesta em *Punica granatum*

As amostras de óvulos e sementes em desenvolvimento foram obtidas a partir de botões florais bissexuais em vários estádios de desenvolvimento distintos, flores em pré-antese, antese e frutos em estádios distintos. Além das alterações morfoantômicas durante o desenvolvimento da semente de romã, também foram observados o crescimento da sarcotesta em relação à porção da semente sem cobertura (mesotesta, tégmen e nucelo) e a contribuição dessa camada para o tamanho total da semente.

Os ovários contêm inúmeros óvulos dispostos muito proximamente, uns aos outros. Em secções longitudinais apresentam formato elíptico, são bitégmicos e anátropos, com micrópila completamente voltada para a placenta, ao lado do funículo (**Figura 3 A**). No óvulo maduro, o tegumento externo é mais espesso, apresentando maior número de camadas de células (5 a 6 camadas) enquanto o tegumento interno consiste de 2 a 3 camadas mais estreitas (**Figura 3 B**). Ainda durante o desenvolvimento do óvulo, anteriormente à antese, a camada mais externa do tegumento externo já se apresenta bem conspícua, com células maiores, mais regulares, retangulares e vacuolizadas em relação às demais camadas (**Figuras 3 A-B**). Ao longo do desenvolvimento do óvulo não se observam novas camadas de células formando o que virá a ser a estrutura carnosas.

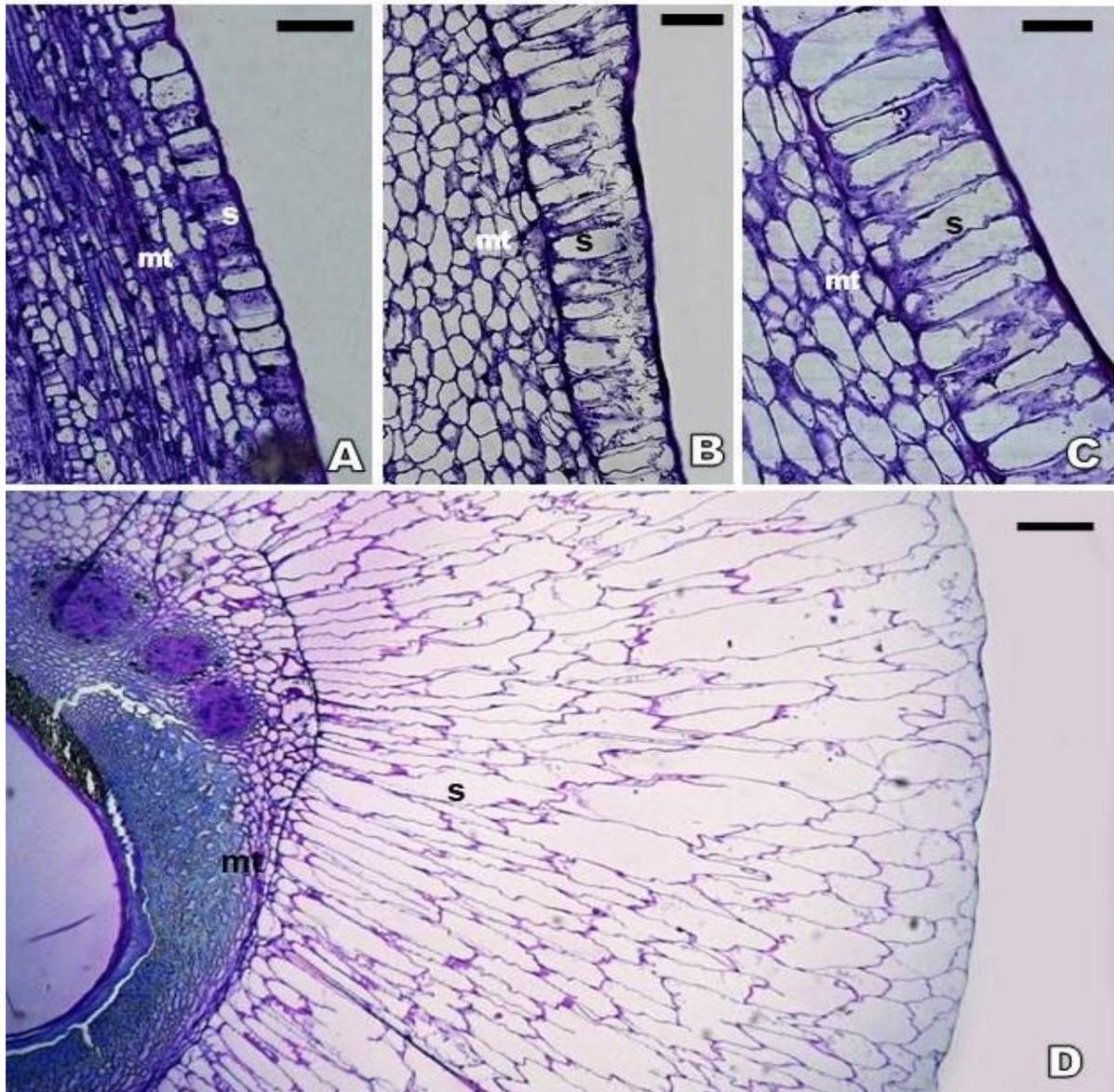
**Figura 3:** Óvulos e sementes de *Punica granatum* em desenvolvimento (A) Óvulo em desenvolvimento. (B) Óvulo maduro. (C-F) Sementes em quatro sucessivos do desenvolvimento. m = micrópila; mt = mesotesta; te = tegumento externo; ti = tegumento interno s = sarcotesta. Barras A= 30  $\mu$ m; B-D = 50  $\mu$ m; E = 100  $\mu$ m; F = 400  $\mu$ m



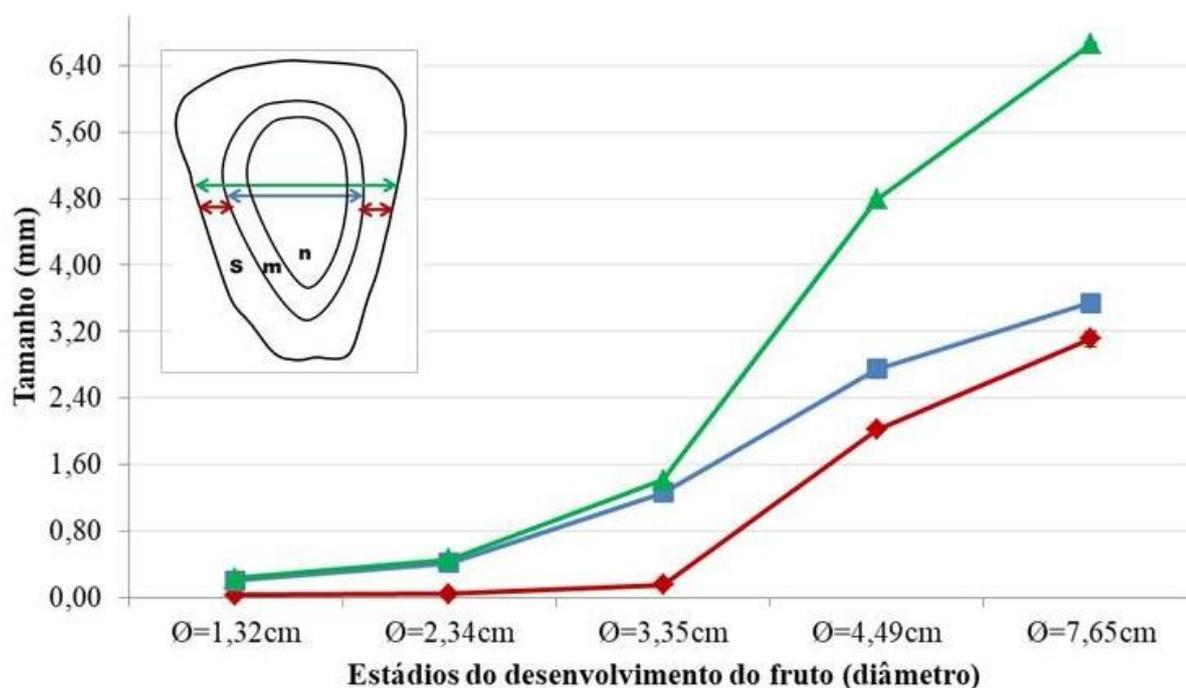
Após a fertilização, inicia-se o desenvolvimento da semente e os tegumentos do óvulo desenvolvem-se formando as camadas da testa e tégmen. A última camada do tegumento externo, que agora formará a testa, continua a se diferenciar, sendo o desenvolvimento dado predominantemente pelo alongamento celular ao contrário das demais camadas que formam o revestimento da semente (**Figuras 3 C-F e 4 A-C**). Nos primeiros dias após a polinização o crescimento da sarcotesta é lento. Em frutos de aproximadamente 2 a 3 cm de diâmetro o aumento de sua espessura foi reduzido em relação ao crescimento da semente (**Figura 5**), sendo que desde a antese e nos dois primeiros estádios de desenvolvimento da semente analisados, essa camada de células representa, em média, 10% do diâmetro total do óvulo/semente (**Tabela 4**). As células da última camada se diferenciam com crescimento do vacúolo, o qual finalmente ocupa praticamente toda a célula deslocando o núcleo para a

periferia das células (**Figura 4**). Quando o fruto em desenvolvimento passa dos 3 cm de diâmetro, a sarcotesta passa a crescer exponencialmente, acompanhando o padrão de crescimento do restante da semente chegando a aumentar 8 vezes sua espessura (**Figura 5**). A partir dessa fase do desenvolvimento até a semente madura a sarcotesta representa quase 50 % do diâmetro total da semente (**Tabela 4**). Na semente madura a sarcotesta consiste de uma camada de células alongadas anticlinalmente e de paredes finas, acumulando água e outras substâncias e circundando a camada lignificada que é a mesotesta da semente (**Figura 4 D**).

**Figura 4:** Desenvolvimento da sarcotesta em estádios sucessivos do desenvolvimento da semente em *Punica granatum*. Detalhe do alongamento anticlinal das células da sarcotesta (**A; B; C**). Detalhe da sarcotesta na semente madura com mesotesta lignificada (**D**). mt = mesotesta; s = sarcotesta Barras: A-C = 40  $\mu$ m; D = 250 $\mu$ m



**Figura 5:** Relação entre o crescimento da semente e sarcotesta, em *Punica granatum*, ao longo do desenvolvimento do fruto. Diâmetro mediano total da semente (A); Diâmetro mediano da semente sem sarcotesta (mesotesta+nucelo) (B); Espessura mediana da sarcotesta (C) (média de 5 amostras). m = mesotesta; n = nucelo; s = sarcotesta



**Tabela 4:** Progressão da contribuição da sarcotesta para o tamanho do óvulo/semente ao longo do desenvolvimento

Diâmetro da semente (mm)	0,23	0,46	1,41	4,79	6,66
% sarcotesta*	11,65	9,67	10,78	42,55	46,74

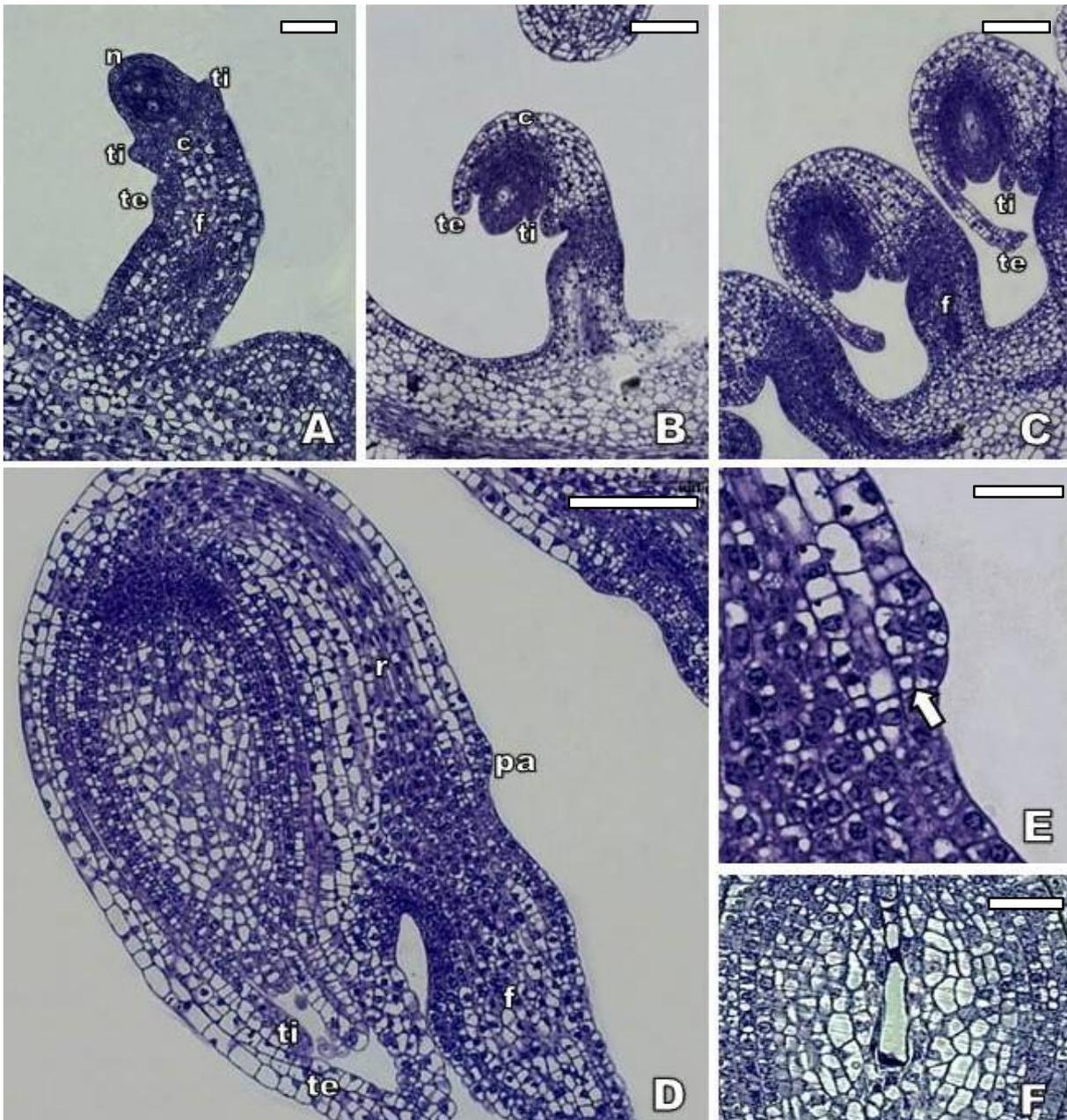
\*porcentagem da sarcotesta = porcentagem da semente que é representada pela camada da sarcotesta, medida através de cortes transversais medianos do óvulo/semente (média de 5 cortes)

### 5.1.2 Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento do arilo em *Passiflora edulis*

Secções transversais de ovários em estádios pré-antese e antese e de frutos em fases iniciais do desenvolvimento, bem como secções longitudinais de sementes em desenvolvimento foram observadas para a caracterização dos estádios de desenvolvimento do arilo em *P. edulis*.

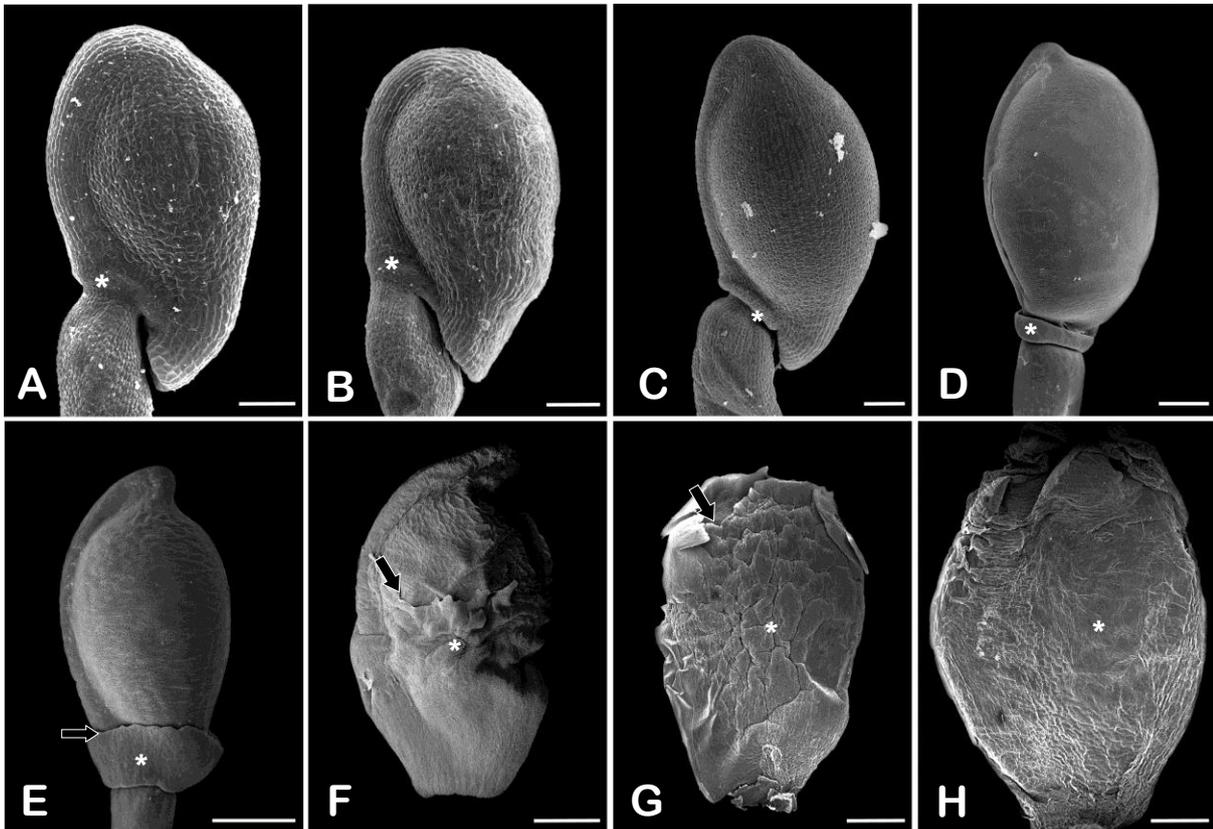
Os ovários de *P. edulis* são uniloculares e pluriovulados, com placentação parietal. Os óvulos são anátropos e bitegmentados. A curvatura dos óvulos é observada desde os estádios iniciais do desenvolvimento (**Figura 6**) e o tegumento interno tem início na porção distal da calaza e, posteriormente, na região subjacente ao tegumento interno, inicia-se primórdio do tegumento externo (**Figuras 6 A**). Nos estádios seguintes o tegumento externo ultrapassa o interno, enquanto ambos crescem em direção ao nucelo para a formação da micrópila (**Figura 6 B, C e D**). Ao longo de seu desenvolvimento os tegumentos, interno e externo, apresentam de duas a três camadas de células (**Figura 6 D**). As primeiras divisões que darão origem ao primórdio do arilo são periclinais na epiderme da região basal do óvulo, na altura da micrópila e são mais conspícuas, em secção longitudinal do óvulo, na porção voltada para fora, oposta à micrópila (**Figuras 6 D e**). Essas divisões só foram observadas quando o óvulo anátropo de *P. edulis*, já estava totalmente curvado e o tegumento externo ultrapassava o comprimento do interno, iniciando a formação da micrópila (**Figura 6 D**). Na maioria das amostras analisadas, essa fase é observada após o segundo ciclo mitótico da megagametogênese, considerando o desenvolvimento assincrônico dos óvulos de um mesmo ovário (**Figura 6 F**).

**Figura 6:** Desenvolvimento do arilo em *Passiflora edulis* pré-fertilização. (A-C) Cortes longitudinais de óvulos em estádios do desenvolvimento anteriores ao surgimento do primórdio do arilo, mostrando a curvatura dos óvulos anátropos e o desenvolvimento dos tegumentos do óvulo. (D) Óvulo em estágio entre fim da megasporogênese e início da megagametogênese apresentando as primeiras divisões do primórdio do arilo, na região entre funículo e rafe. (E) Detalhe das primeiras divisões periclinais (seta) que darão origem ao arilo. (F) Detalhe do estágio da megagametogênese no momento do surgimento do primórdio do arilo. c = calaza; f = funículo; n = nucelo; pa = primórdio do arilo; r = rafe; te: tegumento externo; ti: tegumento interno. Barras= 100  $\mu$ m (A -D); 25  $\mu$ m (E); 40 $\mu$ m (F)



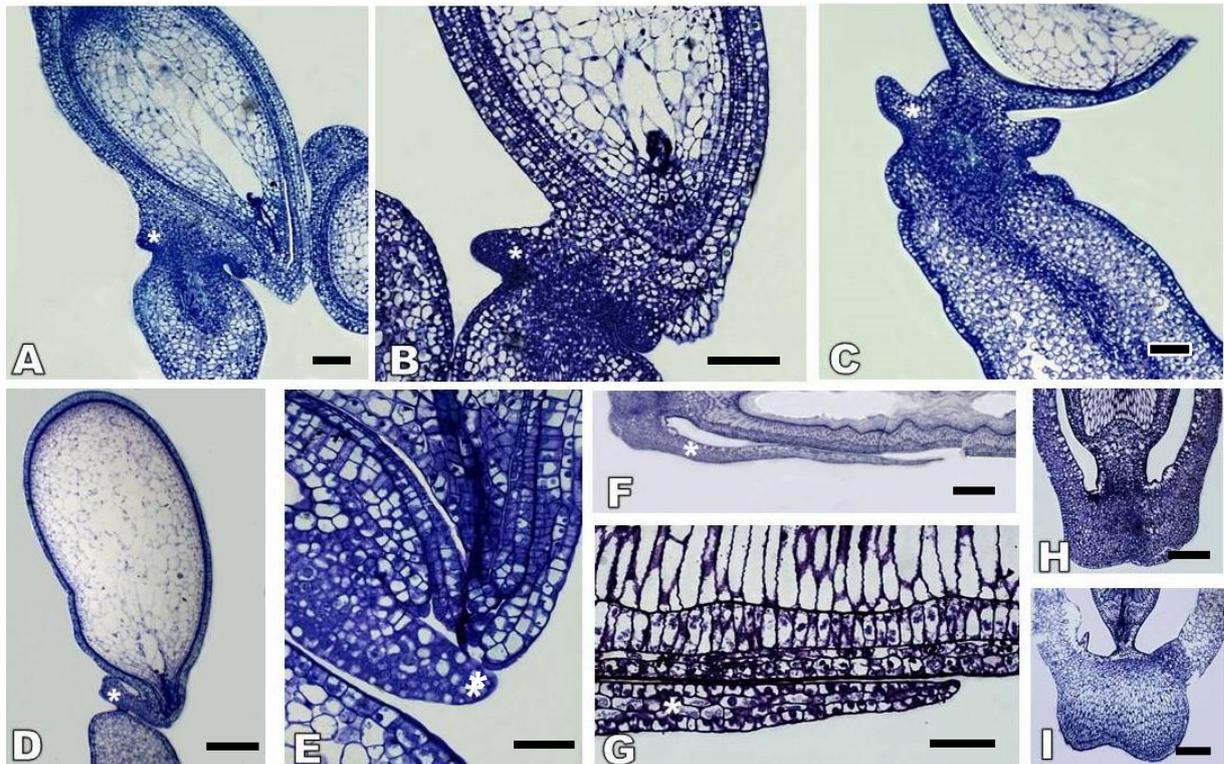
As divisões do primórdio do arilo continuam ocorrendo nas fases seguintes até a formação de um anel ao redor do funículo, na base da rafe (**Figura 7 A**). A partir dessa fase, passando pela antese e primeiros dias após a polinização não são observadas muitas alterações na estrutura (**Figura 7 B**), como divisões ou crescimento, as diferenciações observadas no óvulo nesta fase são restritas aos tegumentos e 3 dias após a polinização é possível observar a entrada do tubo polínico na micrópila e no período que se segue as células do arilo voltam a sofrer divisões intensas, tanto periclinais quanto anticlinais, aumentando o número de camadas da estrutura (**Figuras 7 C, 8 A- C**), que aumenta de tamanho em direção à micrópila até cobri-la totalmente, aproximadamente 10 dias após a polinização (**Figuras 7 D, 8 D- E**). Nesses estádios é possível observar a presença de polaridade na estrutura, as células da porção basal (voltada para o funículo) são menores e sofrem divisões mais intensas, enquanto que as células da porção apical (voltada para a calaza) sofrem aumento celular, o crescimento assimétrico dos dois polos causa a curvatura da estrutura, que passa a envelopar a semente e crescer muito rapidamente em direção ao polo calazal. Aos 14 dias, quando já é possível observar o embrião globular se desenvolvendo no saco embrionário, mais da metade da semente está coberta pelo arilo (**Figuras 7 F e 8 F**).

**Figura 7:** Desenvolvimento do arilo em *Passiflora edulis*, observado por microscopia eletrônica de varredura. (A) Óvulo maduro em estágio anterior à antese. (B) Óvulo 1 dia após a polinização (dap). (C) Sementes 7 dap; (D) 10 dap; (E) 12 dap; (F) 14 dap (G) 25 dap e (H) 35 dap. Asteriscos (\*) indicam arilo e primórdio de arilo; Setas indicam a borda do arilo. Barras: = A-C = 100  $\mu$ m; D = 500 $\mu$ m; E-H = 1 mm



O arilo continua apresentando a polaridade, visto que a camada mais interna (voltada para a semente) é composta por células maiores, mais vacuolizadas, adquirindo características de reserva, enquanto a camada externa (voltada para fora) apresenta células menores e mais divisões (**Figuras 8 F-G**). A estrutura apresenta uma base densa com muitas camadas de células (**Figura 8 H**) e, à medida que se aproxima do polo calazal, vai afinando para 2 a 3 camadas (**Figura 8 G**). Foi possível notar que aos 21 dias, quando é possível observar na maioria das sementes o embrião no estágio cordiforme, a estrutura apresenta maior expansão celular, tanto na base (**Figura 8 I**) quanto ao longo do comprimento e a partir de então, nas fases finais do desenvolvimento, seu crescimento se dá predominantemente por aumento do tamanho celular.

**Figura 8:** Desenvolvimento do arilo em *Passiflora edulis* pós-fertilização. (A) Óvulo 4 dias após a polinização (dap) com arilo anelar. (B) Semente 6 dap e retomada do desenvolvimento do arilo. (C) Semente 8 dap e crescimento do arilo em direção ao polo calazal. (D) Semente 10 dap e (E) detalhe do arilo cobrindo a micrópila. (F) Arilo 14 dap. (G) Detalhe da extremidade apical do arilo 14 dap. (H) Detalhe da base do arilo 14 dap. (I) Detalhe da base do arilo 21 dap. Asteriscos (\*) indicam o arilo. Barras: A-C, G = 100  $\mu\text{m}$ ; D = 250  $\mu\text{m}$ ; E = 50  $\mu\text{m}$ ; F, H = 500  $\mu\text{m}$ ; I = 400  $\mu\text{m}$ )



Durante o desenvolvimento do arilo, foi observada a progressão de sua cobertura em relação à semente também em desenvolvimento. Nos primeiros dias após a polinização não é observado um crescimento significativo. Aproximadamente aos 10 dias o óvulo mais que dobra de tamanho e continua em crescimento exponencial até os 14 dias, enquanto que no mesmo período o crescimento do arilo é linear e discreto no início, apresentando um pico entre os 12 e 14 dias (**Figuras 7 E F; 9**), quando passa de uma cobertura de menos de 18% a mais de 80% da semente (**Tabela 5**). A partir de então o aumento em comprimento da semente se estabiliza e o do arilo cresce exponencialmente (**Figura 9**), cobrindo totalmente a semente e excedendo seu comprimento por volta dos 25 dias após a polinização e continua crescendo até o último estágio analisado neste trabalho (**Figura 7 G e H; Tabela 5**).

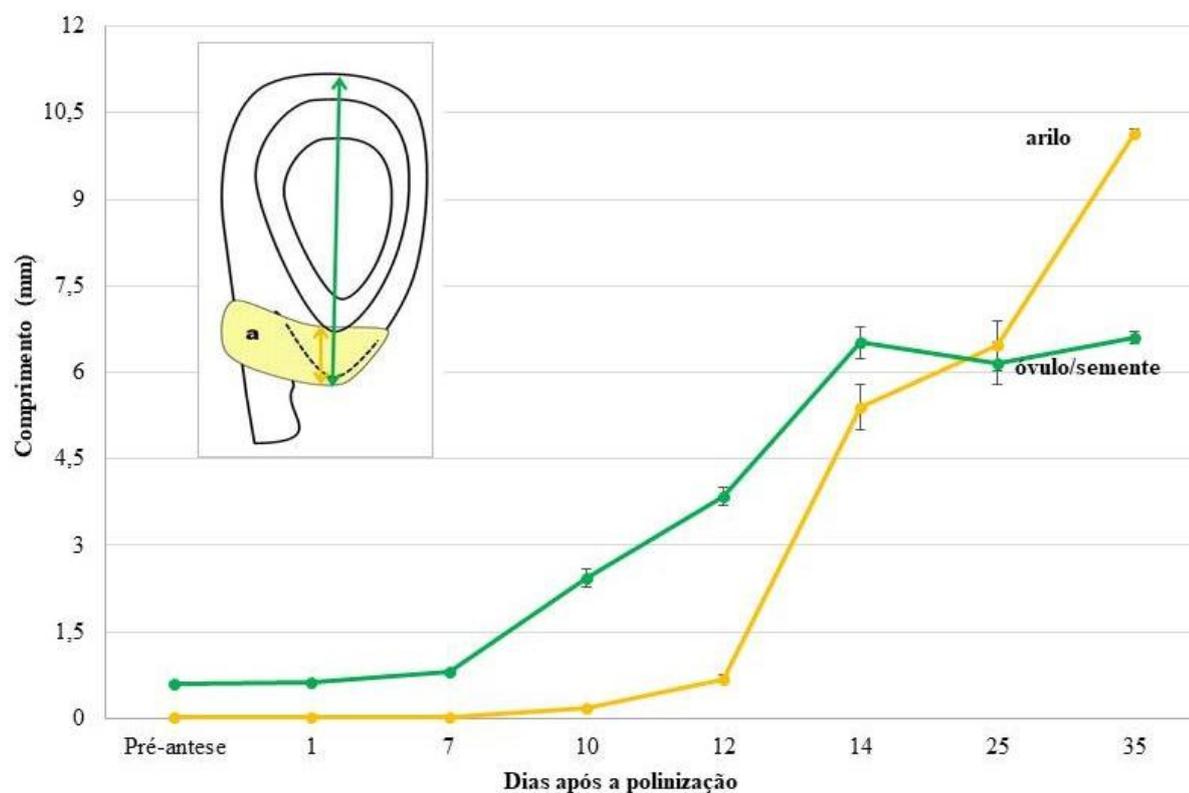
**Tabela 5:** Progressão da cobertura do arilo em relação ao óvulo/semte ao longo do desenvolvimento em *Passiflora edulis*

Estádio de desenvolvimento	Pré-antese	1	7	10	12	14	25	35
% de cobertura*	5,33	5,52	4,65	7,39	17,69	82,99	104,99	153,96

\*porcentagem de cobertura: porcentagem do comprimento\*\* do óvulo/semte que é coberta pelo arilo

\*\*comprimento: medida longitudinal entre as extremidades dos polos micropilar e calazal.

**Figura 9:** Relação entre o crescimento do arilo e óvulo/ semte ao longo do desenvolvimento pós-polinização em *Passiflora edulis* (média de 5 amostras). a= arilo



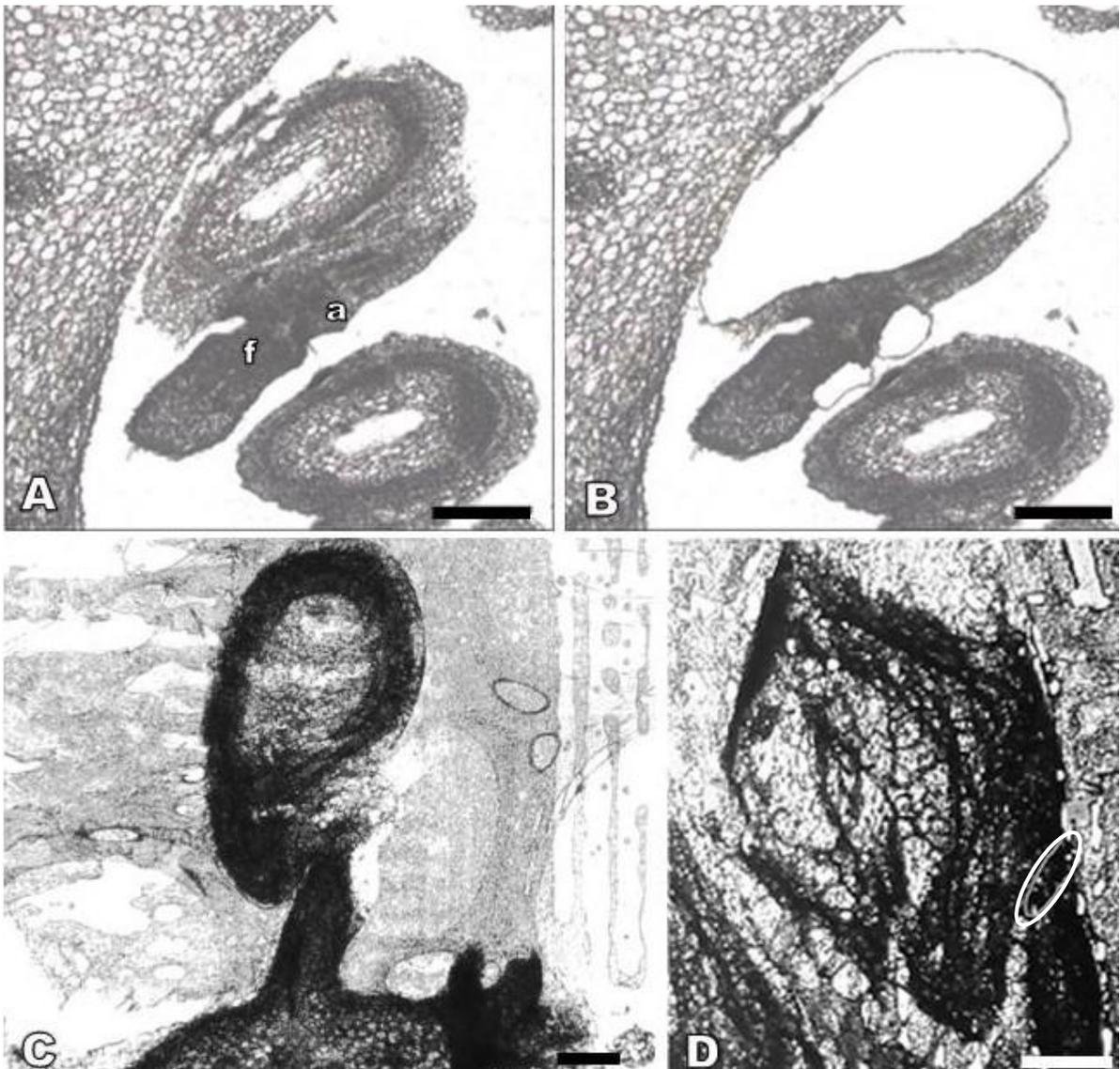
## 5.2 Identificação de genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento do arilo

### 5.2.1 Obtenção de RNA por captura de tecidos específicos por microdissecção a laser

As secções histológicas obtidas em parafina 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 (**Figura 10 A-B**). A princípio foram capturadas regiões do primórdio do arilo de óvulos maduros e, como

controle, regiões do funículo logo abaixo do primórdio do arilo (**Figura 10 B**), bem como região onde o arilo teria origem, em óvulos ainda em desenvolvimento. As seções microdissecadas de um mesmo tecido (arilo, ou funículo), a partir de várias seções histológicas de pelo menos duas lâminas, foram coletadas em um mesmo microtubo e o RNA foi extraído. Os resultados obtidos após a análise de qualidade de RNA indicaram alto grau de degradação das moléculas.

**Figura 10:** Cortes histológicos de ovário de *Passiflora edulis* processadas para microdissecção a laser, em parafina (**A-B**) e crio-seções (**C-D**). **A-B.** Seções histológicas preparadas em parafina antes (**A**) e depois (**B**) da microdissecção de tecidos específicos do óvulo, primórdio do arilo e funículo. **C-D.** Exemplos da preservação da morfologia em crio-seções de ovários em antese; **D.** Detalhe da marcação da região do funículo/arilo a ser capturada (**D**). a = primórdio de arilo; f = funículo; Barras: **A-B** = 100  $\mu\text{m}$ ; **C-D** = 50  $\mu\text{m}$



Novos experimentos foram realizados com diversas adaptações no processamento das amostras, particularmente nas etapas que exigiam exposição prolongada a temperaturas elevadas, utilização de solventes e manuseio das secções, a fim de evitar a degradação de RNA. A avaliação dessas adaptações foi realizada com amostras de ovários e frutos de *P. edulis* em diferentes estádios de desenvolvimento e também em tecidos de outras espécies de plantas e o sucesso foi relativo, conforme pode-se observar na **Tabela 6**.

**Tabela 6:** Parâmetros testados em experimento para obtenção de RNA a partir de tecidos capturados por microdissecção a laser em *Passiflora edulis* em parafina

Amostra	Área total ( $\mu\text{m}^2$ )	Extração RNA	Tempo de exposição (min)	[RNA] (ng/ $\mu\text{L}$ )	RIN
Múltiplos cortes de arilo	40 mil	Trizol	10	3,3	2,1
Múltiplos cortes de arilo	40 mil	Kit*	30	0,47	2,1
Múltiplos cortes de arilo	40 mil	Kit*	10	2,9	2,3
Múltiplos cortes de arilo	40 mil	Trizol	30	0,10	2,3
Corte individual de óvulo	40 mil	Kit*	10	1,58	2,1
Corte individual de óvulo	40 mil	Trizol	10	0,59	2,1
Raspagem de ovários inteiros	25 mil	Kit*	5	24,4	2,1
Raspagem de ovários inteiros	25 mil	Trizol	5	11,7	2,1

\*PicoPure RNA isolation kit (Arcturus)

Os resultados de tais avaliações, juntamente com a experiência bem-sucedida alcançada anteriormente pelo nosso grupo, utilizando botões florais de algodão com obtenção de RNA de qualidade e quantidade suficiente para análises subsequentes (ARTICO et al., 2014), levaram à discussão de que a área de tecido coletado pode influenciar o valor de RIN obtido. Além da área total coletada, outro fator que pode interferir nesse resultado é se a amostra é composta por um corte microdissecado único ou diversos cortes menores, ampliando a área total. Discutiu-se também a influência do tempo de exposição dos cortes histológicos ao laser após a retirada de parafina das lâminas no processo de degradação do RNA. Sendo assim, um novo experimento foi realizado para avaliação desses parâmetros. Estabeleceu-se como condições ideais um limite máximo de 10 minutos de exposição e uma área mínima de 40 mil  $\mu\text{m}^2$  de tecido coletado, de acordo com Balzergue et al. (2014). Variações nesses parâmetros também foram testadas.

Um protocolo para isolamento de RNA alternativo ao PicoPure RNA isolation kit, também foi testado, utilizando o método de extração por Trizol e óleo mineral substituindo o tampão de extração, conforme realizado com sucesso recentemente por Gautam et al. (2016). Utilizou-se como controle o material oriundo de raspagem de um corte histológico inteiro de uma lâmina logo após a desparafinização. Poucas diferenças foram encontradas entre as diferentes condições testadas (**Tabela 6**), o que indica que a degradação das moléculas de RNA pode ter ocorrido principalmente na etapa anterior à microdissecção, durante o processamento em parafina, mesmo com as adaptações realizadas no protocolo.

Visando a obtenção de melhor qualidade e rendimento doo RNA extraído, sem a realização das etapas de preparo de lâmina histológica com parafina, testou-se a utilização de crio-seções histológicas, utilizando protocolo adaptado de Honaas et al. (2013) e Morse et al. (2010), que consiste basicamente no congelamento das amostras em meio adequado, sem etapas de infiltração. As crio-seções, ao contrário das seções em parafina, não apresentaram boa preservação da morfoanatomia dos óvulos, particularmente pela espessura dos cortes e falta de preservação histológica, pela ausência de fixadores (**Figura 10 A e D**), dificultando a distinção de células, sendo possível apenas identificar regiões de interesse, sem maiores detalhes. Ainda assim, foram coletadas regiões do primórdio do arilo (**Figura 10 D**), funículo e óvulos inteiros, para a extração de RNA. Os resultados de integridade de RNA não foram satisfatórios.

Frente às dificuldades encontradas na obtenção de amostras de RNA, com valores de integridade do RNA satisfatórios para subseqüentes estudos transcritômicos quantitativos, a fim de identificar genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento do arilo, optou-se por seguir o trabalho analisando o padrão de expressão de genes candidatos selecionados com base em pesquisa bibliográfica (SILVEIRA; DORNELAS; MARTINELLI, 2016).

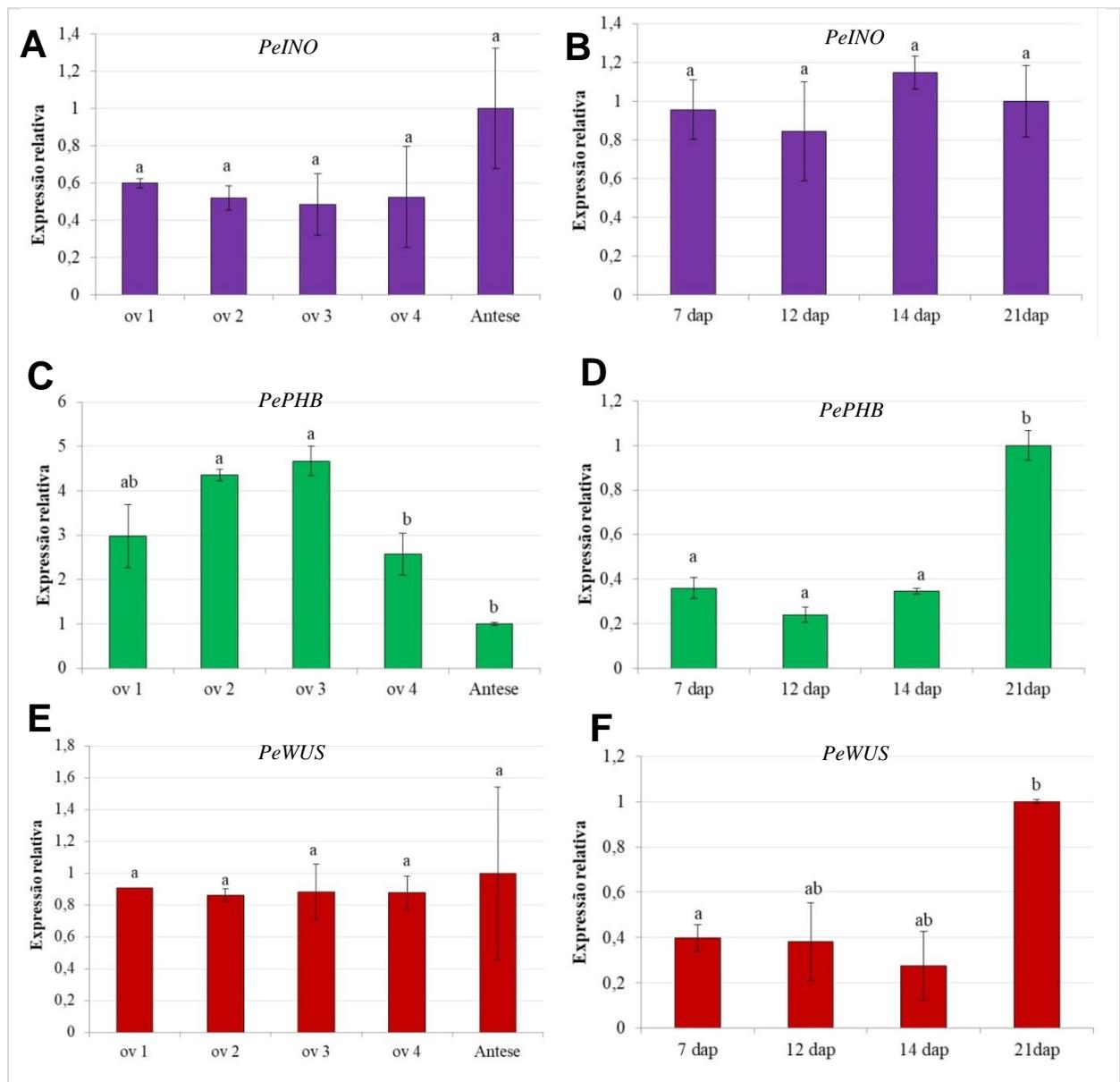
### **5.3 Análise do padrão de expressão dos genes selecionados**

A análise da possível participação dos genes candidatos, homólogos de *PHB*, *INO* e *WUS*, no desenvolvimento do arilo em *Passiflora edulis*, deu-se pela detecção de níveis de transcritos dos referidos genes por RT-qPCR e pela análise do padrão espacial e temporal de expressão destes através de hibridização *in situ*.

### 5.3.1 Padrão de expressão dos genes selecionados por RT-qPCR

Níveis de transcritos de *PeINO*, *PePHB* e *PeWUS* foram detectados por RT-qPCR. As análises do padrão de expressão de cada um dos genes foram realizadas separadamente em amostras de estádios pré-antese e antese e estádios após a polinização, uma vez que para o primeiro caso foram amostrados ovários inteiros e para o segundo, sementes individualizadas. A análise da expressão de *PeINO* nos ovários mostrou um padrão uniforme ao longo dos estádios até a antese (**Figura 11 A**). Em sementes *PeINO* se expressou em níveis constantes ao longo dos quatro estádio analisados (**Figura 11 B**). Nas três primeiras fases de desenvolvimento analisadas, o gene *PePHB* apresentou expressão constante e até quatro vezes maior em relação à expressão na antese (**Figura 11 C**). A partir do quarto estádio (ovários de botões de 4,0 a 4,5 cm) a expressão se reduz à metade e continua reduzindo até a antese (**Figura 11 C**). Nas sementes os maiores níveis de expressão de *PePHB* aparecem aos 21 dias após a polinização, o dobro da expressão encontrada nos estádios anteriores, 7 a 14 dap ao longo dos quais a expressão é constante (**Figura 11 D**). Nos cinco estádios de desenvolvimento analisados a expressão de *PeWUS* é constante nos ovários (**Figura 11 E**) e em sementes é constante nas primeiras fases após a polinização e aumenta até duas vezes aos 21 dias após a polinização (**Figura11 F**).

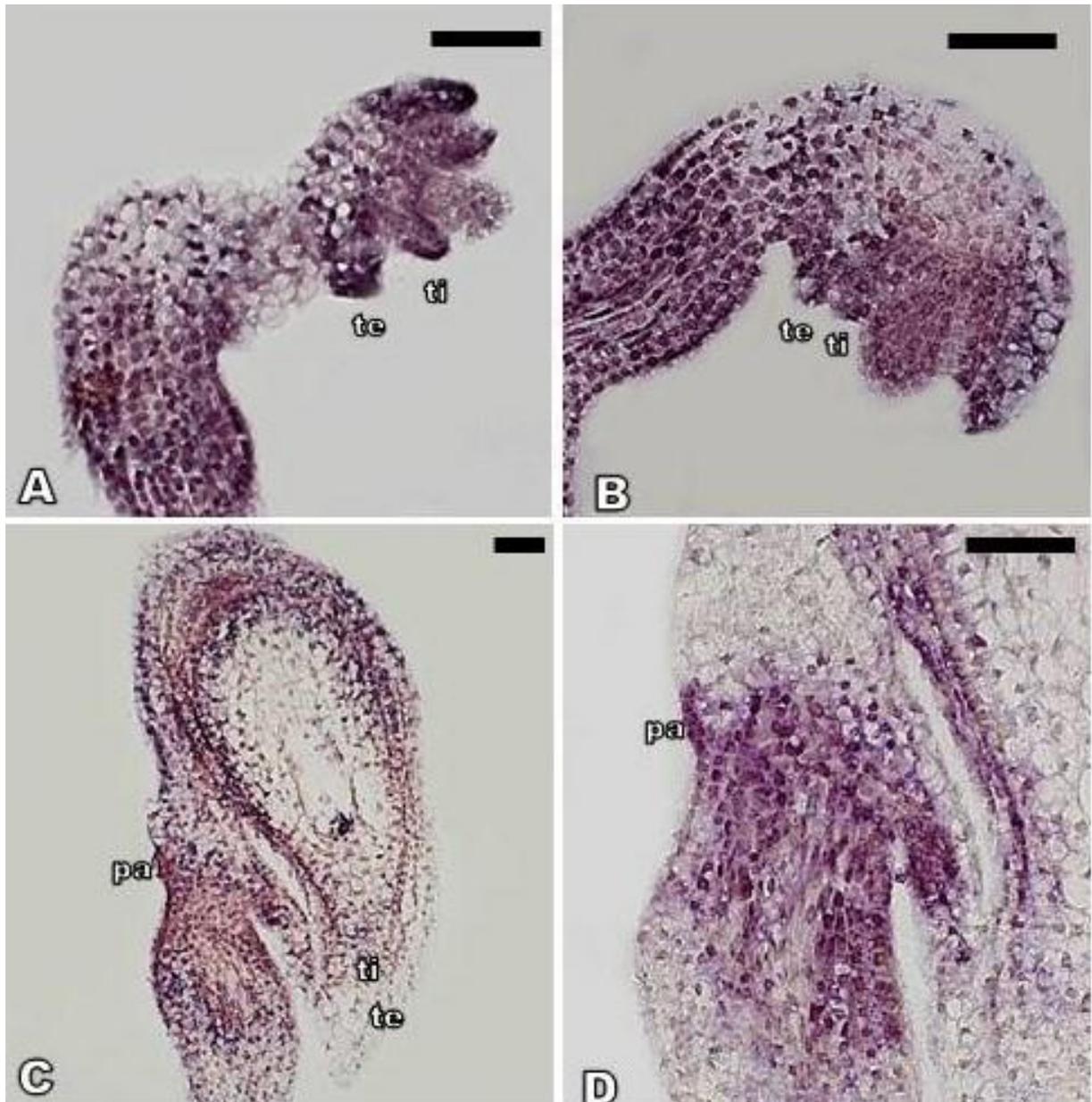
**Figura 11:** Expressão relativa dos genes *PeINO* (A-B), *PePHB* (C-D) e *PeWUS* (E-F) em diferentes estádios do desenvolvimento de ovários (A, C, E) e sementes (B, D, F) de *Passiflora edulis*, por RT-qPCR. As barras correspondem à média da expressão relativa de três replicatas biológicas  $\pm$  o respectivo erro padrão indicado pelas barras verticais. Como genes de referência foram utilizados *PeCAC* e *PeSAND* e como controle a expressão do gene de interesse na antese (A, C, E) e aos 21 dap (B, D, F) (valor 1 do gráfico). Médias seguidas por pelo menos uma letra igual não diferem entre si pelo teste T de Student ( $p < 0,05$ ). A, C, E: ov1(0,9 a 1,5 cm), ov2 (2,0 a 2,5 cm), ov3 (3,0 a 3,5 cm), ov4 (4,0 a 4,5cm); B, D, F: sementes aos 7, 12, 14 e 21 dias após polinização (dap)



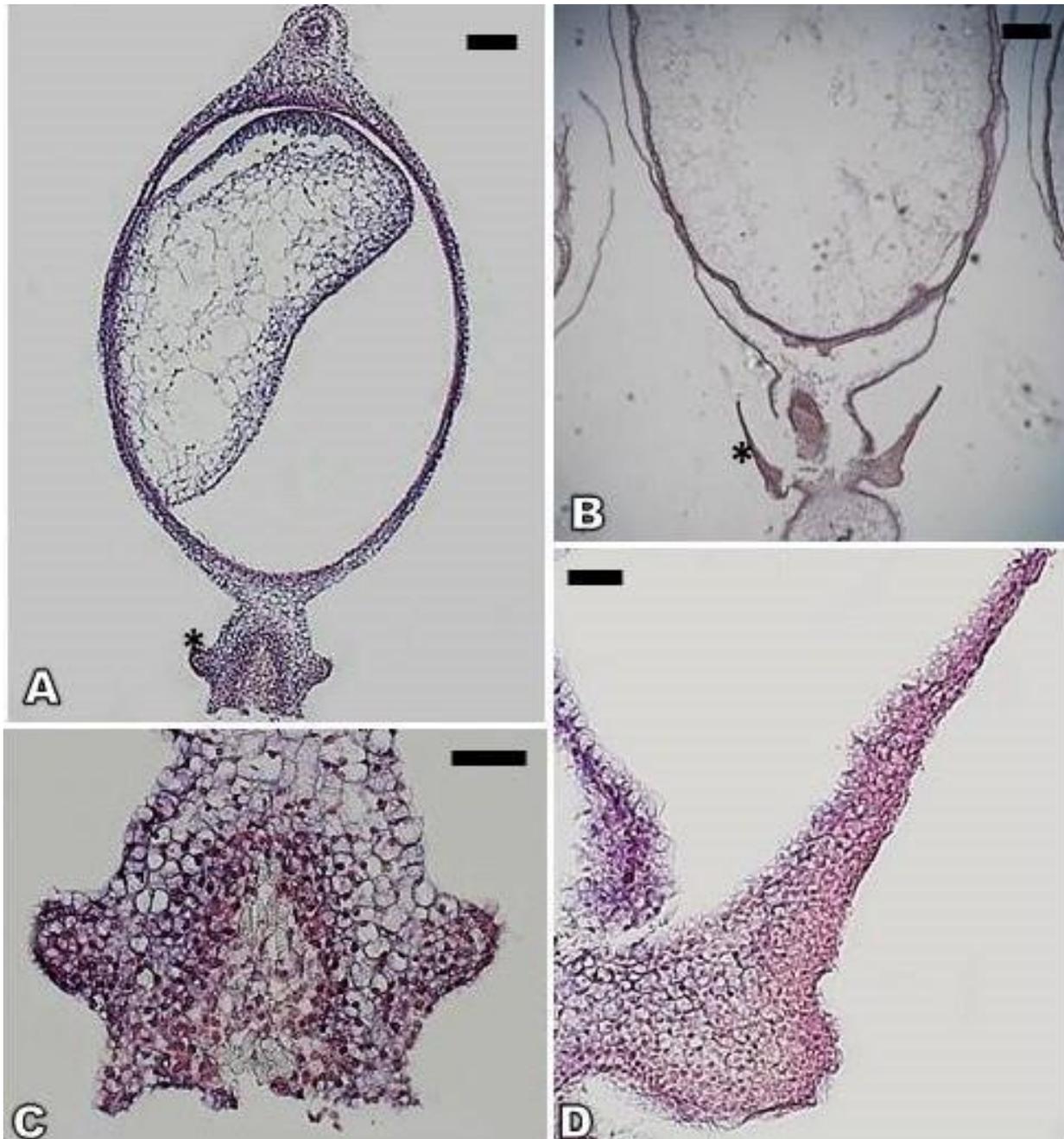
### 5.3.2 Padrão de expressão dos genes selecionados por hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* foi realizada em secções histológicas de óvulos e sementes de *P. edulis* em diferentes estádios do desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do óvulo, nos estádios de crescimento dos tegumentos e curvatura do óvulo, o sinal de hibridização de *INO* foi observado ao longo de todo o funículo e em ambos os tegumentos (**Figura 12 A-B**), sendo inicialmente mais forte nas extremidades do tegumento externo (**Figura 12 A**). O sinal de hibridização se torna mais fraco na região da calaza na medida em que há crescimento diferencial dos tegumentos (**Figura 12 B**). A expressão de *INO* é uniforme em todo o funículo ao longo dos estádios pré-antese analisados. Na antese, transcritos de *INO* ainda são detectados no funículo, porém o sinal é mais pronunciado em na porção distal, seguindo ao longo da extensão do funículo e enfraquecendo na porção proximal (em direção à placenta) (**Figura 12 C**). Um sinal de hibridização foi consistentemente observado na porção mais distal do funículo (em direção à calaza) abrangendo também a região da estrutura anelar, que é o primórdio do arilo (**Figura 12 D**). Ainda na antese, foi possível observar a expressão de *INO* em ambos os tegumentos, sinal intenso está presente desde a porção calazal, se estendendo até aproximadamente 2/3 do comprimento dos tegumentos, porém ausente na porção micropilar (**Figura 12 C**). Aos 7 dias após a polinização transcritos de *INO* são detectados nos tecidos da semente em desenvolvimento, com forte sinal de hibridização na região do arilo e um pouco mais fraco nos tegumentos (**Figura 13 A**). Observando o detalhe do arilo é possível identificar um sinal mais forte na porção abaxial do arilo e em direção a região central do funículo na altura do arilo (**Figura 13 C**). A partir dos 12 dias após a polinização a expressão de *INO* cessa no funículo, e o sinal de hibridização se mantém somente no arilo e tegumento (**Figura 13 B**). Nesta fase o sinal detectado no arilo é mais difuso e fica próximo do ruído de fundo na camada de células da porção adaxial (voltada para a semente) (**Figura 13 D**). A partir deste estádio o sinal diminuiu até não ser mais detectado aos 21 dias após a polinização.

**Figura 12:** Hibridização *in situ* de *INO* em secções longitudinais de óvulos de *Passiflora edulis*. **A-B.** Expressão de *INO* em óvulos em dois estádios pré-antese; **C.** Expressão de *INO* em óvulo na antese; **D.** Detalhe da expressão de *INO* no primórdio do arilo no óvulo na antese. pa = primórdio do arilo; te = tegumento externo; ti = tegumento interno. Barras: **A-B, D** = 50  $\mu$ m; **C** = 100  $\mu$ m

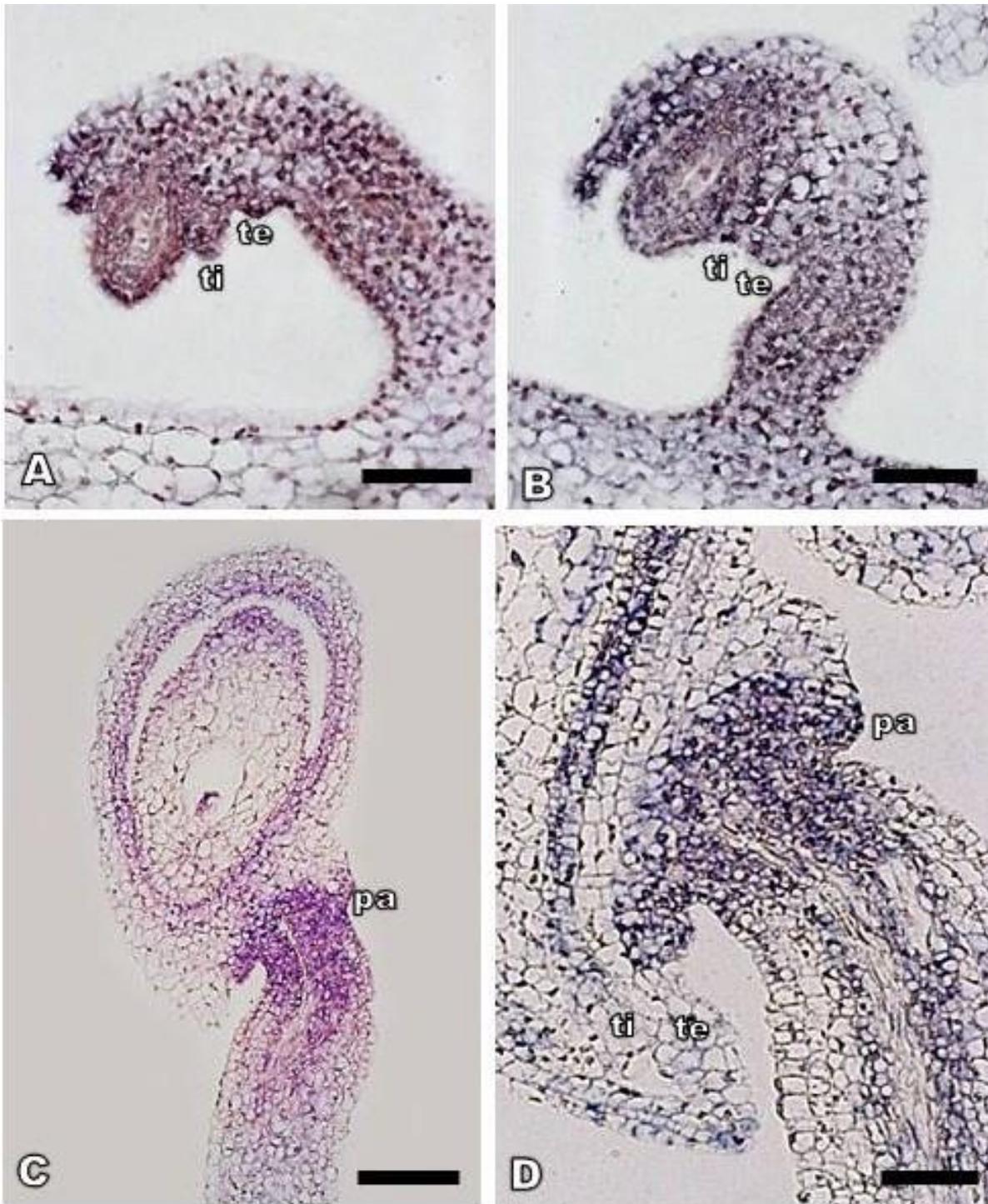


**Figura 13:** Hibridização *in situ* de *INO* em secções longitudinais de sementes de *Passiflora edulis*. **A-B.** Expressão de *INO* em sementes 7 dias (A) e 12 dias após a polinização (B); **C-D.** Detalhes da expressão de *INO* no arilo 7 dap (C) e 12 dap (D). Asteriscos (\*) indicam o arilo. Barras: A = 200  $\mu$ m; B = 500  $\mu$ m; C = 40  $\mu$ m; D = 100  $\mu$ m

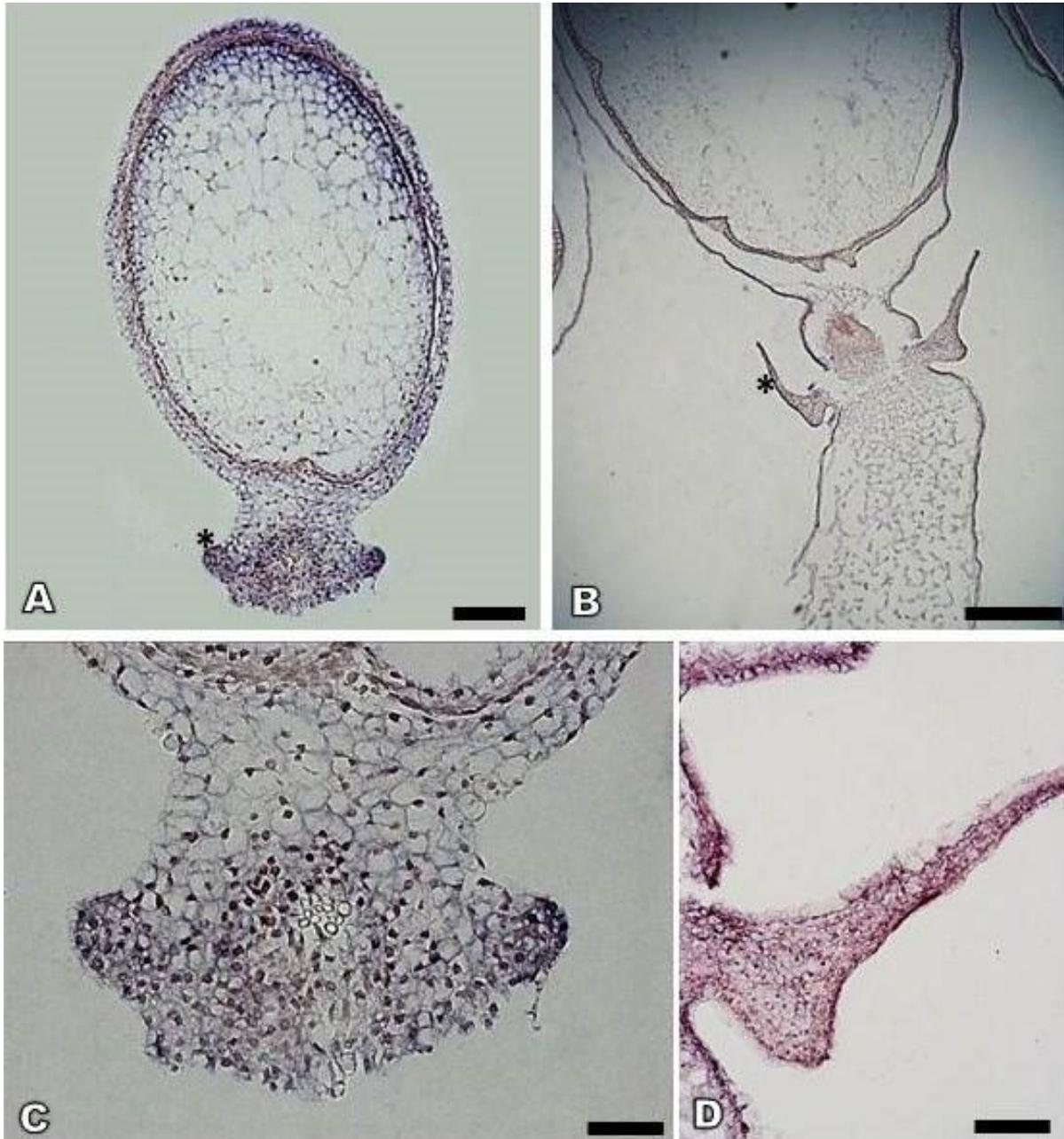


Transcritos de *PHB* foram detectados em ambos os tegumentos nos estádios iniciais de seu desenvolvimento e na região do funículo, apresentando sinal próximo ao ruído de fundo em células da camada mais externa do tegumento externo em formação (**Figura 14 A e B**). Ao longo do desenvolvimento a expressão de *PHB* nos tegumentos se restringe ao tegumento interno ao longo de toda sua extensão, até a região micropilar. Na antese é nítido o sinal restrito ao tegumento interno, algumas células da camada mais externa do nucelo e a uma região específica entre o funículo e o óvulo, onde se desenvolve o arilo e em algumas células da camada externa do tecido vascular (**Figura 14 C**). Na região do arilo, é possível observar a clara distinção entre as células do arilo (marcadas) e células de regiões como o tegumento externo, o início da rafe e a continuidade do funículo (não marcadas) (**Figura 14 D**). Após a polinização, durante o desenvolvimento da semente, observa-se o sinal de hibridização de *PHB* no tegumento interno e na região do arilo quase que exclusivamente (**Figura 15 A e C**) aos 7 dias. A partir de então a intensidade do sinal diminui sendo detectado em todo o arilo, com exceção da camada mais interna (voltada para semente) aos 12 dias após a polinização (**Figura 15 B e D**). Dos 14 dias após a polinização em diante os cortes longitudinais de sementes não apresentaram mais sinal de hibridização.

**Figura 14:** Hibridização *in situ* de *PHB* em secções longitudinais de óvulos de *Passiflora edulis*. **A-B.** Expressão de *PHB* em óvulos em dois estádios pré-antese; **C.** Expressão de *PHB* em óvulo antese; **D.** Detalhe da expressão de *PHB* no primórdio do arilo no óvulo na antese. pa = primórdio do arilo; te = tegumento externo; ti = tegumento interno. Barras: **A-B, D** = 50  $\mu$ m; **C** = 100  $\mu$ m



**Figura 15:** Hibridização *in situ* de *PHB* em secções longitudinais de sementes de *Passiflora edulis*. **A-B.** Expressão de *PHB* em sementes 7 dias (**A**) e 12 dias após a polinização (**B**); **C-D.** Detalhe da expressão de *PHB* no arilo 7 dap (**C**) e 12 dap (**D**). Asteriscos (\*) indicam o arilo. Barras: **A, D** = 100  $\mu\text{m}$ ; **B** = 500  $\mu\text{m}$ ; **C** = 40  $\mu\text{m}$

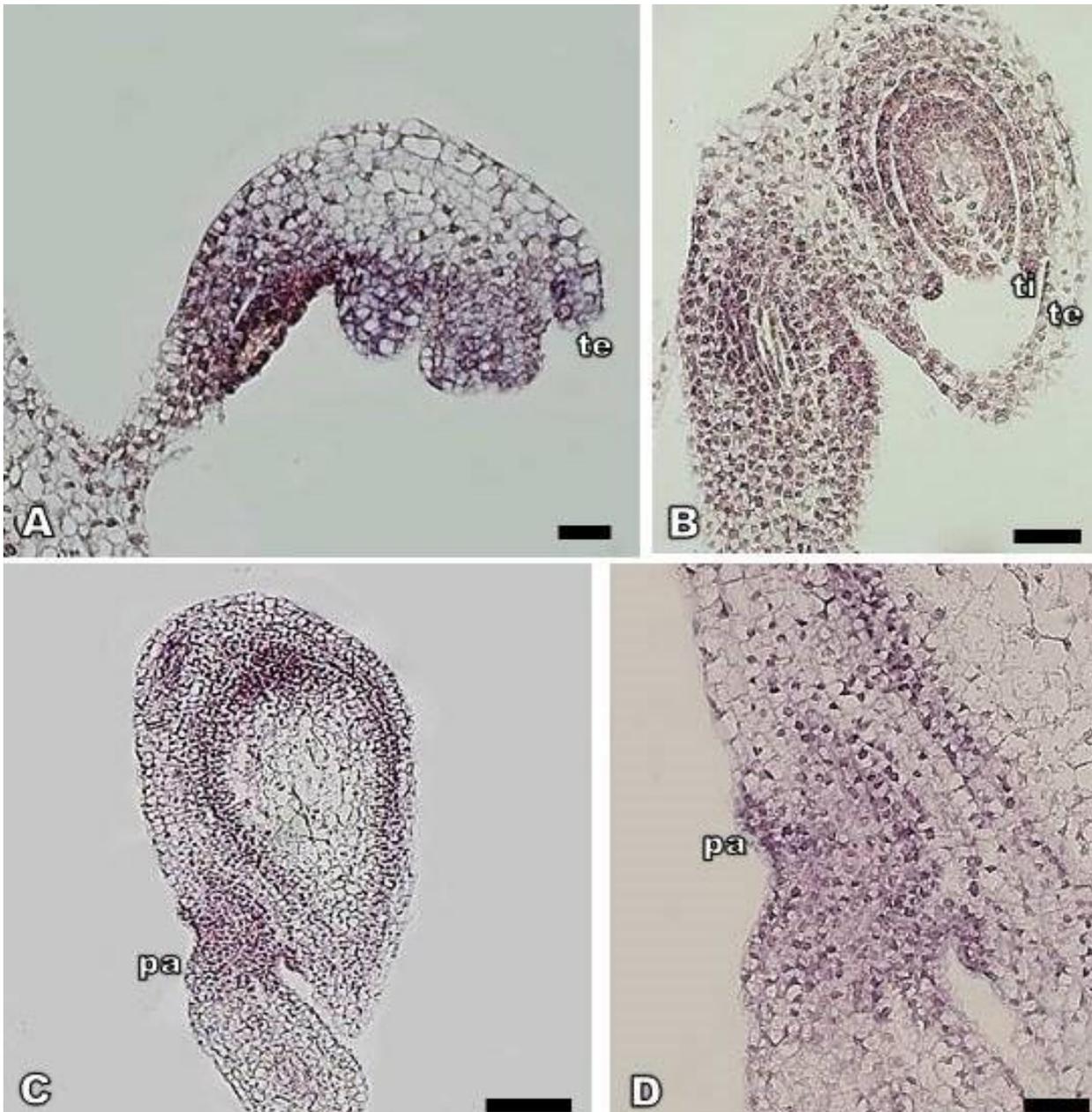


A expressão de *WUS* só foi observada nos estádios pré-antese e antese, estando ausente durante o desenvolvimento da semente. Inicialmente observou-se o sinal de *WUS* no funículo e na porção distal de tegumentos e nucelo em desenvolvimento (**Figura 16 A**). Quando os tegumentos crescem no sentido de iniciar a formação da micrópila, detectou-se sinal de hibridização de *WUS* menos intenso e mais restrito a região central do óvulo, nucelo e

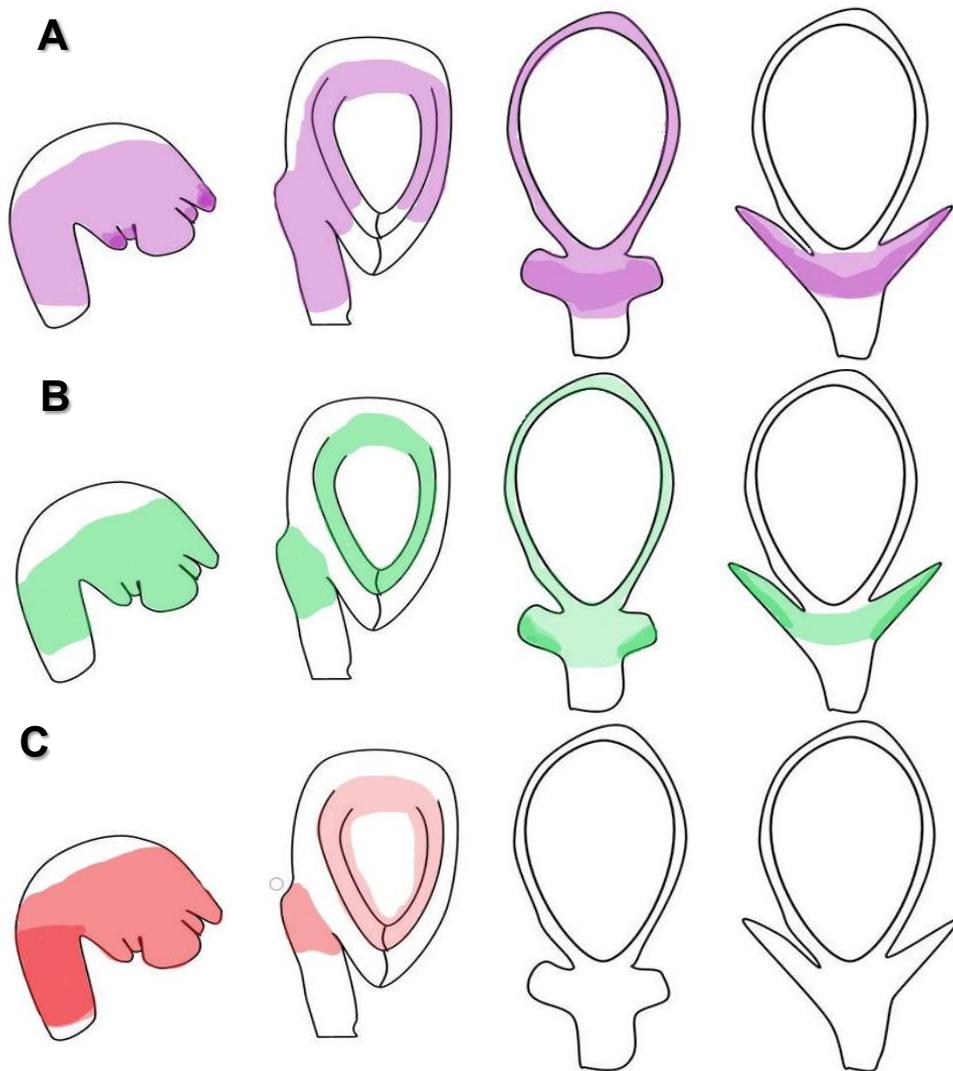
tegumento interno, bem como na região entre funículo e rafe onde ocorrerão as primeiras divisões do arilo (**Figura 16 B**). No óvulo em antese o sinal de *WUS* foi detectado na calaza, tegumento interno e região do arilo (**Figura 16 C e D**).

Os padrões de expressão observados para os três genes estudados são resumidos na **Figura 17**. Nenhum sinal acima do ruído de fundo foi observado quando a hibridização utilizou sondas “sense” para os três genes analisados (**Figura 18**).

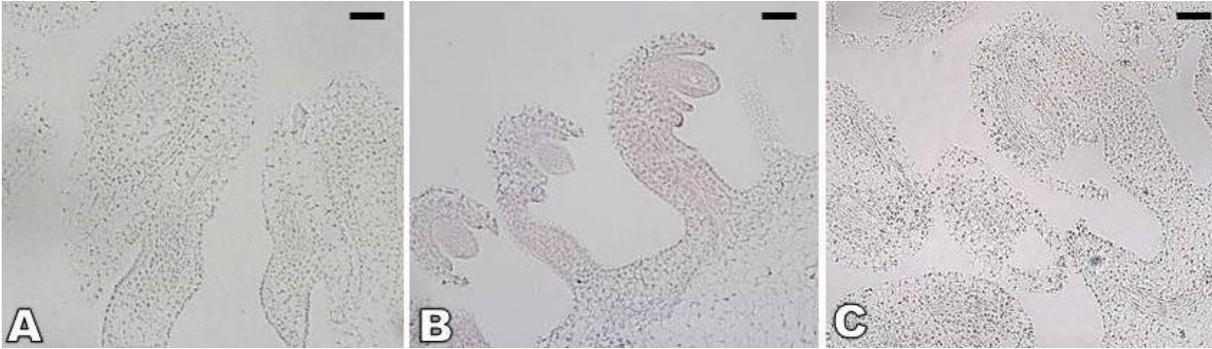
**Figura 16:** Hibridização *in situ* de *WUS* em secções longitudinais de óvulos de *Passiflora edulis*. **A-B.** Expressão de *WUS* em óvulos em dois estádios pré-antese; **C.** Expressão de *WUS* em óvulo na antese; **D.** Detalhe da expressão de *WUS* no primórdio do arilo no óvulo na antese. pa = primórdio do arilo; te = tegumento externo; ti = tegumento interno. Barras: **A**= 20  $\mu\text{m}$ ; **B, D** = 40  $\mu\text{m}$ ; **C** = 100  $\mu\text{m}$



**Figura 17:** Diagrama resumindo os padrões de expressão observados através de hibridização *in situ* de *PeINO* (A) *PePHB* (B) e *PeWUS* (C) em óvulos e sementes de *Passiflora edulis*



**Figura 18:** Hibridização *in situ* em óvulos de *Passiflora edulis*, utilizando como controle negativo sondas “sense” de *PeINO* (A) *PePHB* (B) e *PeWUS* (C) em secções longitudinais de óvulos em desenvolvimento. Barras = 50  $\mu$ m



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Características morfoanatômicas do desenvolvimento do arilo em *Passiflora edulis* e sarcotesta em *Punica granatum*

Em *Passiflora edulis*, o início do desenvolvimento do arilo se dá por divisões celulares periclinais na epiderme em uma região de transição entre o funículo e o óvulo, na altura da micrópila. Essas primeiras divisões ocorrem durante o desenvolvimento do óvulo em paralelo à megagametogênese e após a formação da micrópila, pelos tegumentos inteiramente desenvolvidos. No período que segue, a região do primórdio do arilo passa a apresentar intensa divisão celular, até que, ao final da organização do saco embrionário, no óvulo maduro, se apresenta como uma estrutura anelar na base do óvulo entre rafe e funículo. Em *Passiflora calcarata* os primórdios do arilo foram observados no funículo, logo abaixo da região micropilar durante o desenvolvimento do óvulo, mais precisamente simultâneo à fase de tétrade do megásporo (RAJU, 1956), momento anterior ao observado neste trabalho em *P. edulis*. Em *P. suberosa*, o primórdio do arilo foi observado a partir de divisões celulares periclinais na camada dérmica apenas no rudimento seminal maduro, formando uma pequena projeção circular na base do funículo, contornando a rafe (SILVÉRIO; TORMES; MARIATH, 2009).

Após a formação da estrutura anelar, durante pré-antese e antese, não são observadas alterações no arilo como se o desenvolvimento cessasse até o recebimento de sinais que desencadeiem a segunda fase do desenvolvimento do arilo. Em outras duas passifloráceas a redução da atividade meristemática na região do arilo foi observada nesse mesmo período, assim como no período seguinte, após a polinização (DATHAN; SINGH, 1972; RAJU, 1956). A duração do período entre a polinização e a fertilização varia de acordo com a espécie, como observado em 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. O crescimento do arilo foi observado neste período após a polinização, no entanto não foi possível identificar se necessariamente já havia ocorrido a fertilização. Recentemente, foi descrito que a liberação do conteúdo do tubo polínico é suficiente para a indução da expressão de genes envolvidos nas divisões e expansões celulares que resultam no aumento de tamanho do óvulo e no início da formação dos tegumentos da

semente, independente da fertilização (KASAHARA et al., 2016), o que estabelece uma nova fase reprodutiva entre o direcionamento do tubo polínico e a dupla fertilização (KASAHARA et al., 2017). Acredita-se que a retomada no desenvolvimento do arilo deve-se à reativação de atividade meristemática (RODRIGUEZ-RIAÑO; VALUTEÑA; ORTEGA-OLIVENCIA, 2006) e esta pode ser desencadeada da mesma forma que o tegumento da semente, após a entrada do tubo polínico na micrópila e a partir sinalização desencadeada por este evento.

Na segunda fase de seu desenvolvimento o arilo cresce gradualmente ao redor da base do óvulo/semente em direção ao polo calazal da semente em desenvolvimento, a estrutura aumenta em espessura e comprimento até envolver por completo a semente. Em *P. edulis* as células da camada interna (voltada para o óvulo/semente) 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. No período que segue nenhuma diferenciação da estrutura é 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 no 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).

Em *Punica granatum* o início do desenvolvimento da estrutura carnosa só foi observado após a polinização, não havendo eventos relacionados ao seu desenvolvimento durante o desenvolvimento de óvulos e seus tegumentos. O óvulo maduro apresenta a camada mais externa do tegumento externo mais conspícua, suas células se diferenciam das demais por serem maiores, mais regulares e vacuolizadas. Após a polinização, ao longo do desenvolvimento da semente esta mesma camada se diferencia, predominantemente por alongamento celular e com poucas divisões, sem a formação de novas camadas. O alongamento anticlinal destas células, de paredes celulares finas, se dá de maneira rápida, sendo que a camada aumenta muitas vezes o seu tamanho em curto período de tempo. Pujari e Rane (2015) e Wetzstein, Porter e Ravid (2015) também observaram que a porção carnosa das sementes de *P. granatum* é formada a partir do alongamento radial, em direção ao exterior da semente, da camada epidérmica da testa. As células desta camada se tornam aquosas, translúcidas e com paredes finas, que aumentam muitas vezes o seu comprimento inicial, ficando túrgidas ao longo do desenvolvimento (PUJARI; RANE, 2015), enquanto a parede da superfície externa é espessa e coberta por cutícula (WETZSTEIN; PORTER; RAVID, 2015), conforme também foi observado neste trabalho. Adicionalmente Pujari e Rane (2015)

descrevem que a sarcotesta se desenvolve mais rápido do que as demais células que formam a semente.

Ainda que Corner (1976) tenha mencionado a romã como exemplo típico de semente sarcotestal, como são poucos os estudos que caracterizam a morfoanatomia desta estrutura em romã, muitos trabalhos se referem a ela, como arilo, principalmente os estudos com enfoque horticultural (WETZSTEIN et al., 2011; CHEN et al., 2017), que aparentemente utilizam o termo arilo para se referirem às estruturas carnosas em geral. A mesma controvérsia ocorre em outras espécies que apresentam sarcotesta, como *Carica papaya*. Segundo Santos et al. (2009), o escasso conhecimento do desenvolvimento das sementes de mamoeiro levou alguns autores a denominarem a camada que envolve a semente de arilo, porém, assim como em romã, ela é formada pelo próprio tegumento. Além da discussão em relação à terminologia das estruturas carnosas, houve também um debate em relação à evolução das mesmas. Corner (1976) considera o arilo mais primitivo, enquanto Van der Pijl (1982) considera que a sarcotesta é mais primitiva e a partir dela derivaram-se as outras diferentes estruturas carnosas, como arilo e ariloides. O fato de magnólia, espécie considerada basal, apresentar sarcotesta indica que esta característica pode ser primitiva entre as angiospermas (BOUMAN, 1984).

A caracterização morfoanatômica demonstrou que a origem e desenvolvimento de arilo e sarcotesta é completamente distinta. A sarcotesta de *P. granatum* surge a partir de uma camada de células já existente no tegumento externo do óvulo maduro, envolvendo a semente desde o início de seu desenvolvimento e conectada às camadas subjacentes, com a maior parte de seu desenvolvimento ocorrendo após a polinização. O arilo de *P. edulis*, apresenta duas fases de desenvolvimento, uma pré-antese e outra pós-fertilização, tem origem a partir de divisões da camada dérmica e subepidérmica de uma região de transição entre funículo e rafe, que formam uma estrutura anelar envolvendo a base do óvulo e posteriormente cobrindo a semente, gradativamente, sem que suas células apresentem conexão física com a testa da semente, assemelhando-se com o desenvolvimento de um órgão lateral. Em vista da variedade de estruturas carnosas presentes em diversas espécies, análises morfoanatômicas caracterizando o desenvolvimento de óvulos e sementes, focando na ontogênese destas estruturas, mostram-se ferramentas muito úteis no esclarecimento de debates envolvendo a nomenclatura de arilos e arilóides. Complementarmente, a caracterização de aspectos moleculares de seu desenvolvimento pode esclarecer se os mesmos grupos de genes são recrutados para a formação de estruturas de origens anatômicas distintas, além de demonstrar possíveis homologias entre elas e auxiliar em estudos filogenéticos.

## 6.2 Padrão de expressão de *WUS*, *PHB* e *INO* durante o desenvolvimento do arilo em *Passiflora edulis*

A expressão dos três ortólogos de *INO*, *PHB* e *WUS* foi detectada nos tecidos analisados em *P. edulis* através das duas técnicas utilizadas neste trabalho, hibridização *in situ* e RT-qPCR. A escolha da análise destes três genes se baseou no fato de serem considerados marcadores de identidade tecido-específicos devido aos seus padrões de expressão, sendo *WUS* um marcador de identidade meristemática e *PHB* e *INO* marcadores de identidade de tegumento (SIEBER et al., 2004).

A expressão de *PeWUS* foi observada em todos os estádios de desenvolvimento analisados, porém em níveis variáveis. De acordo com os resultados da RT-qPCR de ovários a expressão de *PeWUS* foi constante com um possível aumento na antese. Em *Arabidopsis* *WUS* é expresso desde os estádios iniciais do desenvolvimento de primórdios dos óvulos, mais especificamente na região distal (oposta à placenta) e que mais tarde se torna o nucelo, determinando a atividade meristemática das células subjacentes (GROSS-HARDT et al., 2002). No entanto, esses autores não detectaram transcritos de *WUS* após a organização do saco embrionário (GROSS-HARDT et al., 2002). A manutenção da expressão de *PeWUS* até a antese pode ser explicada por *WUS* ser necessário para a manutenção da atividade meristemática que dá origem aos tegumentos (SIEBER et al., 2004; GROSS-HARDT et al., 2002), e em *P. edulis*, por haver a produção de uma estrutura extra, o arilo, tardiamente em relação aos tegumentos, essa atividade meristemática precisa ser mantida por mais tempo pela expressão de *WUS*. Neste trabalho, sinais de hibridização de *PeWUS* foram detectados no funículo de óvulos em desenvolvimento e especificamente na região do primórdio do arilo na antese, indicando o papel de *PeWUS* na sinalização responsável pela formação do arilo em *P. edulis*, assim como acontece na formação dos tegumentos em *Arabidopsis*. Gross-Hardt et al. (2002) induziram a expressão de *WUS* na calaza, com o promotor de *ANT*, o que resultou na formação de estruturas semelhantes a tegumentos no funículo, assim como a detecção de expressão de *WUS* no funículo, o que não ocorre em plantas selvagens. A expressão de *WUS* não é reportada em tecidos de sementes em desenvolvimento, porém *WUS* é um conhecido fator de transcrição expresso no meristema apical caulinar do embrião (MAYER et al., 1998), isso explica o fato de níveis de *PeWUS*, observados por RT-qPCR, aumentarem aos 21 dias após a polinização, em sementes de *P.*

*edulis*, sendo que seus transcritos não são detectados nos tecidos analisados por hibridização *in situ* (tegumentos da semente, arilo e funículo).

Em ovários de *P. edulis*, observamos um padrão de expressão de *PePHB* diferente entre os estádios por RT-qPCR. Os níveis de expressão chegam a ser de duas a quatro vezes maiores ao longo do desenvolvimento do óvulo, quando comparados ao óvulo maduro, na antese. Essa redução da expressão de *PePHB* pode ser explicada pelo fato de que na antese, seus transcritos estavam restritos ao tegumento interno, enquanto em estádios anteriores a expressão é detectada nos dois tegumentos. De fato, a expressão de *PHB* é considerada específica no tegumento interno do óvulo em *Arabidopsis*, porém a expressão é detectada desde os primeiros estádios do desenvolvimento do óvulo (KELLEY; SKINNER; GASSER, 2009; SIEBER et al., 2004). Nos quatro primeiros estádios de desenvolvimento do óvulo analisados, *PePHB* se expressou também no tegumento externo e no funículo. O mesmo padrão de expressão é observado em *Arabidopsis*, no mutante para ganho de função *phb-1d/PHB* (SIEBER et al., 2004). Adicionalmente, na antese a expressão de *PePHB* na rafe e funículo é claramente exclusiva na região do primórdio do arilo, o que indica a participação de *PHB* na formação do arilo. Padrão de expressão semelhante ao de *PeWUS* foi observado em *PePHB* nas sementes em desenvolvimento. Nestas há um aumento nos níveis de transcritos

aos 21 dias após a polinização, mesmo sem a detecção de sinal de hibridização de *PePHB* nas sementes e arilo nesse estágio. É importante observar que nas análises por RT-qPCR de sementes inteiras, estas continham o embrião. *PHB* é expresso em embriões de *Arabidopsis* ao longo do desenvolvimento, com altos níveis na região adaxial dos cotilédones (EMERY et al., 2003; MCCONELL et al., 2001), sendo que em *P. edulis*, aos 21 dias após a polinização, os embriões encontram-se no estágio de coração, coincidindo com o início da formação dos cotilédones.

Assim como *PHB*, *INO* também parece estar implicado no desenvolvimento do arilo em *P. edulis*, uma vez que a expressão de *PeINO*, nas hibridizações *in situ*, é bem clara e localizada na região do primórdio do arilo durante o desenvolvimento do óvulo. *INO* é essencial para o crescimento do tegumento externo e sua expressão polarizada, na região abaxial da calaza é também responsável pelo crescimento assimétrico do tegumento (VILLANUEVA et al., 1999). Ainda na antese, diferentemente de *PePHB*, a expressão de *PeINO* se estende pelo comprimento do funículo. Também foi observada certa polarização na expressão de *PeINO*, seus transcritos foram detectados em ambos os tegumentos do óvulo completamente desenvolvido, porém restritos a 2/3 do comprimento do tegumento a partir da

região calazal, deixando de ser detectado na região próxima à micrópila. Expressão polarizada na porção calazal do tegumento, também foi observada apenas em estádios iniciais do desenvolvimento do tegumento externo de *Amborella trichopoda*, uma angiosperma basal (ARNAULT et al., 2018). Nos estádios anteriores à antese, *PeINO* apresenta expressão mais generalizada ao longo dos tegumentos, o que não é observado na maioria das espécies em que a expressão de *INO* foi analisada, observando-se padrão de expressão bem conservado, sempre na região abaxial do tegumento externo do óvulo (revisado por GASSER; SKINNER, 2019). *Nymphaea alba*, angiosperma basal, parece ser uma exceção, sendo que a expressão do homólogo de *INO* foi observada também no tegumento interno e no ápice do nucelo. Um padrão de expressão não abaxializado de genes *YABBY* também é encontrado em algumas espécies de Poaceae, nas quais alguns membros da família gênica são expressos adaxialmente, centralmente, ou até mesmo ao longo dos órgãos laterais (revisado por YAMAGUCHI; TSUKAYA, 2010).

Após a polinização, *PeINO* é expresso de maneira constante nas sementes em desenvolvimento e nessas fases sua expressão é detectada nos tegumentos e no arilo. Não foi observado o aumento da expressão de *PeINO* nas sementes do último estágio de desenvolvimento. Diferentemente de *PHB* e *WUS*, *INO* não se expressa em embriões, sendo a abaxialidade nos cotilédones regulada por outros membros da família *YABBY* (SIEGFRIED et al., 1999).

A detecção da expressão de *WUS*, *PHB* e *INO* durante o desenvolvimento de óvulos de *P. edulis* demonstra a conservação dos mesmos na formação dos tegumentos nessa espécie, mesmo apresentando algumas diferenças em relação ao padrão de expressão, quando comparado ao que é descrito para outras espécies, nas quais os padrões de expressão são bem caracterizados. A presença de transcritos destes genes em diversos estádios de desenvolvimento do arilo indica que os ortólogos em *P. edulis* estão envolvidos na determinação da identidade e no crescimento dessa estrutura e que seu desenvolvimento envolve os mesmos mecanismos presentes no desenvolvimento de tegumentos, o que sugere homologia entre o arilo e os tegumentos. Coen e Magnani (2018) também interpretaram que a detecção da expressão de genes marcadores de tegumentos no arilo, indica que os mesmos devem ser considerados tegumentos, como o caso da expressão de genes B-sister no arilo de *Taxus baccata* (LOVISETTO et al., 2013).

A análise de genes que controlam o desenvolvimento de tegumentos em arilos de angiospermas e gimnospermas é essencial para a melhor compreensão da natureza e evolução destas estruturas, consideradas tegumentos extranumerários, e pouca atenção tem sido dada a elas quando se estuda a evolução do tegumento externo (COEN; MAGNANI, 2018).

De fato, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dos tegumentos têm sido investigados, até o momento, principalmente em *Arabidopsis*, o que não permite a investigação sobre quais mecanismos já estavam presentes nas primeiras angiospermas e quais só surgiram posteriormente em linhagens de *Arabidopsis* (ARNAULT et al., 2018). Uma exceção é o gene *INO*, cujos ortólogos foram investigados em outras eudicotiledôneas como espécies dos gêneros *Impatiens* (MCABEE et al., 2005), *Prunus* (LORA et al., 2015) e da família Solanaceae (SKINNER et al., 2016), em grupos chamados basais como *Nymphaeales* (YAMADA et al., 2003), *Amborella* (ARNAULT et al., 2018) e a magnolídea *Annona squamosa* (LORA et al., 2011). O padrão de expressão de *INO* mostrou-se conservado entre as espécies, sempre na camada mais externa do tegumento externo ou do único tegumento no caso das espécies unitégmicas, e em alguns dos casos também foi demonstrada a conservação da função de *INO*.

Apesar de toda a informação disponível a respeito da expressão e função de *INO* em tegumentos, poucos trabalhos realizaram estas análises de expressão gênica de *INO* ou outros genes especificamente em estruturas carnosas, como o arilo. As informações disponíveis a este respeito foram resultado de estudos da expressão de genes em estruturas carnosas em duas espécies de gimnospermas e em magnólia, demonstrando o envolvimento de alguns MADS-box no desenvolvimento dessas estruturas, sejam elas arilo (LOVISETTO et al., 2012; 2013) ou sarcotesta (LOVISETTO et al., 2012; 2013; 2015a; 2015b). No entanto estes estudos não analisaram arilos em seus estádios iniciais, antes da antese, e focaram em genes envolvidos no desenvolvimento e amadurecimento de frutos, supondo que as estruturas carnosas são análogas aos frutos. Apesar de não fornecerem informações sobre genes responsáveis pela identidade do arilo, estas análises demonstraram a conservação de mecanismos moleculares entre arilo e sarcotesta.

Recentemente, a disponibilidade de dados genômicos e transcritômicos de romã (QIN et al., 2017; XUE et al., 2017; CHEN et al., 2017; YUAN et al., 2018), espécie que apresenta sarcotesta, mostrou-se mais uma ferramenta para esclarecer mecanismos moleculares de desenvolvimento de estruturas carnosas. Análises preliminares demonstraram, por exemplo, que o ortólogo de *INO* no genoma de *Punica granatum*, provavelmente passou por uma seleção positiva durante sua evolução, o que pode ter contribuído para a expansão da

camada externa do tegumento e seu desenvolvimento em uma sarcotesta carnosa (QIN et al., 2017). Essas informações, associadas a dados morfoanatômicos, podem contribuir na elucidação de diferenças na ontogênese dos diferentes tipos de estruturas carnosas associadas às sementes, como sarcotesta e arilo.

Arilo é considerado um tegumento adicional devido à sua localização no óvulo e por envolver total ou parcialmente a sementes (MAHESHWARI, 1950; CORNER, 1976; KAPIL; VASIL, 1963), no entanto a homologia entre o arilo e tegumentos extranumerários é incerta (ENDRESS, 2011). O padrão de expressão de ortólogos de *PHB*, *INO* e *WUS* durante o desenvolvimento do óvulo e arilo e a detecção de expressão de *INO* e *PHB* no primórdio do arilo, demonstrados neste trabalho, são indícios de homologia entre os tegumentos e o arilo.

A homologia com tegumentos também foi sugerida para o arilo de *Taxus baccata* (COEN; MAGNANI, 2018), apesar de serem necessários mais estudos da expressão gênica em arilos, incluindo outros genes cruciais para o desenvolvimento dos tegumentos, bem como em outras espécies em que também ocorra a morfogênese do arilo. Tais indícios não apenas auxiliam a elucidar os processos que levam a formação do arilo, como contribuem para a compreensão da evolução do óvulo e seus tegumentos, entre as angiospermas.

Análises de dados moleculares e registros fósseis tentam explicar a origem evolutiva do óvulo. Uma hipótese aceita por alguns autores sugere que o óvulo funciona como um eixo meristemático, sendo os tegumentos órgãos laterais produzidos por ele (MATHEWS; KRAMER, 2012) e que o tegumento externo teria evoluído a partir de uma estrutura que envolvia os óvulos das precursoras das angiospermas, chamada cúpula, que por sua vez é uma folha modificada. Essa ideia é suportada pela expressão de *WUS* no nucelo, que indica uma analogia à zona central do meristema apical, que por sua vez produz órgãos laterais próprios, os tegumentos, assim como as folhas produzidas a partir do meristema apical caulinar (GROSS-HARDT et al., 2002). Corroborando esta hipótese, análises do padrão de expressão de genes durante o desenvolvimento de óvulos demonstra uma semelhança entre os mecanismos de desenvolvimento e formação de padrão em folhas e tegumentos. Assim como as folhas, ambos os tegumentos necessitam do estabelecimento de identidade abaxial e adaxial para o desenvolvimento apropriado e o padrão de expressão de genes *YABBY*, *KANADI* e *HDZIPIII* é conservado entre estes órgãos laterais, assim como o padrão de *WUS* e *ATS* (SKINNER et al., 2004; GROSS-HARDT et al., 2002; KELLEY et al., 2009 e VILLANUEVA et al., 1999). Adicionalmente a presença de características semelhantes às de óvulos nas cúpulas das plantas consideradas precursoras das angiospermas e a expressão de diferentes genes nos tegumentos interno e externo corroboram a ideia de que o tegumento

externo é derivado da cúpula (GASSER; SKINNER, 2019) e, portanto, também pode ser considerado uma folha modificada. No entanto, alguns autores chamam atenção para o fato de que a perda da função de YABBY no tegumento externo impede a formação da estrutura, enquanto que a mesma perda de função em órgãos laterais vegetativos não impede a formação de folhas, indicando que o tegumento externo, e conseqüentemente a cúpula, podem derivar de uma lamina foliar e não de uma folha inteira. (DOYLE, 2008; COEN; MAGNANI, 2018).

Os padrões de expressão gênica aqui observados, no arilo em *P. edulis*, indicam que o arilo possui identidade de tegumento, podendo-se inferir que o arilo seria também um órgão lateral produzido a partir do nucelo e, portanto, uma folha modificada. O mesmo pode ser sugerido ao comparar os aspectos morfoanatômicos do desenvolvimento de tegumentos, folhas e arilo. Os três tipos de órgãos compartilham características como crescimento determinado, simetria bilateral, primórdios surgindo nas laterais da estrutura apical (representada pelo meristema caulinar para folhas e nucelo para tegumentos e arilo).

Os resultados observados aqui subsidiam a possibilidade de estudar estes mesmos genes em outras espécies com arilo, ou outros tipos de estruturas carnosas, visando à análise da conservação destes mecanismos, bem como a manipulação destes genes em *Passiflora*, visando investigar a conservação da função dos mesmos durante o desenvolvimento do arilo.



## 7. CONCLUSÕES

A caracterização morfoanatômica do desenvolvimento das estruturas carnosas associadas às sementes em *Passiflora edulis* e *Punica granatum* demonstrou a origem anatômica distinta entre sarcotesta e arilo, sendo a sarcotesta, em *P. granatum*, oriunda do tegumento externo da semente e o arilo, em *P. edulis*, oriundo de uma região de transição entre funículo e óvulo, com primórdios presentes desde o óvulo não fertilizado.

A expressão dos genes *INO*, *PHB* e *WUS*, fundamentais para o desenvolvimento e formação de padrão no óvulo, foi observada em *P. edulis*. Estes genes mostraram diferenças espaciais e temporais no seu padrão de expressão e estão envolvidos no desenvolvimento do arilo. A detecção destes genes em *P. edulis*, confirma a existência de conservação de mecanismos moleculares no desenvolvimento do óvulo entre as angiospermas.

O envolvimento de genes responsáveis pela identidade e formação de padrão em tegumentos e órgãos laterais, no desenvolvimento do arilo, indicam paralelos entre estas estruturas e podem auxiliar a elucidar aspectos evolutivos em estudos futuros.

Os genes *INO*, *PHB* e *WUS* demonstraram-se potenciais candidatos para futuros experimentos de transformação genética visando o estudo funcional dos mesmos no desenvolvimento do arilo em *P. edulis*.

*P. edulis* e *P. granatum* apresentam em suas sementes estruturas acessórias de grande importância ecológica e econômica, ausentes em plantas atualmente consideradas como modelo, e devido à disponibilidade de ferramentas moleculares e biotecnológicas e aos dados expostos neste trabalho, demonstram-se potenciais modelos para estudo do desenvolvimento de tais estruturas.



## REFERÊNCIAS

- 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.
- ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, B.; SANTANA, E. N.; DO NASCIMENTO, A. V. S.; CARVALHO, M. G.; OTONI, W. C.; ZERBINI, F. M. Transgenic passion fruit expressing RNA derived from Cowpea aphid-borne mosaic virus resistant to passion fruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 33–38, 2005.
- ANGENENT, G. C.; COLOMBO, L. Molecular control of ovule development. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, p. 228–232, 1996.
- 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.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 438 p.
- ARNAULT, G.; VIALETTE, A. C. M.; ANDRES-ROBIN, A.; FOGLIANI, B.; GÂTEBLÉ, G.; SCUTT, C. P. Evidence for the extensive conservation of mechanisms of ovule integument development since the most recent common ancestor of living angiosperms. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. 1352, 2018.
- 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, v. 15, p.854, 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.
- BALZERGUE, S.; BORREGA, N.; YANSOUNI, J.; BRUNAUD, V.; DELANNOY, E.; FAURE, J. D.; DUBREUCQ, B. Low RNAseq microdissected plant tissue. In: International Symposium on Microgenomics, 1., 2014, Paris, França. Session 3b: Microgenomics and microRNA and NGS.
- BASU, A.; PENUGONDA, K. Pomegranate juice: A heart healthy fruit juice. **Nutrition Reviews**, Burlington, v. 67, p. 49–56, 2008.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M.; HALMER, P. **The Encyclopedia of Seeds: science, technology and uses**. Wallingford: CABI, 2006.

BOUCHEZ, D.; HÖFTE, H. Functional genomics in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 118, p. 725–732, 1998.

BOUMAN, F. The ovule. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 123–157.

BOWMAN, J. L. The YABBY gene family and abaxial cell fate. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 17–22, 2000.

BOWMAN, J. L.; SMYTH, D. R. CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. **Development**, Cambridge, v. 126, p. 2387-2396, 1999.

BRAMBILLA, V.; KATER, M.; COLOMBO, L. Ovule integument identity determination in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 3, n. 4, p. 246-247, 2008.

BRAUTIGAM, A.; MULLICK, T.; SCHLIESKY, S.; WEBER, A. P. Critical assessment of assembly strategies for non-model species mRNA-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C(3) and C(4) species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3093-3102, 2011.

CALIGIANI, A.; BONZANINI, F.; PALLA, G.; CIRLINI, M.; BRUNI, R. Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 65, p. 277-283, 2010.

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO - CEAGESP. São Paulo, 2010. Disponível em <<http://www.ceagesp.gov.br/>> Acesso em: 20 jan. 2015

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO - CEAGESP. São Paulo, 2017. Disponível em <<http://www.ceagesp.gov.br/guia-ceagesp>> Acesso em: 20 jan. 2019

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

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

CHAUHAN, R. P.; KANWAR, K. Biotechnological advances in pomegranate (*Punica granatum* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, Columbia, v. 48, p. 579–594, 2012.

COEN, O.; MAGNANI, E. Seed coat thickness in the evolution of angiosperms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Heidelberg, v.75, p. 2509–2518, 2018.

COLOMBO, L.; BATTAGLIA, R.; KATER, M. M. *Arabidopsis* ovule development and its evolutionary conservation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 13, p. 444-450, 2008.

- CORNER, E.J.H. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. v. 2, 552 p.
- CORREA, M. F.; PINTO, A. P.; C.; REZENDE, J. A. M.; HARAKAVA, R.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of sweet passion fruit (*Passiflora alata*) and reactions of the transgenic plants to Cowpea aphid borne mosaic virus. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, p. 813–821, 2015.
- CUCINOTTA, M.; COLOMBO, L.; ROIG-VILLANOVA, I. Ovule development, a new model for lateral organ formation. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 27, n. 5 p. 117, 2014.
- CUTLER, D. F.; BOTHA, C. E. J.; STEVENSON, D. W. **Plant anatomy: an applied approach**. Malden: Blackwell Publishing, 2007. 300 p.
- CUTRI, L.; DORNELAS, M. C. PASSIOMA: Exploring expressed sequence tags during flower development in *Passiflora spp.* **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 2012, p. 510549, 2012. doi: 10.1155/2012/510549.
- 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.
- 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**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003. p. 253-279.
- DOYLE, J. A. Integrating molecular phylogenetic and paleobotanical evidence on origin of the flower. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 169, n. 7, p. 816–843, 2008.
- EMBRAPA. **Romã será alvo de pesquisa para produção de ingredientes antioxidantes** Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2011/janeiro/4a-semana/roma-sera-alvo-de-pesquisa-para-producao-de-ingredientes-antioxidantes>> Acesso em: 20 ago. 2012.
- EMERY, J. F.; FLOYD, S. K.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N. P.; IZHAKI, A.; BAUM, S. F.; BOWMAN, J. L. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. **Current Biology**, London, v. 13, p. 1768-1774, 2003.
- ENDRESS, P. K. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. **Annals of Botany**, Oxford, v. 107, p. 1465–1489, 2011.

ENUGUTTI, B.; KIRCHHELLE, C.; OELSCHNER, M.; TORRES RUIZ, R. A.; SCHLIEBNER, I.; LEISTER, D.; SCHNEITZ, K. Regulation of planar growth by the *Arabidopsis* AGC protein kinase UNICORN. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 109, p. 15060–15065, 2012.

ENUGUTTI, B.; SCHNEITZ, K. Genetic analysis of ectopic growth suppression during planar growth of integuments mediated by the *Arabidopsis* AGC protein kinase UNICORN. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, p. 2-9, 2013. doi: 10.1186/1471-2229-13-2.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. New York: John Wiley & Sons, 1997.

ESPANHA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente - MAGRAMA. **Anuario de Estadística Agraria, 2014**. Madri, 2014 Disponível em: <[http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2013/AE\\_2013\\_Completo.pdf](http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2013/AE_2013_Completo.pdf)> Acesso em: 21 jan. 2015.

FAHN, A.; WERKER, E. Anatomical mechanisms of seed dispersal. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. 1. ed. New York: Academic Press, 1972. v. 1, p. 152-221.

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.

FINET, C.; FLOYD, S. K.; CONWAY, S. J.; ZHONG, B.; SCUTT, C. P.; BOWMANB, J. L. Evolution of the YABBY gene family in seed plants. **Evolution & Development**, Malden, v. 18, n. 2, p. 116-126, 2016.

GASSER, C. S.; BROADHVEST, J.; HAUSER, B. A. Genetic analysis of ovule development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 1–24, 1998.

GASSER, C. S.; SKINNER, D. J. Development and evolution of the unique ovules of flowering plants. In: GROSSNIKLAUS, U. **Plant development and evolution**. 1. ed. New York: Academic Press, 2019. chap. 4, p. 373-399. (Current Topics in Developmental Biology, 131).

GAUTAM, V.; SINGH, A.; SINGH, S.; SARKAR, A.K. An Efficient LCM-Based Method for Tissue Specific Expression Analysis of Genes and miRNAs. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 21577, 2016. doi: 10.1038/srep21577.

GONÇALVES, B.; HASSON, A.; BELCRAM, K.; CORTIZO, M.; MORIN, H.; NIKOVICS, K.; VIALETTE-GUIRAUD, A.; TAKEDA, S.; AIDA, M.; LAUFS, P.; ARNAUD, N. A conserved role for CUP-SHAPED COTYLEDON genes during ovule development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 83, p. 732–742, 2015.

GRAHAM, S. A.; HALL, J.; SYTSMA, K.; SHI, S. Phylogenetic analysis of the Lythraceae based on four gene regions and morphology. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 166, n. 6, p. 995-1017, 2005.

GREAR, J. W.; DENGLER, N. G. The seed appendage of *Eriosema* (Fabaceae). **Brittonia**, Bronx, v. 28, p. 281–288, 1976.

GROSS-HARDT, R.; LENHARD, M.; LAUX, T. *WUSCHEL* signalling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 16, p. 1129–1138, 2002.

HAECKER, A.; GROSS-HARDT, R.; GEIGES, B.; SARKAR, A.; BREUNINGER, H.; HERRMANN, M.; LAUX, T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 131, p. 657-668, 2004.

HERRERA, C. M. Seed dispersal by animals: a role in Angiosperm diversification? **The American Naturalist**, Chicago, v. 133, p. 309-322, 1989.

HOLLAND, D.; HATIB, K.; BAR-YA'AKOV, I. Pomegranate: Botany, horticulture, breeding. **Horticultural Reviews**, Westport, v. 35, p. 27–191, 2009.

HONAAS, L. A.; WAFULA, E. K.; YANG, Z.; DER, J. P.; WICKETT, N. J.; ALTMAN, N. S.; TAYLOR, C. G.; YODER, J. I.; TIMKO, M. P.; WESTWOOD, J. H.; DEPAMPHILIS, C. W. Functional genomics of a generalist parasitic plant: laser microdissection of host-parasite interface reveals host-specific patterns of parasite gene expression. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, p. 9, 2013. doi: 10.1186/1471-2229-13-9

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **PAM - Produção Agrícola Municipal, 2012**. [online]. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. Acesso em: 20 out. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **PAM - Produção Agrícola Municipal, 2017**. [online]. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam>. Acesso em: 20 jan. 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agro 2017 - Resultados Preliminares**. [online]. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>. Acesso em: 5 mar. 2019.

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 143, p. 397-405, 2012.

JBIR, R.; HASNAOUI, N.; MARS, M.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, p. 231–237, 2008.

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.

KANWAR, K.; DEEPIKA, R.; CHAUHAN, R. Agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation and regeneration of *Punica granatum L.* In: National Seminar on Physiological and Biotechnological Approaches to Improve Plant Productivity, 2008, Haryana. Hisar, India: CCSHAU, 2008. p. 52.

KAPIL, R. N.; VASIL, I. K. Ovule. In: MAHESHWARI, P. (Ed.). **Recent advances in the embryology of angiosperms**. Delhi: International Society of Plant Morphologists, 1963. p. 41–67.

KASAHARA, R. D.; NOTAGUCHI, M.; NAGAHARA, S.; SUZUKI, T.; SUSAKI, D.; HONMA, Y.; MARUYAMA, D.; HIGASHIYAMA, T. Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. **Science Advances**, Washington, DC, v. 2 n. 10, 2016. DOI: 10.1126/sciadv.1600554

KELLEY, D. R.; SKINNER, D. J.; GASSER, C. S. Roles of polarity determinants in ovule development. **The Plant Journal**. Oxford, v. 57, p. 1054-1064, 2009.

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.

KOZLOWSKI, T. T.; GUNN, C. R. Importance and characteristics of seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. 1. ed. New York: Academic Press, 1972. v. 1, p.1-18.

KUBO, T.; FUJITA, M.; TAKAHASHI, H.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; KURATA N. Transcriptome analysis of developing ovules in rice isolated by laser microdissection. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 54, n. 5, p. 750–765, 2013.

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

LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 109, p. 177–206, 2007.

LAUX, T.; MAYER, K. F. X.; BERGER, J.; JÜRGENS, G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 122, p. 87-96, 1996.

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**, Lancaster, v. 144, n. 2, p. 562–574, 2007.

LENGYEL, S.; GOVE, A. D.; LATIMER, A. M.; MAJER, J. D.; DUNN, R. R. Convergent evolution of seed dispersal by ants, and phylogeny and biogeography in flowering plants: A global survey. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Amsterdam, v. 12, p. 43–55, 2010.

LIU, S.; LI, A.; CHEN, C.; CAI, G.; ZHANG, L.; GUO, C.; XU, M. De Novo Transcriptome Sequencing in *Passiflora edulis* Sims to Identify Genes and Signaling Pathways Involved in Cold Tolerance. **Forests**, Basel, v. 8, p. 435–449, 2017.

LORA, J.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. Transition from two to one integument in *Prunus* species: expression pattern of *INNER NO OUTER (INO)*, *ABERRANT TESTA SHAPE (ATS)* and *ETTIN (ETT)*. **New Phytologist**, London, v. 208, n. 2, p. 584–595, 2015.

LORA, J.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M.; GASSER, C. S. Seedless fruits and the disruption of a conserved genetic pathway in angiosperm ovule development. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 108, p. 5461–5465, 2011.

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

LOVISETTO, A.; BALDAN, B.; PAVANELLO, A.; CASADORO, G. Characterization of an AGAMOUS gene expressed throughout development of the fleshy fruit-like structure produced by *Ginkgo biloba* around its seeds. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 15, p. 139, 2015a. doi: 10.1186/s12862-015-0418-x.

LOVISETTO, A.; MASIERO, S.; RAHIM, M. A.; MENDES, M. A. M.; CASADORO, G. Fleshy seeds form in the basal Angiosperm *Magnolia grandiflora* and several MADS-box genes are expressed as fleshy seed tissues develop. **Evolution & Development**, Malden, v. 17, p. 82–91, 2015b.

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, v. 112, p. 535–544, 2013.

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**, Chicago, v. 29, n. 1, p. 409–419, 2012.

MACK, A. L. Did fleshy fruit pulp evolve as a defense against seed loss rather than as a dispersal mechanism? **Journal of Biosciences**, Berlin, v. 25, p. 93–97, 2000.

MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. New York: McGraw-Hill, 1950.

MANDERS, G.; OTONI, W. C.; D'UTRA VAZ, F. B.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 697–702, 1994.

MARS, M. Pomegranate plant material: Genetic resources and breeding, a review. In: MELGAREJO, P.; MARTÍNEZ-NICOLÁS, J. J.; MARTÍNEZ-TOMÉ, J. (Ed.). **Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region**: Advances in research and technology. Zaragoza: CIHEAM Options Méditerranéennes, 2000. p. 55-62. (Séminaires Méditerranéens. Serie A, 42).

MARTÍNEZ, J. J.; MELGAREJO, P.; HERNÁNDEZ, F.; SALAZAR, D. M.; MARTÍNEZ, R. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, p. 241–246, 2006.

MATHAN, J.; BHATTACHARYA, J.; RANJAN, A. Enhancing crop yield by optimizing plant developmental features **Development**, Cambridge, v. 43, p. 3283-3294, 2016.

MAYER, K.F.; SCHOOF, H.; HAECKER, A.; LENHARD, M.; JURGENS, G.; LAUX, T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 805-815, 1998.

MCABEE, J. M.; HILL, T. A.; SKINNER, D. J.; IZHAKI, A.; HAUSER, B. A.; MEISTER, R. J.; VENUGOPALA REDDY, G.; MEYEROWITZ, E. M.; BOWMAN, J. L.; GASSER, C. S. *ABERRANT TESTA SHAPE* encodes a KANADI family member, linking polarity determination to separation and growth of *Arabidopsis* ovule integuments. **The Plant Journal**. Oxford, v. 46, p. 522-531, 2006.

MCCONNELL, J. R.; EMERY, J.; ESHED, Y.; BAO, N.; BOWMAN, J.; BARTON, M. K. Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. **Nature**, London, v. 411, p. 709-713, 2001.

MEISTER, R. J.; KOTOW, L. M.; GASSER, C. S. SUPERMAN attenuates positive INNER NO OUTER autoregulation to maintain polar development of *Arabidopsis* ovule outer integuments. **Development**, Cambridge, v. 129, p. 4281–4289, 2002.

MELGAREJO, M. P.; MARTÍNEZ, V. R. **El granado**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1992. 163 p.

METZKER, M. L. Sequencing technologies- the next generation. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MORSE, A. M.; CARBALLO, V.; BALDWIN, D. A.; TAYLOR, C. G.; MCINTYRE, L. M. Comparison between NuGEN's WT-Ovation Pico and one-direct amplification systems. **Journal of Biomolecular Techniques**, Santa Fé, v. 21, n. 3, p. 141-147, 2010.

MUNHOZ, C. F.; SANTOS, A. A.; ARENHART, R. A.; SANTINI, L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VIEIRA, M. L. C. Analysis of plant gene expression during passion fruit–*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. **Annals of Applied Biology**, Warwicks, UK, v. 167, p. 135–155, 2015.

MUNHOZ, C. F.; COSTA, Z. P.; CAUZ-SANTOS, L. A.; REÁTEGUI, A. C. E.; RODDE, N.; CAUET, S.; DORNELAS, M. C.; LEROY, P.; VARANI, A. M.; BERGÈS, H.; VIEIRA, M. L. C. A gene-rich fraction analysis of the *Passiflora edulis* genome reveals highly conserved microsyntenic regions with two related Malpighiales species. **Scientific Reports**, London, v. 8, p. 13024, 2018.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, New Jersey, v. 4, p.1-13, 2010.

NAIK, S. N.; CHAND, P. K. Tissue culture-mediated biotechnological intervention in pomegranate: a review. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, p. 707–721, 2011.

NELSON, T.; TAUSTA, S. L.; GANDOTRA, N.; LIU, T. Laser microdissection of plant tissue: What you see is what you get. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 181-201, 2006.

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 and Cell Physiology**, Kyoto, v. 48, n. 1, p. 3-7, 2007.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 21, p. 3–11, 2010.

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.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n.9, e. 45, p. 2002-2007, 2001.

PUJARI, K. H.; AND RANE, D. A. Concept of seed hardness in pomegranate - I) anatomical studies in soft and hard seeds of 'muskat' pomegranate. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1089, p. 97-104, 2015.

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**, Bareilly, v. 35, p. 126–138, 1956.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

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

RODRIGUEZ-RIÑO, 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.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers In: MISENER S., KRAWETZ S.A. (Ed.). **bioinformatics methods and protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 365–386. (Methods in Molecular Biology, 132).

SABLOWSKI, R. Plant stem cell niches: from signalling to execution. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, p. 4–9, 2011.

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.

SANTOS, S. A.; SILVA, R. F.; PEREIRA, M. G.; ALVES, E.; MACHADO, J. C.; BORÉM, F. M.; GUIMARÃES, R. M.; MARQUES, E. R. Estudos morfo-anatômicos de sementes de dois genótipos de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 116–122, 2009.

SARIKHANI, H.; VALIPOUR, M.; CHEHREGANI, A. Fruit growth and patterns of lignification in the seeds of four Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 89, n. 3, p. 268–272, 2014.

SCHNABLE, P. S.; HOCHHOLDINGER, F.; NAKAZONO, M. Global expression profiling applied to plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 50–56, 2004.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, New York, v. 9, p. 671–675, 2012.

SCHNEITZ, K.; HÜLSKAMP, M.; PRUITT, R. E. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared wholemount tissue. **The Plant Journal**. Oxford, v. 7, p. 731–749, 1995.

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

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOÇKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, London, v. 7, n. 3, p. 14, 2006. doi: 10.1186/1471-2199-7-3

SCORZA, L. C. T. **Crescimento de gavinhas e identificação de genes potenciais diferenciadores de órgãos e meristemas em *Passiflora edulis* (Passifloraceae)**. 2015. 145 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SEERAM, N. P.; SCHULMAN, R. N.; HEBER, D. (Ed.). **Pomegranates: Ancient roots to modern medicine**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

SIEBER, P.; GHEYSELINCK, J.; GROSS-HARDT, R.; LAUX, T.; GROSSNIKLAUS, U.; SCHNEITZ, K. Pattern formation during early ovule development in *Arabidopsis thaliana*. **Developmental Biology**, v. 273, p. 321–334, 2004.

SIEGFRIED, K. R.; ESHED, Y.; BAUM, S.; OTSUGA, D.; DREWS, G. N.; BOWMAN, J. L. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 126, n. 18, p. 4117–4128, 1999.

SIMSEK, O.; DONMEZ, D.; KACAR, Y. A. RNA-Seq Analysis in Fruit Science: A Review. **American Journal of Plant Biology**, New York, v. 2, n. 5, p. 1-7, 2017.

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.

SILVEIRA, S. R.; DORNELAS, M. C.; MARTINELLI, A. P. Perspectives for a framework to understand aril initiation and development. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1919, 2016.

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

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

SINGH, S. K.; SINGH, A.; SINGH, N. V.; RAMAJAYAM, D. Pomegranate: Tissue culture and biotechnology. In: \_\_\_\_\_. **Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology**. New Dehli, India: Global Science Books, 2010. p. 35-44.

SKINNER, D. J.; HILL, T. A.; GASSER, C. S. Regulation of ovule development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. S32–S45, 2004,

SKINNER, D. J.; BROWN, R. H.; KUZOFF, R. K.; GASSER, C. S. Conservation of the role of INNER NO OUTER in development of unitegmic ovules of the Solanaceae despite a divergence in protein function. **BMC Plant Biology**, London, v. 16, p. 143, 2016. doi: 10.1186/s12870-016-0835-z.

SRIVASTAVA, L. M. **Plant growth and development - Hormones and environment**. New York: Elsevier Science, 2002. 772 p.

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

TEIXEIRA-DA-SILVA, J. A.; RANA, T. S.; NARZARY, D.; VERMA, N.; MESHRAM, D. T.; RANADE, S. A. Pomegranate biology and biotechnology: A review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 160, p. 85–107, 2013.

TERAKAMI, S.; MATSUTA, N.; YAMAMOTO, T.; SUGAYA, S.; GEMMA, H.; SOEJIMA, J. *Agrobacterium*-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. *nana*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 1243–1251, 2007.

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

VALIZADEHKAJI, B.; ABBASIFAR, A. Transformation of pomegranate (*Punica granatum* L.) a difficult-to-transform tree. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Atlanta, v. 10, p. 46-52, 2017.

VALIZADEHKAJI, B.; ERSHADI, A.; TOHIDFAR, M. *Agrobacterium*-mediated transformation of pomegranate (*Punica granatum* L.) ‘Yousef Khani’ using the *gus* reporter gene. **International Journal of Horticultural Science and Technology**. Karaj, Iran, v. 1, p. 31–41, 2014.

VAN DER GRAAFF, E.; LAUX, T.; RENSING, S. A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. **Genome Biology**, London, v.10, p.248, 2009. doi: 10.1186/gb-2009-10-12-248.

VAN DER PIJL, L. **Principles of dispersal in higher plants**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1972.

VERMA, N.; MOHANTY, A.; LAL, A. Pomegranate genetic resources and germplasm conservation: a review. In: CHANDRA, R. (Ed.). **Pomegranate. Fruit, vegetable and cereal science biotechnology**. Ikenobe: Global Science Books, 2010. p. 120-125.

VILLANUEVA, J. M.; BROADHVEST, J.; HAUSER, B. A.; MEISTER, R. J.; SCHNEITZ, K.; GASSER, C. S. *INNER NO OUTER* regulates abaxial-adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 3160–3169, 1999.

VROEGRIJK, I. O. C. M.; VAN DIEPEN, J. A.; VAN DEN BERG, S.; WESTBROEK, I.; KEIZER, H.; GAMBELLI, L.; HOTENCILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J.; ZONDAG, G. C. M.; ROMIJIN, J. A.; HAVEKES, L. M.; VOSHOL, P. J. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 49, p. 1426–1430, 2011.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants**: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. 1992 onwards. Version: 19th August 2014. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>> Acesso em: 21 jan. 2015.

WELLMER, F.; RIECHMANN, J. L. Gene network analysis in plant development by genomic technologies. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 49, p. 745-759, 2005.

WETZSTEIN, H. Y.; RAVID, N.; WILKINS, E.; MARTINELLI, A. P. A morphological and histological characterization of bisexual and male flower types in pomegranate. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 136, p. 83-92, 2011a.

WETZSTEIN, H. Y.; YI, W.; PORTER, J. A.; RAVID, N. Flower position and size impact ovule number per flower, fruitset and fruit size in Pomegranate. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 138, p. 159-166, 2013.

WETZSTEIN, H. Y.; ZHANG, Z.; RAVID, N.; WETZSTEIN, M. E. Characterization of attributes related to fruit size in pomegranate. **Hort Science**, St. Joseph, v. 46, n. 6, p. 908–912, 2011b.

WETZSTEIN, H. Y.; PORTER, J. A.; RAVID, N. Reproductive biology of pomegranate from flowering to fruit development. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1089, p. 21-28, 2015.

WU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; HUANG, H.; FOLTA, K.; LU, J. Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 234, 2010. doi: 10.1186/1471-2229-10-234

YAMADA, T.; ITO, M.; KATO, M. Expression pattern of *INNER NO OUTER* homologue in *Nymphaea* (water lily family, Nymphaeaceae). **Development Genes and Evolution**, Berlin, v. 213, p. 510–513, 2003.

YAMAGUCHI, T.; TSUKAYA, H. Evolutionary and developmental studies of unifacial leaves in monocots: *Juncus* as a model system. **Journal of Plant Research**, Heidelberg, v. 123, n. 1, p. 35-41, 2010.

ZAREI, A.; ZAMANI, Z.; FATAHI, R.; MOUSAVI, S.; SALAMI, A.; AVILA, C.; CÁNOVAS, F. M. Differential expression of cell wall related genes in the seeds of soft-and hard-seeded pomegranate genotypes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 205, p. 7–16, 2016.

ZHANG, S.; DING, F.; HE, X.; LUO, C.; HUANG, G.; HU, Y. Characterization of the ‘Xiangshui’ lemon transcriptome by de novo assembly to discover genes associated with selfincompatibility. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 290, n. 1, p. 365-375, 2015.

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



**APÊNDICE**



## Apêndice A - Sequências de cDNA e respectivas proteínas dos genes estudados no presente trabalho

Legenda de cores para sequências de aminoácidos:

região a 5' não traduzida (5' UTR)

região a 3' não traduzida (3'UTR)

CDS ; **START CODON STOP CODON**

Primer **FW RV**

### >PeINO

cacaacgtttagcttcagtgtgtctctctctctctctctcagggcaggaaaaccgttcaggggcaaga  
 cccaaaccttcaagctaggtggcagacagc**ATG**TC AATGTTGAACCATCTCTTTGATCTTCC  
 GGAGCAGATTTGCTATGTGCAGTGTGGTTTTTTCGCCACAATTTTACTGGTAAGCGTTCCAT  
 GCAGCAGCTTATCCATGGTGGTGACTGTGAGATGTGGGCACTGCACTAGCCTCCTCTCTGTC  
 AACATGATGAAAGTCTCTTTTGTCCCTCTCCATCTCTTGGCTTCGTTCGCTTGGACATGATGA  
 TCATGGGAAAGAAGAAGCTGGTCCCTGAAGAAGCAGATGCTCAGAAGTCCCTTGGACACTCGCA  
 GCTCATTAATGGTGTCTCTTCTGACAACGAAGAAGAGGATCACAAACCTGTGAACCGTGTA  
 ATTAACAAACCTCCTGAGAAGAGGCAGAGACCCGTCTGCTTATAACCGTTTCATCAAAGA  
 AGAGATCAAAGGCTCAAAGCTGAAA**ACCCGAACATGGCTCACAAAG**GAAGCCTTCAGTACAG  
 CAGCCAAGAATTGGGCCAATTTTCCACAGATGAACTACAGTGAAGATGGAGAGAGCTGCGGC  
 CATGAAGAAGACGGCGGGAC**ATGGTTCGCTGATGCACATG**AGGTCAACAGAGAAAGCAAAGG  
 TTTCCACGAAAGAAAGGCTCCAAGGCATTCCATTTGGACAAAGACACCCTTCGAG**TAA**caca  
 caagtcttttagaaactgccattacaaggaacctgttcctcatttagagatagggttgagtt  
 tcgaatctcatgtcctttttgtgggtagatgctctcgggaatgagaagcactgcatgttat  
 cagca**ggactactgatcaacgagcgt**aagaaaattgaagtttttcaaggtacttgatgattg  
 atgtatgctgtcgaactcaaggaaccatttcattatttcaagccttctcgccctatattaag  
 cagcttaatggtattgcctcgatgattgattagtggtcaaaaaaaaa

### >PeINO protein

MSMLNHLFDLPEQICYVQCGFCATILLVSVPCSSLSMVVTVRCGHCTSLLSVNMMKVSEFVPL  
 HLLASSLGHDDHGKEEAGPEEADAQKSLDTRSSLMVLSSDNEEEDHNPVNRVINKPPEKRQR  
 APSAYNRFIKEEIKRLKAENPNMAHKEAFSTAAKNWANFPQMNYSEDGESCGHEEDGGTWCA  
 DAHEVNRESKGFHERKAPRHSIWTKTPFE

### >PePHB

tagtaacagaagagaaaaagagagttcatttttatgtttatgtggtgttgtaagtaagaatc  
 acgagatcggcgtctaagataaaaagaccacaggagcccctcatagtc caagtttgtgttctt  
 aagacgcacagtagaaggaggtagagaaaagaaagataaaaaggatcaaaagagaaaaaaaag  
 ccacaaccactctcaatctgatgaagctgcagggaggaggctcctcttgaggagagagcct  
 gcctgaccgacgccacagtcacgtcaaaaaacaccacctacggcagcagcaacggagaagaa  
 gagcctaaccaaggacaccaccttttccactgaaaaatattgcctttcccatctacactacc  
 ttgagtcctgaaaacaacatctgggtcttgcttcttttttattcccttttaagtttatact  
 ccgagcacctgaaaccagtatctgggtctcttggttctaaggaaggccttttagatcacttagg  
 tgcttcttct<sup>1</sup>**tggggttggtgtgtgtA**<sup>2</sup>**TG**<sup>1</sup>**GCTCTTCTATGCACAA**<sup>2</sup>CAAAGAAGCAAGTA  
 GCAAGCAAATGGATTCAAGCAAGTATGTGAGGTATACTCCAGAGCAGGTTGAGGCATTAGAG  
 AGGGTTTAT<sup>1</sup>**ACAGAATGCCCAAAGCCCAG**<sup>1</sup>TTCTCTGAGAAGGCAGCAGCTCATTAGAGAAT  
 GTCCCATTCTCTTAATATCGAGCCCAAACAGATCAAAGTCTGGTTTCAAACCGCAGATGT  
 CGAGAAAAGCAGAGGAAAGAATCATCCCGTCTCCAGACAGTGAACAGAAAACACTGACTGCCAT  
 GAATAAGCTGTTGATGGAAGAGAATGACCGCTTGCAGAAGCAGGTTTCTCATTTGGTTTATG

AAAATGGTTTTATGCGACAGCAACTGCACAGTGCTTCAGCAACGACCACAGACAATAGCTGT  
 GAGTCTGTGGTCATGAGTGGTCAG<sup>2</sup>CACCAACAACAGCAAAACCC<sup>2</sup>AACACCTCAGCATCCTC  
 AACGGGATGCTAATAACCCAGCTGGTCTTCTTGCAATAGCAGAGGAGACCCTGGCAGAGTTC  
 CTTTCCAAGGCTACTGGAAGTGTGTCAACTGGGTCCAAATGATTGGGATGAAGCCTGGTCC  
 GGATTCTATTGGCATTGTTGCTGTTTCCCGCAACTGCAGTGGGGTAGCAGCACGAGCCTGCG  
 GCCTCGTGAGTCTAGAGCCCACGAAGGTTGCTGAAATTCTCAAAGATCGTCCATCTTGGTTT  
 CGTGACTGTAGATGCCTTGATGTTTTGAGTGTAATTCCCACAGGAAGTGGGGGAACAATTGA  
 GCTTGTGTATATGCAGACATACGCTCCAACAACCTTTGGCCGCTGCACGGGACTTTTGGACAC  
 TGAGATACACAACAACCTCTGGAAGATGGCAGCCTCGTTATATGCGAGAGGTCATTGACTTCC  
 TCCACTGGTGGCCCAACAGGTCCTCCTGCTTCAAGTTTTGTAAGAGCTGAGATGCTTCCAAG  
 TGGCTATCTTGTTCGACCATGTGAAGGTGGCGGCTCCATCATTACATTGTTGATCATGTTG  
 ATTTGGATGTTTGGAGTGTTCCTGAAGTTTTGAGGCCACTCTATGAATCATCCAAAATTCTG  
 GCACAAAAGATGACCATGGCTGCAATGCGGCATATAAGACAGATTGCTCAGGAGACCAGTGG  
 AGAAATTC AATATGGTGGTGGTTCGCCAGCCTGCTGTTTTAAGGACATTTAGCCAGAGACTCT  
 GCCGGGGCTTCAATGATGCTGTTAATGGGTTTGCAGACGATGGATGGTCTGTTCTGGGTAGT  
 GATGGTGTGGAGGATGTAACCATTTGTTGTAACCTCTTCTCCAAGTAAATTTCTTGGGTCACA  
 ATACAGTGCATCTATGTTCCCAACGTTTGGAGGTGGAGTGCTTTGTGCAAAGGCCTCAATGC  
 TTCTCCAGAATGTTCCCCCTGCATTGCTAGTTCGCTTTCTTCGTGAACATCGCTCAGAGTGG  
 GCTGATTATGGGGTTGACACGTACTCTGCTGCTTGTCTTAAAGCCAGTCCATATGCTGTTCC  
 TTGTGCACGACCTGGTGGCTTCCCTAGTAGCCAGGTCATTCTACCTCTCGCTCACACCATAG  
 AGCAGGAGGAGTTCCCTCGAGGTTGTTCCGGCTGGAAGGTCATGCATTTTCCCTGAAGATGTG  
 GCTTTGGCACGTGATATGTACTTATTACAGTTATGCTGCGGGGTTGATGAAAATGCTGTTGG  
 GTCATGTGCTCAACTTGTCTTCGCACCTATTGATGAATCTTTTGTGATGATGCTCCTTTGT  
 TGCCATCTGGTTTTTCGTGTCATAACCTGGATCCAAAACAGATGGCCCTGCTGCAACTCGG  
 ACATTGGATTTGGCCTCTACACTTGAGACGGGAACTGCTGGTACACGTCCGTCTTGTGAAGC  
 TGACGCCAGTTTTAACCTTAGGTCCGTGCTGACAATTGCTTTCCAATCACTTTCGAGAATC  
 ACTTGCGGGAAAATGTGGCTGCGATGGCTCGACAGTATGTGCGCAGTGTGTGGGTTCAAGT  
 CAAAGGGTTGCTATGGCTATTTCCCATCCCGACTTGGCTCCCATTTGGGTCCAAAGTCCCT  
 TCCTGGCTCTCCTGAGGCTCTTACTCTGGCACAATGGATTACACAGAAGCTACAGGATCCATA  
 CTGGGGGAGAGCTATTTTCAAGTAGATTCTGAAGGTGATGCTTTGCTGAAGCAACTTTGGCAC  
 CATTAGATGCAATCATGTGCTGCTCGTTGAAAACAAATGCATCTCCAGTTTTCACTTTTGC  
 AAACCAAGCTGGACTTGACATGCTGGAACTACTCTTGTAGCTCTTCAAGATATTATGCTAG  
 ACAAATTTCTAGACGAGGCCGGCCGAAAATTTCTCTGCTCTGAGTTCTCCAAGATTATGCAA  
 CAGGGATTTGCATATCTGCCAGCCGGAATATGTGTATCTAGCATGGGTAGGCCAGTCTCCTA  
 CGAGCAAGCTGTTGCATGGAAAGTCTCAACGATGATGATTGAATCACTGCCTCGCTTTTA  
 TGTTTCAATGAAGTGGTCTTTGTG**TGAttgactgaggagagatacttctgagaacctgtctac**  
**tttctatctatttatgttatttatttacttctaatatcagtaccttaagaccttgagataca**  
**tgaatgaagttcatgagtac**

### >PePHB protein

MALSMHNKEASSKQMDSSKYVRYTPEQVEALERVYTECPKPSLRRQQLIRECPILSNIEPK  
 QIKVWFQNRRCREKQRKESSRLQTVNRKLTAMNKLLMEENDRLQKQVSHLVYENGFMRQQLH  
 SASATTTDNSCESVVMMSGQHQQQNPTPQHPQRDANNPAGLLAIAEETLAEFLSKATGTAVN  
 WVQMIGMKPGPDSIGIVAVSRNCSGVAARACGLVLSLEPTKVAEILKDRPSWFRDCRCLDVLS  
 VIPTGSGGTIELVYMQTYAPTTLAAARDFWTLRYTTTTLEDGSLVICERSLTSSTGGPTGPPA  
 SSFVRAEMLPSGYLVRPCEGGGSI IHIVDHVDLDVWSVPEVLRPLYESSKILAQKMTMAAMR  
 HIRQIAQETSGEIQYGGGRQPAVLRFTFSQRLRCRGNDAVNGFADDGWSVLGSDGVEDVTIVV  
 NSSPSKFLGSQYSASMFPTFGGGVLCAKASMLLQNVPPALLVRFLEHRSEWADYGVDTYSA  
 ACLKASPYAVPCARPGGFSSQVILPLAHTIEQEFLVVRLLEGHAFSPEDVALARDMYLLQ  
 LCCGVDENAVGSCAQLVFAPIDESFADDAPLLPSGFRVIPLEPKTDGPAATRDLDLASTLET  
 GTAGTRPSCEADASFNLRSVLTIAFQFTFENHLRENVAAARQYVRSVVGSVQRVAMAI SPS

RLGSHLGPKSLPGSPEALTLAQWIHRYSYRIHTGGELFQVDSEGDALLKQLWHHSDAIMCCSL  
 KTNASPVFTFANQAGLDMLETTLVALQDIMLDKILDEAGRKILCSEFSKIMQQGFAYLPAGI  
 CVSSMGRPVSYEQAVAWKVLNDDDSNHCLAFMFMNWSFV

### >PeWUS

ctcatttcccactagctagggttccttttatcagcttcagcgtatgctatatgtgagcatca  
 tctatctccctaccctgaaatggttaggtgctgccattttctgaatcgcctccactgtccata  
 ctattattattcatgttccttcaaccccgaaccgtttgcttttcttcagcactaccatcgtc  
 ttgacgaggagcatttccctcaagagagtgaggactacgtcaagacgtacagagaagtttat  
 caagagtgaaccgtcacttgcttttttttttgggtttttggatactcatcgtttaggcttac  
 cctagactccttctggttgctacaactactctacgttttagatcctttgtattaactccttt **tcc**  
**tctaggagacgaaccgc**gccagcttctctcttcttctgtttacttgtccagcttgagttagtt  
 ctctttgtaccaaa**ATG**TGGATGATGGGTTACAATGATGGAGGAGACCTCAACATACCGGAT  
 TCCTG**CAACAGTAGGAGGCTTAGGCC**GCTCTTTCCGAGGCCGGTTTCCTCTGCCAATATCAA  
 TTCTACTTCAGCCACTCCTTGTCTTAGCCGTCTCCATGGGAATGATTTGTTTGCCCTAAATC  
 ACCATATTGCACCTATGGCTGATCAAGGCCAAAAGAGATTACAACACACAGCCGGTTGTGGTA  
 AGCTCAAGGTGGAACCCAACACCAGAGCAGCTGAGGACCCTCGAAGAAGTGTATAA**ACGAGG**  
**GACCAGAACTCCAT**CAGCCGAGCAGATTCAACACATCACAGCACAGCTTCGTAGGTACGGAA  
 AGATTGAAGGGAAGAATGTGTTCTACTGGTTTCAAATCACAAGGCAAGAGAAAAGGCAGAAA  
 CGTCGGCGTCAATTGGAATCAGCTGCTTCTGAACACGACCAGTATCGTGACATGGAGATATT  
 CGAAAGGAAAGAATCGGGGGTTAGGACAGTTTATGATGGTGAACATAACCAAGAACTGGGTAC  
 AGTCCACAAACTGCAGTATACTACCAGAGGAATCTATATCAATCCCAAGGGCAACAAAAGCA  
 GCCATGTCAGAGTGTAGAACGGATGGATGGATCCAATTTGACAACGGAGAATTACAGCTCAG  
 AAAGGACTTTTATGGAAAGGAATGCCACGTGGCAGATGACGCAGTTGTCTTGTCCATCTACCC  
 CCCACCTCATAAACACTATGAATCCTACTTCTTCAACTAAAGCCATAGCCACTGCTACAACG  
 TCGACAGTAATAAGAACAATGGACCCGAAGGTGTTTAAAGGCACATGACCTCAACATCTTTAT  
 AGCACCACACAGAGATAATGCGCAGGGCCTGATCCACCATTTTCAGCACCAGTACGGCCATCA  
 ATGAGGAGAACGGGTGTGGGGAATCTCAAACCCTCCAAGTGTCCCTCTTTCGAAGTGGCGGA  
 GTCGACGGTAGTGAAGGAAGCACTAACGAGAAAGACACTGAGTTATCAGCTGCTGCCGCTGC  
 CATGAACGCCAACCTCACACCGTGCCAGTTTTTCGAGTTCCTCCCACTCAAGAAC**TAA**caat  
 gcctatataatttcactttatgtaacttttactatgtctgtaaaatcatgggcttgattg  
 gaacttgtttttagctggtaactggaactgctattgtggttgatgatggtttacatatca  
 taatcatataggatcagtactgcatggttgatggggataggaaaaattaagagtgattgc  
 ccgaattgtacttgaccaggtcgtttgaaccaatgaagaaaccacattataag

### >PeWUS protein

MWMMGYSDGGEFNMPDSFSGRKLKPLIPRTPPVVSPNNTSNSSPPRLGRIHGNDFFSLNHHL  
 ATMADQSKRDFHAQSVVSSRWNPTEQLRLEELYRRGTRTPSAEQIQHITAQLRRYKIE  
 GKNVIFYWFQNHKARERQKRRRQMESAAPDHQQQNRDIEIFETKESGASRTTYEGEQTKNWP  
 STNCSTLPEEAMSIQRAAKGVVAECRGDGIQYDEVELQHRNFMERNDTWQMMQLSCPSPT  
 HLINASSGTCTITTTTTATILAGAEATSTVVAGTIRTMDPNRQLIKHTDLNIFIAPYIEN  
 NIGPGLINHFSNEEDHNGYGDShQTLQLFLRNNGGESINDKETETSSAVAAAMNANFTTPY  
 QFFEFLPLKN

### >PeMON1 - SAND

tttcgtttcacgaaattacgacacacatgaccgcctcgctgaactcggactcgagctatc  
 ccgggtcgtcaaccacctaccggtcagcctcgaagcctgccgttggtttttcacgtttgatg

aaagtcaaagaattattaacgaccggttgatgaagcagcaggaaaacaacataaggaatccc  
 taatatcaaaacgcaacagcagatcgaattttatctcagcaatcaccgaattctacca**ATGT**  
 CCTCCCCCTCATCCTCTGTTGACGATCCAATCCCTTCTTCCGGGCCTTCTCTTGACCAATTC  
 CAGTCCTTAACCATCCAAAACGACGGCGTGTCCGTGCAACAGCGACAATCTTCATATAACGG  
 ATCTCTCGATGATTTTCGTTGATCAGGAGGCGATAGTCGACGGCAGAACGGATGCGAGTGGCG  
 GTACGCCGTCGAGCCCTAGCAGCAGTGGCTACGCCGGCGAGAGAGGGAGCAGCAGCGCCACG  
 TCAGGTGTTGTTCGGTGTGAACCGAGTGAAGATGAGATACAGGAAGCTGGGAGCGGAGTCGT  
 TGATGGGGTTTTGGACCCGCAGAGTACCTCGTGGGTGTCTCAAAAACAACATGCCGATGAGG  
 ATGATGCTTCCATATCATGGAGGAAAAGGAAAAAGCATTTTTTTATATTGAGTCACTCTGGC  
 AAACCAATATACTCAAGATATGGTGATGAACACAAACTCGCAGGATTCTCTGCAACATTACA  
 AGCCATAATATCATTGTGGAGAACGGATGTGATCGTGTAATAATTTGTTAGGGCGGGAAAAC  
 ACCAGGTGGTTTTTCTTGTGAAAGGACCCATTTACTTAGTTTTGTATCAGCTGCACCGAGGAG  
 CCATATGAATCATTGAAGGGGCAATTGGAGCTACTTTATGGTCAGATGATTCTCATCTTAAC  
 AAAATCCGTAAATAGATGTTTTGAGAAGAATCCAAAGTTTGATATGACACCCTTGCTCGGAG  
 GAACAGATGTTGTCTTCTCATCCCTCATCCATTCAATTTAGTTGGAACCCTGCTACATTTCTT  
 CATGCGTATACATGCCTTCCCCTTGCTTATGCAACAAGGCAAGCTGCAGGTGCCATATTGCA  
 AGATGTTGCTGAATCAGGCGTCTCTTTGCAATATTGATGTGCAAACACAAAGTTGTCAGCC  
 TTGTTGGTGCTCAAAAAGCTTCTCTTCATCCTGATGATATGCTGCTACTTTTGAACCTTCATT  
 ATGTCGTCCGAATCATTTAGGACATCTGAATCTTTTTTACCAATTTGCCTGCCAAGATATAA  
 TCCCTTGGCCTTTTTGCATGCGTATGTCCACTATTTTCGATGTTGAGACATACTTGATTTTGC  
 TTACCACCAGTTCAGATGCCTTTTATCATCTCAAGGATTGCAGGATCCGCATTGAAACAGTT  
 CTTCTCAAGTCAAATGTTCTTAGTCAAATCCAGAGATCCATGCTGGATGGTGAATGCGCAT  
 TGAGGATTTGCCACCATTGCATTGCGTGCCTTGGAGCTGCTTCTCCCCATTTAGGACAAC  
 ATAAACAAGCAACAAATTCTCCTGAGAGACTCATTTGGAATTGGTGGCCCTGCAGGACTTTGG  
 CATTTTTATGTATCGCAGTATATATCTGGATCAATATGTATCCTCTGAATTTTCTCTCCAAT  
 TAATACTTCTCAACAACAGAAAAGATTATACAGAGCTTACCAAAACCTTATGTCTCCATGC  
 ATGACAAAGGAAATGGACCCCAAAAACCTCAGTTTAGGAGAGATGAGAACTACGTCTACTC  
 TGTTGGGTACCCCGGATTTTGAACCTTATGCAGCATTGATCCACTAGCAGACAAGGCTTT  
 GGCAATAAAAACATGCAACAGGATTTGTCAATGGGTGAAGGATGTTGAGAATGAAATATTTT  
 TGCTGGGAGCAAGCCCCTTTTCATGG**TGA**cgttccaaaccatcttgtaattctacttgata  
 ctagatggtgtagcataaaatcttacaatttctttccagcagcactgattttgctta  
 tattaataatttagcaccgatttgtttctctgtacgtctaaaggttcacatagagctgcct  
 cctattggcatacagattgcaattggtgaatgcataaaatgcatttttgatgaagaattgta  
 tgattatgaaacgctaatagttacctattgtctttgccgcaacttgatgaagccaatctttt  
 tatttagtcgacgcag

**>PeMON1 - SAND**

MSSPSSSVDDPIPSSGPSLDQFQSLTIQNDGVSVQQRQSSYNGSLDDFVDQEAIVDGRTDAS  
 GGTSPSSSGYAGERGSSSATSGVVGAEPESEDEIQEAGSGVVDGVLDPQSTSWVSQKQHAD  
 EDDASISWRKRKKHFFILSHSGKPIYSRYGDEHKLAFSATLQAIISFVENGCDRVKFRVAG  
 KHQVVFLVKGPIYLVCI SCTEEPYESLKGQLELLYGQMILILTKSVNRCFEKNPKFDMTPLL  
 GGTDVVFSLSLHFSWNPATFLHAYTCLPLAYATRQAAGAILQDVAESGVLFAILMCKHKVV  
 SLVGAQKASLHPDDMLLLSNFIMSSSEFRTSESFSPICLPRYNPLAFLHAYVHYFDVETYLI  
 LLTSSDAFYHLKDCRIRIETVLLKSNVLSEIQRSMLDGMRIEDLPTIALRRPGAASPHLG  
 QHKQATNSPERLIGIGGPAGLWHFMYRSIYLDQYVSSEFSSPINTSQQQKRLYRAYQKLYVS  
 MHDKGNPHKTQFRRDENYVLLCWVTPDFELYAAFDP LADKALAIKTCNRI CQVVKDVENEI  
 FLLGASPFWS

**>PeCAC**

**ATG**CCGGTGGCTGCTTCCGCCGTCTACTTCTTGAACCTCCGCCGGTGACGTTCTTATTAACCG  
 ACTTTATCGCGACGATGTGGGCGGAAATATGGTGGACGCGTTCAGGATGCATATAATGCAAA  
 CGAAAGAACTGGGCACGTGCCCTGTGCGGCAGATTGGAGGCTGCTCTTTCTTGTACATGAGA  
 ATCAGCAACGTCTACATTGTCATTGTCGTCAGTAGCAATGCTAATGTAGCCTGTGCATTCAA  
 GTTTGTGTTGTTGAGGCAGTTGCGTTGTTCAAGTCATACTTCGGGGGAGCATTTGATGAAGATG  
 CCATCAGAAACAATTTTGTCTGATTTATGAGTTACTTGTATGAAATCATGGACTTCGGTTAC  
 CCACAGAATCTTTCTCCCGAGATTTTAAAGCTTTACATTAC**TCAAGAGGGAGTGCCTTCAC**  
 ATTCTCATCAAAGCCTACAGATAAACCTGTCCCAATGCCACTTTACAA**GTTACAGGCGCTG**  
**TTGGTTG**GCGTCGAGAAGGCCTAATGTATAAGAAAAATGAGGTTTTTCTGGATATTGTTGAA  
 AGTGTGAACCTTCTAATGTCATCAAAGGTAATGTTCTCCGATGTGATGTTACTGGAAAAAT  
 TCTAATGAAGTGCTTCTTGTCTGGAATGCCGGATCTGAAGTTGGGTTTTAAATGATAAAATTG  
 GCCTTGAGAAAGAGTCACAACTGAAATCTCGCCCCACTAAAAGTGGAAAAACAATTGAGCTC  
 GATGATGTTACTTTCCATCAATGTGTCAATTTGACAAGGTTTAAACGCAGAAAAGACTGTTAG  
 TTTTGTCCCGCCTGATGGTGAATTTGAACTAATGAAGTACCGTATCACTGAAGGGGTTAATC  
 TACCGTTTTCGGGTACTGCCAACAATCAAGGAACTTGGCCGAACACGTCTGGAAGTGAATGTT  
 AAGGTAAAGAGCGTCTTCGGTGCAAAAATGTTTGTCTTTGGTGTGTGCATCAAATTCCTGT  
 ACCAAAACAACAGCTAAAACAAGTTTCCAAGTGACATCAGGTCGAGCAAAGTACAATGCTT  
 CCATTGATTGCATAGTTTGAAGATCAGAAAATTTCTGGGCAAACCTGAGCCAACCATGAGT  
 GCCGAAATCGAGTTGATTTCTACCATGTGAGAAAAGAAGTCGTGGACAAGGCCTCCAATTCA  
 GATGGAGTTTCAGGTGCCTATGTTTACCGCATCTGGTTTACGTGTTTCGTTTCTGAAGGTAT  
 GGGAGAAGAGTGGATAACAATACAGTTGAGTGG

#### >PeCAC

MPVAASAVYFLNLRGDVLIINRLYRDDVGGNMVDAFRMHIMQTKELGTCPVRQIGGCSFLYMR  
 ISNVYIVIVVSSNANVACAFKVVVEAVALFKSYFGGAFDEDAIRNNFVLIYELLDEIMDFGY  
 PQNLSPEILKLYITQEGVRSFSSKPTDKPVPNATLQVTGAVGWRREGLMYKKNEVFLDIVE  
 SVNLLMSSKGNVLRCDVTGKILMKCFLSGMPDLKGLNDKIGLEKESQLKSRPTKSGKTIEL  
 DDVTFHQCVNLTRFNAEKTVSFVPPDGEFELMKYRITEGVNLPFRVLPTIKELGRTRLEVNV  
 KVKSVMGAKMFALGVVIKIPVPKQTAKTSFQVTSGRAKYNASIDCIVWKIRKFPQGTEPTMS  
 AEIELISTMSEKKSWTRPPIQMEFQVPMFTASGLRVRFLKVWEKSGYNTVEW



**ANEXOS**



## **Anexo A - Outras atividades realizadas durante o período do doutorado**

### **A.1 - Estágios em Universidades do exterior**

Durante o doutorado foi realizado o estágio “sanduíche” pelo período de um ano na Wageningen University & Research (WUR) em Wageningen, Holanda. O estágio teve supervisão do Prof. Dr. Richard G. H. Immink junto ao grupo Plant Developmental Systems da unidade de Biosciências da WUR, como parte de colaboração já existente entre nossos grupos de pesquisa e financiado por projeto CAPES/NUFFIC intitulado “The evolution of fruit development regulatory networks”, o qual visou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares que determinam o desenvolvimento reprodutivo em plantas. Dentre as atividades realizadas durante o estágio estão experimentos envolvendo fenotipagem, microscopia confocal, imunoprecipitação de cromatina, RT-qPCR, análise de dados RNAseq, clonagem e estudos de interação proteína-proteína baseados em levedura, entre outras metodologias comumente usadas para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na evolução e desenvolvimento de espécies de plantas e que auxiliam a desvendar a complexa rede regulatória que controla estes processos. O tipo de abordagem científica vivenciada nesse período foi extremamente importante e útil no estudo da estrutura reprodutiva diferenciada presente nas sementes de *Passiflora edulis*, bem como no melhor entendimento dos processos e fatores de transcrição envolvidos na origem e no desenvolvimento do arilo. Além disso, o trabalho realizado durante este período de colaboração resultou em um artigo publicado e manuscrito aceito para publicação, cujas referências constam no item anterior.

Anteriormente a este estágio, houve também oportunidade de um estágio de curta duração na Ohio Agricultural and Research and Development Center, Ohio State University, sob a supervisão do Prof. Christopher Taylor, com o apoio do PPG-CENA através do Programa PROEX-CAPES. Durante um período de 20 dias tive a oportunidade de realizar processamento de amostras para criosecção seguida de microdissecção a laser.

## Anexo B - Artigos publicados durante o doutorado

### B.1 - Artigo resultante de parte da presente tese de doutorado e apresentado no exame de qualificação

**SILVEIRA, S. R.**; DORNELAS, M. C.; MARTINELLI, A. P. (2016). Perspectives for a framework to understand aril initiation and development. **Frontiers in Plant Science**, 7:1919. doi: 10.3389/fpls.2016.01919

Acessível pelo link: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01919/full>

### B.2 - Artigos resultantes de participação em colaboração durante o estágio “sanduíche”

VAN ES, S.; **SILVEIRA, S. R.**; ROCHA, D.; MARTINELLI, A. P.; DORNELAS, M. C.; ANGENENT, G.; IMMINK, R. (2018). Novel functions of the *Arabidopsis* transcription factor TCP5 in petal development. **The Plant Journal**, v.94:867-879. doi:10.1111/tpj.13904

Acessível pelo link: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tpj.13904>

VAN ES, S.; VAN DER AUIWERAERT, E.; **SILVEIRA, S.**; ANGENENT, G.; VAN DIJK, A-J.; IMMINK, R. (2019). Comprehensive phenotyping reveals new interactions and functions of *Arabidopsis thaliana* TCP genes in yield determination. **The Plant Journal**, doi:10.1111/tpj.14326

Acessível pelo link: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tpj.14326>