

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

**“Morfologia, Anatomia e Imunocitoquímica da Interação entre Pólen e Estigma
em duas espécies de *Passiflora* (Passifloraceae)”**

Adriana Farias Braum

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como parte dos pré-requisitos necessários para a
obtenção do título de Mestre em Botânica.**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath
Co-Orientadora: Prof. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti**

2008

Título do Projeto:

“Morfologia, Anatomia e Imunocitoquímica da Interação entre Pólen e Estigma em duas espécies de *Passiflora* (Passifloraceae)”

Autora:

Adriana Farias Braum

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS

Orientador:

Professor Doutor Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Professor Titular

Departamento de Botânica

Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Co-Orientadora:

Professora Doutora Alexandra Antunes Mastroberti

Departamento de Botânica – Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Local de execução:

Laboratório de Anatomia Vegetal

Departamento de Botânica

Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período:

Início: Março 2006

Término: Março 2008

Sumário:

Agradecimentos.....	05
Resumo.....	06
Abstract.....	08
CAPÍTULO 1 Aspectos gerais e a família Passifloraceae: Antecedentes de diversas abordagens.....	10
1.1 Histórico da família e importância do gênero <i>Passiflora</i>	11
1.2 Taxonomia (Família Passifloraceae).....	14
1.3 Biologia Floral.....	17
1.3.1 Estrutura Carpelar.....	21
1.3.2 Tipos de Estigma.....	23
1.3.3 Compatibilidade e Auto-incompatibilidade.....	24
1.4 Objetivo.....	27
1.5 Bibliografia citada.....	29
CAPÍTULO 2 Morfologia, anatomia e histoquímica da interação pólen-pistilo em <i>P. elegans</i> Masters e <i>P. suberosa</i> L (Passifloraceae).....	36
2.1 Introdução.....	37
2.2 Descrição das espécies.....	39
2.3 Objetivo.....	40
2.4 Material e Métodos.....	41
2.5 Resultados e Discussão.....	43
2.6 Bibliografia citada.....	53
ANEXOS - ESTAMPAS.....	97

CAPÍTULO 3 Auto-incompatibilidade e Imunocitoquímica.....	64
3.1 Introdução.....	65
3.1.1 O uso da imunocitoquímica no esclarecimento da dinâmica da parede celular.....	68
3.1.2 Os componentes químicos da matriz de pectinas (parede celular).....	69
3.2 Objetivo.....	72
3.3 Material e Métodos.....	72
3.4 Resultados e Discussão.....	74
3.4.1 Reconhecimento de epitopos pécticos	76
3.4.1.1 Estigma.....	76
3.4.1.2 Tecido transmissor.....	78
3.4.1.3 Tubo polínico.....	80
3.4.1.4 Pólen.....	82
3.4.2 Reconhecimento de epitopos para proteínas arabinogalactanos.....	83
3.4.2.1 Estigma.....	83
3.4.2.2 Tecido transmissor.....	83
3.4.2.3 Tubo polínico.....	83
3.4.2.4 Pólen.....	84
3.5 Bibliografia citada.....	85
CONCLUSÕES.....	95
ANEXOS – TABELAS E ESTAMPAS.....	107

Agradecimentos

Dedico este trabalho à minha filha Amanda, que sempre apostou em mim, e com paciência, compreendeu com boa vontade a minha ausência e as incontáveis horas à frente do computador.

À minha família que sempre me apoiou de todas as formas, ao meu pai, João Paulo, à minha mãe, Gilcei, e aos meus irmãos, Alexandre e Camila.

Ao meu orientador, Mariath, que convivo desde a monitoria no ano de 2000, pelo otimismo, orientação e amizade. Pela sua paixão contagiante à botânica, que nos faz continuar e renovar nossas forças.

À minha co-orientadora Alexandra, que sempre com bom humor me explicou tudo o que eu, ansiosa, precisava saber...

Aos colegas do LaVeg, em especial ao Adriano, Érica, Jaqueline, Fernanda, Carla... pelas horas de microscopia, de estudo, de desabafos, de cafezinhos, de confraternizações.

Ao Professor J. Paul Knox (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) pelos anticorpos monoclonais cedidos.

A Capes, pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

Enfim, ao PPG em Botânica, aos professores do Departamento e a todos que participaram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Resumo

O gênero *Passiflora* é originário da América do Sul e tem no Centro-Norte do Brasil seu maior centro de distribuição geográfica. A família Passifloraceae congrega espécies arbóreas, arbustivas, herbáceas, e, sobretudo, lianas que desempenham fundamental importância ecológica na dinâmica de regeneração natural de florestas. Apesar da importância ecológica das Passifloras, conhecimentos sobre seu modo de reprodução são escassos, e pouco se sabe sobre como se dá o mecanismo de compatibilidade e incompatibilidade nas espécies do gênero, assim como as alterações ocorridas durante a interação entre pólen e pistilo, incluindo a dinâmica da parede celular durante esses mecanismos. O presente trabalho foi desenvolvido com duas espécies do gênero *Passiflora*: *Passiflora suberosa* L. (Clado *Decaloba*) e *Passiflora elegans* Masters (Clado *Passiflora*) no intuito de contribuir para o esclarecimento da biologia reprodutiva do gênero. Foram realizadas polinizações controladas em botões florais de ambas as espécies, tanto em experimentos de polinização cruzada, quanto de autopolinização. O material coletado foi submetido à fixação, desidratação etílica ascendente e infiltração em resina hidroximetilacrilato para as secções observadas em microscopia óptica, bem como inclusões em resina LR White para as reações de imunocitoquímica observadas em epifluorescência. Foram utilizados anticorpos monoclonais para determinação de epitopos pécnicos e para detecção de proteínas arabinogalactanos nos tecidos que atuam na interação pólen-pistilo. Anatomicamente o estigma é formado por emergências multicelulares constituídas por células da camada dérmica e subdérmica que se projetam e expõe a superfície receptora do pólen proporcionando um maior direcionamento do tubo polínico na sua trajetória estigmática. Essas estruturas são importantes na seleção e no processo de reconhecimento dos grãos de pólen depositados durante a polinização, resultando em reações de compatibilidade

ou incompatibilidade. O mecanismo de auto-incompatibilidade desencadeado pelo contato das proteínas contidas no pólen com as células do estigma, foi observado em *P. elegans*, resultando no bloqueio do crescimento do tubo polínico por deposição de calose em sua extremidade. No entanto, nessa espécie, a reação de auto-incompatibilidade é transposta após dois eventos de autopolinização. A espécie *P. suberosa* mostrou-se ser autocompatível. O crescimento dos tubos polínicos se dá por via apoplástica em ambas as espécies. Os estiletes são do tipo sólido e seco, com tecido transmissor rico em polissacarídeos, pectinas, proteínas e amido. Os resultados comparativos entre as duas espécies analisadas quanto à composição química das paredes celulares detectaram diferenças químicas nas paredes dos grãos de pólen. Arabinanos e galactanos estão ausentes na intina de *P. elegans*, ao contrário do encontrado em *P. suberosa* e proteínas arabinogalactanos estão presentes na intina de *P. elegans* e ausentes em *P. suberosa*, que talvez esteja relacionado com a expansão celular, o que sugeriria que os tubos polínicos têm exigências químicas distintas em seu desenvolvimento.

Abstract

The *Passiflora* genus is originated from South America and the Middle-North region of Brazil is the great center of its geographical distribution. The Passifloraceae family presents trees, bushes, herbs and mostly climbers' species that play an important ecological role in the forest regeneration dynamics. Despite of its ecological importance, the knowledge of its reproduction mode is scarce and there are few works about compatibility and incompatibility mechanisms in the genus species, as well as, information about cell changes during pollen-pistil interaction that includes cell wall dynamics during this process. The present work investigated two species of *Passiflora* genus: *P. elegans* Masters (*Passiflora Clade*) and *P. suberosa* L. (*Decaloba Clade*) with the aims to contribute to illuminate the genus reproductive biology knowledge. It was made controlled pollination in floral buds of both species, cross-pollination and self-pollination tests. The collected material was fixed, dehydrated in crescent alcohol series and included in hydroxyethylmetacrylate resin to observations in light microscopy, as well as, in LR White to make immunocytochemical reactions at fluorescence microscopy. It was used monoclonal antibodies to detect arabinogalactan proteins and pectin epitops in pollen-pistil tissues. The anatomy of stigma is formed by multicelled emergences. Cells from dermal and subdermal layers compose them. These cells project and expose the receptive surface, promoting greater pollen tube guidance on its stigma trajectory. These structures are important in selection and recognition process of pollen grains deposited during pollination, resulting in compatibility or incompatibility reactions. Auto-incompatibility mechanisms, unchained by the contact of pollen and stigma proteins, were observed in *P. elegans* and they resulted in blocking of pollen tube growth by the callose deposition on its extremity. However, in this species, the self-incompatibility reaction fails after two events of self-pollination. *P. suberosa*

species are self-compatibility. The pollen tube growth occurs by apoplastic way in both species. Styles are solid and dry, with a rich polysaccharide, pectin, protein and starch transmitter tissue. Comparative results between the two analyzed species detected cell wall chemical differences in pollen grain. Arabinans and galacturans are absent in *P. elegans* intine and arabinangalactans proteins are present in *P. elegans* and absent in *P. suberosa*. It may be related with cell expansion and it suggests that pollen tubes have different chemical demands in their development.

CAPÍTULO 1

**Aspectos gerais e a família Passifloraceae: Antecedentes de
diversas abordagens**

1.1 Histórico da família e importância do gênero *Passiflora*

O primeiro registro taxonômico de *Passiflora* que se tem conhecimento foi realizado por Nicolae Monardis no ano de 1569 com a espécie hoje conhecida por *Passiflora incarnata* L. sob o nome de “granadilla” devido sua semelhança com o fruto da romã, *Punica granatum* (Hoehne, 1939; Casal, 1976; Ruggiero, 1987).

No Brasil a primeira referência ao maracujá que se tem registro data de 1587 no “Tratado Descritivo do Brasil” como "ervas que dão fruto na Bahia e que não são árvores". Porém, os indígenas de origem Tupi a denominavam de murucuya que significa: “alimento em forma de cuia” (Salomão & Andrade, 1987; Teixeira *et al.* 1995; Bernacci *et al.* 2003).

A obra “História do Brasil”, concluída em 1627, é um resumo sobre a história de nosso continente sob o domínio de Portugal escrito no primeiro século do descobrimento por Frei Vicente Salvador. Nessa obra, as passifloras são descritas quanto ao seu habitat e diversidade de forma e cor dos frutos (Teixeira *et al.* 1995).

Já os primeiros contatos dos colonizadores com a *Passiflora* e a propagação de sua flor com um sentido religioso e cultural, surgiram com a conquista e exploração Espanhola do Novo Mundo durante os séculos XVI e XVII. Devido à beleza, valor ornamental e às características estruturais de suas flores, o nome científico da família a qual pertencem, Passifloraceae, e do gênero, *Passiflora*, originaram-se por associação da morfologia da flor com os símbolos da "Paixão de Cristo", sendo atribuído o nome vulgar de “Flor de la Pasi3n ou Passion3ria” em alus3o a esse s3mbolo (Cervi, 1986; Salom3o & Andrade, 1987; Souza & Meletti, 1997).

Segundo Cervi (1997) em 1700, Tournefort, em uma tentativa de classifica3o, prop3s dois g3neros de passion3rias: *Granadilla* para as esp3cies com corona filamentosa e *Murucuja* para as esp3cies de corona tubular. No entanto, o atual g3nero

Passiflora só foi estabelecido por Linnaeus em 1735 na primeira edição do *Systema Naturae*. No ano de 1828, 145 espécies de Passifloras foram descritas por De Candolle na obra *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Posteriormente, em 1872, Masters publica na *Flora Brasiliensis*, uma das mais importantes e completa obra sobre a família Passifloraceae das Américas, enumerando 202 espécies de Passifloras.

Já no ano de 1925, é publicado um importante trabalho sobre a família Passifloraceae, intitulado *Die natürlichen Pflanzenfamilien* onde Harms divide o gênero *Passiflora* em secções, subsecções e/ou séries (Harms, 1925).

Em 1938, Killip publica a relevante obra *The American Species of Passifloraceae*, onde o autor divide o gênero *Passiflora* em 22 subgêneros e estes subgêneros são subdivididos em secções e/ou séries. A obra trata de 355 espécies de Passifloras citadas para a América, dentro das quais, 101 espécies ocorrem no Brasil. Vinte e dois anos depois dessa publicação, uma nota suplementar feita pelo próprio autor, veio a ampliar os dados da distribuição geográfica de algumas espécies citadas, além de descrever 11 novas espécies Americanas sem nenhuma nova adição, no entanto para o Brasil (Killip, 1960).

Com os estudos de Sacco entre as décadas de 60 e 80, ficou acrescido de 10 o número de espécies de *Passiflora* ocorrentes no país (Sacco 1962, 1980).

Além de sua importância religiosa e cultural, o cultivo de algumas espécies do gênero tem sido bastante difundido nos últimos tempos visando o interesse comercial da espécie *P. edulis* Sims e medicinal das espécies *P. incarnata* L. e *P. alata* Dryand (Harri, 2002). Várias espécies silvestres ou cultivadas, são tradicionalmente conhecidas no âmbito da medicina popular em quase todos os países Ocidentais. O suco do maracujá oferece ao organismo que o ingere boa quantidade de vitaminas hidrossolúveis, especialmente A, C, sais minerais e fibras, mas o principal valor do

maracujá advém de suas propriedades calmantes e sedativas (Freitas, 1987; Cunha & Cardoso, 1998; Harri, 2002). Algumas espécies do gênero estão incluídas em Farmacopéias ou aceitas oficialmente para uso medicamentoso, como *P. alata* Dryand na Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia Brasileira, 1977).

Os frutos de maracujá são usados na preparação de bebidas refrescantes e o uso das folhas na forma de chá, como um calmante e suave indutor do sono (Sacco, 1980; Harri, 2002).

O cultivo do maracujazeiro no Brasil teve seu início em 1970, onde passa a ser cultivado em 652 municípios de 23 Estados (Cunha & Cardoso, 1998). Além do grande cultivo da espécie *P. edulis* Sims, são também cultivadas, embora em escala comercial menor, e difundidas no país as espécies: *P. alata* Dryand, *P. quadrangularis* L., *P. caerulea* L., e *P. laurifolia* L. e, mais esporadicamente, *P. ligularis* A. Juss, *P. maliformis* Vell., *P. raddiana* DC. e *P. capsularis* L. (Leitão & Aranha, 1974). Esse cenário confere ao Brasil o título de maior produtor mundial de maracujá, sendo responsável por 85% da produção colhida no mundo, sendo complementada por outros dez países (IBGE, 2003; RanckBrasil). O Brasil produz anualmente quase 5.000.000 toneladas de maracujá, praticamente todo para consumo no mercado interno. A área brasileira plantada equivale há 37.252 ha com uma produção média de 13,441 kg/ha (IBGE, 2004). Dessa forma o maracujá passa a ser um dos mais importantes cultivos intermediários em termos de fruteiras, sendo superado apenas pelos citros, caju, banana, manga e abacaxi (Cunha & Cardoso, 1998).

O histórico apresentado sofre, a cada instante, novas contribuições em diversas áreas, contando, por exemplo, com trabalhos realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo Departamento de Genética, envolvendo análises moleculares e evolutivas (Lorenz, 2002; Muschner, 2003; Souza-Chies *et al.* 2005; Koehler-Santos *et*

al. 2006) pelo Departamento de Zoologia, com pesquisas sobre a interação inseto-plantas (Acioli, 1999 e 2003; Kerpel *et al.* 2006; Rodrigues *et al.* 2007) pelo Departamento de Ecologia, com estudos da plasticidade fenotípica das folhas de *P. suberosa* L. (Barp *et al.* 2006) e por parte das pesquisas realizadas em nosso Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde o “Projeto Universal *Passiflora*” abrange estudos sobre a embriologia, ontogênese e reprodução das espécies ocorrentes de Passifloraceae no Brasil.

1.2 Taxonomia (família Passifloraceae)

Segundo a classificação de Cronquist (1988) a família está incluída na ordem Violales principalmente por apresentar placentação parietal. No entanto, mais recentemente, Passifloraceae passou a ser posicionada dentro da ordem Malpighiales devido à classificação de Judd *et al.* (1999) que afirmam que a monofilia do gênero *Passiflora* é sustentada pela presença de uma corona de filamentos nas flores, de gavinhas axilares, flores especializadas em decorrência da co-evolução com insetos polinizadores e nectários extraflorais. Atualmente com base em estudos filogenéticos e moleculares, a família Passifloraceae continua posicionada na ordem Malpighiales. Várias famílias, dentro desta ordem, possuem características em comum como nós trilacunares, estigmas secos e exotegma fibroso e algumas famílias compartilham o gineceu tricarpelar, entre elas (Euphorbiaceae, Malpighiaceae, Passifloraceae e Violaceae) (Sistema APG II, 2003).

A sistemática de Passifloraceae apresenta frágeis limites de circunscrição entre subgêneros, seções e/ou séries (Feuillet & MacDougal, 1999), pois, a última revisão abrangente para o grupo, realizada por Killip, data de 1938 e foi baseada principalmente em caracteres morfológicos.

A família conta com 18 gêneros e aproximadamente 630 espécies distribuídas em zonas tropicais e subtropicais do mundo todo (Deginani, 2001). O gênero *Passiflora* é originário da América do Sul e tem no Centro-Norte do Brasil seu maior centro de distribuição geográfica (Manica, 1981; Souza & Meletti, 1997). Passifloraceae congrega espécies arbóreas, arbustivas, lianas e herbáceas, sendo que o gênero ocorre nas áreas mais quentes da América, com algumas espécies na Ásia, Austrália e uma espécie em Madagascar (Deginani, 2001).

A família Passifloraceae está dividida em duas tribos - *Paropsieae* e *Passiflorieae* (Escobar, 1988). A tribo *Passiflorieae* é representada no continente latino-americano por quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. dentre estes destaca-se o gênero *Passiflora* L. com notável expressão na flora brasileira, apresentando cerca de 520 espécies (Feuillet & MacDougal, 2003).

Segundo Killip (1938), o gênero *Passiflora* foi subdividido em 22 subgêneros, porém, Feuillet & MacDougal (1999) sugerem uma mudança nessa classificação diminuindo o número de subgêneros para apenas 4:

- *Astrophea* (56 espécies);
- *Deidamioides* (16 espécies);
- *Decaloba* (+ de 200 espécies); e,
- *Passiflora* (+ de 220 espécies).

Os subgêneros *Decaloba* e *Passiflora* substituíram, respectivamente, os antigos subgêneros *Plectostemma* e *Granadilla* da classificação de Killip (1938).

Yochteng & Nadot (2004) estabelecem três clados a partir do número cromossômico de diferentes espécies analisadas. O Clado 1: *Astrophea*, contendo espécies com $x = 12$ (composto pelos subgêneros *Astrophea* e *Tryphostemmatoides*); Clado 2: *Plectostemma*, com $x = 6$ (composto pelos subgêneros *Astephia*,

Deidamioides, *Murucuja*, *Plectostemma*, *Pseudomurucuja* e *Tetrapathea*) e o Clado 3: *Granadilla*, com $x = 9$ (composto dos subgêneros *Calopathanthus*, *Distephana*, *Dysosmia*, *Granadilla*, *Manicata*, *Psilanthus*, *Tacsonia* e *Tacsonioides*). As autoras estabelecem oito subgêneros (*Plectostemma*, *Granadilla*, *Astrophea*, *Deidamioides*, *Polyanthea*, *Dysosmia*, *Tetrapathea* e *Tryphostemmatoides*), usando quatro subgêneros adicionais à proposta de Feuillet & MacDougal (1999) (*Deidamioides*, *Polyanthea*, *Tryphostemmatoides* e *Tetrapathea*) sendo um subgênero separado (*Dysosmia*) devido ao seu número cromossômico variável. Cabe mencionar que as próprias autoras sugerem estudos adicionais utilizando outros marcadores moleculares a fim de confirmar os resultados obtidos.

Muschner *et al.* (2003) através da utilização de marcadores moleculares estabeleceram três clados. O primeiro clado incluindo os subgêneros *Distephana*, *Dysosmia*, *Dysosmioides*, *Passiflora* e *Tacsonioides*; o segundo os subgêneros *Adopogyne*, *Decaloba*, *Murucuja* e *Pseudomurucuja*, e o terceiro o subgênero *Astrophea*, sendo denominados respectivamente: Clados *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea*. No entanto, as interrelações entre os três clados, entre esses clados e os gêneros relacionados, bem como a monofilia do gênero *Passiflora* ainda permanecem não resolvidas.

Espécies nativas que abrangem os três clados citados na classificação de Muschner *et al.* (2003) são encontradas no Brasil e no estado do Rio Grande do Sul, mais especificamente, encontramos espécies representantes dos clados *Passiflora* e *Decaloba*:

- *P. actinia* Hook (subg. *Passiflora*)
- *P. amethystina* Mik (subg. *Passiflora*)
- *P. caerulea* L. (subg. *Passiflora*)

- *P. capsularis* L. (subg. *Decaloba*)
- *P. edulis* Sims. (subg. *Passiflora*)
- *P. eichleriana* Mast. (subg. *Passiflora*)
- *P. elegans* Mast. (subg. *Passiflora*)
- *P. foetida* L. var. *Ingelliflora* (Hook.) Mast. (subg. *Dysosmia*)
- *P. misera* H.B.K. (subg. *Decaloba*)
- *P. morifolia* Mast. (subg. *Decaloba*)
- *P. organensis* Gardn. (subg. *Decaloba*)

1.3 Biologia Floral

As espécies da família Passifloraceae, em sua grande maioria representada por lianas, desempenham fundamental importância ecológica na dinâmica de regeneração natural de florestas (Richards, 1952). As lianas permanecem abundantes após a exploração ou desmatamento de áreas florestais, pois suas sementes participam do banco de sementes do solo podendo germinar após esses distúrbios e encontrar condições favoráveis de luz e de suporte em áreas sucessionais (Uhl & Vieira, 1989).

Ainda com respeito às relações ecológicas, vários estudos têm sido realizados sobre os mecanismos de polinização, assim como a existência ou não de compatibilidade nas plantas (Semir & Brown Jr., 1975; Sazima & Sazima, 1978; Buzato & Franco, 1992; Varassin, 1996).

Dentre os mecanismos de polinização, muitas angiospermas desenvolveram um conjunto de características, incorporadas à flor, relacionado ao tipo de mecanismo de transporte do pólen e/ou ao agente polinizador (Weberling, 1989). O processo de polinização tem seu início com a exposição e liberação do pólen que porta o gameta masculino (Dafni, 1992). Os grãos de pólen podem ser transferidos da antera para o

estigma de duas formas: abiótica ou biótica. Na polinização abiótica dois vetores podem atuar: a água (hidrofilia) ou o vento (anemofilia). Na polinização biótica os vetores são: insetos ou vertebrados (zoofilia) (Mariath & Ayub, 1994).

Na hidrofilia, o pólen possui adaptações para flutuação e é transportado de uma planta a outra através da superfície da água. Estruturalmente, em algumas dessas plantas os grãos de pólen formam filamentos (pólen filiforme), ou são ligados entre si, em cadeias, aumentando as chances de contatar estigmas receptivos, que por sua vez exibem um maior tamanho ou até ramificações no intuito de ampliar sua superfície de contato com os grãos de pólen (Weberling, 1989).

Nos casos de anemofilia, o transporte dos grãos de pólen é efetuado pela ação do vento. Flores polinizadas pelo vento usualmente apresentam adaptações morfológicas, a fim de obter um maior sucesso na polinização. Os estames são bem expostos para facilitar a dispersão dos grãos de pólen, que por sua vez são abundantes, geralmente lisos, pequenos e não apresentam aderência uns aos outros. Os estigmas são grandes, comumente ramificados ou plumosos e bem adaptados para interceptar o pólen transportado pelo vento (Bertin, 1989).

O mecanismo de zoofilia abrange a maioria das flores e garante uma maior eficiência na polinização se comparado com os mecanismos de hidrofilia e anemofilia. A polinização, principalmente realizada por insetos, impulsionou a evolução das angiospermas envolvendo uma relação de atração e recompensa entre inseto e planta (Bertin, 1989).

Algumas das modificações especializadas das flores surgiram durante o curso da evolução em resposta à polinizadores específicos. Um dos eventos que foi favorecido na evolução das angiospermas foi a homocia, flores simultaneamente pistiladas e estaminadas. Nas plantas homóicas o polinizador executa tanto a deposição de pólen no

estigma, quanto à retirada do pólen das anteras a cada visita realizada (Bittencourt, 2003). Acredita-se que as plantas com flores surgiram há cerca de 120 milhões de anos e adaptaram-se a este tipo de polinização. Os primeiros polinizadores possivelmente foram besouros, moscas e vespas pouco especializadas (Proctor, Yeo & Lack, 1996).

A interação animal-planta tornou imprescindível que as flores apresentassem estruturas de maior resistência a fim de suportar o estresse mecânico do contato direto entre flor e polinizador, além da necessidade de possuir uma morfologia adaptada à anatomia do agente biótico que possibilitasse o contato do mesmo com o pólen e o estigma concomitantemente (Figueiredo, 2000).

A morfologia floral tanto pode excluir visitantes quanto atrair polinizadores potenciais, seja pela relação interdependente entre o tamanho das flores e dos polinizadores ou pela ocorrência de diferentes tipos de recompensas florais (Frankie *et al.* 1983). O conjunto de atributos florais caracteriza as diferentes síndromes de polinização (Faegri & Pjil, 1971). Segundo Mariath & Ayub (1994) cada síndrome é caracterizada quanto ao vetor, à cor, ao odor, à forma e ao recurso oferecido pela flor.

Dentro das síndromes de polinização realizadas por animais (zoofilia), pode-se destacar a polinização intermediada por besouros (cantarofilia), por formigas (formicofilia), por borboletas (psicofilia) e mariposas (falenofilia). Há também as flores que sofrem polinização por moscas (miofilia), por aves (ornitofilia), por morcegos (quiropterofilia), por abelhas (melitofilia) e ainda há outros tipos de polinizações realizadas por animais sem denominação específica. As flores melitófilas, em geral, apresentam um local de pouso para o polinizador e freqüentemente têm algum mecanismo de proteção do néctar e possuem odores doces (Howe & Westley, 1988).

As flores da família Passifloraceae (figura a) são especialmente polinizadas por abelhas que são atraídas pelas belas, grandes e coloridas flores aromáticas e com néctar

na base da corona (Falleiro, 2000). Os agentes polinizadores mais eficientes são as mamangavas do gênero *Xylocopa*. Insetos menores, como a abelha *Apis mellifera*, podem coletar o néctar sem polinizar o estigma, sendo prejudiciais à polinização (Manica, 1981; Hoffmann, 1997; Camillo, 2003), no entanto, também há as espécies polinizadas por beija-flores (*P. coccinia*) e por morcegos (*Passiflora mucronata*) (Sazima & Sazima, 1978; Koschnitzke & Sazima, 1997; Varassin *et al.* 2001). A melitofilia agrupa os mais importantes visitantes florais, sendo responsável pela polinização de mais espécies de plantas que qualquer outro mecanismo de polinização.

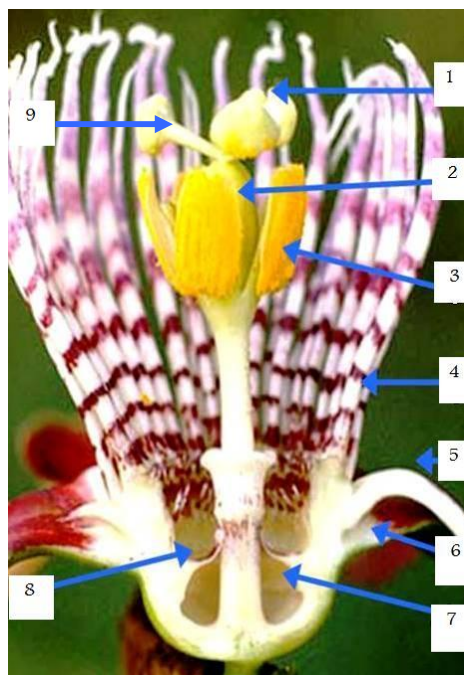


Figura a: 1) estigma; 2) ovário; 3) antera; 4) corona de filamentos; 5) pétalas; 6) sépalas; 7) câmara nectarífera; 8) opérculo; 9) estilete; (espécie: *Passiflora alata*).

As flores das Passifloraceae são dependentes da ação de agentes bióticos na realização da polinização cruzada, pois além de apresentarem características estruturais que dificultam a autopolinização, a ação do vento como agente polinizador é

considerada nula, o que determina a dependência da maioria das Passifloraceae aos insetos polinizadores (Akamine & Girolami, 1957, 1959; Ruggiero, 1975).

A disposição das peças florais nas espécies de passifloras, como os estigmas situados no ápice de um androginóforo seguidos das anteras basalmente localizadas, exige que o polinizador possua uma anatomia adequada para a realização de uma polinização efetiva. É necessário que ao coletar o néctar o agente biótico atinja, com seu corpo, as anteras e os estigmas, concomitantemente, no intuito de fazer a transferência dos grãos de pólen das anteras de uma flor para a superfície estigmática da flor de outra planta, obtendo, assim, êxito na polinização cruzada (Semir & Brown, 1975; Ruggiero, 1980; Manica, 1981; Acioli, 1999).

O néctar, segundo Dafni (1992) é considerado o mais importante mediador nas interações entre plantas e agentes bióticos, sendo produzido pelo floema e secretado ativamente (Baker & Baker, 1990). O polinizador ao se direcionar à câmara nectarífera, entra em contato com as anteras e, posteriormente, com os estigmas que estão curvados para baixo (Endress, 1994). O deslocamento das estruturas reprodutivas durante a antese é uma característica do gênero *Passiflora*. É necessário que os estiletos tenham sofrido flexão total para que os polinizadores entrem em contato com os estigmas e depositem, neles, o pólen (Ruggiero, 1987; Endress, 1994; Varassin & Silva, 1999).

1.3.1 Estrutura carpelar

Além do importante papel da curvatura dos estiletos, as características morfológicas e anatômicas da estrutura carpelar ou pistilo (estigma, estilete e ovário) são de extrema importância no sucesso da polinização. Cada pistilo é formado por um ou mais carpelos, que são folhas modificadas, com uma porção basal dilatada denominada ovário, que contém os rudimentos seminiais no seu interior, um

prolongamento superior em forma de haste, mais ou menos alongada, o estilete, por onde se dá a penetração do tubo polínico até o ovário e na sua região apical, uma expansão receptiva para o pólen denominada estigma (Fahn, 1990; Souza, 2003; Mariath *et al.* 2006).

O estigma possui uma epiderme papilosa que secreta substâncias que irão auxiliar na adesão, hidratação e germinação dos grãos de pólen, estimulando o desenvolvimento do tubo polínico (Mariath *et al.* 2006).

O estilete, por sua vez, é a haste que propicia a condução dos tubos polínicos em crescimento, através da conexão que estabelece entre estigma e ovário. Anatômica e morfológicamente, essa estrutura pode ser oca ou sólida, pode apresentar-se longa e delgada ou curta e espessa, ou então pode estar praticamente ausente (Shivanna & Johri, 1985; Lersten, 2004; Mariath *et al.* 2006).

Após a germinação do grão de pólen no estigma, o tubo polínico percorrerá o estilete em busca do rudimento seminal que se encontra no ovário da flor. Esse caminho percorrido pelo tubo se dá através de um tecido especializado do estilete denominado de tecido transmissor, que apresenta células alongadas de paredes espessas e ricas em substâncias pécticas. O tecido transmissor serve como substrato nutritivo para o desenvolvimento e orientação do tubo polínico (Taylor & Hepler, 1997; Souza, 2003; Lersten, 2004).

O estigma e o estilete também são importantes na seleção dos grãos de pólen no processo de reconhecimento, durante a reação de compatibilidade ou incompatibilidade (Mariath *et al.* 2006).

Ainda dentre as funções atribuídas ao estilete estão o provimento de uma separação espacial entre estigma e ovário, diminuindo as chances de acidentes com os rudimentos seminais por ação mecânica dos polinizadores e a ampliação da zona de

ação célula-a-célula através do aumento da distância a ser percorrida pelo tubo polínico, onde o contato do tubo incompatível possa ser retardado ou bloqueado antes que o mesmo alcance o ovário. E, finalmente, a nutrição do tubo polínico compatível (Shivanna, 2003; Lersten, 2004).

1.3.2 Tipos de estigma

Em relação ao contato e o caminho percorrido pelo tubo polínico, Capus (1878 *apud* Heslop-Harrison & Shivanna, 1977) realizou um estudo da anatomia do estilete e notou características diferentes que vieram a classificar os tipos de estigmas. O estigma classificado como seco, seria aquele com pouca ou nenhuma superfície secretora na maturidade, já o estigma úmido teria uma superfície secretora com fluido liberado na sua superfície. Entre os estigmas úmidos, assim como nos estigmas secos, foram distintas duas categorias: a categoria dos estigmas com a superfície receptiva papilada e a dos estigmas não-papiladas.

Além da classificação dos tipos de superfície estigmática também foram realizados estudos sobre a região de transmissão estilar. O maior estudo comparativo da superfície do estigma foi publicado por Guéguen (1900 – 1902 *apud* Heslop-Harrison & Shivanna, 1977).

Vasil & Johri (1964) também publicaram um valioso estudo comparativo sobre as características da superfície dos estigmas e o subsequente caminho seguido pelo tubo polínico em *Brassica oleracea*.

Segundo Mascarenhas (1993) o caminho a ser percorrido pelo tubo polínico depende de reações favoráveis e desfavoráveis que ocorrem entre pólen e tecidos carpelares que são denominadas de reações compatíveis ou incompatíveis, respectivamente. Essa interação depende da viabilidade do pólen, da receptividade do

estigma e da interação genética de ambas as partes, imposta pelo sistema de incompatibilidade (Dafni, 1992).

1.3.3 Compatibilidade e Auto-incompatibilidade

As reações de compatibilidade e incompatibilidade são enquadradas em três categorias, a primeira categoria é denominada de interação compatível. Esta interação é vista como uma reação favorável, ou seja, o pólen germina e fecunda a oosfera resultando em um diásporo viável. Ocorre quando o esporófito apresenta características genéticas diferentes e ao mesmo tempo características bioquímicas semelhantes às do grão de pólen. O grão de pólen se adere às células papilares do estigma e germina dando origem ao tubo polínico (Mascarenhas, 1993).

Na categoria denominada de incongruência, ocorre na realidade uma “não reação” devido ao grão de pólen e estigma apresentar características genéticas e bioquímicas muito diferentes. Essas características podem até ser percebidas ou simplesmente não serem detectadas. Ainda segundo Mascarenhas (1993), na interação incompatível, a incompatibilidade requer a atividade de rejeição baseada em mensagens genéticas e bioquímicas liberadas pelo próprio pólen, ou por suas características genéticas, mas originadas pela planta-mãe, a tempo suficiente para que o carpelo possa reconhecê-lo como incompatível e desencadear então a resposta específica.

Há casos, no entanto, de auto-incompatibilidade tardia, onde a fecundação chega a ocorrer resultando em uma ineficiência reprodutiva. Sutherland & Delph (1984) comparando 316 espécies, verificaram que a média de formação de frutos em espécies autocompatíveis era de 72,5 % contra 22,1 % em espécies auto-incompatíveis.

Os sistemas de auto-incompatibilidade ocorrem em uma ampla gama de famílias e gêneros de angiospermas, inclusive em várias plantas de interesse econômico

(Brewbaker, 1957).

A auto-incompatibilidade é regida por três sistemas principais: o sistema homomórfico gametofítico, o sistema homomórfico esporofítico e o sistema heteromórfico esporofítico.

O sistema de auto-incompatibilidade homomórfico gametofítico é desencadeado por determinação do genótipo do grão de pólen. Produtos formados no gametófito jovem durante o seu desenvolvimento e estocados na intina são detectados e reconhecidos posteriormente com a condução do tubo polínico através do carpelo. Esse sistema ocorre com flores morfológicamente homogêneas, ou seja, flores que não apresentam variação quanto à altura dos estigmas e das anteras. Essa auto-incompatibilidade é encontrada em várias famílias, entre elas: Solanaceae, Rosaceae, Papaveraceae, Liliaceae, Onagraceae, Leguminosae, Commelinaceae e Amaryllidaceae (Bruckner *et al.* 1995).

O sistema homomórfico esporofítico é desencadeado pelo contato das proteínas esporofíticas com as células do estigma. Essas proteínas são oriundas do tapete da antera do esporófito e depositam-se na superfície polínica, resultando no bloqueio do crescimento do tubo polínico por deposição de calose na parede interna de sua extremidade (Heslop-Harrison, 1975; Heslop-Harrison & Shivanna, 1977). Segundo Lersten (2004) há evidências diretas que o “*pollenkitt*” e os trifinos, substâncias originadas pelo exudado do tapete, possam ser fatores de reconhecimento responsáveis pela germinação do pólen compatível ou rejeição do pólen incompatível no estigma.

O sistema homomórfico gametofítico é determinado pelo alelo que o grão de pólen carrega, ou seja, seu respectivo genótipo, enquanto que no sistema no esporofítico, são as substâncias presentes na superfície do pólen, originadas pelo tecido diplóide da planta mãe que o gerou, que determinam a reação (Bruckner *et al.* 1995;

Schifino-Wittmann & Dall'Agnol, 2002). A ocorrência da auto-incompatibilidade esporofítica tem sido descrito, nas últimas três décadas, em algumas famílias, entre elas Brassicaceae, Asteraceae e, mais recentemente em Passifloraceae (Bruckner *et al.* 1995).

O sistema heteromórfico esporofítico, é um sistema de incompatibilidade relacionado à distília (indivíduos de uma população divididos em dois grupos - estilete longo ou curto) ou tristília (indivíduos de uma população divididos em três diferentes grupos – três diferentes comprimentos de estilete). Esse sistema também é conhecido como dialélico com apenas dois alelos envolvidos na incompatibilidade, que envolve também um mecanismo esporofítico, determinado pelo genótipo do esporófito que o produziu (Ganders, 1979).

Os diferentes sistemas de incompatibilidade, ainda apresentam diversos sítios de reações com distintos mecanismos moleculares de ação inibitória (Nettancourt, 1997; Takayama & Isogai, 2005). São mais comumente conhecidos três modelos de incompatibilidade de acordo com o local e mecanismo molecular utilizado pela planta:

O Modelo Brassicaceae: Esse modelo apresenta um sistema do tipo esporofítico, tendo um locus-S altamente polimórfico. Segundo Hiscock & McInnis (2003) embora o locus-S se expresse somente por um gene, ele é formado na verdade por dois genes, sendo que o produto de um deles atua como receptor de membrana, e o outro como um fator de ligação determinando a especificidade das papilas estigmáticas (S-locus Receptor Kinase ou SRK) e do grão de pólen (Cysteine-Rich, S-locus Protein ou SCR) respectivamente.

A rejeição do pólen incompatível em estigmas de *Brassica* é precisamente controlada e uma única célula papilar permitirá simultaneamente o desenvolvimento do

grão de pólen compatível rejeitando o grão de pólen incompatível situados lado a lado (Hiscock & McInnis, 2003).

No Modelo Solanaceae e Rosaceae a reação de incompatibilidade é comandada por uma RNase (glicoproteína com função enzimática), produto do *locus-S* em pistilos de algumas espécies de Solanaceae e Rosaceae, que degrada o RNA sintetizado pela célula vegetativa resultando na morte do tubo polínico (Elleman & Dickinson, 1994).

Por fim, no Modelo Papaveraceae, o reconhecimento específico de proteínas derivadas do *locus-S*, secretadas pelo estigma, é realizado por um receptor transmembrana do pólen/tubo polínico. A interação pólen e estigma desencadeia uma rota de transdução de sinais, mediada pelo cálcio, resultando na inibição do tubo polínico incompatível (Elleman & Dickinson, 1994).

Em Passifloraceae, segundo Ho & Shi (1986) é a superfície do estigma que reconhece ou rejeita o grão de pólen, através de um mecanismo de auto-incompatibilidade. No entanto, há espécies de passifloras que aceitam o seu próprio pólen, sendo então classificadas como autocompatíveis.

Pesquisas envolvendo a biologia floral ainda são escassas para o gênero *Passiflora* sendo restritas a poucas espécies de interesse econômico. Alguns estudos foram realizados com *P. suberosa*, visando uma maior compreensão ecológica do processo de polinização e interação com o agente polinizador (Koschnitzke & Sazima, 1997; Acioli, 1999 e 2003).

1.4 Objetivos

Muito pouco se sabe sobre como se dá o mecanismo de auto-incompatibilidade nas espécies do gênero, sendo a maior parte dos trabalhos realizados com a espécie *P. edulis*, e praticamente nada se sabe a respeito nas espécies selvagens.

Os trabalhos publicados sobre o assunto abrangem aspectos morfológicos, fisiológicos, aplicações no melhoramento vegetal, biologia molecular e genética, no entanto há uma carência de trabalhos que descrevam as reações imunocitoquímicas ocorridas, e as possíveis mudanças estruturais na arquitetura da parede celular ocorrentes durante a interação pólen e estigma nos diferentes sistemas de compatibilidade e incompatibilidade.

A abordagem proposta se constituirá nas bases do conhecimento que poderão auxiliar na elucidação dos mecanismos de auto-incompatibilidade do subgênero *Passiflora* e de autocompatibilidade do subgênero *Decaloba* da família Passifloraceae, após eventos de autopolinização.

1.5 Bibliografia citada

- ACIOLI, M. F. (1999). **Estudo preliminar da Biologia Floral de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae)**. Dissertação de Bacharelado apresentada no Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS.
- ACIOLI, M. F. (2003). **Ecologia da Polinização de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS.
- AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, D. G. (1957). **Problems in Fruit Set in Yellow Passion Fruit**. Hawaii Farm. Sci., 5 (4): 3-5.
- AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, D. G. (1959). **Pollination and Fruit Set in the Yellow Passion Fruit**. Hawaii. Agric. Exp. Sta., 44.
- APG II. (2003). **An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II**. Botanical Journal of the Linnean Society (141): 399-436.
- BAKER, H. G. & BAKER, I. (1990). **The predictive Value of Nectar Chemistry to the Recognition of Pollinator Types**. Israel Journal of Botany (39): 157-166.
- BARP, E. A.; SOARES, G. L. G.; GOSMANN, G.; MACHADO, A. M.; VECCHI C. & MOREIRA, G. R. P. (2006). **Phenotypic Plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): Induction and Reversion of two Morphs by Variation in Light Intensity**. Braz. J. Biol. 66 (3): 29-41.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, H. R. S. (2003). **Espécies de Maracujá: Caracterização e Conservação da Biodiversidade**. Embrapa - Cerrados, Distrito Federal.
- BERTIN, R. I. (1989). **Pollination Biology**. In: ABRAHAMSON, W. G. Ed. Plant-animal Interactions. New York, McGraw-Hill. p. 23-83.
- BITTENCOURT JR, N. S. (2003). **Auto-incompatibilidade de Ação Tardia e Outros Sistemas Reprodutivos em Bignoniaceae**. Tese de Doutorado apresentada na Universidade Estadual de Campinas.
- BREWBAKER, J. L. (1957). **Pollen Cytology and Self-Incompatibility Systems in Plants**. The Journal of Heredity, 28 (6): 271-277.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZZI, A. J & SILVA, E. M. (1995). **Self-Incompatibility in Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims)**. Universidade Federal de Viçosa, MG. Acta Horticulturae, (370): 45-57.
- BUZATO, S.; FRANCO, A. L. M. (1992). ***Tetrastylis ovalis*: A Second Case of Bat-Pollinated Passionflower (Passifloraceae)**. Plant System Evolution, (181): 261-267.

- CAMILLO, E. (2003). **Polinização do Maracujá**. Ribeirão Preto: Holos, Editora.
- CAPUS (1878) *apud* HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K. R. (1977) **The Receptive Surface of the Angiosperms Stigma**. *Annals of Botany* (41):1233-1258.
- CASAL, M. A. (1976). **Corografia Brasileira ou Relação Histórica-Geográfica do Reino do Brasil**. Belo Horizonte: Ed. Itatiaia; São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, (27): 59 p.
- CERVI, A. C. (1986). **Flora do Estado de Goiás**. Coleção Rizzo. Goiânia, (7).
- CERVI, A. C. (1997). **Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora***. *Fontqueria* (45): 1-92.
- CRONQUIST, A. (1988). **An integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia University Press, New York.
- CUNHA, M. A. P. & CARDOSO, C. E. L. (1998). **Variabilidade Genética e Melhoramento do Maracujá**. Trabalho apresentado no Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil.
- DAFNI, A. (1992). **Pollination Ecology: A Practical Approach** (the Practical Approach Series). New York, Oxford: University press. 250 p.
- DE CANDOLLE, A. P. (1828). **Passifloraceae. In Prodrromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis** (A. P. De Candolle, ed.). Treuttel et Wurtz, Paris, (3).
- DEGINANI, N. B. (2001). **Las Espécies Argentinas del Género *Passiflora* (Passifloraceae)**. *Darwiniana* 39 (1-2): 43-129.
- ENDRESS, P. K. (1994). **Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers**. Cambridge University Press, Cambridge.
- FAEGRI, K. & PIJL, L. van der (1971). **Principles of Pollination Ecology**. Second Revision Edition. New York.
- FALLEIRO, T. M. (2000). **Herança da Auto- Incompatibilidade no Maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims**. Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Federal de Viçosa.
- FAHN, A. (1990). **Plant Anatomy**. 4.ed. New York : Pergamon. 588 p.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1977). 3 ed., p. 389.
- FEUILLET C. & MACDOUGAL J. M. (1999). **A New Infrageneric Classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. XVI International Botanical Congress, Saint Louis, Missouri, USA, Abstract 4295.

- FEUILLET, C. & MACDOUGAL, J. M. (2003). **Checklist of recognized species names of passion flowers.** *Passiflora* 12 (2): 41-43.
- FIGUEIREDO, R. A. (2000). **Biologia Floral de Plantas Cultivadas. Aspectos Teóricos de um Tema Praticamente Desconhecido no Brasil.** Revista das Faculdades de Educação, Ciências, Letras e Psicologia Padre Anchieta.
- FRANKIE, G. W.; HERBER, W. A.; OPLER, P. A.; BAWA, K. S. (1983). **Characteristics and Organization of the Large Been Pollination Systems in the Costa Rican Dry Forest.** In: JONES, C. E.; LITTLE, R. J. (eds). Handbook of Experimental Pollination Biology. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- FREITAS, P. C. D. (1987). **Possibilidades Farmacológicas.** In: Cultura do Maracujazeiro. Ribeirão Preto, Editora Legis Summa.
- GANDERS, F. R. (1979). The Biology of Heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, (17): 607-635.
- GUÉGUEN (1900, 1902) *apud* HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K. R. (1977). **The Receptive Surface of the Angiosperms Stigma.** *Annals of Botany* (41): 1233-1258.
- HARMS, (1925). **Passiflora. Die natürlichen Pflanzenfamilien.** Duncker and Humblot (21): 470-507.
- HARRI, L. (2002). **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA.
- HESLOP-HARRISON, J. (1975). **Incompatibility and the Pollen-stigma Interaction.** *Annual Review of Plant Physiology*, (26): 403-425.
- HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K. R. (1977). **The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma.** *Annual Botany*, (41): 1233-1258.
- HISCOCK, S. J. & MCLNNIS, S. M. (2003). **Pollen Recognition and Rejection During the Sporophytic Self-incompatibility Response: *Brassica* and Beyond.** *TRENDS in Plant Science* 12 (8).
- HOEHNE, F. C. (1939). **Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais.** São Paulo, Departamento de Botânica do Estado, p. 199-201.
- HOFFMANN, M. (1997). **Polinização do Maracujá *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.** Maracujá: Temas Seleccionados (1). Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 58-70.
- HOWE, H. F. & WESTLEY, L. C. (1988). **Ecological Relationships of Plants and Animal.** Oxford, Inglaterra, 273p.
- HO, W. F. & SHI, C. T. (1986). **Incompatibility System in Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims).** *Acta Horticulturae*, 194, p. 31-38.

- IBGE (2003). **Produção Agrícola Municipal: Culturas Permanentes**. São Paulo.
- IBGE (2004). **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. Rio de Janeiro.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. (1999) **A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Sunderland. Plant Systematics, 464 p.
- KERPEL, S.; SOPRANO, E.; MOREIRA, G. R. P. (2006). **Effect of Nitrogen on *P. suberosa* L. (Passifloraceae) and Consequences for Larval Performance and Oviposition by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae)**. Neotropical Entomology, 2 (35): 192-200.
- KOEHLER-SANTOS, P.; LORENZ-LENKE A. P.; MUSCHNER, V. C.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M. & FREITAS L. B. (2006). **Molecular Genetic Variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an Invasive Species in Southern Brazil**. Biological Journal of the Linnean Society, (88): 611-630.
- KOSCHNITZKE, C. & SAZIMA, M. (1997). **Biologia Floral de Cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em Mata Semidecídua**. Revista Brasileira de Botânica, 2 (20): 119-126.
- KILLIP, E. P. (1938). **The American Species of Passifloraceae**. Field Museum of Natural History, Botanical Series, (19): 1-613.
- KILLIP, E. P. (1960). **Supplemental Notes on the American Species of Passifloraceae, With Descriptions of New Species**. Contr. U. S. Nat. Herbarium, (35): 1-23.
- LEITÃO, H. F. & ARANHA, C. (1974). **Botânica do Maracujazeiro**. Sociedade Brasileira de Fruticultura. Campinas.
- LERSTEN, N. R. (2004). **Flowering Plant Embryology**. Blackwell Publishing Professional. State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA.
- LINNAEUS, C. (1735). **Species Plantarum**. Ed.1 (2): 955-960.
- LORENZ, A. P. (2002). **Relações Evolutivas entre *Passiflora actinia* Hooker e *Passiflora elegans* Masters (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MANICA, I. (1981) **Fruticultura: 1. Maracujá**. Editora Ceres, São Paulo, 151p.
- MARIATH, J. E. A.; AYUB, D. M. (1994). **Estruturas Reprodutoras das Angiospermas e Adaptações para Polinização**. In: II Jornada de Estudos sobre interações animais/plantas e manejo integrado de pragas. Ijuí. Resumo expandido, p. 26-28.

- MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR, N. S. (2006). **Anatomia Vegetal**. In Appezzato – da – Glória, B. & Carmello – Guerreiro (eds), 2. ed. Atual. Viçosa: Ed. UFV.
- MASCARENHAS, J. P. (1993). **Molecular Mechanisms of pollen Tube Growth and Differentiation**. *Plant Cell* (5): 1303-1314.
- MASTERS, M. T. (1872). **Passifloraceae**. In: MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. G.; Urban, I. *Flora Brasiliensis*, 1 (13): 527-628.
- MILWARD-de-AZEVEDO, M. A. & BAUMGRATZ, J. F. A. (2004). **Passiflora L. subgênero Decaloba (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil**. *Rodriguésia* 55 (85): 17-54.
- MONDIN, C. A. (2001). **Passiflora organensis Gardner (Passifloraceae), Primeira Ocorrência para o Rio Grande do Sul**. *Pesquisas, Série Botânica*, (51): 147-150.
- MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIES, T. T.; SALZANO, F. M. & FREITAS, L. B. (2003). **A First Molecular Phylogenetic Analysis of Passiflora (Passifloraceae)**. *American Journal of Botany* 90 (8): 1229-1238.
- NETTANCOURT, D. de. (1997). **Incompatibility in Angiosperms. Sexual Plant Reproduction**. New York, 10 (4): 185-199.
- PROCTOR, M., YEO, P. & LACK, A. (1996). **The Natural History of Pollination**. London: Harper Collins Publishers.
- RANKBRASIL: **Records Brasileiros**. Agricultura [online].
- RÊGO, M. M.; RÊGO, E.; BRUCKNER, C. H.; SILVA, E. A. M.; FINGER, F. L. (2000). **Pollen Tube Behavior in Yellow Passion Fruit Following Compatible and Incompatible Crosses**. *Theoretical and Applied Genetics*, 5/6 (101): 685-689.
- RICHARDS, P.W. (1952). **The Tropical Rain Forest: an Ecological Study**. Cambridge: Cambridge University Press.
- RODRIGUES, D.; DUARTE, L. S.; MOREIRA, G. R. P. (2007). **Performance Consequences of Food Mixing in Two Passion vine Leaf-footed Bugs, *Holymeria clavigera* and *Anisosceles foliaceae marginella* (Hemiptera: Coreidae)**. *Brazilian Journal of Biology*, 1 (67): 91-99.
- RUGGIERO, C.; LAM-SANCHEZ, A.; MIGUEL, S. (1975). **Estudo Sobre a Fertilidade de Grãos de Pólen de Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 3, Rio de Janeiro.
- RUGGIERO, C. (1980). **Alguns Fatores que Podem Influir na Frutificação do Maracujazeiro**. In: RUGGIERO, C. *Cultura do Maracujazeiro*. Jaboticabal, F. C. A. N., 85 p.

- RUGGIERO, C. (1987). **Cultura do Maracujazeiro**. Ribeirão Preto, Editora Legis Summa, Unesp., 250 p.
- SACCO, J. C. (1962). **Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul (Passifloraceae)**. Editora UFRGS.
- SACCO, J. C. (1980). **Flora Ilustrada Catarinense – Passifloráceas**. Boletim do Instituto. Itajaí – Santa Catarina, Brasil.
- SALOMÃO, T. A. e ANDRADE, V. M. de M. (1987). **Botânica**. In: RUGGIERO, C. **Cultura do Maracujazeiro**. Jaboticabal, FCAVJ – UNESP.
- SAZIMA, M.; SAZIMA, I. (1978). **Bat Pollination of the Passion Flower, *Passiflora mucronata*, in Southeastern Brazil**. Biotropica, 2 (10): 100-109.
- SEMIR, J.; BROWN JR., K. S. (1975). **Maracujá: a Flor da Paixão**. Revista Geográfica Universal, 2 (5): 40-47.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.; DALL'AGNOL, M. (2002). **Auto-incompatibilidade em Plantas**. Ciência Rural, Santa Maria, 6 (32): 1083 - 1090.
- SHIVANNA, K. R. (2003). **Pollen Biology and Biotechnology**. Science Publishers, Inc. USA.
- SHIVANNA, K. R. & JOHRI, B. M. (1985). **The Angiosperm Pollen: Structure and Function**. Wiley Eastern, New Delhi.
- SOUZA, L. A. (2003). **Morfologia e Anatomia Vegetal: Célula, Tecidos, Órgãos e Plântula**. Ponta Grossa: Editora UEPG. 259 p.
- SOUZA-CHIES, T. T.; YOCKTENG, R. & NADOT, S. (2005). **Systématique Moléculaire Comparée em France et au Brésil du Genre *Passiflora L.* (Passifloraceae)**. Cahiers Agricultures, 2 (14) mars-avril.
- SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. (1997). **Maracujá: Espécies, Variedades e Cultivo**. São Paulo: FEALQ, (3).
- SUTHERLAND, S. & DELPH, L. F. (1984). **On the Importance of Male Fitness in Plants, Patterns of Fruit-set**. Ecology 65 (4): 1093-1104.
- TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. (2005). **Self Incompatibility in Plants**. Annual Rev. Plant Biology, (56): 467-489.
- TAYLOR, L. P. & HEPLER P. K. (1997). **Pollen Germination and Tube Growth**. Plant Physiology. Plant Mol. Biology, (48): 461-91.
- TEIXEIRA, C. G.; CASTRO, J. V.; TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J. C.; TURATTI, J. M.; LEITE, R. S. S. L.; BLISKA, F. M. M.; GARCIA, A. E. B. (1995). **Maracujá: Cultura, Matéria-**

- prima, Processamento e Aspectos Econômicos.** Série Frutas Tropicais. Campinas, (9): 1-142.
- UHL, C.; VIEIRA, I. C. G. (1989). **Ecological Impacts of Selective Logging in the Brazilian Amazon: a Case Study From the Paragominas Region of the State of Pará.** Biotropica, 2 (21): 98-106.
- WEBERLING, F. (1989). **Morphology of flowers and inflorescences.** University. Press. Cambridge. 405 p.
- VARASSIN, I. G. (1996). **Néctar e Voláteis na Polinização de Quatro Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae).** Dissertação de Mestrado apresentada na UNICAMP, Campinas, 76 p.
- VARASSIN, I. G. & SILVA, A. G. (1999). **A Melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em Vegetação de Restinga.** Rodriguésia 50 (76/77): 5-17.
- VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. (2001). **The Role Nectar Production, Flower Pigments and Odour in the Pollination of Four Species of *Passiflora* (Passifloraceae) in South-Eastern Brazil.** Botanical Journal of the Linnean Society, (136): 139-152.
- VASIL, I. K. & JOHRI, M. M. (1964). **The Style, Stigma and Pollen Tube.** Phytomorphology, (14): 352-369.
- YOCTENG, R. & NADOT, S. (2004). **Phylogenetic Relationships among *Passiflora* Species based on the Glutamine Synthetase Nuclear Gene Expressed in Chloroplast (ncpGS).** Molecular Phylogenetics and Evolution, (31): 379-396.

Capítulo 2

Morfologia, anatomia e histoquímica da interação entre pólen e pistilo em *Passiflora elegans* Masters e *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae)

2.1 Introdução

A interação pólen-pistilo envolve processos de reconhecimento entre pólen e estigma. O reconhecimento do grão pólen se dá através da interação das proteínas esporofíticas originadas do tapete da antera, que ficam entre as báculas da exina ou na superfície do grão de pólen (“*pollenkitt*” e/ou trifino), com as células das papilas estigmáticas, ou através da interação entre o genótipo do grão de pólen e os tecidos carpelares (Schifino-Wittmann & Dall’Agnol, 2002; Went & Willemse, 1984; Shivanna, 2003; Takaiama & Isogai, 2005).

Além dos processos de reconhecimento supracitados, a curvatura das peças florais exerce importante papel no sucesso dessa interação pólen-pistilo. Ruggiero (1973) estudando o maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis*) constatou três tipos de flores na mesma planta com diferentes tipos de curvatura do estilete e posição do estigma em relação às anteras, denominando-os de totalmente curvos (TC), parcialmente curvos (PC) e sem curvatura (SC) diferenças estas observadas somente duas horas após a antese. As flores do tipo (SC) não produzem frutos, mesmo quando polinizadas artificialmente. Cada tipo de flor causa reflexos diferentes na polinização, que sob condições naturais, apresenta melhores resultados nos de estiletos completamente curvos.

O período efetivo para polinização é compreendido desde a completa curvatura dos estiletos até que a flor se feche. Quando os estiletos estão completamente curvos, a polinização apresenta melhores resultados, pois não só a superfície estigmática está em uma posição mais apropriada para receber o pólen nela colocado mecanicamente pelos insetos, como também há um aumento na sua viscosidade, facilitando a retenção do grão de pólen (Mariot & Cechet, 2003). De acordo com Ruggiero (1980) o tempo médio decorrido desde a antese até a curvatura total do estilete é de 71 minutos.

A antese das flores do maracujazeiro, segundo Manica (1981) e Souza (1994) é afetada pelo número de horas de insolação, onde o mínimo de 12 horas é requerido para que ocorra o florescimento. As condições climáticas definem o período de florescimento do maracujá, que pode florescer continuamente como no Norte e Nordeste. Aqui no Sul as estações frias diminuem o período de produção da planta. Em dias de chuva há uma redução na frutificação, devido à necessidade dos grãos de pólen permanecerem secos por pelo menos duas horas na superfície estigmática para que a germinação do tubo ocorra (Akamine & Girolami, 1957).

Usualmente, a hidratação do pólen, a germinação e a penetração no estigma pelo tubo polínico são influenciadas pelo exudado nos estigmas do tipo úmido que apresentam adesão indiscriminada dos grãos de pólen, contando somente com a tensão superficial dos líquidos e, no caso dos estigmas do tipo seco, pelo contato da superfície do pólen com o protoplasto das células do estigma. O sucesso da polinização depende da interação e reconhecimento entre as proteínas polínicas e estigmáticas, sendo que também há o envolvimento de moléculas mais simples como a água, cálcio, lipídios e açúcares (Gaude & McCormick, 1999).

As proteínas agem como fatores de reconhecimento e estão contidas na superfície do pólen e do estigma. Os lipídios contribuem para um posterior estabelecimento de uma contínua hidratação que proverá o crescimento do tubo polínico através do tecido transmissor do estilete (Elleman & Dickinson, 1986, 1994; Wolters-Arts *et al.* 1998).

As flores das espécies *Passiflora elegans* e *Passiflora suberosa*, alvos deste estudo, possuem três estiletos unidos na base com três estigmas livres no topo e, o gênero, é classificado na categoria de estigmas do tipo seco (Capus, 1878 *apud* Heslop-Harrison & Shivanna, 1977).

A classificação dessas espécies quanto à autocompatibilidade definem que *P. suberosa* é uma espécie autocompatível (Koschnitzke & Sazima, 1997; Acioli, 1999). Segundo Acioli (1999) em condições experimentais a espécie *P. suberosa* produz frutos com sementes viáveis tanto por autopolinização, quanto por polinização cruzada. Já a espécie *P. elegans* é presumivelmente auto-incompatível.

2.2 Descrição das espécies

Passiflora elegans (fig 1) é conhecida popularmente como maracujá-de-estalo. Seu nome popular reporta ao fato de “estalar” quando esmagado. Essa espécie floresce e frutifica de outubro a dezembro. Suas características diferenciais importantes são: caule angular, quando em secção transversal, e lenhoso. Folhas trilobadas no terço superior, truncadas na base, lobos suborbiculares, subiguais, arredondados e emarginados no ápice, biglandulares nos sínus. Flores brancas, opérculo membranoso de margem denticulada; ovário glabro. Fruto globoso, amarelo quando maduro, de fácil abscisão natural. Ocorre no interior das florestas. A distribuição geográfica de *P. elegans* está basicamente restrita ao estado do Rio Grande do Sul e a algumas localidades da Argentina e Uruguai (Sacco 1980).

Passiflora suberosa (fig 2) é conhecida popularmente como maracujá-de-cortiça, floresce a partir de setembro, estendendo o período de floração e frutificação até julho, possui como características diferenciais importantes, caules herbáceos a lenhosos subangulares espessamente suberificados nas porções inferiores, característica esta que deu o nome à espécie. Liana perene com presença de gavinhas, estípulas, pedúnculos, brácteas, folhas simples trilobadas, trinervadas, de forma extremamente variável, comumente polimórficas no mesmo indivíduo, desde inteiras até profundamente trilobadas com um par de glândulas no terço inferior. Flores pequenas, esverdeadas,

desprovidas de pétalas, corona bisseriada com filamentos na serie externa e interna. Fruto pequeno (em média 2 cm de diâmetro), globoso ou ovóide, púrpuro escuro ou preto quando maduro, sementes obovadas com testa foveolada. Crescem em lugares geralmente úmidos, em bordas ou interior de bosques. São encontradas como ruderais, em cercas e apoiadas sobre árvores e arbustos. No Brasil ocorre desde Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina até Rio Grande do Sul. É uma espécie amplamente distribuída. Também é comum encontrá-la em toda a América, desde os Estados Unidos (Flórida e Texas) até a Argentina, com exceção das Guianas e Andes (Sacco, 1980; Milward-de-Azevedo & Baumgratz, 2004).

2.3 Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo analisar as características morfológicas, anatômicas e histoquímicas da dinâmica da interação entre o pólen e o estigma das espécies *P. suberosa* do clado *Decaloba*, nas reações de autocompatibilidade e *P. elegans* do clado *Passiflora*, nas reações de auto-incompatibilidade, através de importantes questões a serem investigadas:

- Como são classificados os tecidos carpelares quanto à histoquímica e anatomia de suas estruturas?
- Por onde e como se dá o desenvolvimento do tubo polínico?
- A partir de qual estágio de desenvolvimento da flor, auto-incompatível, desenvolve-se a capacidade de reagir à autopolinização?
- Realizando-se duas autopolinizações no dia da antese é possível anular o efeito da reação de auto-incompatibilidade?

No intuito de esclarecer a essas e outras questões é que objetivou-se o presente trabalho.

2.4 Material e Métodos

Os procedimentos de polinização dirigida e coleta dos botões florais de *P. elegans* e *P. suberosa* foram realizados no estado do Rio Grande do Sul, mais especificamente no bairro Agronomia, e em Ipanema, ambos em Porto Alegre (latitude 30° 02' e longitude 51° 13') e na cidade de Gravataí (latitude 29° 56' e longitude 50° 59'), situada na região Metropolitana a aproximadamente 30 km de Porto Alegre. Essas regiões apresentam clima temperado subtropical úmido, com estações bem diferenciadas. A temperatura média em janeiro é de 25° C e em julho é de 14° C. A média anual é de aproximadamente 19,5° C (Atlas Geográfico-IBGE, 2002). Exemplares de *P. elegans* foram depositados no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número: 152108 (Ipanema) e 152109 (Campus do Vale - Agronomia) e de *P. suberosa* sob o número 152427 (Campus do Vale - Agronomia).

Os botões de *P. elegans* foram submetidos a polinização cruzada para a avaliação da receptividade estigmática, desde 5 mm até a antese com 23 mm de comprimento. As polinizações foram realizadas artificialmente à campo e os botões foram coletados três horas depois. Os botões florais da espécie *P. suberosa* foram submetidos ao teste de peróxido de hidrogênio (Dafni, 1992) para receptividade estigmática, por possuírem botões muito pequenos para um manuseio adequado na realização de polinização artificial. Foram testados botões desde 4 mm até 10 mm de comprimento, momento da antese.

A autopolinização dos botões de ambas as espécies foi realizada na fase de pré-antese para nos certificarmos que não haveria polinização por nenhum agente natural. Após a autopolinização os botões eram protegidos com uma malha de tecido fina e em intervalos de tempo de meia em meia hora, os mesmos iam sendo coletados e fixados.

As autopolinizações e coletas abrangeram um intervalo de tempo desde 30 minutos até 24 horas, com pelo menos três exemplares para cada horário de coleta.

O material coletado foi fixado em Glutaraldeído 1% e Formaldeído 4% em solução tampão-fosfato pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976), submetidos à pressão negativa de 0,6 atm, desidratado em série etílica, emblocado em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983) e seccionado histologicamente em micrótomo de guias Leitz 1400 e Microm HM 340 E.

A análise anatômica foi realizada através de seções transversais e longitudinais de 3 a 4 µm de espessura, aderidas a lâminas histológicas e coradas com Azul de Toluidina O, 0,05%, pH 4,4 (Feder & O'Brien, 1968). Testes histoquímicos para detecção de Amido com Lugol (Johansen, 1940), calose com Azul de Anilina em fluorescência (filtro de excitação 340-380 nm) (Smith & McCully, 1978), celulose com Calcoflúor White em fluorescência (filtro de excitação 340-380 nm) (Hughes & McCully, 1975), pectinas com Alcian Blue (Lillie, 1965) e Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940), polissacarídeos com Ácido Periódico e Reagente de Schiff (reação de PAS) (O'Brien & McCully, 1981), proteínas totais com Azul Brilhante de Coomassie (Southworth, 1973) e lipídeos com Sudam III (Sass, 1951) foram realizados em seções aderidas às lâminas mantidas sem coloração e com material fresco.

Para a análise da morfologia externa as amostras foram desidratadas em acetona, secas através do método de ponto crítico (Gersterberger & Leins, 1978) (CPD Balzers 030) e metalizadas com ouro (Sputtering Balzers SCD 050) e observados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6060) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

2.5 Resultados e Discussão

Passiflora elegans apresenta o pico de formação de estruturas reprodutivas entre os meses de agosto a dezembro, ampliando o intervalo de floração e frutificação da espécie, que segundo Sacco (1980) se concentraria nos meses de outubro a dezembro. Ostenta flores brancas vistosas, com aproximadamente 4 cm de diâmetro e coroa em tons violáceos (fig 3). Fruto globoso, amarelo quando maduro, de fácil abscisão natural, com aproximadamente 5 cm de diâmetro (fig 4), cobrindo inteiramente o solo sob a ramagem que serve de suporte à planta, que vive naturalmente sobre a copa de outras árvores (fig 5).

Passiflora suberosa floresce a partir de setembro, estendendo o período de floração e frutificação até julho, de acordo com os dados da literatura (Sacco, 1980; Deginani, 2001). Exibe flores pequenas, esverdeadas, desprovidas de pétalas, em média apresentando de 2 cm de diâmetro (fig 6). Fruto pequeno, globoso ou ovóide, púrpuro escuro ou preto quando maduro, com 2 cm de diâmetro, em média (fig 7). Possuem hábito ruderal, crescem em bordas ou interior de bosques (fig 8).

As flores do maracujazeiro desabrocham e permanecem abertas durante um único dia. No caso da espécie *P. elegans*, a antese é de ocorrência matinal, por volta das 8 horas, enquanto que os indivíduos da espécie *P. suberosa* entram em antese por volta das 6 horas da manhã. Ambas as espécies fecham suas flores ao cair da tarde. A flor ao se abrir, apresenta os estiletos eretos e estes vão se curvando até que a superfície estigmática esteja em uma posição apropriada para a polinização, isto é, ao mesmo nível das anteras (figs 9 e 10 - *P. elegans*) (figs 11 e 12 - *P. suberosa*). Corroborando, Acioli (1999, 2003) e Ruggiero (1980) quanto aos dados apresentados sobre a curvatura das peças florais. Durante este período há movimentação dos filetes em direção à base da flor assumindo posição perpendicular em relação ao androginóforo. Os estiletos

apresentam igual movimento, alcançando a mesma posição somente mais tarde. Garcia & Hoc (1998 a, b) descrevem este mesmo padrão de movimentação das peças florais para outras espécies de passifloras.

Os botões de *P. elegans* entram em antese, aproximadamente, aos 23 mm de comprimento. Após polinização cruzada, observamos que seus estigmas apresentaram-se receptivos a partir de 15 mm (fig 13), onde se pôde visualizar em secção transversal, o tubo polínico atravessando por entre as células do tecido transmissor (figs 16a e 16b) e longitudinal (fig 37). Apresenta, portanto, um mecanismo de protoginia, ou seja, a receptividade do estigma ocorre antes da liberação dos grãos de pólen.

Ainda em *P. elegans*, não raramente, no dia anterior à antese pôde-se observar uma pequena retração das sépalas (fig 15), deixando à vista o ápice dos estigmas mantendo, no entanto, suas anteras indeiscentes, característica que talvez esteja relacionada com um dos mecanismos utilizados para priorizar a polinização cruzada.

Em *P. suberosa* os estigmas passam a ser receptivos a partir de 4 mm de comprimento (fig 14), comprovado através do teste de peróxido de hidrogênio (fig 14a), sendo que a antese ocorre aproximadamente aos 10 mm. Quando ocorre polinização natural, pode se observar no dia seguinte um ligeiro aumento do ovário e uma mudança de cor verde para róseo das sépalas das flores (fig 17).

Em *P. suberosa* não ocorre a visualização dos estigmas por retração das sépalas, talvez por tratar-se de uma espécie autocompatível que, portanto, não necessita exclusivamente de polinização cruzada.

Sabe-se que o período efetivo para polinização cruzada é quando os estiletes estão completamente curvos. Segundo Varassin & Silva (1999) os testes de receptividade estigmática em *Passiflora alata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, revelaram que os estigmas apresentam-se receptivos durante todo o período diurno da antese estando eles

flexionados ou não. Isso significa que potencialmente a flor pode ser polinizada artificialmente durante todo o período da antese, pois não depende da interação anatômica adequada entre polinizadores naturais e posicionamento das peças florais para este evento. Portanto, a polinização artificial pode ser realizada desde o período de pré-antese, pois seus estigmas já estão receptivos, até momentos antes do fechamento das flores.

Os botões florais em pré-antese de *P. elegans* polinizados artificialmente somente apresentaram germinação dos grãos de pólen na superfície estigmática após duas horas de contato com o pólen sem sofrerem nenhum contato com água (fig 18). O material processado antes desse intervalo de tempo não apresentou aderência do pólen ao estigma, vindo ao encontro das ponderações de Akamine & Girolami (1957) quanto à necessidade dos grãos de pólen permanecerem secos por pelo menos duas horas, em contato com a superfície estigmática, para que a germinação do tubo ocorra. No entanto, a espécie *P. suberosa*, apresentou resultados satisfatórios quanto a aderência e germinação do tubo polínico em contato com o estigma em um intervalo de tempo mais reduzido. Após uma hora e meia de contato pólen-estigma a germinação do tubo polínico já pôde ser observada (fig 19).

Os estiletos tanto de *P. elegans* quanto de *P. suberosa* (figs 20 e 21) são do tipo sólido, com epiderme simples, parênquima cortical, feixes vasculares e tecido transmissor coincidindo com dados obtidos por Souza *et al.* (2006) com a espécie *P. edulis*. Esses autores observaram que as substâncias intercelulares do tecido transmissor e do estigma apresentavam-se ricas em polissacarídeos, entretanto o teste realizado para detecção de pectinas reagiu negativamente. No entanto, observamos a presença de pectinas nas paredes das células das emergências estigmáticas e também nas células do

tecido transmissor de *P. elegans* (figs 22 e 23) e nas emergências estigmáticas de *P. suberosa* (fig 24).

A parede celular primária possui uma diversidade de funções, dentre elas: proporcionar às células robustez mecânica, manter a morfologia das células, controlar a expansão celular e o transporte intercelular, proteger as células contra organismos patogênicos, participar na comunicação intercelular e contribuir em alguns casos como reserva alimentar (Brett & Waldron, 1990). As pectinas são um dos componentes dessas paredes primárias e da lamela média, que auxiliam na regulação da adesão entre as paredes das células em relação aos espaços intercelulares. Essas pectinas encontradas nas paredes e na lamela média apresentam características estruturais diferentes entre elas (Willats *et al.* 2001).

Segundo Selvendran (1985) as pectinas presentes na lamela média são menos ramificadas e possuem cadeias laterais mais curtas do que as das paredes primárias. Essas cadeias laterais estão diretamente relacionadas com o grau de rigidez das paredes celulares, ao passo que cadeias com um baixo número de ramificações formam géis menos resistentes (Jones *et al.* 1997).

Atribuímos a essa menor resistência do gel péctico na zona de lamela média, a causa de um maior afrouxamento entre as paredes das células, tanto mecânica quanto quimicamente (Willats *et al.* 2001). Isso permite que o tubo polínico se desenvolva apoplasticamente através do material extracelular das emergências estigmáticas e do tecido transmissor em ambas as espécies aqui estudadas (fig 35 - *P. suberosa* - fig 36 - *P. elegans*).

O tecido transmissor se estrutura logo abaixo do estigma, e em ambas as espécies, segue centralmente posicionado por todo o comprimento do estilete até o ovário (fig 25) apresentando células alongadas de paredes espessas e ricas em

polissacarídeos (fig 26), como em geral é observado, nesse tipo de tecido (Lersten 2004).

As células adjacentes à passagem do tubo polínico demonstram alteração no conteúdo dos seus vacúolos com acúmulo de substâncias de natureza péctica (figs 16a e 16b), bem com junto às paredes celulares. As substâncias pécticas são sintetizadas no Complexo de Golgi na forma metil-esterificada. A metil-esterificação de grupos carboxílicos evita que as pectinas, recentemente secretadas, formem ligações com cálcio, proporcionando uma menor rigidez da parede celular, pois quanto maior o grau de metil-esterificação mais fluido será o caráter do gel de pectinas, facilitando a expansão da parede celular (Taiz & Zeiger, 2004). A presença dessas pectinas, na parede celular e nos vacúolos celulares, confere elasticidade à célula, permitindo dessa forma a expansão celular, e a manutenção da integridade das estruturas celulares pelas propriedades hidrofílicas das pectinas (Taylor & Hepler, 1997). Essas propriedades são importantes para promover as alterações, das paredes das células do tecido transmissor, necessárias para a passagem do tubo polínico em ambas as espécies estudadas.

Segundo Heslop-Harrison & Shivanna (1977) o estigma do gênero *Passiflora* é do tipo seco e com papilas unicelulares. Souza *et al.* (2006) interpretam essa estrutura como uma papila estigmática multicelular e multisseriada. Entretanto, em *P. elegans* e em *P. suberosa* analisadas, essa estrutura é constituída por emergências multicelulares constituídas por células da camada dérmica e subdérmica, formando uma projeção que expõe a superfície receptora de pólen, além de proporcionar um maior direcionamento do tubo polínico no início de sua trajetória (figs 27 e 28). O termo papila, segundo Font Quer (1975), se refere ao mais simples dos tricomas, reduzido a uma proeminência da parede das células epidérmicas. Uphof (1962) descreve na categoria de emergências epidérmicas uma estrutura muito semelhante à encontrada em *Passiflora*, citando-a

como “*barbules*” (do inglês, sem correspondência em português) e encontradas em *Begonia manicata*.

A identificação de proteínas no estigma e estilete de ambas as espécies foi positiva, concentradas na superfície das células do estigma e nas paredes das células do tecido transmissor (figs 29 e 30), bem como na exina e na intina dos grãos de pólen (fig 43). Em aspectos gerais, segundo Heslop-Harison (1979) as proteínas contidas na exina e na intina diferem nas suas funções e origens. As proteínas da exina são originadas do esporófito, enquanto que as da intina têm sua origem no gametófito. Essas proteínas participam do reconhecimento entre pólen e estigma durante as reações de auto-incompatibilidade esporofítica e gametofítica, respectivamente (Shivanna, 2003). A relação das proteínas com as reações de auto-incompatibilidade foi detectada e caracterizada, pela primeira vez na espécie *Brassica oleraceae*, por Nasrallah & Wallace (1967).

Observou-se também que as substâncias do tecido transmissor e do estigma são ricas em polissacarídeos (fig 26 - *P. elegans* - fig 31 - *P. suberosa*) de acordo com o observado no trabalho de Souza *et al.* (2006) com a espécie *Passiflora edulis*. Além dessas substâncias, foi observado que há uma visível concentração de amido nas células do tecido transmissor, se comparado à quantidade de amido nesse mesmo tecido em um estilete não polinizado (fig 32), evidenciando a função de nutrição do tubo polínico por esse tecido (fig 33), de acordo com Cheung (1996) a matriz extracelular do tecido transmissor é composta por polissacarídeos, proteínas, dentre outras substâncias, que são utilizadas pela demanda metabólica do tubo polínico em crescimento.

Quanto aos testes histoquímicos com pólen, há uma deposição de calose na extremidade do tubo polínico nos casos de autopolinização em *P. elegans* (fig 34). Alguns autores sugerem que a camada de calose poderia agir como obstrução mecânica,

ou como uma barreira à permeabilidade para impedir o desenvolvimento dos tubos polínicos incompatíveis (Heslop-Harrison, 1975a; Takayama & Isogai, 2005). É possível que essa deposição seja a causa do fracasso no desenvolvimento desse tubo polínico (Bell, 1995).

Em *P. suberosa*, espécie autocompatível, não foi observado bloqueio do crescimento do tubo após autopolinização, conseqüentemente não houve deposição de calose na extremidade do tubo polínico.

Quanto à morfologia do pólen, na espécie *P. elegans*, o mesmo apresenta-se com 6 a 12 colpos (figs 38 e 39). Na espécie *P. suberosa* o pólen é 12 colpado (figs 40 e 41) de acordo com o observado por Milward-de-Azevedo & Baumgratz (2004). Segundo a classificação de Erdtman (1952) para a família Passifloraceae, o pólen apresenta de 3 a 12 colporos, estes por sua vez fundem-se dois a dois, nos pólos, formando um colpóide. A sexina é reticulada, na qual se percebe a presença de báculas em seu interior. Segundo Corbet *et al.* (1982) grãos de pólen com exina reticulada têm um importante papel na polinização por insetos devido à maior atração eletrostática entre o corpo do polinizador e a superfície reticulada do grão de pólen. Trabalhos sobre biologia floral para o gênero *Passiflora*, principalmente para o maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), relatam a ocorrência de insetos do grupo dos Himenópteros como os seus principais polinizadores (Souza *et al.* 2004). Desse modo, a forma reticulada em adição às substâncias presentes na superfície do pólen poderia desempenhar a função de aderência dos grãos ao corpo do polinizador, bem como participar da aderência à superfície do estigma.

Na espécie *P. elegans*, foram observados grãos contendo 8 e 12 colpos, mantendo sua junção nos pólos, enquanto que em *Passiflora suberosa* não houve variação no número de colpos.

A morfologia polínica em Passifloraceae é considerada similar à encontrada em famílias como Cucurbitaceae, e alguns gêneros de Flacourtiaceae e particularmente Turneraceae, famílias essas pertencentes à mesma Ordem Violales (Cronquist, 1988). Vale ressaltar que a família Turneraceae foi incorporada recentemente à Passifloraceae devido às características em comum, como as variações na transmissão de plastídios (APG II, 2003). Dessa forma a análise polínica acaba fortalecendo esse posicionamento taxonômico.

Além da morfologia externa apresentada, o pólen do gênero *Passiflora* é bem característico pela estrutura e espessura de sua parede. A esporoderme das espécies analisadas apresentou-se bem característica pela sua espessura. A exina é facilmente visualizada como dois estratos distintos. A mais externa, denominada sexina, é semitectada e menos densa que a camada mais interna, a nexina (Erdtman, 1952).

Os testes histoquímicos revelaram a presença de proteínas depositadas sobre a superfície externa e entre os espaços formados pelas báculas da sexina dos grãos de pólen de ambas as espécies. Uma menor quantidade de proteínas foi detectada na intina do pólen de *P. elegans* (fig 43) o que não foi observado nessa mesma camada no pólen de *P. suberosa*. Também foram observadas substâncias de natureza lipídica envolvendo os grãos de ambas as espécies (fig 46). Essas substâncias costumam ter origem a partir do citoplasma de tecidos esporofíticos, como o tapete, que se desprendem após a lise celular e ficam depositadas sobre a superfície dos grãos de pólen, localizados na cavidade locular da antera, constituindo o “*pollenkitt*” e/ou trifino (Nepi & Franchi, 2000).

De acordo com Dobson (1988) o “*pollenkitt*” é composto de uma mistura de substâncias hidrofóbicas que recobre a superfície do pólen de muitas angiospermas. A presença dessas substâncias costuma estar relacionada às espécies com polinização

entomófila (Nepi & Franchi, 2000) e são vitais na interação com estigmas secos sendo responsáveis pela adesão e hidratação do grão de pólen quando em contato com o estigma, assim como pela conservação das proteínas esporofíticas dentro das cavidades da exina (Dickinson & Lewis, 1973; Pacini & Hesse, 2005).

Pacini & Hesse (2005) relatam a dificuldade em diferenciar o “*pollenkitt*” de outros tipos de materiais aderidos à superfície do grão, dentre eles o trifino. Esses materiais diferem em sua composição, origem, desenvolvimento e função. Dessa forma somente um estudo durante as etapas do desenvolvimento possibilitaria a correta denominação do material depositado sobre a parede do pólen nas espécies aqui analisadas.

Anatomicamente, o pólen apresenta-se no estágio bicelular no momento da dispersão em ambas as espécies (fig 42) de acordo com o descrito para a família Passifloraceae (Johri *et al.* 1992). Segundo alguns autores (Brewbaker, 1957, 1967; Nettancourt, 1997) há características que apontam certa correlação entre o tipo de pólen e o sistema de auto-incompatibilidade. O pólen binucleado ocorreria no sistema de auto-incompatibilidade gametofítica, com a inibição do tubo polínico ocorrendo na altura do estilete ou do ovário. Já o pólen trinucleado faria parte do sistema de auto-incompatibilidade esporofítica, com inibição do tubo na superfície estigmática. Em *P. elegans*, a inibição do tubo polínico ocorre na superfície estigmática e há presença de proteínas na exina, o que caracterizaria uma reação de auto-incompatibilidade esporofítica, porém, o pólen apresenta-se binucleado no momento da dispersão e também há presença de proteínas na intina do grão de pólen, o que poderia sugerir uma reação de auto-incompatibilidade gametofítica. É importante salientar que *P. suberosa* é uma espécie autocompatível e que não foi observada a presença de proteínas na intina de seus grãos de pólen. Portanto, a função de reconhecimento do pólen auto-

incompatível em *P. elegans* é atribuída às proteínas presentes na intina, caracterizando uma provável reação do tipo gametofítica.

Polissacarídeos e pectinas estão presentes na intina (figs 44 e 45). Shivanna (2003) compara a intina à parede primária das outras células das plantas, tendo como principais componentes a celulose, hemicelulose e pectinas. No entanto, um estrato celulósico não foi detectado, mas não se pode descartar em definitivo a presença de celulose. Adaptações nas técnicas e/ou outros testes para possível detecção desse polissacarídeo devem ser realizados futuramente.

2.6 Bibliografia citada

- ACIOLI, M. F. (1999). **Estudo Preliminar da Biologia Floral de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae)**. Dissertação de Bacharelado apresentada no Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS. 23p.
- ACIOLI, M. F. (2003). **Ecologia da Polinização de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre.
- AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, D. G. (1957). **Problems in Fruit Set in Yellow Passion Fruit**. Hawaii Farm. Sci., 4 (5): 3-5.
- APG II. (2003). **An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II**. Botanical Journal of the Linnean Society, (141): 399-436.
- BARP, E. A.; SOARES, G. L. G.; GOSMANN, G.; MACHADO, A. M.; VECCHI C. & MOREIRA, G. R. P. (2006). **Phenotypic Plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): Induction and Reversion of two Morphs by Variation in Light Intensity**. Braz. Journal Biology, 66 (3): 29-41.
- BELL, P. R. (1995). **Incompatibility in flowering plants: adaptation of an ancient response**. Plant Cell, (7): 5-16.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, H. R. S. (2003). **Espécies de Maracujá: Caracterização e Conservação da Biodiversidade**.
- BRETT, C. & WALDRON, K. (1990). **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. London.
- BREWBAKER, J. L. (1957). **Pollen cytology and self incompatibility systems in plants**. Journal Hered. (48): 271-277.

- BREWBAKER, J. L. (1967). **The Distribution and Phylogenetic Significance of Binucleate and Trinucleate Pollen Grains in the Angiosperms.** American Journal Botany, (54): 1069-1083.
- BUCKERIDGE, M. S., TINÉ, M. A. S., SANTOS, H., P. e LIMA, D. U. (2000). **Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular em Sementes. Estrutura, Metabolismo, Funções e Aspectos Ecológicos.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 12 (Edição Especial): 137-162.
- BUZATO, S.; FRANCO, A. L. M. (1992). **Tetrastylis Ovalis: a Second Case of Bat-Pollinated Passionflower (Passifloraceae).** Plant Syst. Evolution, (181): 261-267.
- CAPUS (1878) *in* HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K. R. (1977). **The Receptive Surface of the Angiosperms Stigma.** Annals Botany, (41): 1233-1258.
- CERVI, A. C. (1997). **Passifloraceae do Brasil. Estudo do Gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*.** Fontqueria, (45): 1-92.
- CHEUNG A. Y. (1996). **Pollen tube growth pathway: its contribution and response to pollination.** Sexual Plant Reproduction, (9): 330-336.
- CORBET, S. A.; BEAMENT, J.; EISIKOWITCH, D. (1982). **Are Electrostatic Forces Involved in pollen Transfer?** Plant Cell and Environment, (5): 125-129.
- CRONQUIST, A. (1988). **An integrated System of Classification of Flowering Plants.** Columbia University Press, New York.
- DAFNI, A. (1992). **Pollination Ecology: A Practical Approach (the Practical Approach Series).** New York, Oxford: University press, 250 p.
- DEGINANI, N. B. (2001). **Las Especies Argentinas del Gênero *Passiflora* (Passifloraceae).** Darwiniana, 39 (1-2): 43-129.

- DICKINSON, H. G.; LEWIS, F. R. S. (1973). **The Formation of the Tryphine Coating the pollen Grains of *Raphanus*, and its Properties Relating to the Self-incompatibility System.** Proc. R. Soc. Lond. B, (184): 149-165.
- DOBSON, H. E. M. (1988). **Survey of Pollen and Pollenkitt Lipids-Chemical cues to Flower Visitors?** American Journal Botany, (75): 170-182.
- ELLEMAN, C. J.; DICKINSON, H. G. (1986). **Pollen-stigma Interaction in *Brassica*, Structural Reorganisation in the pollen Grains During Hydration.** Journal Cell Sci., (80): 141-157.
- ELLEMAN, C. J.; DICKINSON, H. G. (1994). **Pollen-stigma Interaction during Self-incompatibility in *Brassica oleraceae*.** In Williams, E. G.; Knox, R. B.; Clarke, A. E. (eds.). Genetic Control of Self-incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 67-87.
- ERDTMAN, G. (1952). **Pollen Morphology and Plant Taxonomy Angiosperms.** Almqvist & Wilsell, Stockholm.
- ESCOBAR, L. K. (1988). **Passifloraceae.** In P. Pinto and G. Lozano. Editora: Flora da Colômbia Universidad Nacional de Colombia, (10): 1-138.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. (1968). **Plant Microtechnique, Some Principles and New Methods.** American Journal of Botany, (55): 123-142.
- FEUILLET, C. & MACDOUGAL, J. M. (1999). **A New Infrageneric Classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae).** XVI International Botanical Congress, Saint Louis, Missouri, USA, Abstract 4295.
- FIGUEIREDO, R. A. (2000). **Biologia Floral de Plantas Cultivadas. Aspectos Teóricos de um Tema Praticamente Desconhecido no Brasil.** Revista das Faculdades de Educação, Ciências, Letras e Psicologia Padre Anchieta.

- FONT-QUER, P. (1975). **Diccionario de botánica**. 5ª ed. Editorial Labor, Barcelona.
- FREITAS, P. C. D. (1987). **Possibilidades Farmacológicas**. In: Cultura do Maracujazeiro. Ribeirão Preto, Editora Legis Summa.
- GARCIA, M. T. A. & HOC, P. S. (1998 a). **Biologia Floral de *Passiflora foetida* (Passifloraceae)**. Revista de Biologia Tropical, 2 (46).
- GARCIA, M. T. A. & HOC, P. S. (1998 b). **Aspectos de la Biologia Floral y el Sistema Reproductivo de *Passiflora mooreana* (Passifloraceae)**. Darwiniana (35): 9-27.
- GAUDE, T. & McCORMICK, S. (1999). **Signaling in pollen-pistil interactions**. Semin. Cell Dev. Biology, (10): 139-147.
- GERRITS, P. O. & SMID, L. (1983). **A New, Less Toxic Polymerization System for the Embedding of Soft Tissues in Glycol Methacrylate and Subsequent Preparing of Serial Sections**. Journal of Microscopy, (132): 81-85.
- GERSTERBERGER, P. & LEINS, P. (1978). **Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae)**. Anwendung einer neuen Präparationsmethode. Ber. Deutsch Bot. Ges., (91): 381-387.
- GUPTA, M. P. (1995). **Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Talleres de Editorial Presencia, Santafé de Bogotá: Colombia, 347p.
- HESSE, M. (1993). **Pollenkitt Development and Composition in *Tilia platyphyllos* (Tiliaceae) Analysed by Conventional and Energy Filtering TEM**. Plant Syst. Evol. Suppl. (7): 39-52.
- HESLOP-HARISSON, J. (1975a). **Incompatibility and the Pollen-stigma Interaction**. Annals Rev. Plant Physiology, (26): 403-425.

- HESLOP-HARRISSON, Y. & SHIVANNA, K. R. (1977). **The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma**. *Annals Botany*, (41): 1233-1258.
- HESLOP-HARRISSON, J. (1979). **Pollen walls as adaptive systems**. *Annals of the Missouri Botanic Garden*, (66): 813-829.
- HUGHES, J.; McCULLY, M. E. (1975). **The Use of an Optical Brightener in the Study of Plant Structure**. *Stain Technol.*, (50): 319-329
- IBGE (2002). **Atlas Geográfico Escolar**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro.
- IBGE (2003). **Produção Agrícola Municipal: Culturas Permanentes**. São Paulo.
- IBGE (2004). **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. Rio de Janeiro.
- JOHANSEN, D. A. (1940). **Plant Microtechnique**. 3 ed. N. York. Paul B. Hoeber, Inc. 790 p.
- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K .B.; SRIVASTAVA, P. S. (1992). **Comparative Embryology of Angiosperms**. Springer Verlag, Berlin.
- JONES, L.; SEYMOR, G. B.; KNOX, J. P. (1997). **Localization of Pectin Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1→4) β-D-Galactan**. *Plant Physiology*, (113): 1405-1412.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. (1999). **Plant Systematics. A Plylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Sunderland, 464p.
- KILLIP, E. P. (1938). **The American Species of Passifloraceae**. *Field Museum of Natural History, Botanical Series*, (19): 1-613.

- KOSCHNITZKE, C. & SAZIMA, M. (1997). **Biologia Floral de Cinco espécies de *Passiflora* L. (passifloraceae) em Mata Semidecídua.** Revista Brasileira de Botânica, 2 (20): 119-126.
- LERSTEN, N. R. (2004). **Flowering Plant Embryology.** Blackwell Publishing Professional. State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA.
- LILLIE, R. D. (1965). **Histopathologic Technic and Pratical Histochemistry.** McGraw-Hill Book Company. New York, 751p.
- LUNAU, K. (2000). **The Ecology and Evolution of Visual Pollen Signals.** *Plant Syst. Evolution*, (222): 89-111.
- MACDOUGAL, J. M. (1994). **Revision of *Passiflora* Subgenus *Decaloba*, Section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae).** *Syst. Bot. Monogr.*, (41): 1-146.
- MANICA, I. (1981). **Fruticultura: 1.** Maracujá. Editora Ceres, São Paulo. 151p.
- MARIOT, E. J. ; CECHET, L. G. (2003). **Horário de Abertura de Flores do Maracujazeiro Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg) nas Condições de Camboriú, Santa Catarina.** Anais XVII CBF - Fitotecnia.
- MASTERS, M. T. (1872). **Passifloraceae.** In: MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. G.; Urban, I. *Flora Brasiliensis*, 1 (13): 527-628.
- MCDOWELL, E. M. & TRUMP, B. (1976). **Histological Fixatives for Diagnostic Light and Electron Microscopy.** *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, (100): 405-414.
- MILWARD-de-AZEVEDO, M. A. & BAUMGRATZ, J. F. A. (2004). ***Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil.** *Rodriguésia* 55 (85): 17-54.

- MONDIN, C. A. (2001). *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira ocorrência para o Rio Grande do Sul. Pesquisas, Série Botânica, (51): 147-150.
- NASRALLAH, M. E., WALLACE, D. H. (1967). Immunogenetics of self-incompatibility in *Brassica oleraceae*. Heredity (2): 519 - 527.
- NEPI, M.; FRANCHI, G. G. (2000). **Cytochemistry of Mature Angiosperm Pollen**. In: Dafni, A., Hesse, H., Pacini, E. (eds.). Pollen and Pollination. Springer - Verlag, Wien, Austria, pp. 45 - 62.
- NETTANCOURT, D. de (1997). **Incompatibility in Angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. (1981). The Study of Plant Structure: Principles and Select Methods. Melbourne, Vic., Australia: Termacarphi Pty. Ltda.
- PACINI, E. & HESSE, M. (2005). **Pollenkitt - its Composition, forms and Functions**. Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 5 (200): 399-415.
- PEREIRA, T.; LOURO R. & HOFFMAN M. (1996). **Análise da Biologia Reprodutiva de Flores sem Curvatura de Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. In: Congresso Nacional de Botânica, 47, Nova Friburgo, RJ. Resumos...Nova Friburgo, S. B. B., 398 p.
- RANKBRASIL. **Records Brasileiros**. Agricultura [online].
- RICHARDS, P. W. (1952). **The Tropical Rain Forest: an Ecological Study**. Cambridge: Cambridge University Press.
- RODRIGUES, D.; DUARTE, L. S.; MOREIRA, G. R. P. (2007). **Performance Consequences of Food Mixing in Two Passion Vine Leaf-Footed Bugs, *Holymenia clavigera* and *Anisoscelis foliacea marginella* (Hemiptera: Coreidae)**. Brazilian Journal of Biology, 1 (67): 91-99.

- RUGGIERO, C. (1973). **Estudos Sobre a Floração e Polinização do Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.)**. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal, 92 p.
- RUGGIERO, C. (1980). **Alguns Fatores que Podem Influir na Frutificação do Maracujazeiro**. In: RUGGIERO, C. *Cultura do Maracujazeiro*. Jaboticabal, F. C. A. N. p. 76-85.
- SACCO, J. C. (1962). **Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul (Passifloraceae)**. Editora UFRGS, Porto Alegre.
- SACCO, J. C. (1980). **Flora Ilustrada Catarinense - Passifloráceas**. Itajaí - Santa Catarina, Brasil.
- SALOMÃO, T. A. & ANDRADE, V. M. de M. (1987). **Botânica**. In: RUGGIERO, C. *Cultura do Maracujazeiro*. Jaboticabal, FCAVJ - UNESP.
- SASS, J. E. (1951). **Botanical Microtechnique**. 2nd ed. Ames, The Iowa State College Press, Iowa.
- SAZIMA, M.; SAZIMA, I. (1978). **Bat Pollination of the Passion Flower, *Passiflora mucronata*, in Southeastern Brazil**. *Biotropica*, 2 (10): 100-109.
- SELVENDRAN, R. R. (1985). **Development in the chemistry and Biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers**. *Journal Cell Sci. Suppl.*, (2): 51-88.
- SEMIR, J.; BROWN JR., K. S. (1975). **Maracujá: a Flor da Paixão**. *Revista Geográfica Universal*, 2 (5): 40-47.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. & DALL'AGNOL, M. (2002). **Auto-Incompatibilidade em Plantas**. *Ciência Rural*, Santa Maria, 6 (32): 1083-1090.
- SHIVANNA, K. R. (2003). **Pollen Biology and Biotechnology**. Science Publishers, Inc. USA.

- SHIVANNA, K. R. & JOHRI, B. M. (1985). **The Angiosperm Pollen: Structure and Function**. Wiley Eastern, New Delhi.
- SHIVANNA, K. R. (2003). **Pollen Biology and Biotechnology**. Science publishers, Inc. Enfield (NH), USA.
- SMITH, M. M. & MCCULLY, M. E. (1978). **A critical evaluation of the specificity of aniline blue induce fluorescence**. *Protoplasma*, (95): 229-254.
- SOUTHWORTH, D. (1973). **Cytochemical Reativity of pollen Walls**. *J. Histochem. Cytochem.*, (21): 73-80.
- SOUZA-CHIES, T. T.; YOCKTENG, R. & NADOT. S. (2005). **Systématique Moléculaire Comparée em France et au Brésil du Genre *Passiflora L.* (Passifloraceae)**. *Cahiers Agricultures*, 2 (14): mars-avril.
- SOUZA, P. J. S. (1994). **Polinização em Maracujazeiro**. In: SÃO JOSÉ, A. R. (ed.) *Maracujá Produção e mercado*. Vitória da Conquista, **DFZ/UESB**, BA. p 65-70.
- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; JÚNIOR, A. T. A.; MADUREIRA, H. C. (2004). **Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener* (Passifloraceae)**. *Scientia Horticulturae*, (101): 373-385.
- SOUZA de M. M., PEREIRA T. N. S., DIAS A. J. B., RIBEIRO B. F., VIANA A. P. (2006). **Structural, Hystochemical and Cytochemical Characteristics of the Stigma and Style in *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Passifloraceae)**. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 1 (49): 93-98.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). **Fisiologia vegetal**. Lincoln Taiz & Eduardo Zeiger; tradução de Eliane Romanato Santarém (*et al.*), 3 ed. Porto Alegre: Artmed.

- TAKAYAMA, S. & ISOGAI, A. (2005). **Self-incompatibility in Plants**. *Annu. Rev. Plant. Biology*, (56): 467-489.
- TAYLOR, L. P. & HEPLER P. K. (1997). Pollen Germination and Tube Growth. *Plant Physiol. Plant Mol. Biology*, (48): 461-91.
- UPHOF, J. C. (1962). **Plant Hairs**. Gebruder Borntraeger Berlin: Nikjolassee. 292 p.
- UHL, C.; VIEIRA, I. C. G. (1989). **Ecological Impacts of Selective Logging in the Brazilian Amazon: a Case Study from the Paragominas Region of the State of Pará**. *Biotropica*, 2 (21): 98-106.
- VARASSIN, I. G. (1996). **Néctar e Voláteis na Polinização de Quatro Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado apresentada na UNICAMP, Campinas.
- VARASSIN, I. G. & SILVA, A. G. (1999). **A Melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) em Vegetação de Restinga**. *Rodriguésia* 50(76-77): 5-17.
- VASIL, I. K. & M. M. JOHRI. (1964). **The Style, Stigma and Pollen Tube**. *Phytomorphology*, (14): 352-369.
- WENT, J. L. & WILLEMSE T. M. (1984). **Fertilization**. In: JOHRI, B. M. *Embryology of Angiosperms*. Spring-Verlag, 83 p.
- WIERMANN, R. & GUBATZ, S. (1992). **Pollen Wall and Sporopollenin**. *International Review of Cytology*, (140): 35-72.
- WILLATS, W. G.; McCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J. P. (2001). **Pectin: Cell Biology and Prospects for Functional analysis**. *Plant Molecular Biology*, (47): 9-27.

WOLTERS-ARTS, M.; LUSH, W.M.; MARIANI, C. (1998). **Lipids are required for directional pollen-tube growth.** *Nature*, (392): 818-821.

Capítulo 3

Auto-incompatibilidade e Imunocitoquímica

3.1 Introdução

A auto-incompatibilidade é o mecanismo de inibição do crescimento do tubo polínico procedente de autopolinização, estimulando assim, a polinização cruzada. Esse mecanismo de reconhecimento entre pólen e estigma, em angiospermas, pode ocorrer na superfície estigmática, no interior do estilete ou no próprio rudimento seminal denominado então de ação tardia (Went & Willemse, 1984; Shivanna, 2003).

Segundo Schifino-Wittmann & Dall'Agnol (2002) a auto-incompatibilidade resume-se na incapacidade de uma planta fértil formar sementes quando polinizada por seu próprio pólen favorecendo a polinização cruzada e promovendo assim, uma maior variabilidade genética.

O mecanismo de auto-incompatibilidade em plantas seria análogo ao da resposta imune em animais, a diferença é que no sistema imune dos animais o “não-próprio” é rejeitado, enquanto nas plantas ocorre exatamente o contrário, as células rejeitadas são as “próprias” (Bodanese-Zanettini, 2003).

Existem duas formas distintas de rejeição do próprio pólen, denominadas de auto-incompatibilidade gametofítica e auto-incompatibilidade esporofítica.

Na reação de auto-incompatibilidade gametofítica a rejeição do pólen auto-incompatível é determinada através do reconhecimento de substâncias formadas no próprio pólen e estocadas na intina, que serão detectadas posteriormente, através do desenvolvimento e condução do tubo polínico, pelos tecidos do estilete. Enquanto que na auto-incompatibilidade esporofítica a reação de rejeição é desencadeada pelo contato do pólen auto-incompatível, que tem seu fenótipo determinado pelo genoma diplóide do esporófito que o originou, com a superfície do estigma. Nessa reação, ocorre o reconhecimento dos produtos originados pelos tecidos diplóides da antera da planta-mãe, geralmente de origem protéica, que se encontram depositados nas cavidades da

exina ou sobre as aberturas do grão de pólen, pelas paredes das emergências estigmáticas (Heslop-Harrison *et al.*, 1973; Heslop-Harrison, 1975; Shivanna, 2003).

A reação de auto-incompatibilidade se dá gradualmente desde o impedimento da hidratação ou da germinação do pólen até o rompimento do tubo polínico (Schifino-Wittmann & Dall'Agnol, 2002). O tipo de estigma é muito importante no momento da hidratação do pólen. Segundo Ho & Shi (1986) e Takaiama & Isogai (2005) a absorção da água por parte do grão de pólen auto-incompatível se torna ainda mais difícil sobre o estigma do tipo seco, por ter que ser capaz de hidratar-se apenas com a água do protoplasto das células do estigma. No momento da hidratação, através do contato entre pólen e estigma, ocorre uma interação entre a parede das células das emergências estigmáticas e a superfície do pólen. Até que essa interação seja completada, muitos pólenes incompatíveis germinam e penetram no estigma sofrendo inibição somente no decorrer do desenvolvimento do tubo (Hiscock *et al.* 2002).

Em Rêgo *et al.* (2000) foram investigadas as interações entre pólen e pistilo em polinizações e cruzamentos compatíveis e incompatíveis, assim como a existência de proteínas no estigma e na parte superior do estilete, responsáveis pela reação de incompatibilidade. Segundo o Rêgo (1997) essas proteínas apresentam um aumento gradativo da sua concentração desde dois dias antes da abertura da flor até o dia da antese.

Estudos histoquímicos apontam proteínas, que são secretadas por células do tapete da antera e translocadas para a camada superficial do pólen, substâncias essas que estabeleceriam uma relação tipo chave-fechadura entre as emergências estigmáticas e as proteínas presentes sobre a exina dos grãos de pólen no caso de auto-incompatibilidade esporofítica (Richards, 1997).

Segundo Fernandes *et al.* (1996) provavelmente esse efeito das proteínas de auto-incompatibilidade possa ser anulado realizando-se dois eventos de autopolinização no dia da antese, sendo provável que a primeira autopolinização anule a ação dessas proteínas permitindo que os rudimentos seminiais sejam, em parte, fecundados por um segundo evento de autopolinização.

Além de a auto-incompatibilidade envolver o reconhecimento de proteínas, Bruckner *et al.* (1995) ainda relacionam uma característica anatômica dos grãos de pólen ao tipo de reação auto-incompatível desenvolvida, onde as espécies que sofrem a reação de auto-incompatibilidade gametofítica liberariam grãos de pólen na forma binucleada e as espécies que desenvolvem auto-incompatibilidade esporofítica liberariam grãos de pólen na forma trinucleada.

Quando a planta não sofre os mecanismos de auto-incompatibilidade gametofítica ou esporofítica, ela é denominada uma planta autocompatível.

Se a interação entre pólen e estigma for favorável, ou seja, se o esporófito for compatível ao pólen depositado na superfície estigmática, ocorrerá a germinação desse pólen dando origem ao tubo polínico, que terá um crescimento restrito a sua zona apical (Mascarenhas 1993). O grão de pólen, por sua vez, é formado por camadas de constituição química variável. Em geral, as pectinas são os principais componentes químicos da camada externa da parede do tubo polínico, o que confere elasticidade e permite a expansão das células. As pectinas, com suas propriedades hidrofílicas, ainda preservam a integridade e a estabilidade das membranas celulares. Já a camada interna do tubo polínico é constituída principalmente por calose, que se deposita secundariamente na superfície interna da camada externa do tubo com exceção da zona apical de crescimento (Taylor & Hepler, 1997; Bittencourt, 2003).

Segundo Nettancourt (2000) os tubos polínicos compatíveis apresentam deposição reticulada de calose enquanto que os auto-incompatíveis desenvolvem um depósito irregular dessa substância química na extremidade do tubo, mas ainda não está claro se a deposição de calose na região apical da parede do tubo é que ocasiona o bloqueio de seu desenvolvimento, ou se essa deposição seria uma consequência posterior à reação de incompatibilidade. À medida que o tubo polínico compatível cresce em comprimento, tampões de calose vão sendo deixados para trás (Martin, 1959).

Dentro do gênero *Passiflora*, são relatadas espécies autocompatíveis e auto-incompatíveis. Análises sobre as mudanças ocorridas na parede celular durante esses processos reprodutivos são escassas, particularmente para a família Passifloraceae, o que justifica o uso de anticorpos monoclonais na marcação de epitopos pécticos no intuito de contribuir com os estudos da dinâmica de parede celular na interação pólen-estigma.

3.1.1 O uso da imunocitoquímica no esclarecimento da dinâmica da parede celular

As pectinas e as proteínas arabinogalactanos são importantes componentes das paredes celulares. As alterações nas moléculas pécticas e a expressão dessas proteínas são importantes na definição da função dessas paredes (Knox, 1997).

As pectinas, em geral, possuem um importante papel fisiológico, contribuindo para a hidratação, força e flexibilidade das paredes celulares de órgãos não-lignificados, amadurecimento dos frutos, sinalização em resposta a ferimentos e à interação hospedeiro-patógeno, efeitos morfogenéticos (efeito regulatório na ação hormonal e síntese) e adesão intercelular (Van Cutsem & Messiaen, 1994, Jarvis *et al.* 2003).

As proteínas arabinogalactanos são diferentemente expressadas durante o desenvolvimento celular e estão envolvidas em processos fundamentais tais como a expansão celular (Knox *et al.* 1989), reconhecimento e diferenciação (Knox *et al.* 1991, Knox, 2006), morte celular programada (Dolan *et al.* 1995), reprodução sexuada e embriogênese (Kreuger & Van Holst, 1996; Serpe & Nothnagel, 1994; Borderies *et al.* 2004). Essas proteínas estruturais parecem estar envolvidas nos processos de polinização. Há uma hipótese de que as proteínas arabinogalactanos no pistilo teriam a função de reconhecimento, adesão, nutrição e orientação do tubo polínico (Cheung & Wu, 1995).

Anticorpos monoclonais e policlonais são utilizados como ferramentas precisas na detecção e localização espacial de diferentes componentes químicos da parede celular (Knox, 1997). Segundo Willats *et al.* (2000) o uso destes anticorpos seria a maneira mais direta de compreender a arquitetura molecular das paredes celulares sendo visualizados sob microscopia óptica de fluorescência.

A imunocitoquímica tem como princípio básico a detecção de uma molécula alvo utilizando um anticorpo marcado com compostos químicos que emitam cor ou luz. Estes compostos químicos, quando excitados por luz ultravioleta, passam a emitir luz visível ao serem observados sob microscopia óptica (Souto-Padrón, 1998).

3.1.2 Os componentes químicos da matriz de pectinas (parede celular)

Segundo Brett & Waldron (1990) a matriz de pectinas é composta por ácidos poligalaturônicos, ramnogalacturonanos I e II, arabinanos, galactanos e proteínas arabinogalactanos.

Existem três domínios polissacarídicos encontrados nas pectinas. O primeiro domínio, é composto pelos ácidos poligalaturônicos, também referidos como ácidos

homogalacturônicos quando se apresentam na forma de polímeros não-ramificados. Esses ácidos são encontrados em quantidade considerável em muitas frutas e também estão presentes nas paredes primárias das células. O segundo domínio é o dos ramnogalacturonanos I (RG-I), os quais são os maiores componentes químicos da lamela média e das paredes primárias de dicotiledôneas (Brett & Waldron, 1990). Os RG-I contêm um número variado de cadeias laterais que são compostas principalmente por arabinoses e galactoses. Essas cadeias laterais estão diretamente relacionadas com o grau de rigidez das paredes celulares, sendo que, quanto maior o número de ligações de cadeias laterais à cadeia principal, maior será a rigidez da parede. Ao passo que cadeias que apresentam um baixo número de ramificações formam géis menos resistentes (Jones *et al.* 1997). E o terceiro, o domínio dos ramnogalacturonanos II (RG-II), são polissacarídeos pécticos altamente ramificados, que contém ao menos dez açúcares diferentes em um padrão complexo de ligações. Os RG-II também são componentes das paredes primárias, porém encontrados em menor quantidade em células de dicotiledôneas (Brett & Waldron, 1990; Krishnamurthy, 1999; Scheller *et al.* 1999; Perez *et al.* 2000).

Os três domínios polissacarídicos podem ser covalentemente ligados para formar a rede de pectinas, estrutura essa considerada importante para a modulação e ação das enzimas baseadas nas paredes das células, conferindo a essa rede um aspecto de gel rígido (O'Neill *et al.* 1990).

Morris *et al.* (2000) observaram que as pectinas estão sujeitas à modificações que podem alterar a sua conformação. Visto que, a rigidez da parede celular apresenta-se menor, quanto maior for o grau de metil-esterificação das pectinas, facilitando a expansão da parede durante o crescimento, a metil-esterificação de grupos carboxílicos evita que as pectinas, recentemente secretadas, formem ligações com cálcio. Muitos dos

resíduos ácidos são esterificados com metil, acetil e outros grupos durante a síntese no complexo de Golgi. Tal esterificação mascara as cargas de grupo carboxila e impede as ligações de cálcio entre pectinas, tornando o caráter de gel mais fluido. Ao passo que, a redução ou perda da esterificação induz a capacitação dessas ligações, aumentando a rigidez do gel péctico (Jarvis, 1984; Taiz & Zeiger, 2004).

O grau de esterificação das pectinas pode variar de 0 a 100 %, e também varia muito na mesma parede celular. Em uma única célula há vários domínios onde esse grau pode ser modificado. Pectinas que apresentam de 0 a 50 % de metil-esterificação são consideradas pouco metil-esterificadas, enquanto que as de valores acima de 50 % altamente metil-esterificadas (Morris *et al.* 2000).

Além dos polissacarídeos supracitados que compõem aproximadamente 90 % da matriz de pectinas da parede celular, cabe às proteínas os 10 % restantes (Brett & Waldron, 1990). Dentre as classes de proteínas presentes na matriz péctica, as AGP's são componentes abundantes na parede celular, na membrana plasmática e nas secreções extracelulares. Elas são classificadas como proteoglicanos encontradas em todos os órgãos das plantas desde briófitas até angiospermas (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000, Letarte *et al.* 2006) e estão envolvidas nos processos de expansão celular, reconhecimento, diferenciação (Knox, 1991, 2006), morte celular programada (Dolan *et al.* 1995), reprodução sexuada e embriogênese (Kreuger & Van Holst, 1996).

Segundo Abreu & Oliveira (2004) a presença de proteínas arabinogalactanos e pectinas na parede celular são vitais na manutenção da forma da célula, crescimento do tubo polínico, adesão e interação entre pólen e estigma. Esse fato justifica o uso da imunocitoquímica como ferramenta na análise dessa interação nas espécies de *Passiflora*, estudadas nesse trabalho. A relevância do uso dessa técnica é salientada na

comparação entre espécies compatíveis e incompatíveis e as possíveis alterações da parede celular nesses processos.

3.2 Objetivo

O objetivo desse trabalho foi comparar a dinâmica da parede celular durante a interação entre pólen, estigma e estilete no momento da autopolinização e germinação do tubo polínico, através da utilização de anticorpos monoclonais, nas reações de compatibilidade e incompatibilidade em duas espécies de passifloras, com o objetivo de responder as seguintes questões:

Há diferenças na arquitetura da parede celular do pólen e do pistilo que possam esclarecer o mecanismo ocorrido durante sua interação resultando em reações de compatibilidade e incompatibilidade?

A quebra da auto-incompatibilidade após dois eventos de autopolinização pode ser atribuída às alterações da parede celular?

Baseado no esclarecimento dessas e de outras questões relacionadas ao modo de reprodução, de espécies do gênero *Passiflora*, é que se realizou o presente trabalho.

3.3 Material e Métodos

Os botões e as flores em antese de *P. suberosa* e *P. elegans* (figs 1 e 2) foram coletadas no Rio Grande do Sul, especificamente na zona Sul de Porto Alegre. Os estigmas das flores, após autopolinização, foram fixados em Glutaraldeído 1 % e Formaldeído 4 % em solução tampão-fosfato pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976), lavados em tampão fosfato pH 7,2, desidratados em série etílica ascendente, pré-infiltrados, infiltrados e emblocados em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983) para análise em microscopia óptica.

Material a fresco foi utilizado para os testes de detecção de calose com Azul de Anilina em fluorescência (filtro de excitação 340-380 nm) (Smith & McCully, 1978). Autopolinizações e polinizações cruzadas foram realizadas com estigmas das flores de *P. suberosa* e *P. elegans* para avaliar o crescimento ou bloqueio dos tubos polínicos.

O material usado para a análise imunocitoquímica, foi fixado em Glutaraldeído 1 % e Formaldeído 4 % em tampão-fosfato pH 7,2 (McDowell & Trump, 1976) submetido à pressão negativa e em seguida lavado em tampão fosfato de sódio pH 7,2 e posteriormente, em água destilada. O material foi desidratado em série etílica ascendente (de 20 até 100 %) infiltrado numa solução 1:1 de etanol absoluto e LR White “Hard Grade” (London Resin Company) por 8 horas. Para a infiltração realizaram-se três trocas de LR White 100 %, por um período de 8 horas para cada etapa, deixando-o polimerizar em cápsulas de gelatina em estufa a 60°C por até 24 horas.

Lâminas histológicas foram confeccionadas com secções de 2 a 4 µm, para ambas as técnicas, com MICROM HM 340 E.

Cinco anticorpos monoclonais primários foram utilizados para examinar a distribuição dos componentes de parede, sob microscopia óptica de fluorescência. Os Mabs utilizados: JIM 5, JIM 7 e JIM 13 que reconhecem homogalacturanos com reduzida metil-esterificação, homogalacturanos de alta metil-esterificação e proteínas arabinogalactanos, respectivamente; e os anticorpos LM 5 e LM 6 que reconhecem galactanos e arabinanos, os quais são cadeias laterais das pectinas. Os anticorpos utilizados foram cedidos pelo Professor J. Paul Knox (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK).

Foram analisados os seguintes estádios:

- 1 - Um evento de autopolinização nas duas espécies, com botões em pré-antese;

2 - Dois eventos de autopolinização com botões em pré-antese na espécie *P. elegans*;

As seções foram hidratadas com PBS - tampão fosfato salino pH 7,1 (Harris, 1994) por 10 minutos, bloqueadas com uma solução centrifugada de leite em pó desnatado 3 % em PBS por 45 minutos e tratadas com anticorpos primários diluídos em PBS (1:1) com incubação de 1-2 horas. Posteriormente aplicou-se os anticorpos secundários diluídos em PBS (1:100) com incubação de 1-2 horas em câmara escura. Utilizou-se Goat anti-rat FITC (Sigma). A montagem com lamínula em um meio constituído por para-fenilediamina (PPD) a 0,1% em 10% de tampão fosfato de sódio 10 mM e NaCl a 0,15 M e 90% de glicerol.

As seções foram analisadas em epifluorescência no microscópio Leica DM R (filtro de excitação 340-380 nm) e em campo claro com corante azul de toluidina O 1%, pH 8-9 (Souza, 1998).

Para a análise da morfologia externa, as amostras foram desidratadas em acetona, secas através do método de ponto crítico (CPD Balzers 030), metalizadas com ouro (Sputtering Balzers SCD 050) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL SEM 6060) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

3.4 Resultados e Discussão

Segundo Schifino-Wittmann & Dall'Agnol (2002) a reação de auto-incompatibilidade se dá desde o impedimento da germinação do pólen até o rompimento do tubo polínico. No entanto, em *Passiflora elegans* não foi observada a ocorrência de rompimento do tubo polínico, mas sim um bloqueio do mesmo por deposição de calose em sua extremidade. Esse tubo é bloqueado na altura da superfície estigmática, mais precisamente na base das células da emergência epidérmica do estigma (fig 3).

Segundo Hiscock e McInnis (2003) as flores se tornam incompatíveis exatamente nos momentos antes da antese, assim, somente quando as flores desabrocham é que estas se tornam aptas a discriminar entre pólenes próprios ou provenientes de fecundação cruzada. No entanto, as autopolinizações, em *P. elegans*, foram realizadas com botões em pré-antese e observou-se que o reconhecimento e rejeição do próprio pólen por parte do estigma já ocorrem nessa fase, através de um bloqueio com calose na extremidade do tubo polínico, mostrando que a capacidade de reconhecimento do próprio e não-próprio é anterior à abertura das flores (fig 3) de acordo com Rêgo *et al.* (2000) no estudo de cruzamentos com maracujá amarelo (*P. edulis*). Igualmente na espécie autocompatível, *P. suberosa*, os botões em pré-antese autopolinizados reconheceram e viabilizaram o desenvolvimento do tubo polínico através das emergências estigmáticas e tecido transmissor. Pode-se observar que não há deposição de calose na extremidade do tubo polínico, mas sim tampões de calose no decorrer do desenvolvimento desse tubo isolando a parte vacuolada da parte da extremidade que contém o citoplasma, da mesma forma que ocorre com os tubos polínicos em *P. elegans* quando o estigma é submetido à fecundação cruzada com pólen de outra planta (figs 4 e 5).

Quando a autopolinização é realizada duas vezes no mesmo estigma, a reação de auto-incompatibilidade é quebrada e o tubo polínico não sofre bloqueio por deposição de calose atravessando as emergências estigmáticas e o tecido transmissor (fig 6) corroborando a suposição de Fernandes *et al.* (1996) que afirmam que a fecundação provavelmente poderia ser alcançada realizando-se dois eventos de autopolinização no dia da antese.

Segundo Koschnitzke & Sazima (1997) e Acioli (1999) *P. suberosa* evidenciou ser uma espécie autocompatível quanto à receptividade do pólen da mesma flor, sendo

capaz de produzir frutos com sementes, ainda que em menor quantidade, por autopolinização em condições naturais. Em nossos experimentos a autocompatibilidade da espécie em questão foi comprovada.

Foram analisados eventos de autopolinização e dupla autopolinização em *P. elegans* e autopolinização em *P. suberosa* utilizando-se cinco anticorpos para marcação das seguintes estruturas: tecido transmissor, estigma, tubo polínico, e pólen observados nas tabelas 1, 2 e 3 em anexo.

3.4.1 Reconhecimento de epitopos pécticos

3.4.1.1 Estigma

Nas células das emergências estigmáticas de *P. suberosa* (fig 7 - controle) observou-se intensa marcação, após uma autopolinização, com os anticorpos para pectinas com baixo grau de metil-esterificação (fig 8) e com anticorpos para pectinas com alto grau de metil-esterificação (fig 9). Com anti-galactanos essa marcação foi mais acentuada na superfície das emergências estigmáticas (fig 10). O anticorpo para arabinanos apresentou uma moderada marcação em todo o tecido das emergências estigmáticas da espécie supracitada (fig 11). Em *P. elegans* (fig 12 - controle) após uma autopolinização, a marcação para pectinas desterificadas foi fraca (fig 13), porém a marcação para pectinas altamente metil-esterificadas (fig 14) e galactanos foi intensa (fig 15). Não houve marcação para arabinanos com a espécie *P. elegans* (tabelas 2 e 3). A marcação para galactanos foi mais acentuada na superfície das emergências estigmáticas, como o observado em *P. suberosa*. Em *P. elegans* após dois eventos de autopolinização, constatou-se uma fraca marcação para pectinas desterificadas (fig 16), moderada marcação para pectinas altamente metil-esterificadas (fig 17) e intensa marcação com o anticorpo para galactanos (fig 18) na superfície das emergências estigmáticas, bem como a ausência de marcação para arabinanos (tabelas 2 e 3).

Segundo Jauh e Lord (1996) as pectinas desterificadas são responsáveis pela adesão do tubo polínico, o que explicaria a grande intensidade de marcação que encontramos nas emergências estigmáticas da espécie autocompatível (*P. suberosa*). Em *P. elegans*, após uma e duas autopolinizações observou-se fraca marcação para as pectinas desterificadas nas células da superfície do estigma, demonstrando que a desterificação do estigma nessa espécie não estaria influenciando a adesão do tubo polínico.

Com o anticorpo para galactanos a marcação foi intensa na superfície das emergências estigmáticas em ambas as espécies. Considerando-se que essas células estão diretamente relacionadas com a passagem do tubo polínico, sugerimos que a presença de galactanos na parede dessas células contribua para a passagem apoplástica do tubo, corroborando os estudos de Matheson e Saini (1977), McCartney *et al.* (2000) e McCartney e Knox (2002) sobre a atuação mecânica dos galactanos nas paredes celulares, relacionados à elasticidade celular. Além disso, de acordo com Elleman *et al.* (1988) a presença de galactanos na superfície das emergências estigmáticas seria a comprovação de que as paredes celulares dessas células estariam sofrendo expansão, o que garantiria a entrada do tubo polínico na região da lamela média.

A marcação para pectinas altamente metil-esterificadas foi intensa em *P. suberosa* e em *P. elegans* após uma autopolinização, sendo que após dois eventos de autopolinização a marcação para esse epitopo apresentou-se moderada. Ocorreram marcações intensas e concomitantes dos dois anticorpos para pectinas desterificadas e metil-esterificadas, demonstrando que esse grau de metil-esterificação ocorreria de forma extremamente variável no decorrer do desenvolvimento dos tecidos conforme observado por Knox *et al.* (1990) e Liners *et al.* (1992). Segundo Knox (1997) os homogalacturonanos de alta e reduzida metil-esterificação são cadeias

predominantemente formadas por pectinas que são sintetizadas e secretadas na forma altamente metil-esterificada. Estas cadeias podem ou não sofrer desterificação. A regulação espacial dessas cadeias varia de acordo com a arquitetura da parede celular e formação de espaços intercelulares, resultado da desterificação das pectinas.

Não houve marcação para arabinanos no estigma de *P. elegans*, mas este epitopo estava presente nas emergências estigmáticas de *P. suberosa*. Isso indica que há uma diferença química nas paredes celulares desta região entre as espécies analisadas, entretanto, é difícil explicar sua função. De acordo com Iwai *et al.* (2001) as funções desempenhadas pelos arabinanos ainda são discutidas, mas é possível destacar que a ausência deles possa promover uma fraca adesão celular. Embora presente, esse epitopo não está relacionado com a reação de auto-incompatibilidade na espécie *P. elegans*, pois, após dois eventos de autopolinização onde se observa a quebra da auto-incompatibilidade, a marcação com anti-arabinanos continua ausente do mesmo modo que o observado em uma autopolinização.

3.4.1.2 Tecido Transmissor

Foram observadas pectinas desterificadas nas paredes celulares do tecido transmissor de ambas as espécies analisadas. Em *P. suberosa* após autopolinização (fig 19) foram observadas intensas marcações nos vértices das células do tecido transmissor (figs 20a e 20b). Jarvis (1992, 1998) afirma que um dos papéis das pectinas é suportar a pressão da separação celular imposta pela pressão de turgescência. Caracteristicamente as pectinas desterificadas se ligam mais fortemente com o íon cálcio nas junções (vértices) entre as paredes celulares onde esse estresse é maior, promovendo uma maior coesão do gel péctico.

Em *P. elegans* (fig 21) a marcação para pectinas desterificadas foi fraca após

uma autopolinização (fig 22) e após dois eventos de autopolinização a marcação apresentou-se intensa com esse anticorpo (fig 23), corroborando Lenartowska *et al.* (2001). Os autores afirmam que no tecido transmissor de pistilos polinizados há um alto grau de desterificação e conseqüentemente uma forte ligação com cálcio constituindo um estoque natural desse íon considerado indispensável para o bom desenvolvimento do gametófito masculino. Carpita & Gibeaut (1993) relacionam a maior coesão do gel pécitico com a presença de pectinas desterificadas, provendo uma estrutura para suportar a penetração do tubo polínico através das células do tecido transmissor, resultados esses que estão de acordo com o aumento de pectinas desterificadas, observado em *P. elegans* após dois eventos de autopolinização. Em *P. elegans* após uma autopolinização observou-se uma marcação fraca para pectinas desterificadas, o que talvez possa ser atribuída à reação de auto-incompatibilidade dessa espécie, tendo em vista que o tubo polínico sofrerá bloqueio na base das emergências estigmáticas, local de contato com o tecido transmissor. Observamos que o nível de pectinas desterificadas foi igualmente baixo no estigma de *P. elegans* após uma autopolinização e após dois eventos de autopolinização. Em contrapartida, observou-se uma intensa marcação desse epitopo no tecido transmissor da espécie somente após dois eventos de autopolinização. Com isso atribui-se a esse tecido transmissor juntamente ao estigma, a função de reconhecimento e seleção dos tubos polínicos.

As pectinas metil-esterificadas também foram evidenciadas nas paredes das células do tecido transmissor de ambas as espécies. Em *P. suberosa* (fig 24 - controle), após uma autopolinização foi observada uma moderada marcação para esse epitopo (fig 25) e em *P. elegans* (fig 26 - controle), após uma autopolinização a marcação foi moderada (fig 27), mas após dois eventos de autopolinização essa marcação foi intensa (fig 28). Carpita & Gibeaut (1993) afirmam que a presença de metil-esterificação

previne a maior coesão do gel péctico, permitindo uma maior integridade dos tecidos. Ao contrário, Khosravi *et al.* (2003) descreveram que o nível de pectinas metil-esterificadas é consideravelmente baixo no tecido transmissor de estiletos, curtos e longos autopolinizados, da espécie *Turnera subulata*. Para *P. elegans* acredita-se que se trata de um tecido que necessita de elasticidade para permitir a passagem do tubo polínico, portanto a presença desse epitopo no tecido transmissor vem ao encontro do que foi observado por Carpita & Gibeaut (2003) no estudo das paredes celulares de plantas com flores.

Em *P. elegans* a desterificação aumentou após dois eventos de polinização, ao contrário do reportado por Lenartowska *et al.* (1997, 2001) com *Petunia hybrida*. Os autores observaram uma redução na desterificação das pectinas no tecido transmissor de pistilos polinizados de *Petunia hybrida*, indicando um aumento do cálcio livre no tecido transmissor como uma forma de disponibilização de cálcio para o crescimento dos tubos polínicos.

A detecção de arabinanos diminuiu em direção a base do tecido transmissor de *P. suberosa* (fig 11) após autopolinização e constatou-se a ausência de marcação para arabinanos nas paredes desse tecido na espécie *P. elegans* (tabela 2 e 3). Segundo Orfila *et al.* (2001) a diminuição ou a ausência de arabinanos provoca o afrouxamento das paredes celulares do tecido transmissor, o que poderia facilitar a passagem do tubo polínico. Entretanto, o mesmo não foi observado em *P. elegans* mesmo após dois eventos de autopolinização (tabela 3). Logo, supõe-se que esse epitopo não tem relação com a passagem do tubo polínico pelo tecido transmissor.

3.4.1.3 Tubo Polínico

Em *P. suberosa* após autopolinização foi detectada uma moderada desterificação

ao longo da parede do tubo polínico (fig 29) concordando com Khosravi *et al.* (2003) os quais afirmam que o epitopo para pectinas desterificadas é encontrado na parede fibrilar externa dos tubos polínicos. Em *P. elegans* este epitopo não foi encontrado nesta mesma estrutura (tabelas 2 e 3), de acordo com o que foi observado por Li *et al.* (1995) com *Nicotiana tabacum*.

Houve fraca marcação para pectinas altamente metil-esterificadas na espécie *P. suberosa* ao longo da parede do tubo polínico (fig 30), o mesmo observou-se em *P. elegans* (fig 31b - controle) após uma autopolinização (fig 31a), sendo que após dois eventos de autopolinização não houve marcação ao longo do tubo polínico dessa espécie para esse epitopo (fig 32). Segundo Khosravi *et al.* (2003) os epitopos para pectinas altamente metil-esterificadas estão localizados principalmente nas vesículas citoplasmáticas da extremidade do tubo polínico, cujo local é de expansão celular, o que não foi observado nas espécies de *Passiflora* desse estudo, devido a dificuldade da observação da extremidade do tubo polínico *in vivo*. A adequação de um meio de cultura para germinação dos grãos de pólen *in vitro* tornaria possível uma melhor observação da extremidade do tubo em desenvolvimento, porém não poderíamos observar as alterações naturais, causadas nessa estrutura, durante a interação com o pistilo.

O tubo polínico, de *P. suberosa* após autopolinização, apresentou uma fraca marcação para arabinanos com uma distribuição não homogênea (fig 33) e foi ausente em *P. elegans* (tabela 2). Segundo Iwai *et al.* (2001) os arabinanos podem atuar no processo de adesão celular. A presença desse anticorpo foi observada somente no tubo polínico, assim como no estigma, de *P. suberosa*, confirmando o que sugerimos anteriormente quanto à falta de relação dos arabinanos com a reação de auto-incompatibilidade em *P. elegans*.

3.4.1.4 Pólen

A marcação para pectinas desterificadas e para pectinas com alta metil-esterificação foi semelhante no pólen das duas espécies analisadas, sendo classificada de forte a moderada na intina e ausente na exina. A exina teve ausência de marcação em todos os anticorpos testados nas duas espécies.

Em *P. suberosa*, a intina apresentou marcação moderada para pectinas desterificadas (fig 34) e forte para pectinas altamente metil-esterificadas (fig 35). Os galactanos (fig 36) e os arabinanos (fig 37) apresentaram marcação moderada nessa camada do grão de pólen (tabela 1).

Em *P. elegans*, após um evento de autopolinização, a marcação na intina foi bem evidente para pectinas desterificadas (fig 38) e para pectinas com alta metil-esterificação (fig 39). Observou-se a ausência de marcação para galactanos e arabinanos (tabela 2). Nessa mesma espécie, após dois eventos de autopolinização, também houve uma evidente marcação na intina para desterificação (fig 40) e para metil-esterificação de pectinas (fig 41). Observou-se ausência de marcação para as cadeias laterais de galactanos e arabinanos (tabela 3). Não foram observadas diferenças na marcação com os anticorpos para pectinas desterificadas e metil-esterificadas, nem diferenças relacionadas ao grau de cadeias laterais como arabinanos e galactanos nos grãos de pólen de *P. elegans* com um ou dois eventos de autopolinização. Isso indica que a arquitetura das paredes do pólen dessa espécie não teria influência na reação de auto-incompatibilidade. Pôde-se observar diferenças na arquitetura da parede na intina do pólen de *P. suberosa* com uma moderada marcação utilizando anticorpos para galactanos e arabinanos se comparadas à ausência de marcação na intina de *P. elegans*, após uma autopolinização e após dois eventos de autopolinização (tabelas 1, 2 e 3). Porém, essa diferença química não é suficiente para influenciar no processo de adesão

do pólen nos eventos de compatibilidade e incompatibilidade.

3.4.2 Reconhecimento de epitopos para proteínas arabinogalactanos

3.4.2.1 Estigma

No estigma encontram-se presentes os epitopos pécticos e proteínas arabinogalactanos nas duas espécies testadas. O anticorpo para proteínas arabinogalactanos apresentou uma moderada marcação nas células estigmáticas de *P. suberosa* (fig 42) e uma fraca marcação em *P. elegans* após uma autopolinização (fig 43). Entretanto, observou-se uma forte marcação nessas células após dois eventos de autopolinização (fig 44), comprovando a existência de proteínas arabinogalactanos nesse tecido tanto em plantas autocompatíveis como em plantas auto-incompatíveis. Portanto, a presença de proteínas arabinogalactanos na superfície estigmática é atribuída a um papel importante de reconhecimento e seleção dos grãos pólen de acordo com Cheung *et al.* (1995) e Knox (2006).

3.4.2.2 Tecido Transmissor

No tecido transmissor não houve detecção de proteínas arabinogalactanos em nenhum dos tecidos analisados em ambas as espécies (tabelas 1, 2 e 3).

3.4.2.3 Tubo Polínico

No tubo polínico, o epitopo para proteínas arabinogalactanos está ausente nas duas espécies analisadas (tabelas 1, 2 e 3). Provavelmente esse epitopo ocorra na extremidade do tubo polínico de acordo com Mollet *et al.* (2002), o que não foi confirmado nesse trabalho devido à dificuldade de observação da extremidade do tubo polínico *in vivo*, das espécies de *Passiflora*. A adequação de um meio de cultura para

germinação do pólen *in vitro* possibilitaria melhor observação da extremidade dessa estrutura, porém não poderíamos observar as alterações causadas durante a interação entre pólen e estigma em seu ambiente natural.

3.4.2.4 Pólen

Tanto a intina, quanto a exina apresentaram idênticas marcações em *P. elegans* após um ou dois eventos de autopolinização (figs 43 e 44). A intina teve uma forte marcação para proteínas arabinogalactanos enquanto que a exina não foi reagente à marcação para esse epitopo. No citoplasma do pólen pôde-se observar uma fraca marcação após dois eventos de polinização em *P. elegans* (fig 45). Em *P. suberosa* observou-se ausência de marcação para o epitopo de proteínas arabinogalactanos tanto na intina quanto na exina (fig 42 - tabela 1).

É interessante ressaltar que arabinanos e galactanos estão ausentes e proteínas arabinogalactanos estão presentes na intina de *P. elegans*, ao contrário de *P. suberosa*, onde a intina se constitui de arabinanos e galactanos, mas as proteínas arabinogalactanos estão ausentes nesta estrutura (tabelas 1, 2 e 3). Como tais componentes químicos estão relacionados com a expansão celular, conferindo também força mecânica como é o caso de arabinanos e galactanos, é possível que os recursos utilizados para o crescimento do tubo polínico se diferenciem entre estas duas espécies.

3.5 Bibliografia citada

- ABREU, I. & OLIVEIRA, M. (2004). **Immunolocalisation of Arabinogalactan Proteins and Pectins in *Actinidia deliciosa* Pollen.** *Protoplasma*, (224): 123-128.
- ACIOLI, M. F. (1999). **Estudo Preliminar da Biologia Floral de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae).** Dissertação de Bacharelado apresentada no Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS. 23p.
- ACIOLI, M. F. (2003). **Ecologia da Polinização de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae).** Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, UFRGS. 69p.
- BITTENCOURT JÚNIOR, N. S. (2003). **Auto-Incompatibilidade de Ação Tardia e Outros Sistemas Reprodutivos em *Bignoniaceae*.** Tese de Doutorado apresentada na Universidade Estadual de Campinas.
- BODANESE-ZANETTINI, M. H. (2003). **Sistemas de Incompatibilidade.** In: *Genética & Evolução Vegetal*, Porto Alegre, ed. UFRGS. cap.4, p. 58 - 70.
- BRETT, C. & WALDRON, K. (1990). **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls.** London.
- BREWBAKER, J. L. (1957). **Pollen Cytology and Self-incompatibility Systems in Plants.** *J. Hered.* (48): 271 - 277.
- BREWBAKER, J. L. (1967). **The Distribution and Phylogenetic Significance of Binucleate and Trinucleate Pollen Grains in the Angiosperms.** *American Journal Botany*, (54): 1069 - 1083.
- BRUCKNER C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZZI, A. J.; SILVA, E. M. (1995). **Self-incompatibility in Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims).** *Acta Hort.*, (370): 45 - 57.

- CARPITA, N. C. & GIBEAUT, D. M. (1993). **Structural Models of Primary Cell Walls in Flowering Plants: Consistency of Molecular Structure with the Physical Properties of the Walls During Growth.** *Plant Journal*, (31): 1-30.
- CHEUNG, A. Y.; WANG, H.; WU, H. M. (1995). **A Floral Transmitting Tissue-specific Glycoprotein Attracts Pollen Tubes and Stimulates Their Growth.** *Cell*, (82): 383-393.
- DEA, I. C. M.; CLARK, A. H. & McCLEARY, B. V. (1986). **Effect of Galactose Substitution-pattern on the Interaction Properties of Galactomannans.** *Carbohydrate Research*, (147): 275-294.
- DOLAN, L.; LINSTED, P.; ROBERTS, K. (1997). **Developmental Regulation of Pectic Polysaccharids in Root Meristem of Arabidopsis.** *Journal of Experimental Botany*, (48): 713-720.
- ELLEMAN, C. J.; WILLSON, C. E.; SARKER, R. H.; DICKINSON, H. G. (1988). **Interaction Between the Pollen Tube and the Stigmatic Cell Wall Following Pollination in *Brassica oleracea*.** *New Phytol.*, (109): 111-117.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. (1968). **Plant Microtechnique, Some Principles and New Methods.** *American Journal of Botany*, (55): 123-142.
- FERNANDES, A. A.; RÊGO, M. M. do; BRUCKNER, C. H.; PEREIRA, K. J. C.; RANGEL, A. R. P. (1996). **Comparação entre Técnicas de Autofecundação em Maracujazeiro *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.** In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Curitiba. Anais... Londrina: IAPAR, (14): 334.
- FRANKLIN-TONG, N. & FRANKLIN, C. H. (2003). **Gametophytic Self-Incompatibility Inhibits Pollen Tube Growth Using Different Mechanisms.** *Trends in Plant Science*, 8 (12): 598-605.

- GERRITS, P. O. & SMID, L. (1983). **A New, Less Toxic Polymerisation System for the Embedding of Soft Tissue in Glycol Methacrylate and Subsequent Preparing of Serial Sections.** *Journal of Microscopy*, (132): 81-85.
- HARRIS, N. (1994). **Immunocytochemistry for Light and Electron Microscopy.** In: Harris N, Oparka KJ, eds. *Plant cell biology - a practical approach*. Oxford: IRL Press, 157-176.
- HESLOP-HARISSON, J. (1968). **Pollen Wall Development.** *Science*, (161): 230-237.
- HESLOP-HARISSON, J.; HESLOP-HARISSON, Y.; KNOX, R. B.; HOWLETT, B. J. (1973). **Pollen Wall Proteins: Gametophytic and Sporophytic Fractions in the Pollen Wall of the Malvaceae.** *Annals of Botany*, (37): 403-412.
- HESLOP-HARISSON, J. (1975a). **Incompatibility and the Pollen-Stigma Interaction.** *Annals Review Plant Physiology*, (26): 403-425.
- HESLOP-HARISSON, Y.; SHIVANNA K. R. (1977). **The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma.** *Annals of Botany*, (41): 1233-1258.
- HESLOP-HARISSON, J. (1979). **Pollen-Stigma Interaction in Grasses: a Brief Review.** *New Zealand Journal of Botany*, (17): 537-546.
- HISCOCK, S. J.; HOEDEMAEKERS, K.; FRIEDMAN, W. E.; DICKINSON, H. G. (2002). **The stigma surface and pollen-stigma interactions in *Senecio squalidus* (Asteraceae) following cross (compatible) and self (incompatible) pollinations.** *International Journal of Plant Science* 163 (1): 1-16.
- HISCOCK, S. J. & MCLNNIS, S. M. (2003). **Pollen Recognition and Rejection During the Sporophytic Self-incompatibility Response: *Brassica* and Beyond.** *Trends in Plant Science*, 8 (12): 606-613.
- HO, W. F.; SHI, C. T. (1986). **Incompatibility System in Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims).** *Acta Horticulturae*,(194): 31-38.

- IWAI, H.; ISHII, T.; HAYASHI, N. (2001). **Absence of Arabinan in the Side Chains of the Pectic Polysaccharides Strongly Associated With Cell Walls of *Nicotiana plumbaginifolia* Non-organogenic Callus With loosely Attached Constituent Cells.** *Planta*, (213): 907-915.
- JARVIS, M. C. (1984). **Structure and properties of pectin gels in plant cell walls.** *Plant Cell and Environment*, (7): 153-164.
- JARVIS, M. C. (1992). **Control of Thickness of Collenchyma Cell Walls by Pectins.** *Planta*, (187): 218-220.
- JARVIS, M. C. (1998). **Intercellular Separation Forces Generated by Intracellular Pressure.** *Plant Cell Environ.*, (21): 1307-1310.
- JAUH, G. Y.; LORD, E. M. (1996). **Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination.** *Planta*, (199): 251-261.
- JONES, L.; SEYMOR, G. B.; KNOX, J. P. (1997). **Localization of Pectin Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1→4) β-D-Galactan.** *Plant Physiology*, (113): 1405-1412.
- KHOSRAVI, D.; JOULAIE, R.; SHORE, J. S. (2003). **Immunocytochemical Distribution of Polygalacturonase and Pectins in Styles of Distylous and Homostylous Turneraceae.** *Sexual Plant Reproduction*, (16): 179-190.
- KNOX, J. P.; LINSTED, P. J.; KING, J.; COOPER, C. & ROBERTS, K. (1990). **Pectin Esterification is Spatially Regulated Both Within Cell Walls and Between Developing Tissues of Root Apices.** *Planta*, (181): 512-521.

- KNOX, J. P.; LINSTEAD, P. J.; PEART, J.; COOPER, C.; ROBERTS, K. (1991). **Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation.** *Plant Journal*, (1): 317-326.
- KNOX, J. P. (1997). **The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls.** REVIEW. *International Review of Cytology*, (171): 79-120.
- KNOX, J. P. (2006). **Arabinogalactan-proteins and Plant Cell Development.** *Foods & Food Ingredients. Journal of Japan*, (211): 26-31.
- KOSCHINITZKE, C. & SAZIMA, M. (1997). **Biologia Floral de Cinco Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em Mata Semidecídua.** *Revista Brasileira Botânica*, 20 (2): 119-126.
- KREUGER, M. & VAN HOLST, G. J. (1996). **Arabinogalactan Proteins and plant Differentiation.** *Plant Molecular Biology*, (30): 1077-1086.
- KRISHNAMURTHY, K. V. (1999). **Methods in Cell Wall Cytochemistry.** (Boca Raton, FL: CRC Press).
- LENARTOWSKA, M.; BEDNARSKA, E.; BUTOWT, R. (1997). **Cálcio in the Pistil of *Petunia hybrida* Hort. During Growth of the Pollen Tube – Cytochemical and Radiographic Studies.** *Acta Biology Cracov. Ser. Bot.*, (39): 79-89.
- LENARTOWSKA, M.; RODRIGUEZ-GARCIA, M. I.; BEDNARSKA, E. (2001). **Immunocytochemical Localization of Esterified and Unesterified Pectins in Unpollinated and Pollinated Styles of *Petunia hybrida* Hort.** *Planta*, (213): 182-191.
- LERSTEN, N. R. (2004). **Flowering Plant Embryology.** Blackwell Publishing. Iowa, USA, 212p.

- LETARTE J.; SIMION E.; MINER M.; KASHA K. J. (2006). **Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum*) microscope**. Plant Cell Reports, 24 (12): 691-698.
- LI, Y. Q.; FALERI, C.; GEITMANN, A.; ZHANG, H. Q.; CRESTI, M. (1995). **Immunogold localization of Arabinogalactan proteins, Unesterified and Esterified Pectins in Pollen Grains and Pollen Tubes of *Nicotiana tabacum* L.** Protoplasma, (189): 26 - 36.
- LINERS, F.; VAN CUTSEM (1992). **Distribution of Pectic Polysaccharides Throughout Walls of Suspension-cultured Carrot Cells. An Immunocytochemical Study**. Protoplasma, (170): 10 - 21.
- MARTIN, F. W. (1959). **Staining and Observing Pollen Tubes in the Style by Means of Fluorescence**. Stain Technology, (34): 125 - 128.
- MASCARENHAS, J. P. (1993). **Molecular Mechanisms of pollen Tube Growth and Differentiation**. Plant Cell, (5): 1303 - 1314.
- MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL E. A. (2000). **The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development**. Plant Physiology, (122): 3 - 9.
- MATHESON, N. K. & SAINI, H. S. (1977). **α -L-arabinofuranosidases and β -D-galactosidases in germinating-lupin cotyledons**. Carbohydrate Research, (57): 103 - 116.
- MCCARTNEY, L., ORMEROD, A. P., GIDLEY, M. J. & KNOX, J. P. (2000). **Temporal and Spatial Regulation of Pectic (1->4)- β -D-galactan in Cell Walls of Developing Pea Cotyledons: Implications for Mechanical Properties**. Plant Journal, (22): 105 - 113.
- MCCARTNEY, L.; KNOX, J. P. (2002). **Regulation of Pectic Polysaccharide Domains in Relation to Cell Development and Cell Properties in the Pea Testa**. Journal of Experimental Botany, (53): 707 - 713.

- McDOWELL, E. M. & TRUMP, B. (1976). **Histological Fixatives for Diagnostic Light and Electron Microscopy**. Archives of Pathology & Laboratory Medicine (100): 405 - 414.
- MOLLET, J.; KIM, S.; JAUH, G. Y.; LORD, E. M. (2002). **Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside**. Springer Wien, Protoplasma, (219): 89 - 98.
- MORRIS, G. A.; FOSTER, T. J.; HARDING, S. E. (2000). **The Effect of the Degree of Esterification on the Hydrodynamic Properties of Citrus Pectin**. Food Hydrocolloids, (14): 227 - 235.
- NETTANCOURT, D. de. (1997). **Incompatibility in Angiosperms**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- NETTANCOURT, D. de. (2000). **Incompatibility in Angiosperms**. Spring-Verlag, Sex Plant Reprod., (10): 185 - 199.
- O'NEILL, M. A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. (1990). **The pectin polysaccharides of primary cell walls**. In: Methods in Plant Biochemistry. DEY, P. M.; HARBONE, J. B. (Eds). Academic Press London, (2): 415 - 441.
- ORFILA, C.; SEYMOUR, G. B.; WILLATS, W. G. T.; HUXHAM, I. M.; JARVIS, M. C.; DOVER, C. J.; THOMPSON, A. J. & KNOX, J. P. (2001). **Altered Middle Lamella Homogalacturonan and Disrupted Deposition of (1 → 5) - α - L-arabinanin the Pericarp of Cnr, a Ripening Mutant of Tomato**. Plant Physiol., (126): 210 - 221.
- PEREIRA, T.; LOURO, R. & HOFFMAN, M. (1996). **Análise da Biologia Reprodutiva de Flores sem Curvatura de Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.)**. In. Congresso Nacional de Botânica, Nova Friburgo, RJ. Resumos...Nova Friburgo, S. B. B., (47): 398.

- PEREZ, S.; MAZEAU, K.; PENHOAT, C. H. (2000). **The Three-dimensional Structures of the Pectic Polysaccharides.** *Plant Physiological Biochemistry*, (38): 37 - 55.
- RÊGO, M. M. do. (1997). **Genética, Interação Pólen-Pistilo e Expressão de Proteínas na Auto-Incompatibilidade do Maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims.).** Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Federal de Viçosa. MG, 67 p.
- RÊGO, M. M. do.; RÊGO, E.; BRUCKNER, C. H.; SILVA, E. A. M. da; FINGER, F. L. (2000). **Pollen Tube Behavior in Yellow Passion Fruit Following Compatible and Incompatible Crosses.** *Theoretical and Applied genetics*, 5/6 (101): 685 - 689.
- RICHARDS, A. J. (1997). **Plant breeding systems.** (2^a ed). George Allen & Unwin, London.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. & DALL'AGNOL, M. (2002). **Auto-Incompatibilidade em Plantas.** *Ciência Rural*, 6 (32): 1083 - 1090.
- SHELLER, H. V.; DOONG, R. L.; RIDLEY, B. L.; MOHNEN, D. (1999). **Pectin Biosynthesis: a Solubilized Galacturonosyltransferase from Tobacco Catalyzes the Transfer of Galacturonic Acid from UDP-galacturonic Acid Onto the Non-reducing end of Homogalacturonan.** *Planta*, (207): 512 - 517.
- SERPE, M. D.; NOTHNAGEL, E. A. (1994). **Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation.** *Planta*, 193(4): 542 - 550.
- SHIVANNA, K. R. (2003). **Pollen Biology and Biotechnology.** Enfield (NH), USA.
- SMITH, M. M. & MCCULLY, M. E. (1978). **A critical evaluation of the specificity of aniline blue induce fluorescence.** *Protoplasma*, (95): 229 - 254.

- SOMMER-KNUDSEN, J.; CLARKE, A.E.; BACIE, A. (1997). **Proline and hydroxyproline-rich gene products in the sexual tissues of flowers**. *Sexual Plant Reproduction*, 10 (5): 253 - 260.
- SOUTO-PADRÓN, T. (1998). **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas – SBMM (Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise)**. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ.
- SOUZA, W. (1998). **Introdução à Imunocitoquímica**. In: Souza W. (ed.). *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. (UENF: Rio de Janeiro).
- SOUZA de M. M., PEREIRA T. N. S., DIAS A. J. B., RIBEIRO B. F., VIANA A. P. (2006). **Structural, Histochemical and Cytochemical Characteristics of the Stigma and Style in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae)**. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 1 (49): 93 - 98.
- SUTHERLAND, S., DELPH, L. (1984). **On the Importance of Male Fitness in Plants**. *Ecology*, (65): 1093 - 1104.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). **Fisiologia vegetal**. Lincoln Taiz & Eduardo Zeiger; tradução de Eliane Romanato Santarém (*et al.*), 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- TAYLOR, L. P. & HEPLER, P. K. (1997). **Pollen Germination and Tube growth**. *Plant Physiology. Plant Mol. Biology*, (48): 461 - 491.
- TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. (2005). **“Self Incompatibility in Plants”**. *Annual Review Plant Biology*, (56): 467 - 489.
- VAN CUTSEM, P. & MESSIAEN, J. (1994). Biological effects of pectin fragments in plant cells. *Acta Botanica Neerlandica*, 43 (3): 231 – 245.
- WENT, J. L. & WILLEMSE T. M. **Fertilization**. In: JOHRI, B.M. (1984). **Embryology of Angiosperms**. Spring-Verlag. 83p.

WILLATS, W. G.; LIMBERG, G.; BUCHHOLT, H. C. (2000). **Analyses of Pectic Epitopes Recognized by Hybridoma and Phage Display monoclonal Antibodies Using Defined Oligosaccharides, polysaccharides, and Enzymatic degradation.** Carbohydrate Res., (327): 309 - 320.

CONCLUSÕES

Passiflora elegans, apresenta o pico de formação de estruturas reprodutivas entre os meses de agosto a dezembro, antecipando e ampliando o intervalo de frutificação e floração da espécie.

Em *P. elegans*, os botões em pré-antese reconhecem e rejeitam o pólen auto-incompatível, através de um bloqueio com calose na extremidade do tubo polínico. Este bloqueio ocorre entre a base das emergências estigmáticas e o início do tecido transmissor, demonstrando que a capacidade de reconhecimento do próprio e não-próprio é anterior à antese das flores. Entretanto, quando a autopolinização é realizada duas vezes no mesmo estigma, a reação de auto-incompatibilidade é quebrada e o tubo polínico não sofre bloqueio por deposição de calose atravessando as emergências estigmáticas e o tecido transmissor.

O desenvolvimento do tubo polínico ocorre ao longo da parede, ou através do material extracelular das células das emergências e do tecido transmissor, que comunica a superfície estigmática ao ovário através de um longo estilete, não ocorrendo por penetração do protoplasto das células, em ambas as espécies.

A polinização artificial de ambas as espécies pode ser realizada desde o período de pré-antese, pois seus estigmas estão receptivos, até momentos antes do fechamento das flores.

O pólen de ambas as espécies apresentam-se na forma binucleada no momento da dispersão. *P. elegans* sofre inibição do tubo polínico na base das emergências estigmáticas por apresentar uma reação de auto-incompatibilidade. Observou-se a presença de proteínas arabinogalactanos na intina do grão de pólen de *P. elegans*, o que poderia sugerir uma reação de auto-incompatibilidade do tipo gametofítica. É

importante salientar que *P. suberosa* é uma espécie autocompatível e que não foi observada a presença de proteínas na intina de seus grãos de pólen.

A distribuição de galactanos é idêntica em ambas as espécies, exceto por sua ausência na intina do pólen de *P. elegans*, todos os outros tecidos apresentaram marcação com o anticorpo LM 5, com reflexos na modulação mecânica das paredes celulares, e maior distribuição em áreas restritas das células da superfície do estigma.

Os arabinanos não estão relacionados com a reação de auto-incompatibilidade em *P. elegans*, pois, após dois eventos de autopolinização onde se observa a quebra da auto-incompatibilidade, a marcação para esse epítopo continua ausente do mesmo modo que o observado em uma autopolinização.

As principais diferenças químicas foram encontradas nas paredes dos grãos de pólen de *P. suberosa* e *P. elegans*. Arabinanos e galactanos estão ausentes na intina de *P. elegans*, ao contrário do encontrado em *P. suberosa*. Proteínas arabinogalactanos estão presentes na intina de *P. elegans* e ausentes em *P. suberosa*.

É conhecido que arabinoses e galactoses são destacadas das pectinas para constituírem proteínas arabinogalactanos e hemiceluloses. Acredita-se que este fato tenha relação com a expansão celular, o que sugeriria que os tubos polínicos das espécies estudadas têm exigências químicas distintas em seu desenvolvimento. Cabe ressaltar que *P. suberosa* apresenta uma flor muito menor do que a de *P. elegans*, o que poderia justificar esse comportamento da parede do tubo polínico.

ANEXOS

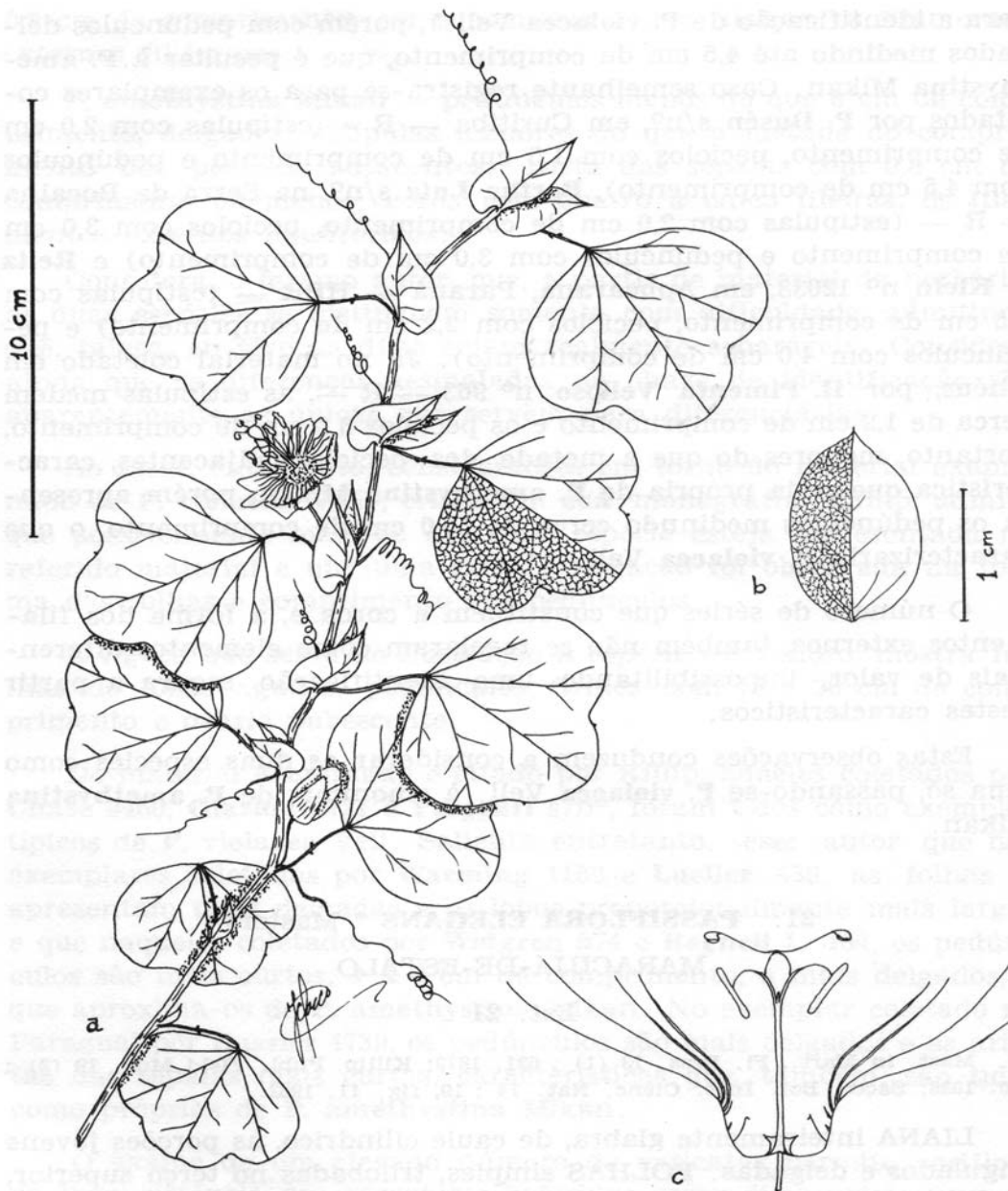


Figura 1 - *Passiflora elegans* Masters, (a) hábito (b) detalhe da folha (c) detalhe da flor. Sacco (1980).

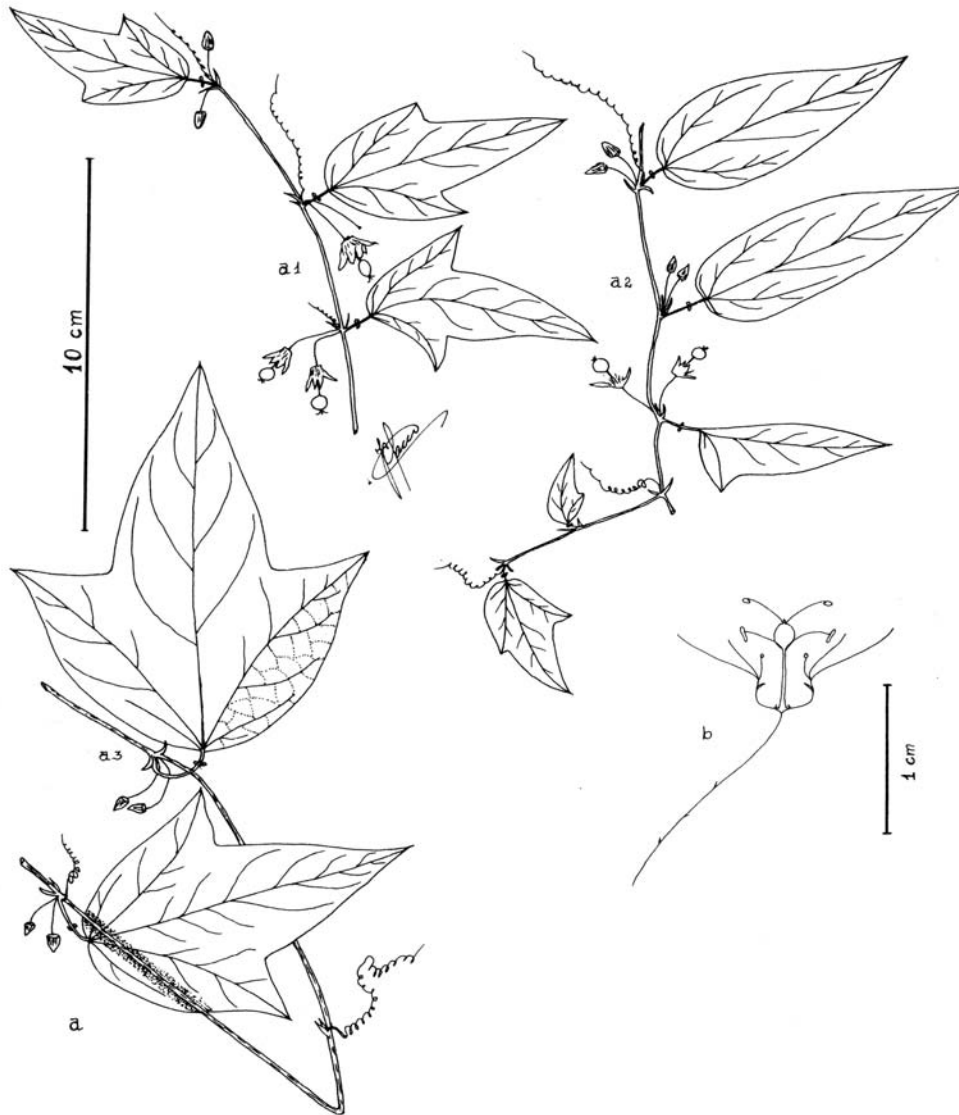


Figura 2 - *Passiflora suberosa* L. (a) hábito (a1, a2) polimorfismo foliar (a3) detalhe da folha (b) detalhe da flor. Sacco (1980).



Figura 3 - Flor de *P. elegans*; Fgura 4 - Fruto de *P. elegans*; Figura 5 - Hábito de *P. elegans*; Figura 6 - Flor de *P. suberosa*; Figura 7 - Fruto de *P. suberosa*; Figura 8 - Hábito de *P. suberosa*.

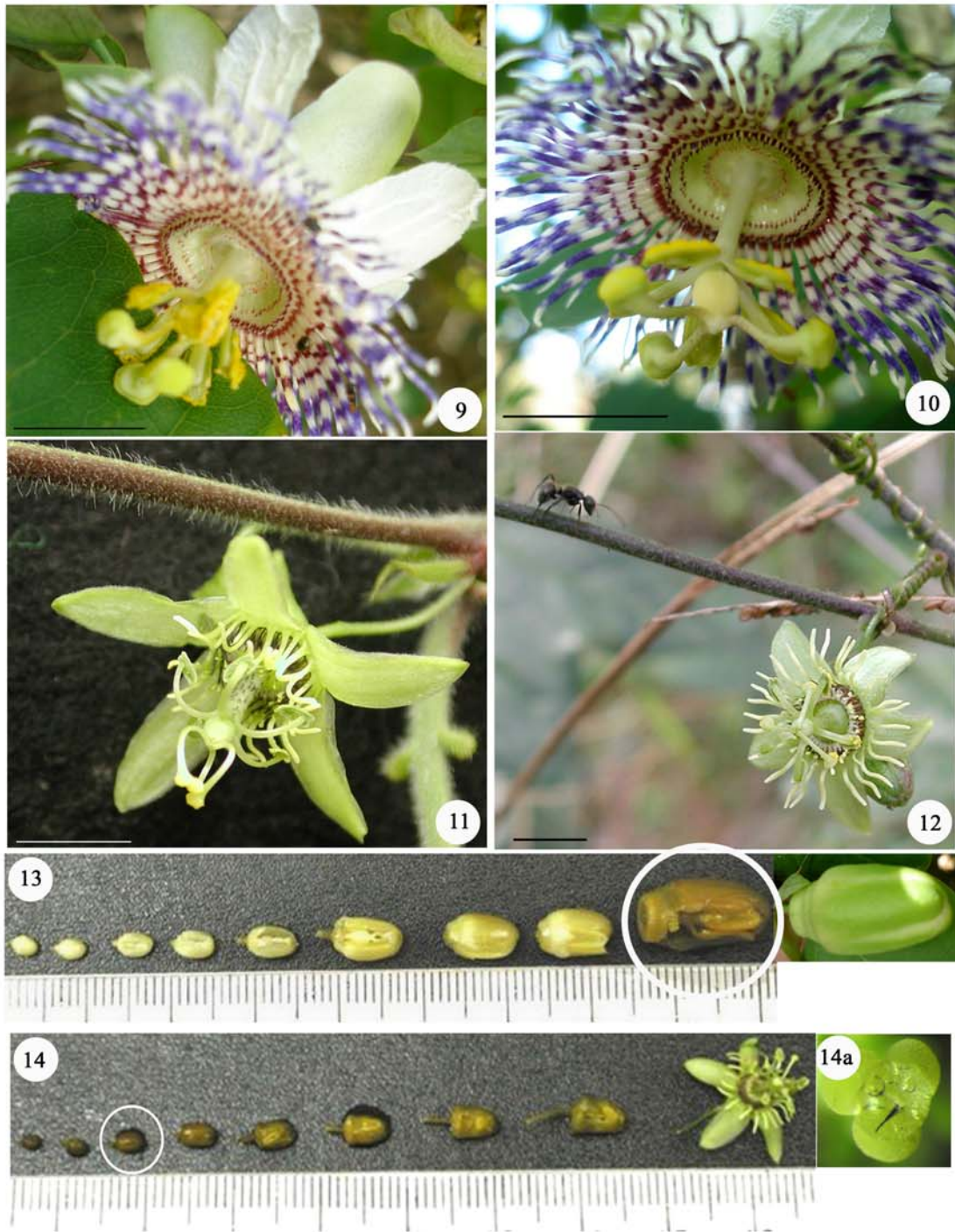


Figura 9 - Flor de *P. elegans* com estiletes eretos; Figura 10 - Flor de *P. elegans* com deflexão dos estiletes; Figura 11 - Flor de *P. suberosa* com estiletes eretos; Figura 12 - Flor de *P. suberosa* com deflexão dos estiletes; Figura 13 - Botões de *P. elegans* de 5mm a 23 mm de comprimento; Figura 14 - Botões de *P. suberosa* de 4mm a 10 mm de comprimento; Figura 14a: Estigmas de *P. suberosa* submetidos ao teste de peróxido de hidrogênio. Barras das figuras de 9 a 12 = 1cm.

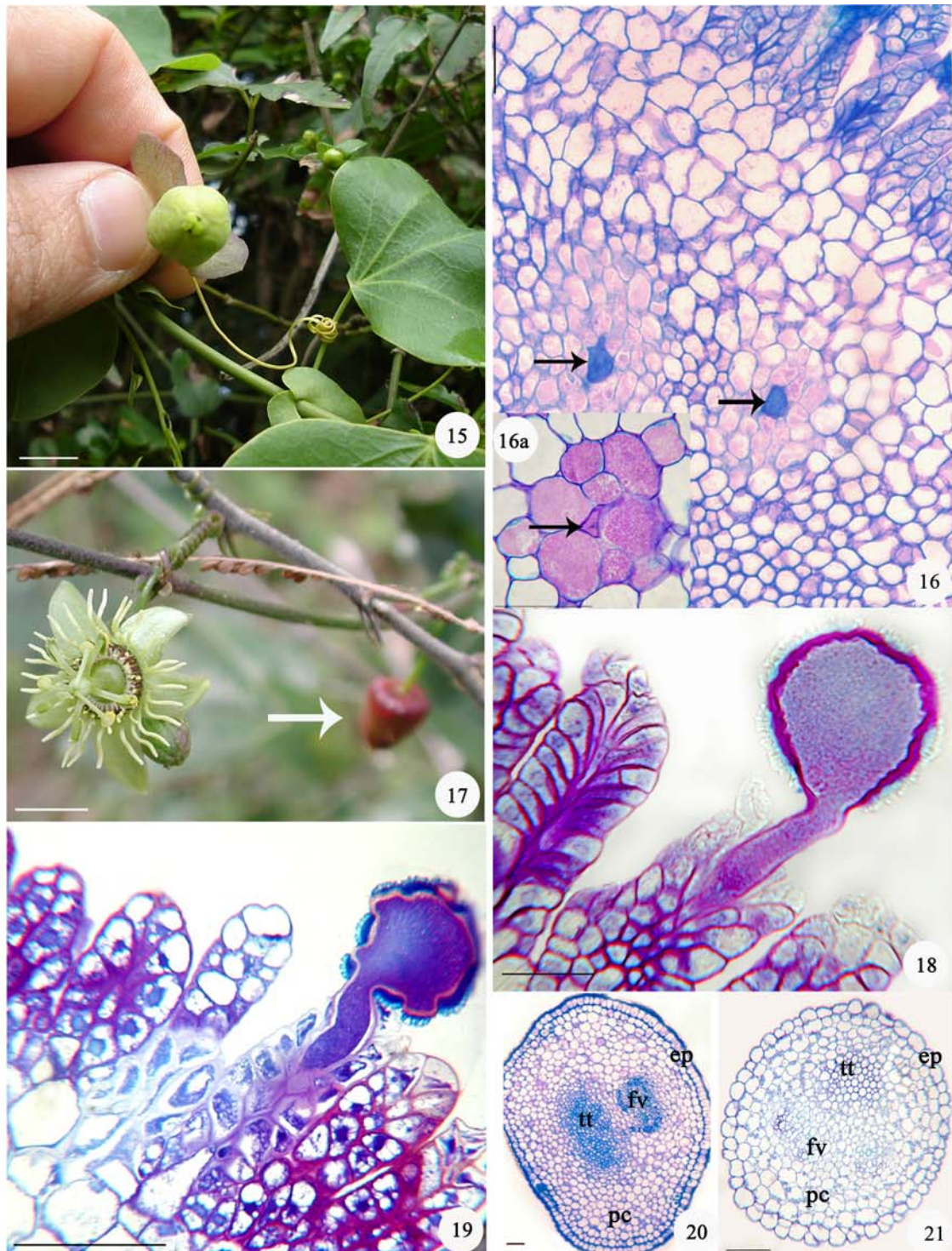


Figura 15 - Flor de *P. elegans* com retração das sépalas; Figura 16 - Secção transversal do tecido transmissor do estilete de *P. elegans*; Figura 16a - Detalhe da passagem do tubo polínico pelo tecido transmissor (botão floral receptivo aos 15mm); Figura 17 - Sépalas com coloração rósea após polinização (*P. suberosa*); Figura 18 - Germinação do pólen nas emergências estigmáticas de *P. elegans*; Figura 19 - Germinação do pólen nas emergências estigmáticas de *P. suberosa*; Figura 20 - Secção transversal do estilete de *P. elegans*; Figura 21 - Secção transversal do estilete de *P. suberosa*; (ep) epiderme; (pc) parênquima cortical; (fv) feixe vascular; (tt) tecido transmissor. Barras = 50 μ m, somente as barras das figuras 15 e 17 = 1 cm.

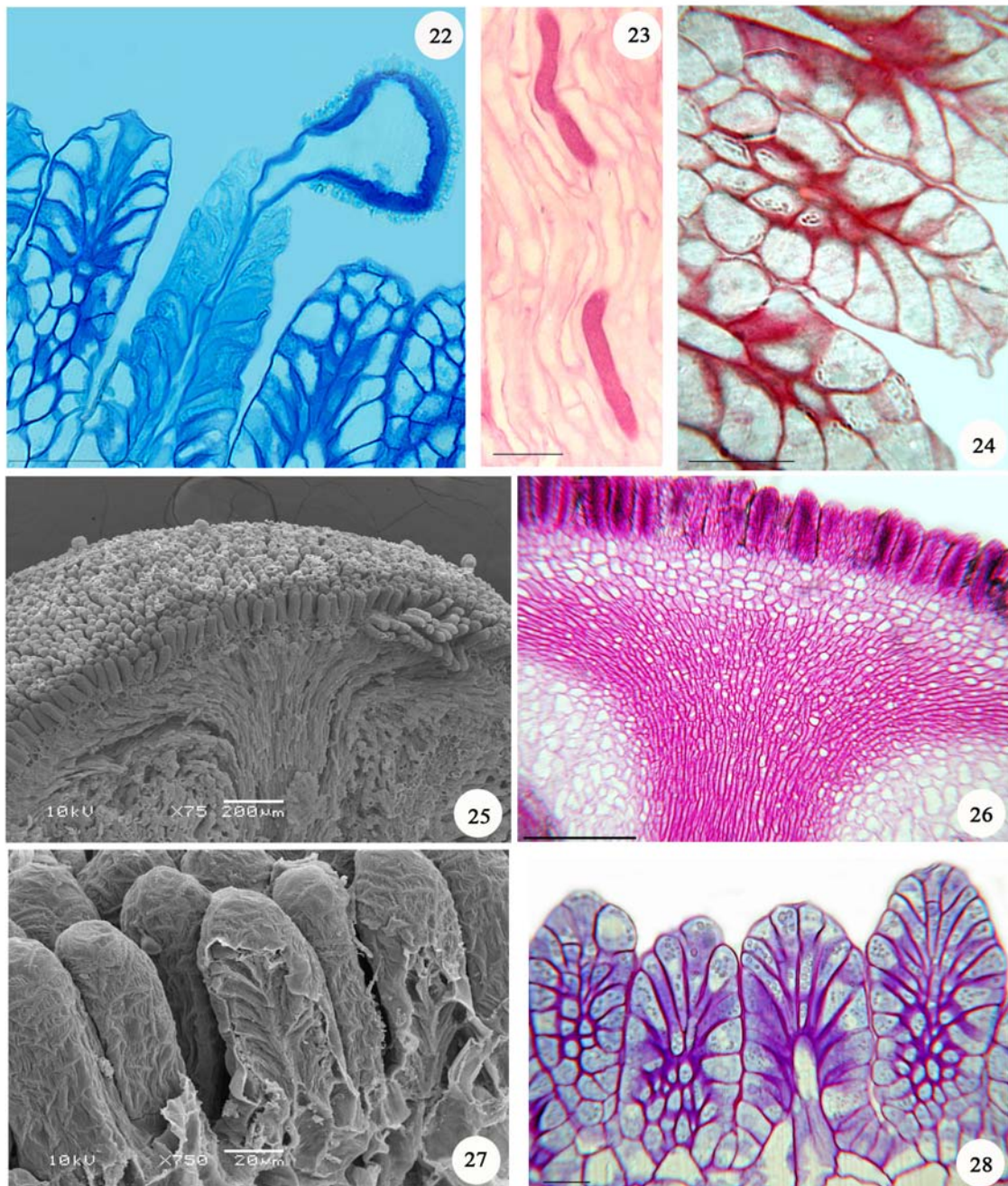


Figura 22 - Emergências estigmáticas de *P. elegans*, evidenciando a presença de pectinas nas paredes celulares, através do teste com Alcian Blue; Figura 23 - Tecido transmissor de *P. elegans* evidenciando pectinas nas paredes celulares através do teste de Vermelho de Rutênio; Figura 24 - Emergências estigmáticas de *P. suberosa*, evidenciando a presença de pectinas principalmente nas paredes internas das células das emergências, através do teste de Vermelho de Rutênio; Figura 25 - Emergências estigmáticas e tecido transmissor centralmente localizado, visualizados através de Microscopia Eletrônica de Varredura; Figura 26: Presença de polissacarídeos nas emergências estigmáticas e tecido transmissor (teste: PAS); Figura 27: Emergências estigmáticas visualizadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura; Figura 28 - Emergências estigmáticas de *P. elegans* visualizadas com Microscopia Óptica. (ep) epiderme (se) sub-epiderme (tt) tecido transmissor (ee) emergências estigmáticas. Barras exceto figuras 25 e 27 = 50µm.

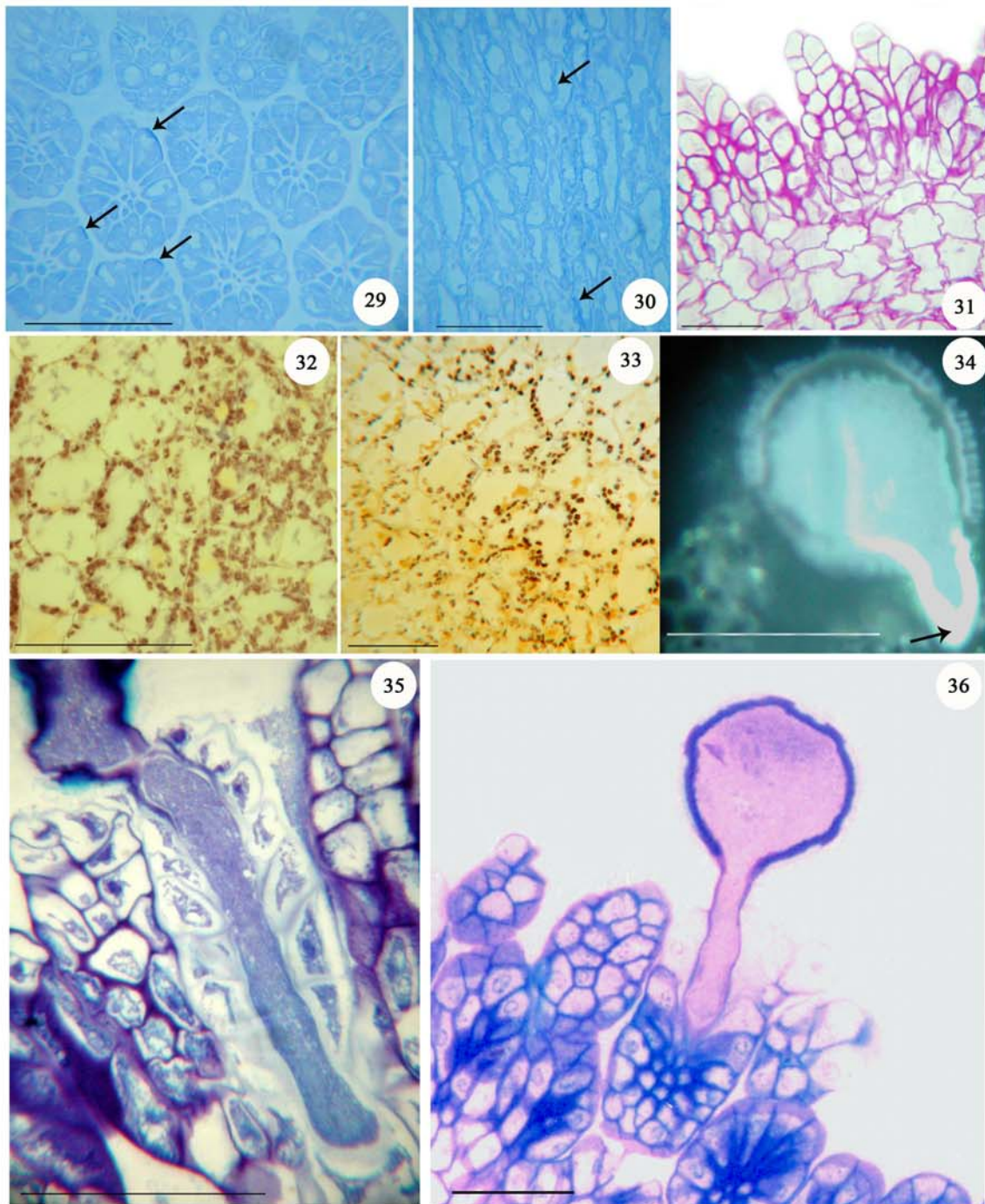


Figura 29 - Emergências estigmáticas de *P. elegans*, evidenciando a presença de proteínas na superfície dessas células; Figura 30 - Tecido transmissor de *P. elegans*, evidenciando a presença de proteínas nas paredes celulares (Teste: Azul Brillhante de Coomassie); Figura 31 - Emergências estigmáticas e tecido transmissor de *P. suberosa* com reação positiva para polissacarídeos (Teste: PAS); Figura 32 - Presença de amido no tecido transmissor de estilete não polinizado de *P. elegans* (controle - Teste: Lugol); Figura 33 - Diminuição da quantidade de amido no tecido transmissor de estilete de *P. elegans* após polinização (Teste: Lugol); Figura 34 - Acúmulo de calose na extremidade do tubo polínico auto-incompatível de *P. elegans* (Teste: Azul de Anilina); Figura 35 - Crescimento do tubo polínico por via apoplástica através das células das emergências estigmáticas de *P. suberosa*; Figura 36 - Crescimento do tubo polínico por via apoplástica através das células das emergências estigmáticas de *P. elegans*. Barras = 50μm.

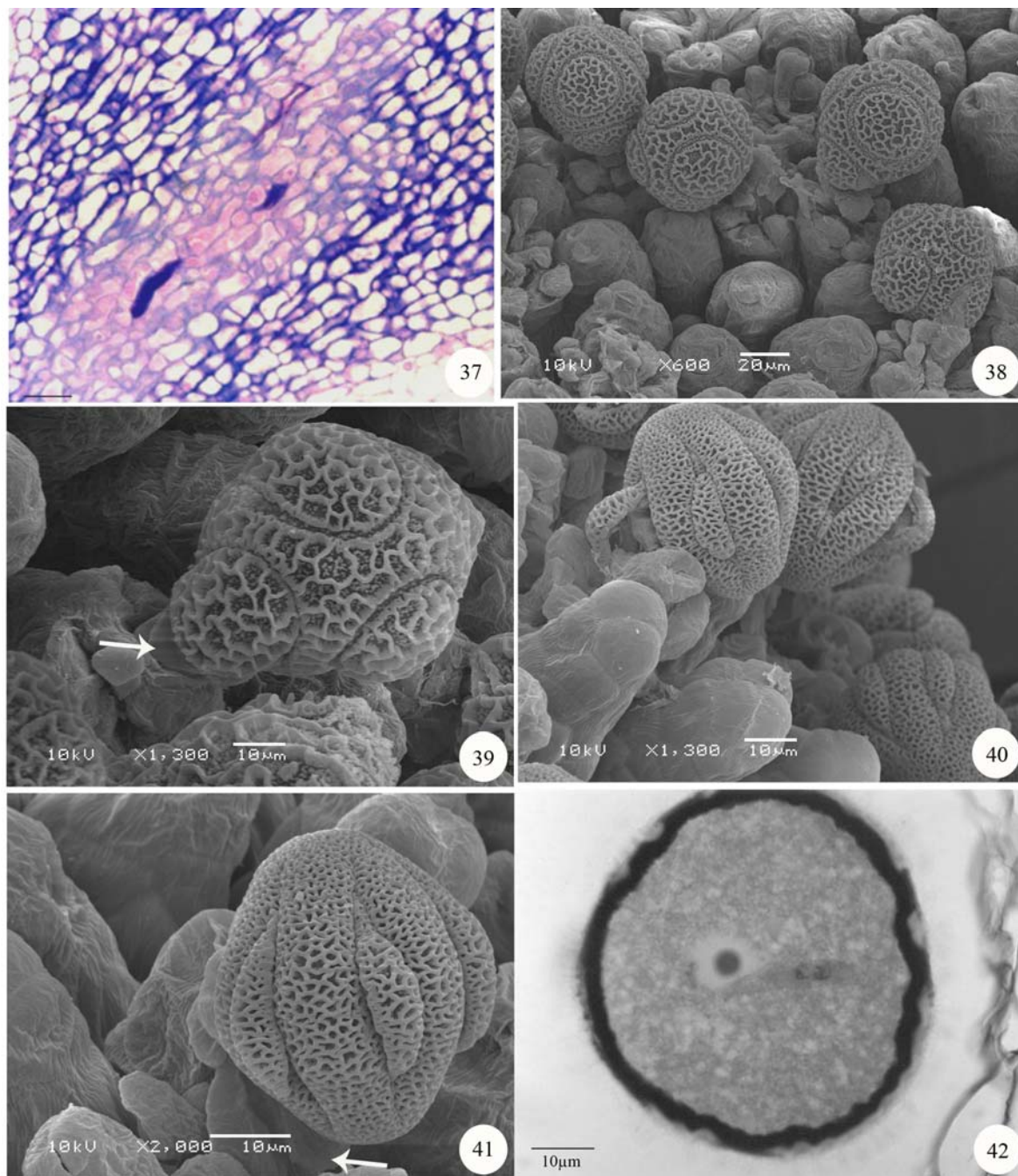


Figura 37 - Secção longitudinal das células do tecido transmissor após a passagem do tubo polínico de *P. elegans*; Figura 38 - Pólenes de *P. elegans* contendo de oito a doze colpi, visualizados com Microscopia Eletrônica de Varredura; Figura 39 - Detalhe do pólen de *P. elegans* emitindo o tubo polínico por entre as células da emergência estigmática; Figura 40 - Pólenes de *P. suberosa* contendo doze colpi, visualizados com Microscopia Eletrônica de Varredura; Figura 41 - Detalhe do pólen de *P. suberosa* emitindo o tubo polínico por entre as células da emergência estigmática; Figura 42 - Pólen binucleado no momento da dispersão, o que ocorre com as duas espécies. Barra da figura 39 = 50 μ m.

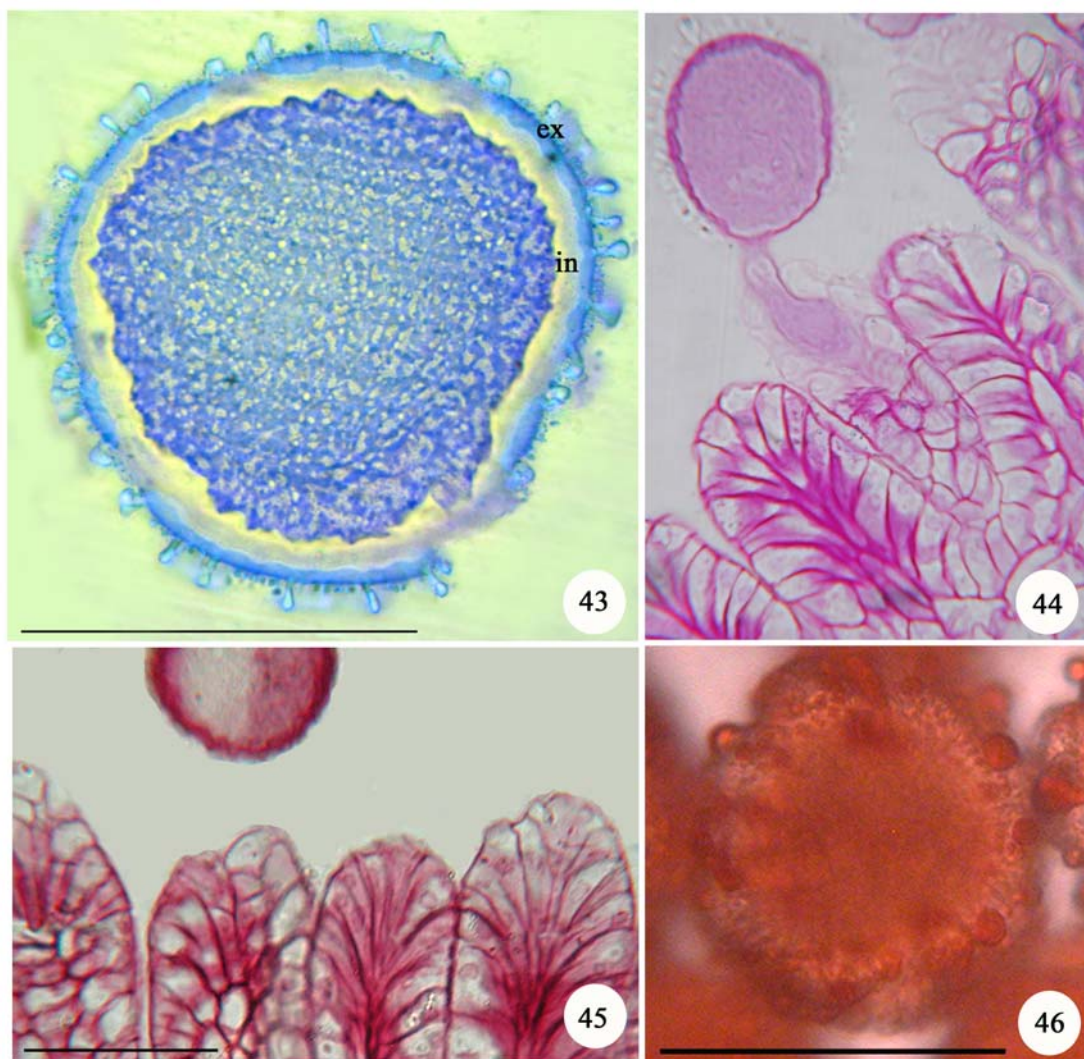


Figura 43 - Pólen de *P. elegans* demonstrando a presença de proteínas totais na exina e na intina (Teste: Azul de Coomassie); Figura 44 - Pólen de *P. elegans* evidenciando a presença de polissacarídeos na intina (Teste: PAS); Figura 45 - Pólen de *P. elegans* evidenciando a presença de pectinas na intina (Teste: Vermelho de Rutênio); Figura 46 - Pólen de *P. suberosa* mostrando lipídios na superfície da exina (Teste: Sudan III) (ex) exina (in) intina. Barras = 50 μ m.

Tabela 1. *Passiflora suberosa* (um evento de autopolinização):

Tecido Mab's	Estigma	Tecido Transmissor	Tubo Polínico	Pólen
JIM 7	+++	++	+	+++ intina - exina
JIM 13	++	-	-	- intina - exina
LM5	+++ superfície	++ decrescente	-	++ intina - exina
LM6	++	++	+ não homogênea	++ intina - exina

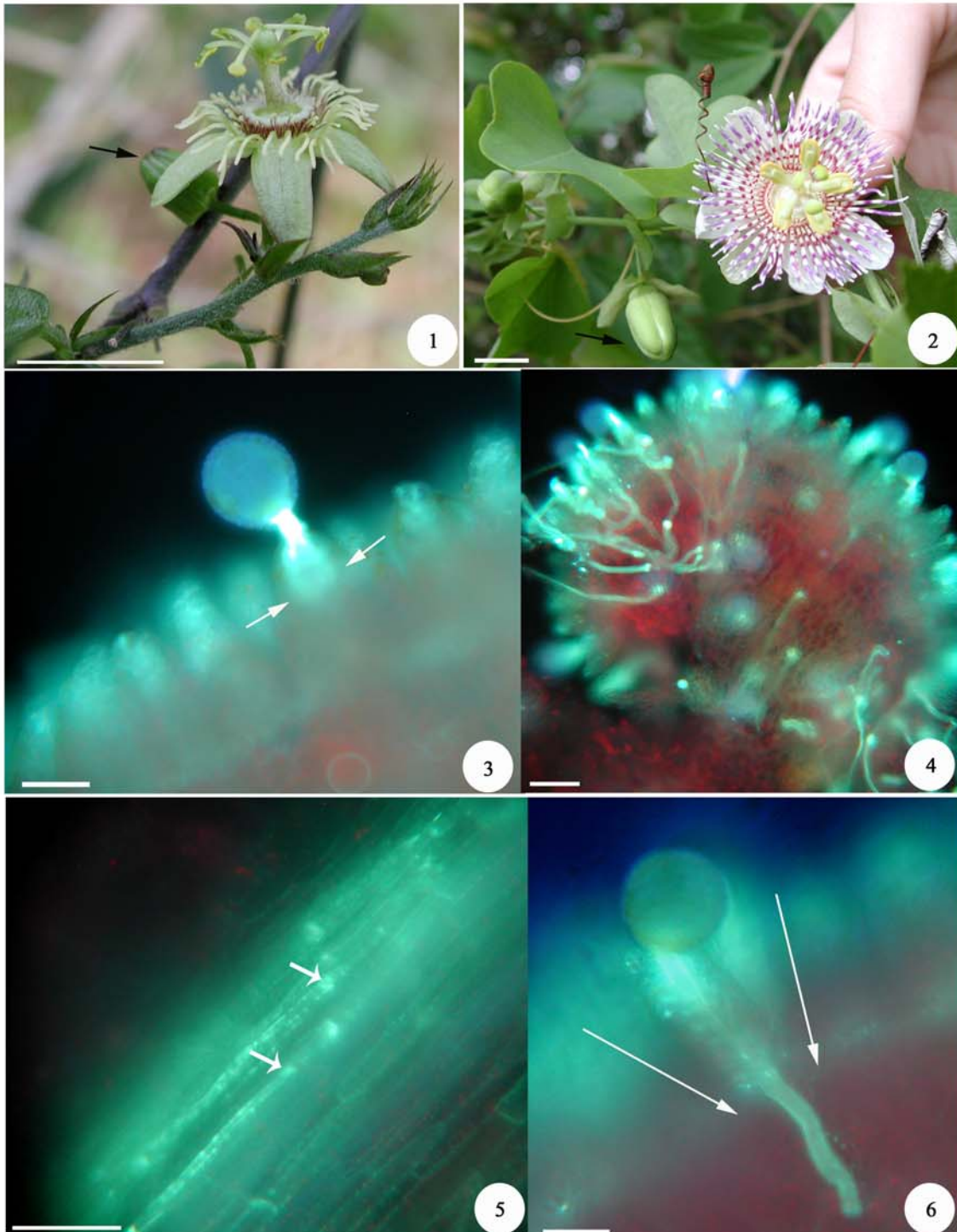
Tabela 2. *Passiflora elegans*: (um evento de autopolinização)

Tecido Mab's	Estigma	Tecido Transmissor	Tubo Polínico	Pólen
JIM 7	+++	++	+	+++ intina - exina
JIM 13	+	-	-	+++ intina - exina
LM5	+++ superfície	++	-	- intina - exina
LM6	-	-	-	- intina - exina

Tabela 3. *Passiflora elegans*: (dois eventos de autopolinização)

Tecido Mab's	Estigma	Tecido Transmissor	Tubo Polínico	Pólen
JIM 7	++	+++	-	+++ intina - exina
JIM 13	+++	-	-	+++ intina - exina
LM5	+++ superfície	++ superfície	-	- intina - exina
LM6	-	-	-	- intina - exina

- (não reativo) + (pouco reativo) ++ (reação moderada) +++ (altamente reativo)



Figuras 1 - Botão em pré-antese e flor em antese de *P. suberosa*; Figura 2 - Botão em pré-antese e flor em antese de *P. elegans*; Figura 3 - Bloqueio da extremidade do tubo polínico por deposição de calose após um evento de autopolinização no estigma de *P. elegans*; Figura 4 - Pólen germinando sobre o estigma de *P. elegans* (fecundação cruzada); Figura 5 - Tampões de calose no decorrer do tubo polínico no tecido transmissor de *P. elegans* (fecundação cruzada); Figura 6 - Tubo polínico transpondo a barreira de auto-incompatibilidade após dois eventos de autopolinização no estigma de *P. elegans*. As barras das figuras 1 e 2 = 2cm, e a das figuras 3, 4, 5 e 6 = 50 μ m.

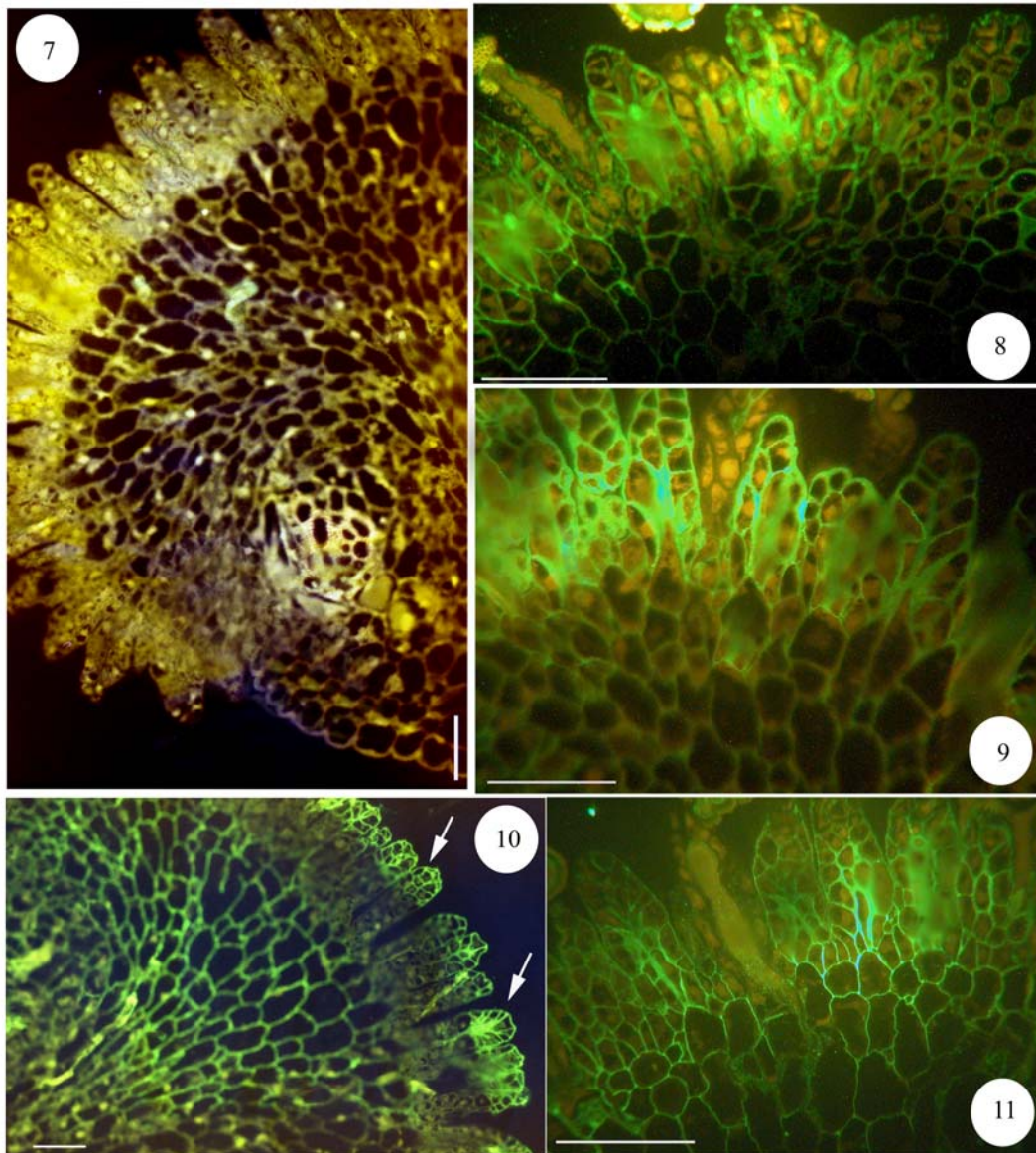
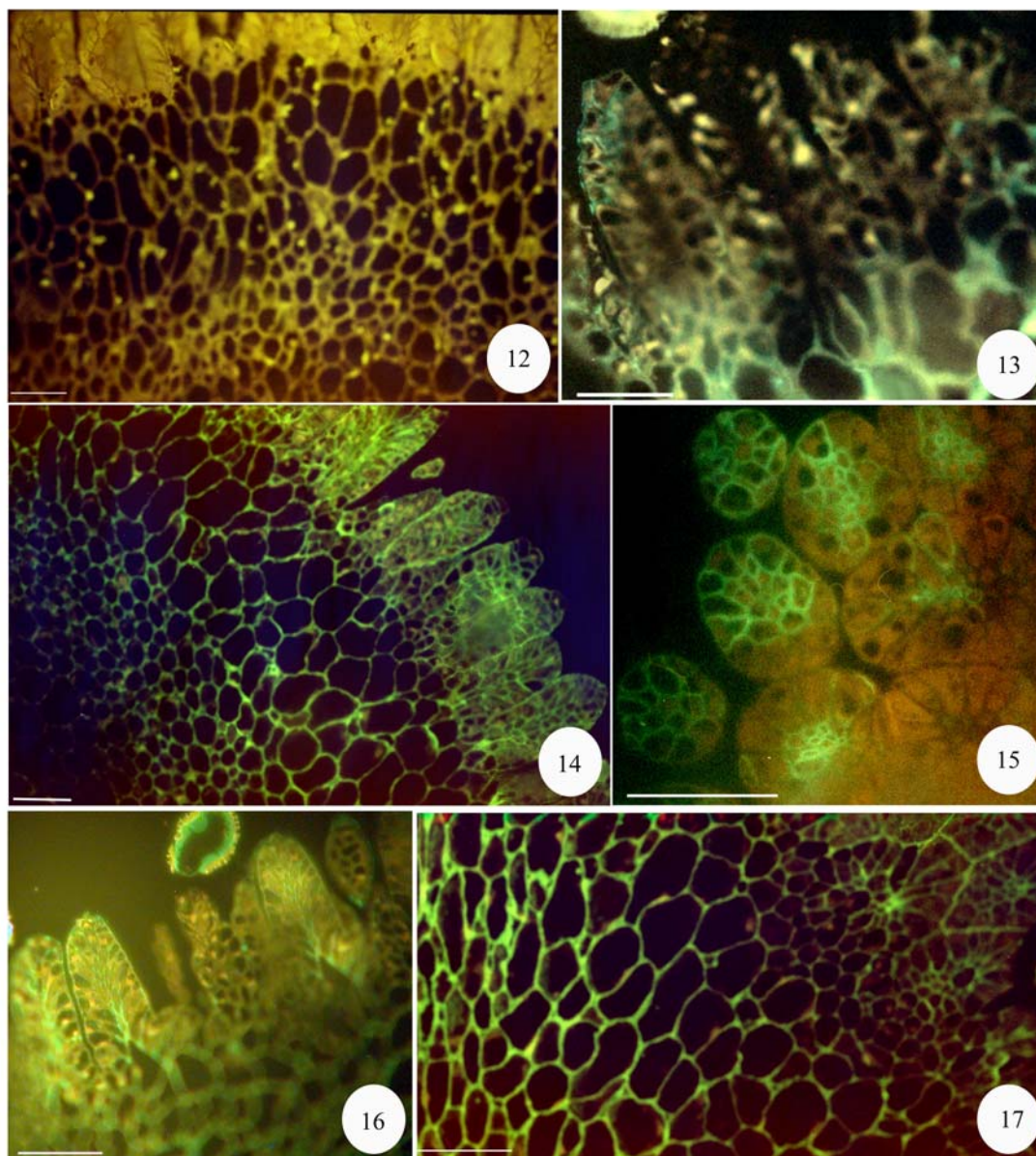
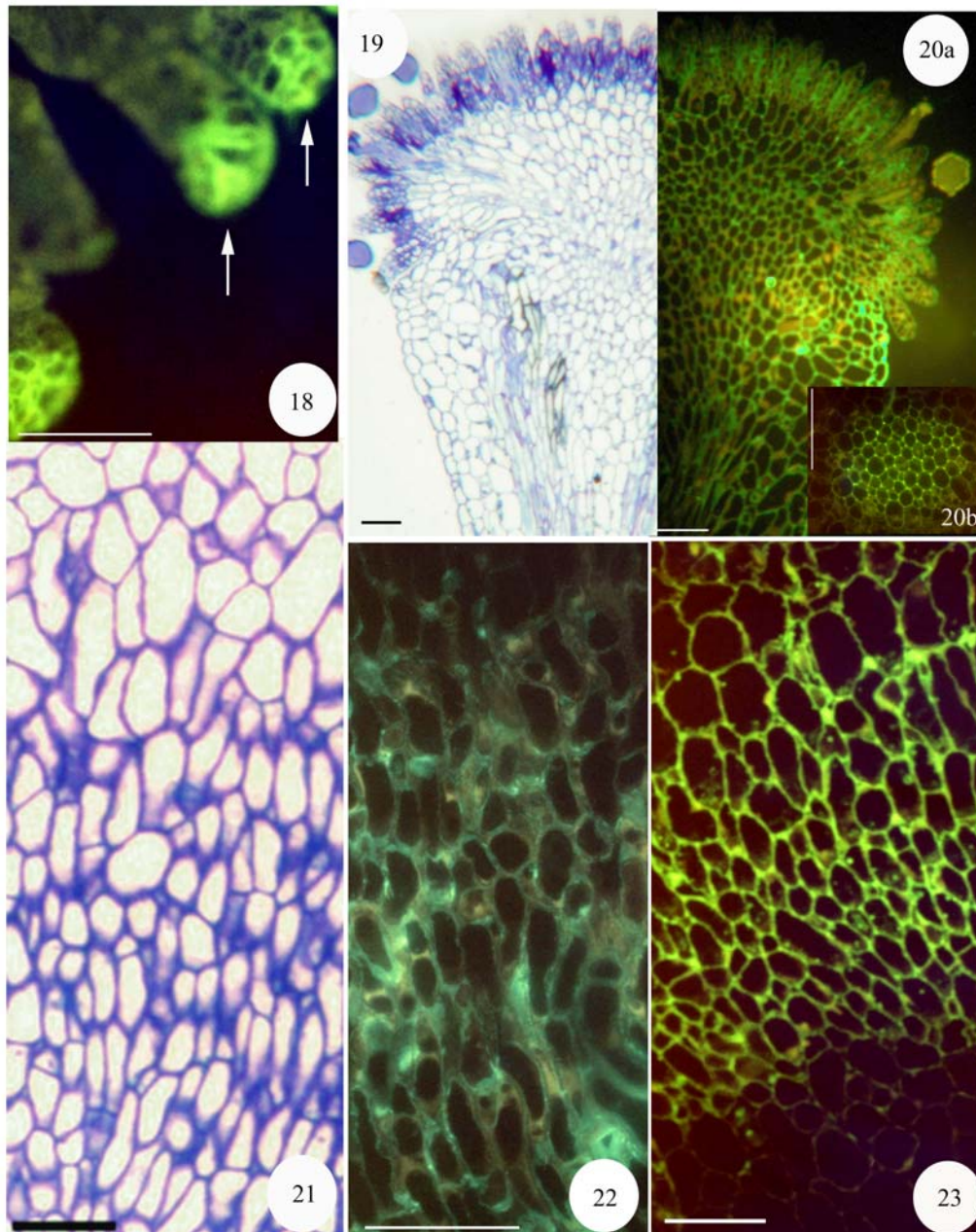


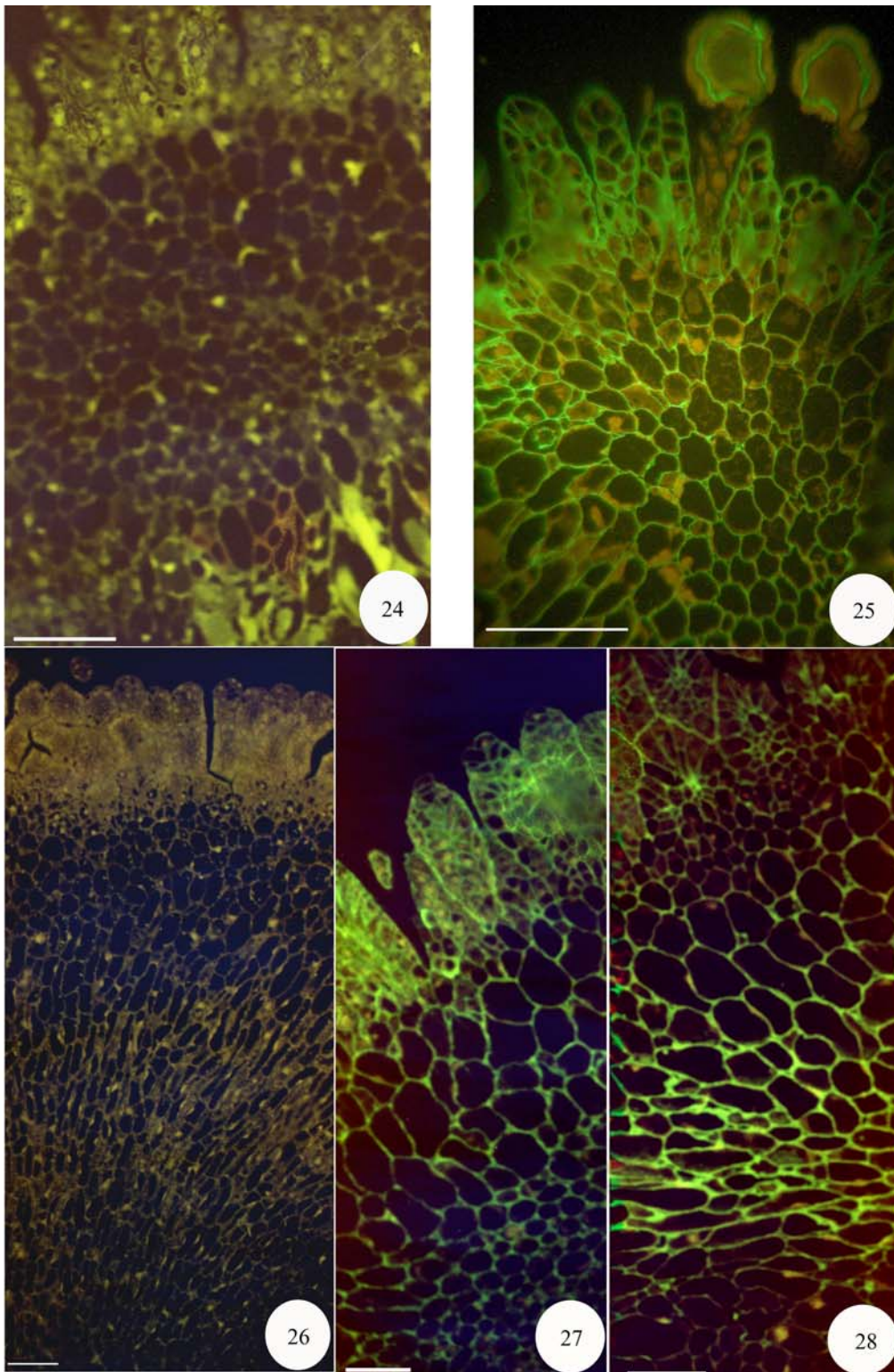
Figura 7 - Secção longitudinal das emergências estigmáticas - Controle *P. suberosa*; Figuras 8 a 11 - Microscopia Óptica em epifluorescência com filtro de excitação 340 - 380 nm; Figura 8 - Emergências estigmáticas evidenciando intensa marcação para pectinas destericadas com JIM 5; Figura 9 - Marcação intensa para pectinas altamente metil-esterificadas com JIM 7; Figura 10 - Marcação para galactanos, mais concentrada na superfície das emergências com LM 5; Figura 11 - Marcação moderada para arabinanos com LM 6. Barras = 50 μ m.



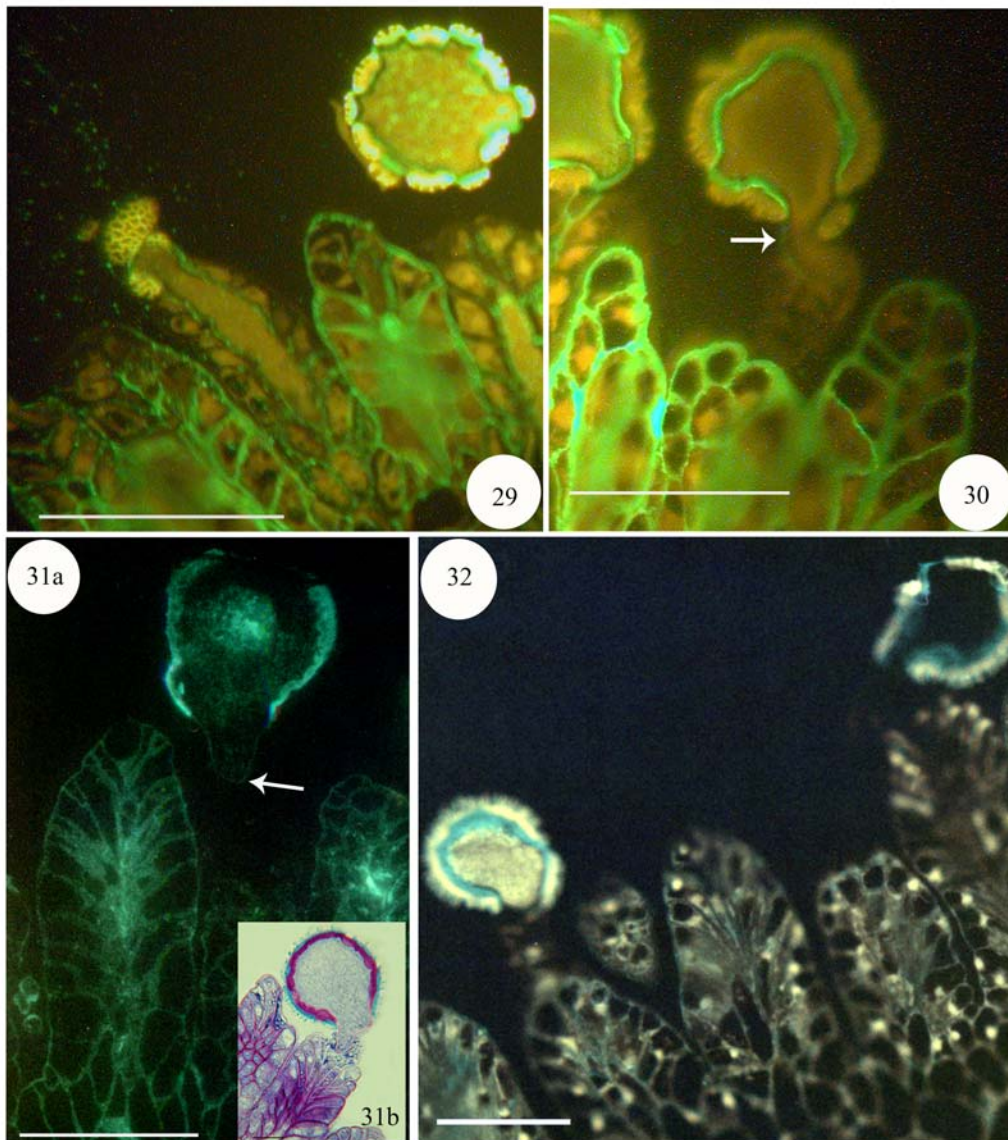
Figuras 12 - 14, 16 e 17 - Secção longitudinal das emergências estigmáticas; Figura 15 - Secção transversal dessa mesma estrutura; todas observadas em Microscopia Óptica de epifluorescência com filtro de excitação 340-380 nm; Figura 12 - Emergências estigmáticas de *P. elegans* - controle; Figura 13 - Fraca marcação para pectinas desterificadas nas emergências após autopolinização com JIM 5; Figura 14 - Intensa marcação para pectinas altamente metil-esterificadas após autopolinização com JIM 7; Figura 15 - Marcação intensa para galactanos após autopolinização, sendo mais intensa na superfície das emergências; Figura 16 - Fraca marcação para desterificação após dois eventos de autopolinização; Figura 17 - Moderada marcação para pectinas altamente metil-esterificadas após dois eventos de autopolinização. Barras = 50 μ m.



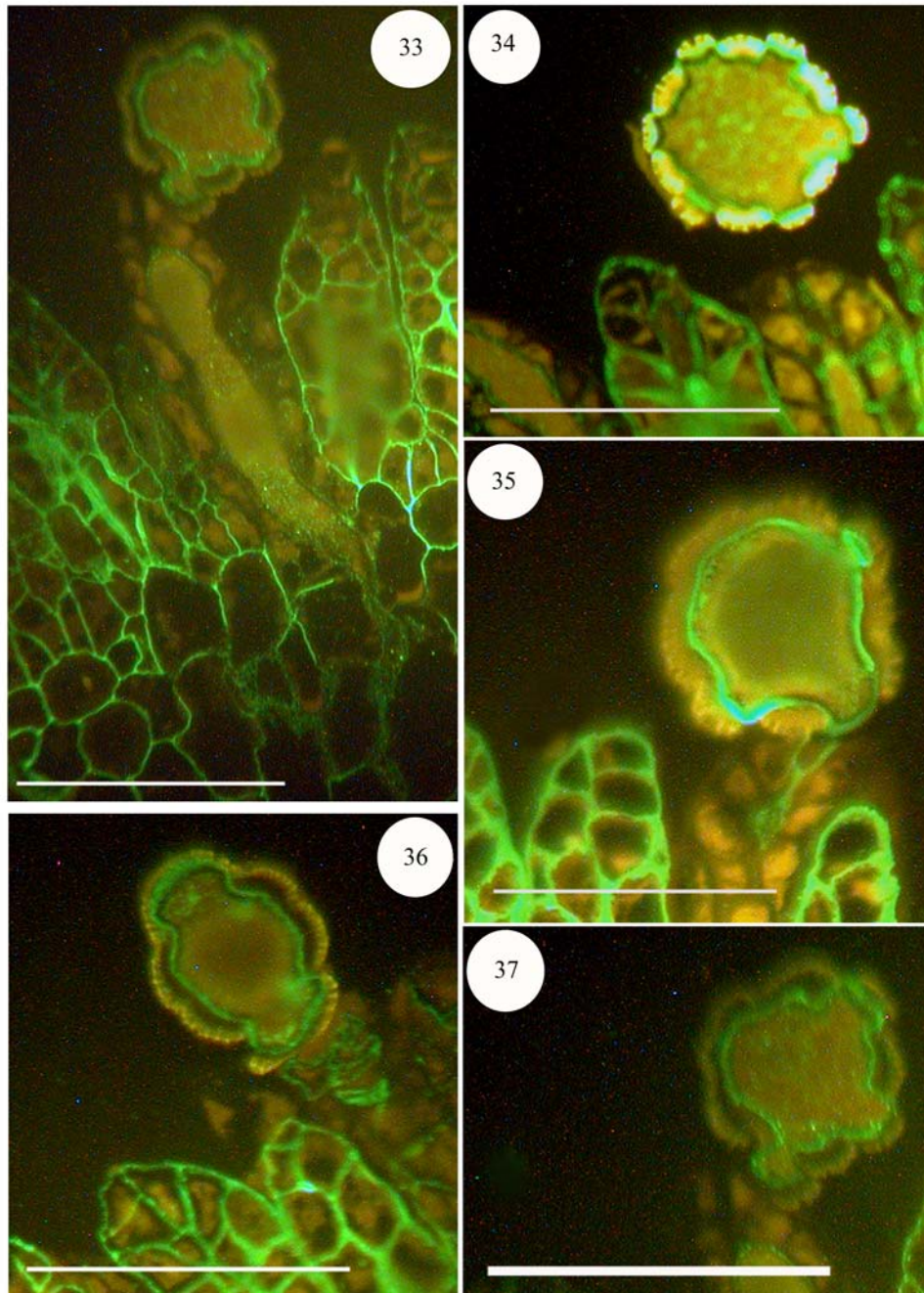
Figuras 18, 22 e 23 - Secção longitudinal do estilete de *P. elegans* observada em Microscopia Óptica sob fluorescência com filtro de excitação 340-380 nm; Figura 18 - Marcação intensa para galactanos, na superfície das emergências estigmáticas após dois eventos de autopolinização, com LM 5; Figura 22 - Tecido transmissor apresentando fraca marcação, para pectinas desterrificadas após autopolinização, com JIM 5; Figura 23 - Intensa desterrificação do tecido transmissor de *P. elegans*, após dois eventos de autopolinização, com JIM 5; Figura 19 - Secção longitudinal do estilete de *P. suberosa* corada com Azul de Toluidina O; Figura 20a - Tecidos carpelares de *P. suberosa* evidenciando intensa marcação para pectinas desterrificadas com JIM 5; Figura 20b - Detalhe da desterrificação do tecido transmissor de *P. suberosa*, em corte transversal, após autopolinização; Figura 21 - Secção longitudinal do tecido transmissor de *P. elegans* corado com Azul de Toluidina O. Barras = 50µm.



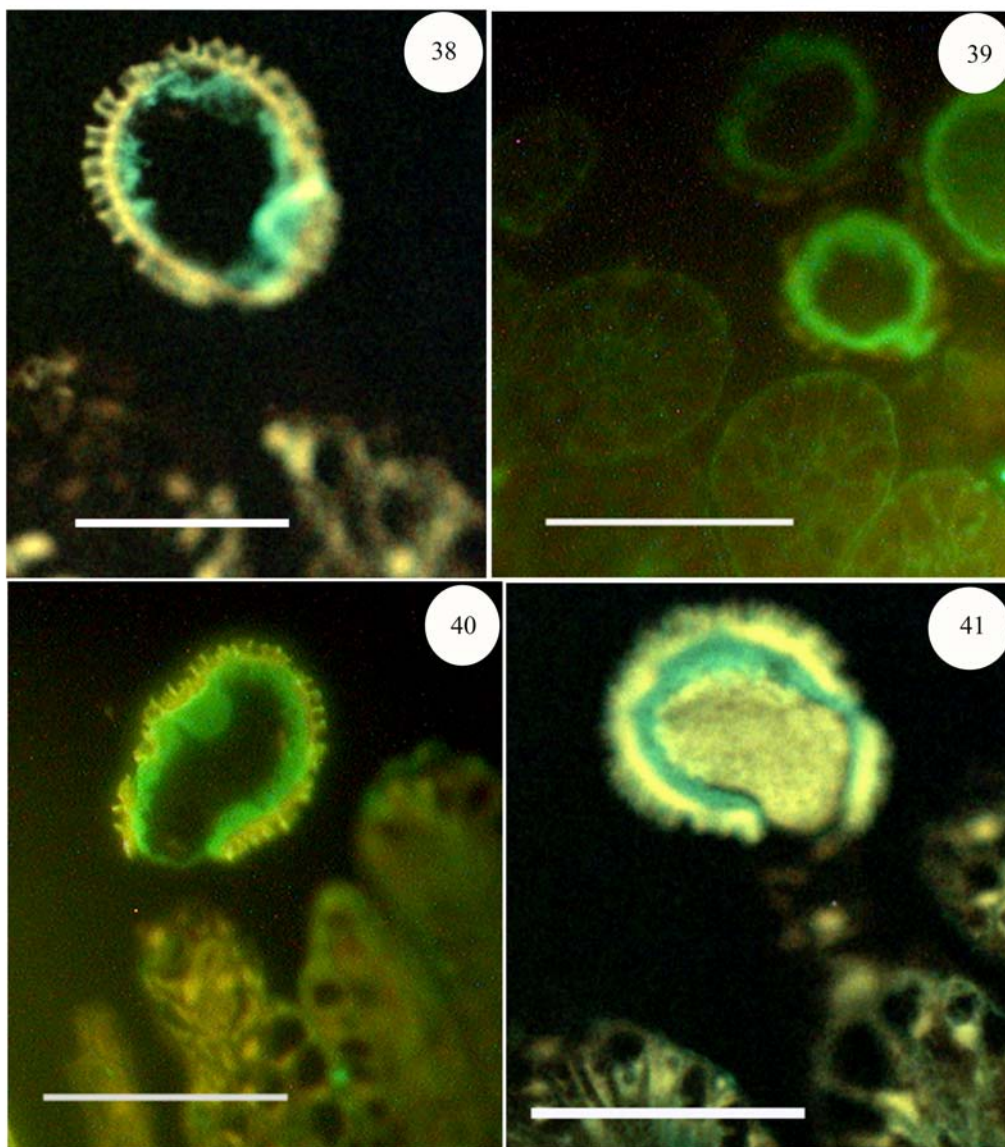
Figuras 24 - 28 - Secções longitudinais do tecido transmissor de ambas as espécies, observadas sob Microscopia Óptica de fluorescência com filtro de excitação 340 - 380 nm; Figura 24 - Tecido transmissor de *P. suberosa* (controle); Figura 25 - Tecido transmissor de *P. suberosa* com moderada marcação para metil-esterificação, após autopolinização, com JIM 7; Figura 26 - Tecido transmissor de *P. elegans* (controle); Figura 27 - Moderada marcação para pectinas metil-esterificadas no tecido transmissor de *P. elegans* após autopolinização; Figura 28 - Intensa marcação para pectinas metil-esterificadas no tecido transmissor de após dois eventos de autopolinização, com JIM 7. Barras = 50µm.



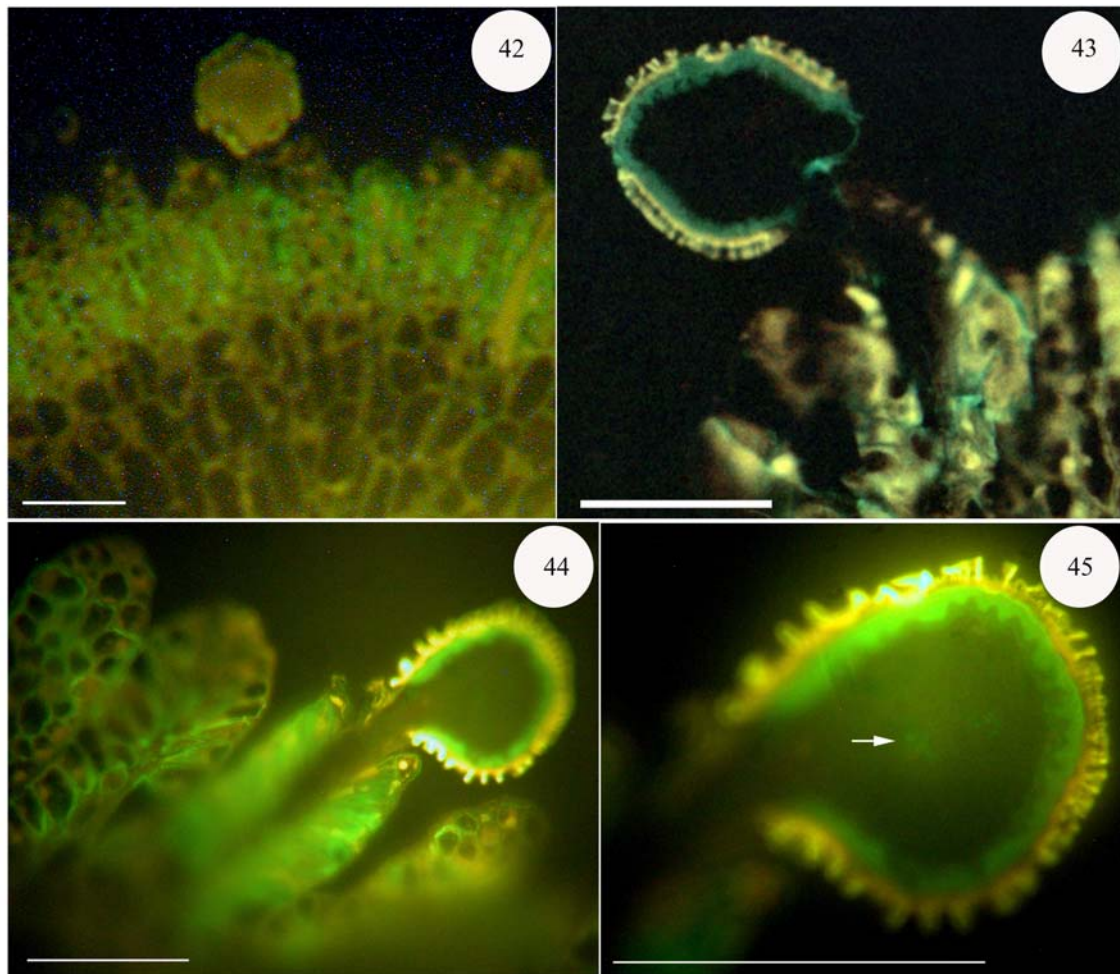
Figuras 29 - 32 - Secções longitudinais do tubo polínico de ambas as espécies, observadas sob Microscopia Óptica de fluorescência com filtro de excitação 340 - 380 nm; Figura 29 - Tubo polínico de *P. suberosa* apresentando moderada marcação, para pectinas desterificadas após autopolinização, com JIM 5; Figura 30 - Fraca marcação para metil-esterificação no tubo polínico de *P. suberosa*, após autopolinização, com JIM 7; Figura 31a - Fraca marcação para metil-esterificação no tubo polínico de *P. elegans*, após uma autopolinização, com JIM 7; Figura 31b - Secção longitudinal de *P. elegans* corada com Azul de Toluidina O; Figura 32 - Ausência de marcação para pectinas altamente metil-esterificadas no tubo polínico de *P. elegans*, após duas autopolinizações, com JIM 7. Barras = 50µm.



Figuras 33 - 37 - Secções longitudinais do pólen de *P. suberosa* observadas sob Microscopia Óptica de fluorescência com filtro de excitação 340 - 380 nm; Figura 33 - Fraca marcação para arabinanos no tubo polínico de *P. suberosa*, após autopolinização, com LM 6; Figura 34 - Moderada marcação para pectinas desterificadas na intina, após autopolinização, com JIM 5; Figura 35 - Intensa marcação para pectinas altamente metil-esterificadas na intina, após autopolinização, com JIM 7; Figura 36 - Moderada marcação para galactanos na intina, após autopolinização, com LM 5; Figura 37 - Moderada marcação para arabinanos na intina, após autopolinização, com LM 6. Barras = 50µm.



Figuras 38 - 41 - Secções longitudinais do pólen de *P. elegans* observadas sob Microscopia Óptica de fluorescência com filtro de excitação 340 - 380 nm; Figura 38 - Intensa marcação para pectinas desterificadas na intina, após uma autopolinização, com JIM 5; Figura 39 - Intensa marcação para pectinas altamente metil-esterificadas na intina, após uma autopolinização, com JIM 7; Figura 40 - Intensa marcação para pectinas desterificadas na intina, após dois eventos de autopolinização, com JIM 5; Figura 41 - Intensa marcação para pectinas altamente metil-esterificadas na intina, após dois eventos de autopolinização, com JIM 7. Barras = 50 μ m.



Figuras 42 - 45 - Secções longitudinais de ambas as espécies, mostrando a germinação do pólen sobre as emergências estigmáticas, observadas sob Microscopia Óptica de fluorescência com filtro de excitação 340 - 380 nm; Figura 42 - Moderada marcação no estigma de *P. suberosa* para proteínas arabinogalactanos e ausência de marcação para esse epitopo no pólen; Figura 43 - Fraca marcação para arabinogalactanos no estigma de *P. elegans*, após uma autopolinização, com JIM 13 e intensa marcação na intina para esse epitopo; Figura 44 - Intensa marcação no estigma de *P. elegans*, após dois eventos de autopolinização, com JIM 13 e intensa marcação na intina para arabinogalactanos; Figura 45 - Fraca marcação para arabinogalactanos no citoplasma do pólen de *P. elegans*, após dois eventos de autopolinização (detalhe). Barras = 50 μ m.