

CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO SISTEMA DE
AUTO-INCOMPATIBILIDADE ESPOROFÍTICA DO
MARACUJAZEIRO AZEDO (*PASSIFLORA EDULIS* SIMS)

HÉRIKA CHAGAS MADUREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
JULHO - 2009

CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO SISTEMA DE
AUTO-INCOMPATIBILIDADE ESPOROFÍTICA DO
MARACUJAZEIRO AZEDO (*PASSIFLORA EDULIS* SIMS)

HÉRIKA CHAGAS MADUREIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias, da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Orientadora: Prof^a Telma Nair Santana pereira

Co-Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
JULHO - 2009

CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO SISTEMA DE
AUTO-INCOMPATIBILIDADE ESPOROFÍTICA DO
MARACUJAZEIRO AZEDO (*PASSIFLORA EDULIS* SIMS)

HÉRIKA CHAGAS MADUREIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias, da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 29 de julho de 2009

Comissão Examinadora:

Prof. Fábio Gelape Faleiro (D.Sc. em Genética e Melhoramento) – Embrapa
Cerrados

Prof^a. Maura Da Cunha (D.Sc. em Ciências Biológicas) – UENF

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Plant Breeding) – UENF

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Plant Breeding) – UENF
(Orientadora)

Aos meus pais,
Maciel Reis Madureira e Maria Conceição de Souza
Chagas Madureira, ao meu irmão Vinícius Chagas
Madureira e a minha avó Luzia Pereira de Souza
(*in memorian*); dedico este trabalho, com amor e
admiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Maciel e Conceição, e ao meu irmão Vinícius, por todo apoio durante toda esta jornada. Sem vocês eu jamais teria conseguido.

A professora Telma, pela orientação durante a realização deste trabalho.

Ao co-orientador Gonçalo, pelos ensinamentos, atenção concedida e por todo apoio essencial para a execução deste projeto.

A professora Maura, pelo interesse, disponibilidade, incentivo e amizade, durante toda minha vida acadêmica.

Ao professor Alexandre, ao Marcelo Coró e ao Eduardo Buchaul, por disponibilizarem as plantas utilizadas em diferentes etapas deste trabalho.

Ao Marcos Vinícius, Flávia Mury e a Beatriz Ferreira, por toda ajuda, incentivo, disponibilidade e, principalmente, pela amizade. Vocês foram fundamentais!

Ao Pedro Damasceno, por todo auxílio nos meus estudos, nas capturas de imagens no microscópio e pela disposição em ajudar sempre.

Ao professor Messias, por todos os ensinamentos e pela permissão ao uso de equipamentos do LMGV e por compor esta banca.

Ao professor Fábio G. Faleiro, por aceitar participar da banca de defesa desta tese.

A Denise E. Klein, pela ajuda no preparo das amostras, pelo auxílio na captura de imagens nos microscópios eletrônicos, pelas discussões dos resultados de microscopia, e pelos maravilhosos momentos compartilhados.

Aos amigos César Luís e Leandro Mattos, pela ajuda na manipulação dos programas de Bioinformática.

Aos amigos, colegas e, principalmente, companheiros Janice, Patricinha, Robson, João Cláudio, Luciléa, Wellington, Adriane, Fernanda, Mariana, Ana Lídia, Juliana, Roberta, Aline, Fred e Natália, que entre uma “pipetagem” e outra fizeram esta trajetória muito mais agradável.

Aos amigos da Citogenética, Rodrigo Gualandi, Monique, Carlos Eduardo, Sérgio, Emanuelli, Kellen, Neuma e Fabiane por toda ajuda e ótima convivência.

A equipe da professora Maura, em especial a Tarsila, Germana, Emílio e Camilla Alexandrino, por toda ajuda e auxílio na utilização dos microscópios, micrótomos, discussões sobre metodologias e pelos momentos de descontração.

Ao professor Flávio C. Miguens, pelos ensinamentos e auxílio na utilização dos microscópios eletrônicos.

Ao Leandro Hespanhol, pela amizade, apoio e ajuda nas coletas de campo.

As técnicas do LBCT, Beatriz e Giovana, e a técnica do Genoma, Valéria, por todo auxílio, assistência, amizade e incentivo.

A professora Tânia Jacinto, por todos os ensinamentos e pela contribuição fundamental na minha formação acadêmica.

Ao secretário do programa de Genética e Melhoramento de Plantas, Daniel, pela competência, atenção e pela disponibilidade em ajudar.

A técnica do LMGV, Vitória, e aos técnicos do LBT, Adão, Rívia e Eduardo, por toda ajuda prestada.

Às instituições FAPERJ, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	01
2. Revisão de literatura.....	03
2.1 O maracujá.....	03
2.2 Taxonomia.....	04
2.3 Biologia reprodutiva.....	05
2.4 Citogenética.....	07
2.5 Interação pólen-pistilo.....	08
2.6 Auto-incompatibilidade em plantas.....	09
2.6.1 Auto-incompatibilidade gametofítica.....	11
2.6.2 Auto-incompatibilidade esporofítica.....	12
2.6.3 Auto-incompatibilidade em Passifloraceae.....	14
2.6.4 Genes envolvidos no processo de auto-incompatibilidade no sistema esporofítico	15
2.6.4.1 Determinante feminino da auto-incompatibilidade	15
2.6.4.2 Determinante masculino da auto-incompatibilidade	16
2.6.4.3 Interação entre os determinantes masculino e	

feminino	16
2.6.5 Transdução de sinal no sistema de auto-incompatibilidade	17
2.7 Melhoramento genético de <i>Passiflora</i>	19
3. Objetivos.....	23
4. Material e métodos.....	24
4.1 Material vegetal	24
4.2 Polinização.....	24
4.3 Análise morfológica e ultraestrutural.....	25
4.3.1 Fixação e desidratação do pistilo para análise microscópica	25
4.2.2 Infiltração e inclusão do material	25
4.2.3 Microscopia óptica	26
4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	26
4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura	26
4.4 Análise da interação pólen-pistilo <i>in vivo</i>	27
4.5 Detecção da deposição de calose como resposta a auto-incompatibilidade.....	28
4.5 Análise molecular	28
4.5.1 Extração do DNA genômico	28
4.5.2 Quantificação do DNA	29
4.5.3 Desenho de iniciador degenerado para a identificação de genes envolvidos com a auto-incompatibilidade.....	29
4.5.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)	29
4.5.5 Purificação do fragmento amplificado.....	30
4.5.6 Clonagem do fragmento no vetor pCR [®] 2.1	31
4.5.7 Produção de células competentes de <i>E. coli</i> , linhagem DH 5 α via cloreto de rubídio	31
4.5.8 Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> com o vetor ligado ao fragmento amplificado	32
4.5.9 Identificação dos clones positivos, extração e digestão dos vetores.....	33
4.5.10 Sequenciamento dos fragmentos amplificados	34

4.5.11 Análise da sequência de nucleotídeos.....	35
5. Resultados e discussão	37
5.1 Análise da interação pólen-estigma após polinizações compatíveis e incompatíveis	37
5.2 Análise ultraestrutural das interações compatível e incompatível em maracujá amarelo	43
5.3 Análise comparativa de grãos de pólen de maracujá azedo através de microscopia eletrônica de varredura	48
5.4 Análises da interação pólen-pistilo de maracujá amarelo <i>in vivo</i>	52
5.5 Deposição de calose em resposta a reação de incompatibilidade	56
5.6 Análise molecular do sistema de auto-incompatibilidade em maracujá azedo.....	62
6. Resumo e conclusões.....	68
Referências bibliográficas	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Passiflora edulis</i> Sims	05
Figura 2. Modelo da possível base das diferenças entre as auto-incompatibilidades esporofítica e gametofítica	12
Figura 3. Modelo molecular da resposta de auto-incompatibilidade esporofítica	18
Figura 4. Mapa do sítio de policlonagem do vetor pCR [®] 2.1-TA Cloning.....	36
Figura 5. Microscopia óptica da interação pólen-estigma em maracujá azedo.....	42
Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a zona de contato entre o tubo polínico e o estigma após polinizações compatíveis e incompatíveis.....	47
Figura 7. Caracterização estrutural dos grãos de pólen de maracujá azedo.....	51
Figura 8. Microscopia de fluorescência exibindo a interação pólen-pistilo <i>in vivo</i> em maracujá azedo.....	55
Figura 9. Indução da síntese de calose durante interações pólen-estigma seguindo polinizações incompatíveis.....	61
Figura 10. Ensaios de amplificação via PCR realizados com amostras de DNA genômico	65
Figura 11. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos obtidos a partir de	

fragmento amplificado de *Passiflora edulis* Sims (pe) utilizando iniciadores
SLG.....66

Figura 12. Alinhamento da seqüência de aminoácido deduzida a partir de
fragmento amplificado de *Passiflora edulis* Sims utilizando iniciadores
SLG.....67

RESUMO

MADUREIRA, Hérika Chagas; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Julho de 2009. Caracterização celular e molecular do sistema de auto-incompatibilidade esporofítica do maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims). Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Co-orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: Maura da Cunha; e Messias Gonzaga Pereira.

O maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims), embora apresente flores hermafroditas e férteis, normalmente é incapaz de produzir zigotos quando polinizados com pólen de mesmo genótipo, pois apresenta auto-incompatibilidade (AI) do tipo homomórfica esporofítica, a qual é conhecida em várias famílias de vegetais como Brassicaceae, Asteraceae, Sterculiaceae e Convolvulaceae. Nestas famílias, a AI está sob controle de um único locus multialélico, o locus-S. A reação de incompatibilidade esporofítica ocorre na superfície estigmática, resultando na inibição da germinação do grão de pólen. No presente trabalho teve-se por objetivos avaliar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no reconhecimento e rejeição do pólen incompatível, bem como investigar a base genética da AI em maracujazeiro azedo. Análises morfológicas da interação pólen-pistilo indicaram um crescimento reduzido do tubo polínico incompatível, além de ter sido também observado uma desorganização do protoplasto do tubo como resposta a incompatibilidade. Uma outra reação detectada foi a deposição de calose em tubos polínicos após polinizações incompatíveis. Nossos resultados indicaram ainda, que em flores autopolinizadas até 48 horas antes da antese, os

tubos polínicos cresceram através do estilete se encaminhando em direção aos óvulos. Deste modo, observamos que é possível realizar polinizações utilizando pólen com mesmo genótipo, desde que o estigma esteja imaturo. Quanto à base genética da AI foram desenhados oligonucleotídeos degenerados, a partir de sequências conservadas de proteínas determinantes da AI esporofítica (SLG e SRK) de espécies descritas na literatura, visando a amplificação de tais sequências via PCR. Ensaio de amplificação realizados com amostras de DNA genômico de *Passiflora*, utilizando os iniciadores para SLG, revelaram uma banda amplificada de aproximadamente 200 pares de base (pb). Como controle positivo, foi utilizado DNA genômico da espécie *Brassica oleracea*, onde foi observada amplificação semelhante. Análises de sequenciamento foram realizadas para validação dos dados e os resultados mostraram uma alta similaridade com genes envolvidos com AI esporofítica de *Brassica*. Juntas, tais observações indicaram que o sistema de auto-incompatibilidade presente em *Passiflora edulis* contém similaridades com aquele já caracterizado para o gênero *Brassica*.

ABSTRACT

MADUREIRA, Hérika Chagas; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Julho de 2009. Characterization of cellular and molecular sporophytic self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). Adviser: Telma Nair Santana Pereira; Co-adviser: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Comittee Members: Maura da Cunha; and Messias Gonzaga Pereira.

The passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) although present fertile flowers is usually unable to produce zygotes when self pollinated, due to the homomorphic sporophytic self-incompatibility (SI), which is known in various plant families such as Brassicaceae, Asteraceae, Sterculiaceae and Convolvulaceae. In these families, SI is under the genetic control of a single multiallelic locus, the S-locus. The reaction of sporophytic incompatibility occurs on the stigmatic surfaces, resulting in inhibition of pollen grain germination. The objectives of present work were to evaluate the cellular and molecular characters involved in the recognition and rejection of incompatible pollen as well as to investigate the genetic basis of self-incompatibility in passion fruit. Morphological analysis of pollen-pistil interaction indicated a reduced growth of incompatible pollen tube and it was also observed a disorganization of the protoplasm of the tube in response to the incompatibility. Another reaction that was observed was the deposition of callose in incompatible pollen tubes after pollination. Our results also indicated that in flowers self-pollinated up to 48 hours before anthesis, the pollen tubes grew through the style moving toward the ovules. Thus, we observe that it is possible to do pollinations using pollen with the same genotype, since the stigma is not

mature. To do the genetic basis study, degenerated primers were designed from conserved sequences of protein determinants of sporophytic SI (SLG and SRK) of species described in the literature, to the amplification of such sequences by PCR. Amplification tests conducted on samples of genomic DNA of *Passiflora*, using the primers for SLG, revealed an amplified band of approximately 200 pb. As positive control, we used genomic DNA of the species *Brassica oleracea*, which was similar amplification. Analysis of sequences were performed to validate the data, and the results showed high similarity with genes involved in *Brassica* sporophytic SI. Together, these results suggest that the self-incompatibility observed in *Passiflora* have similarities to that already characterized for the genus *Brassica*.

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) é de grande interesse dos fruticultores, face à sua rápida produção em relação a outras frutíferas e a sua grande aceitação no mercado para consumo *in natura* e a industrialização. No entanto, há poucas informações disponíveis que corroborem com o trabalho do melhorista em relação a esta espécie, dificultando assim um desenvolvimento satisfatório desta cultura na região Norte e Noroeste Fluminense. Esta espécie é altamente dependente da polinização cruzada para frutificação devido à presença da auto-incompatibilidade (AI), porém há poucos trabalhos abordando este fenômeno na cultura.

A presença da AI tem implicações importantes nas metodologias de melhoramento por induzir a alogamia e o alto grau de heterozigose, além de ter influências na compatibilidade entre cruzamentos (Allard, 1971; Bruckner et al., 2005). Além disso, a AI induz o produtor a ter no seu pomar grande variedade de plantas geneticamente distintas. Bruckner et al. (1995) demonstraram que a AI do maracujazeiro é do tipo homomórfica esporofítica, de herança monofatorial. Anos mais tarde, estudos realizados por Suassuna et al. (2003), em maracujazeiro, sugeriram que há um gene de efeito gametofítico associado ao sistema esporofítico.

O Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético para a cultura visando o

estabelecimento de variedades adaptadas a região. Neste contexto, no presente trabalho visou-se investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o processo que conduz ao reconhecimento e à rejeição do pólen incompatível como resposta a reação de AI presente no maracujazeiro azedo.

Até o presente momento, apenas está esclarecido o tipo de controle genético que atua na determinação da AI no maracujazeiro, porém não se conhece o mecanismo genético que rege a incompatibilidade nesta espécie. Assim, nesta pesquisa objetivou-se elucidar alguns pontos relacionados a esse sistema, além de determinar os mecanismos que regem a AI, visando gerar conhecimentos que possam auxiliar o melhorista, como a possibilidade de manipular o sistema e, deste modo, desenvolver linhagens e variedades ou híbridos mais homogêneos e com maior qualidade para o mercado consumidor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O maracujá

O maracujá tem denominação indígena de origem Tupi e significa “alimento em forma de cuia”. Esta espécie é caracterizada por ser uma planta trepadeira, de caule lenhoso na base e herbáceo no ápice (Meletti et al., 2000). O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae e ao gênero *Passiflora*, reunindo mais de 500 espécies distribuídas pelos trópicos, principalmente no Brasil. Destaca-se economicamente em seus usos farmacológico, alimentar e ornamental (Lima, 1999). Sendo, as espécies que produzem frutos comestíveis as que apresentam maior importância econômica. Entre as espécies descritas, a *Passiflora edulis* Sims é a mais importante e a mais cultivada, devido ao fato de esta ser mais vigorosa, adaptada a baixas altitudes, altas temperaturas, além da qualidade de seus frutos. A polpa desta espécie é mais ácida e possui maior rendimento de suco, sendo este muito apreciado por sua qualidade de aroma e sabor agradáveis. O fruto é rico em minerais e vitaminas, principalmente A e C (Lima, 2002).

Os principais países produtores de maracujá no mundo são Brasil, Colômbia e Equador. Segundo estimativas da ITI Tropicals (2007) a produção mundial de maracujá é de 640.000 toneladas e o Brasil aparece em posição de destaque apresentando, aproximadamente, 70% desse total. Nas regiões brasileiras o maracujazeiro azedo é cultivado principalmente em pequenas áreas,

cerca de 2 hectares, e em pequenas propriedades, sendo importante gerador de renda, além de propiciar um período longo de colheita (São José et al., 1994). O período produtivo pode variar de 6 meses por ano nas regiões mais ao Sul do país, até o ano todo nas regiões ao Norte do Brasil.

2.2 - Taxonomia

O maracujazeiro azedo é uma planta nativa da América do Sul, sendo encontrado no Havaí, Quênia, Índia, Austrália, Caribe e Brasil. Embora existam divergências com relação à origem desta espécie, é provável que o Brasil seja seu centro de origem (Bernacci et al., 2008). A denominação *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* foi descrita em 1932 por Otto Degener, o qual sugeriu que esta espécie era originária da Austrália, tendo como características exclusivas a cor do fruto, a porção colorida da corona ser maior e com tonalidade roxa mais escura, e pela presença de glândulas nas sépalas.

Bernacci et al. (2008) afirmam que as características apresentadas para diferenciar o maracujá amarelo dos demais maracujazeiros azedos são infundadas. Os autores comentam que as glândulas são comuns na espécie, embora possam estar ausentes em alguns casos. Além disso, afirmam que a corona possui grandes variações de cores independente da cor do fruto, e por último constatam que a coloração externa do fruto é um caráter de herança complexa que não possui dominância, logo é possível encontrar frutos que apresentam uma grande variação de cores (amarelo pálido, amarelo, amarelo-alaranjado, vermelho-rosado, vermelho-roxo, vermelho, roxo avermelhado, roxo e roxo escuro). Sendo assim, foi determinado pelo Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas que, a nível taxonômico, deve-se utilizar *Passiflora edulis* Sims para todo e qualquer fruto de maracujá azedo, associando o nome da cultivar nos materiais selecionados.

2.3 - Biologia reprodutiva

A reprodução é uma etapa fundamental no ciclo de vida de todos os organismos, devido a este fato há um grande interesse em determinar como esta é controlada. Em plantas com flores, uma das etapas mais importantes no processo reprodutivo é a polinização (Wheeler et al., 2001).

Nas plantas do gênero *Passiflora*, as flores são hermafroditas, grandes, vistosas e protegidas na base pôr brácteas foliares. No centro da flor, existe o androginóforo colunar bem desenvolvido. O ovário é globoso, unilocular, com placentação parietal e multiovulado. Os estiletes, em número de três, são livres ou conatos na base, com estigmas capitados. O androceu é formado por cinco estames, com filetes livres inseridos abaixo do ovário e anteras dorsofixas e versáteis (Bruckner, 1997) (Figura 1).



Figura 1: Flor de *Passiflora edulis* Sims. Foto obtida do site: http://zoo.bio.ufpr.br/polinizadores/Textos/bio_floral.htm.

A flor do maracujazeiro azedo abre-se a partir do meio dia, permanecendo aberta até a noite. Foi observado que nos dias com menos horas de luz solar a abertura das flores é retardada para os horários finais da tarde. Nas condições de Jaboticabal, São Paulo, verificou-se que o florescimento não ocorre em dias com duração inferior a 11 horas (Vallini et al., 1976). No período da antese ocorre

polinização da flor e posterior fecundação dos óvulos. A polinização consiste no transporte dos grãos de pólen das anteras para os estigmas. O maracujazeiro mostra alto insucesso na polinização pelo vento, devido ao grande peso e à viscosidade do grão de pólen, necessitando portanto de um agente transportador, principalmente mamangavas, abelhas de médio a grande porte do gênero *Xylocopa*, que apresentam boa eficiência na polinização. Estudos revelaram que, em média, são produzidos 300 óvulos por flor, havendo uma necessidade de no mínimo 190 grãos de pólen depositados no estigma para que ocorra a formação de um fruto normal (Ruggiero, 1978). Os grãos de pólen precisam permanecer secos por pelo menos 2 horas na superfície estigmática para que ocorra a fecundação; com as chuvas estes ficam umedecidos e arrebentam-se não ocorrendo então à fertilização (Akamine e Girolami, 1959). As flores quando não fecundadas murcham e caem.

Ruggiero (1973) constatou que o maracujazeiro azedo apresenta diferentes tipos de flores, que podem ocorrer em uma mesma planta. Assim, as flores podem ser classificados, em relação à curvatura do estigma como: totalmente curvas (TC), nas quais os estigmas encontram-se abaixo e/ou no mesmo nível das anteras; parcialmente curvas (PC), nas quais os estigmas encontram-se acima das anteras formando com elas um ângulo aproximado de 45°, e sem curvatura (SC), nas quais os estigmas não se curvam permanecendo unidos formando um ângulo aproximado de 90° em relação às anteras. Este estudo indicou ainda que o tempo médio decorrido desde a abertura da flor e a curvatura total do estilete está em torno de 71 minutos. É possível encontrar os três tipos de flores em uma mesma planta, bem como em outras plantas os três tipos podem não ocorrer.

De acordo com Ruggiero et al. (1976), as flores sem curvatura não produzem frutos, mesmo quando polinizadas com pólen de uma outra planta e, segundo os autores, isso se deve a um percentual reduzido de células em divisão nos ovários dessas flores. Assim, essas flores apresentam esterilidade feminina devido à inviabilidade dos óvulos. Estudos efetuados por Pereira et al. (1996) mostraram que o saco embrionário das flores do tipo SC não apresentam oosfera, componente essencial para a formação do embrião. No entanto, o pólen é viável nos diversos tipos de flores, independente da curvatura do estilete. Em média, as flores TC ocorrem em maiores porcentagens.

O conhecimento mais detalhado da biologia floral de espécies de *Passiflora* é, portanto, de fundamental importância para subsidiar meios que conduzam a uma melhor produtividade e, conseqüentemente, maior rentabilidade na comercialização devido este fator influenciar diretamente na produção.

2.4 - Citogenética

As espécies de *Passiflora* podem ser divididas dentro de quatro grupos citológicos, representados por $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$. A maioria das espécies apresentam $2n = 2x = 12$ ou 18 , porém, $2n = 14, 20, 22, 24, 36, 72$ e 84 também podem ser encontrados em espécies nativas e introduzidas. Aneuplóides e poliplóides têm sido relatados como mecanismo evolucionário (Melo et al., 2001). As espécies que apresentam maior expressão comercial, como o maracujazeiro azedo, possuem $2x = 18$ cromossomos. Contudo, segundo Bruckner (1997), muitas seções e subgêneros permanecem incontados e, deste modo, há a necessidade de estudos citológicos aprofundados que auxiliem na determinação de relações filogenéticas entre as espécies.

Há uma alta compatibilidade interespecífica em cruzamentos dentro do grupo com $2n = 2x = 18$, e de acordo com esta observação híbridos interespecíficos naturais e artificiais têm sido obtidos (Junqueira et al., 2008). Os cruzamentos sugerem que as barreiras entre várias espécies são frágeis; entretanto, os híbridos nem sempre são férteis e viáveis (Knight, 1991). A maioria dos híbridos interespecíficos apresentam problemas de desenvolvimento, macho-esterilidade, baixa viabilidade polínica ou dificuldade em florescer (Soares-Scott et al., 2003).

De acordo com Meletti et al. (2005), a hibridação interespecífica, objetivando a transferência dos genes de resistência a doenças ao maracujazeiro azedo, tem apresentado pouca aplicação prática. Este fato é decorrente de diversos problemas, dentre eles a alta variação morfológica nos frutos os quais, normalmente, são intermediários entre as duas espécies e desprovidos de características comerciais desejáveis. Deste modo, para recuperá-las, muitas gerações de retrocruzamentos com o progenitor comercial são necessárias. Junqueira et al. (2005) relataram experiências de sucesso com este método de

melhoramento e com o uso de espécies silvestres como fonte de genes de resistência. É notório que informações mais aprofundadas da origem e relação entre as espécies poderá auxiliar na escolha de procedimentos adequados à manipulação genética dentro de um programa de melhoramento.

2.5 - Interação pólen-pistilo

Nas angiospermas, a flor é responsável pela perpetuação da espécie. Dentre os diversos órgãos que a constitui, o pistilo e o estame são responsáveis pela reprodução sexuada da planta. O primeiro, representa o órgão feminino; sendo composto pelo estigma, estilete e ovário, onde os óvulos são armazenados. Os grãos de pólen se desenvolvem nos estames, o órgão masculino da flor, quando maduros são constituídos por uma bicamada: a intina, camada interna, composta por celulose, pectina e proteína; e a exina, camada externa, da qual é sintetizada e secretada pela antera e cuja composição são lipídios e proteínas. Estudos indicam que as proteínas presentes na exina do pólen interagem com compostos do pistilo (Doughty et al., 1998).

Durante interações compatíveis, a polinização se inicia com a deposição do pólen na superfície estigmática. Em sequência, após aderir, o pólen é hidratado e germina emitindo o tubo polínico, o qual penetra na cutícula das células do estigma e invadem a matriz extracelular deste tecido, crescendo através do tecido de transmissão do estilete. O processo culmina na condução dos gametas masculinos até o saco embrionário, local onde é liberado duas células espermáticas, uma que será responsável pela fertilização da oosfera, enquanto que a outra funde com os dois núcleos polares da célula central para formar o endosperma triplóide (Hiscock e Allen, 2008).

O grão de pólen é liberado da antera como um micrósporo desidratado; o grau de desidratação varia de acordo com a espécie, no entanto, estima-se que o percentual de água presente no grão de pólen durante a antese encontra-se entre 15 e 35% (Dumas et al., 1984). A hidratação necessária para a germinação do pólen é realizada quando este interage com o estigma. A superfície do estigma tem sido classificada como úmida ou seca; esta indicação se dá de acordo com a quantidade de secreção presente nesta região. Estas secreções estão

diretamente relacionadas com o sucesso da polinização, já que a absorção de água é um fator essencial para a germinação do pólen e penetração do tubo polínico no estigma (Goldman et al., 1994). As secreções presentes nos estigmas úmidos são compostas principalmente de lipídios ou carboidratos (Lush et al., 2000).

Por sua vez, os estigmas secos são cobertos por uma cutícula contínua que pode ser penetrada pelos tubos polínicos através de processos enzimáticos utilizando uma cutinase. A função desta película em estigmas secos é desconhecida, porém há indícios que esta cobertura desempenhe um papel essencial no reconhecimento pólen-estigma. Estudos indicam que a remoção desta camada através do tratamento com detergentes impede a penetração do tubo polínico no estigma (Hiscock e Dickinson, 1993).

Heslop-Harrison e Shivanna (1977) relataram que em estigmas úmidos os grãos de pólen hidratam e germinam rapidamente. Em contraposição, em estigmas secos as células das papilas são estimuladas durante a polinização a secretar exudatos sobre a superfície estigmática. Há indícios que plantas possuidoras de estigmas úmidos e pólenes binucleados estejam correlacionadas a espécies possuidoras de AI gametofítica, e àquelas que apresentam estigmas secos e pólenes trinucleados apresentam AI esporofítica. Contudo, grãos de pólenes binucleados também podem ser encontrado em sistemas de AI esporofítica (De Nettancourt, 1997).

2.6 - Auto-incompatibilidade em plantas

A AI é um dos mais importantes mecanismos genéticos que interfere na reprodução das angiospermas. Estima-se que este sistema ocorra em 30 a 50% das espécies de plantas com flores (Wheeler et al., 2001). Esse mecanismo de reprodução favorece a alogamia, promovendo, desta forma, a variabilidade genética dentro da espécie. A AI pode ser homomórfica, quando não existem modificações florais que acompanham o processo; ou heteromórfica, quando o mecanismo de AI origina flores que diferem basicamente no comprimento relativo do estilete e da antera, implicando, assim, em barreira física para a autopolinização (De Nettancourt, 1997). A AI homomórfica pode ser gametofítica

ou esporofítica e a resposta da AI é desencadeada após a interação entre pólen-pistilo, via um processo de discernimento entre o grão de pólen compatível e o incompatível. No sistema gametofítico, o fenótipo da AI é determinado quando o grão de pólen carrega um alelo também presente no estigma. Este fato culmina na inibição do desenvolvimento do tubo polínico. Em contrapartida, na AI esporofítica a reação é gerada pelo genótipo somático da planta adulta, que deu origem ao grão de pólen.

Plantas hermafroditas e férteis que apresentam AI são incapazes de produzir sementes quando polinizadas com pólen de mesmo genótipo. Este fato é resultante do fracasso dos grãos de pólen de mesmo genótipo de aderirem ou germinarem no estigma ou, ainda, da incapacidade dos tubos polínicos penetrarem ou crescerem através deste órgão (Schifino-Wittmann e Dall'Agnol, 2002).

A AI ocorre em diversas famílias e gêneros de angiospermas, inclusive em várias espécies de interesse econômico (Brewbaker, 1957), como em *Nicotiana*, *Brassica*, *Lycopersicon*, *Passiflora* e muitas outras. Segundo Schifino-Wittmann e Dall'Agnol (2002), a ocorrência da AI em espécies economicamente importantes pode ser de grande valia, pois diversas são as aplicações desse mecanismo. Em espécies ornamentais cujas flores são destinadas ao corte, a existência da AI pode ser altamente benéfica, pois a não ocorrência de fertilização mantém a flor viçosa por muito mais tempo. Além disso, em algumas culturas a supressão da frutificação pode ser útil evitando a alocação de recursos para as partes reprodutivas, assegurando um maior vigor vegetativo. Os autores afirmam ainda que uma das grandes vantagens práticas da AI para a realização de cruzamentos em plantas auto-incompatíveis, ou quando a auto-incompatível é utilizada como progenitor feminino, é que a emasculação é dispensável. Por outro lado, a principal utilização da indução da auto-compatibilidade em espécies auto-incompatíveis é a produção de linhas puras e, posteriormente, híbridos.

Estudos genéticos clássicos têm estabelecido que o reconhecimento de pólen compatível e incompatível pelo estigma é controlado na maioria das espécies por um único locus multialélico, o locus S. Análises moleculares comprovam que a inibição do pólen ocorre quando o mesmo alelo S específico é expresso pelo pistilo e pelo pólen ao mesmo tempo (Takayma e Isogai, 2005).

2.6.1 - Auto-incompatibilidade gametofítica

De acordo com Newbigin et al. (1993), em plantas possuidoras de AI gametofítica os cruzamentos compatíveis só ocorrerão se o alelo S do pólen for diferente de qualquer alelo presente no estilete diplóide. Nesse sistema o pólen é binucleado e a superfície estigmática é úmida, a qual facilita a hidratação do grão de pólen. Uma outra característica do mecanismo gametofítico é que a superfície estigmática se rompe na maturação. Em conjunto, esses fatores favorecem a germinação rápida do pólen, de modo que a reação de incompatibilidade ocorra já no estilete. Segundo Mascarenhas (1993), no sistema gametofítico os fatores inibitórios ou seus precursores seriam produzidos pelos alelos S, após a anáfase da primeira divisão da meiose (Figura 2).

Acredita-se que as RNases sejam um dos fatores determinantes da reação de incompatibilidade no sistema gametofítico. Estas enzimas estão presentes desde a superfície das papilas estigmáticas, nos tecidos condutores do estilete até o ovário, o que coincide com o trajeto do tubo polínico. Há evidências de que as RNases interrompem o crescimento do tubo polínico por meio da degradação do RNA do tubo possuidor do mesmo haplótipo S, mas os processos celulares que conduzem ao reconhecimento e a eliminação dos tubos incompatíveis ainda não estão completamente elucidados (Haring et al., 1990; De Nettancort, 1997). Um tipo de controle gametofítico diferenciado das demais formas descritas foi observado em papoula (*Papaver rhoeas*), cujo mecanismo de inibição do pólen incompatível é dependente de gradientes de Ca^{+2} (Franklin-Tong et al., 2002).

Diversos estudos têm relatado que em algumas espécies possuidoras da AI gametofítica existem genes restauradores da auto-fertilidade, ocorrendo naturalmente ou surgindo como resultado de mutações ou poliploidização. As análises têm indicado que a poliploidia pode afetar e mesmo impedir a reação de AI gametofítica em dicotiledôneas, como consequência da alteração do balanço genético, como exemplo podemos citar poliplóides de *Lycopersicon peruvianum* (Chawla et al., 1997) e *Petunia* (Entani et al., 1999). No entanto, em espécies monocotiledôneas e algumas dicotiledôneas primitivas, a incompatibilidade é mantida à nível de poliplóides (De Nettancort, 1997).

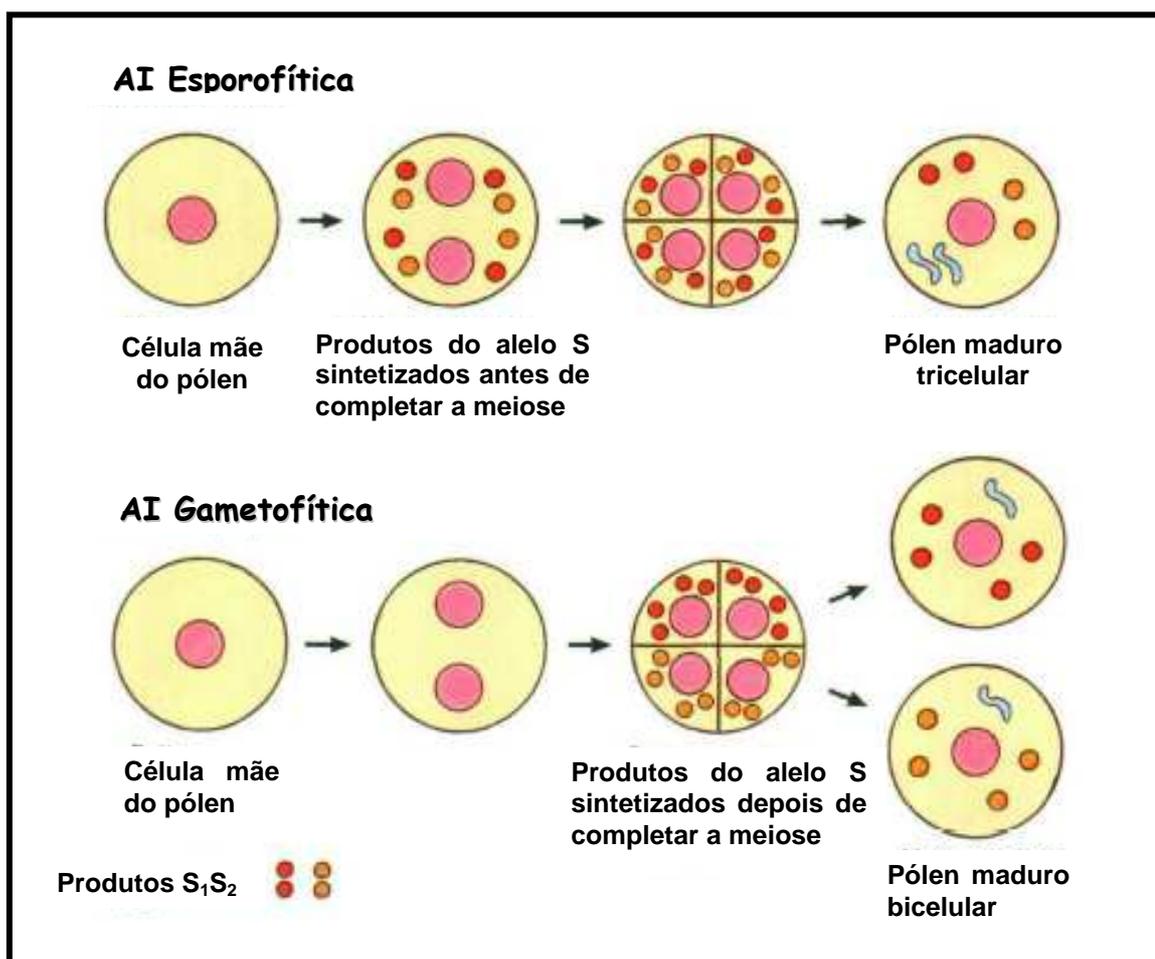


Figura 2. Modelo da possível base das diferenças entre as auto-incompatibilidades esporofítica e gametofítica. Adaptado de Mascarenhas (1993).

2.6.2 - Auto-incompatibilidade esporofítica

A reação de incompatibilidade esporofítica ocorre na superfície estigmática, resultando na inibição da germinação do pólen. De um modo geral, a capacidade de discriminar entre o pólen da mesma planta e um pólen com genótipo distinto é influenciado pelo estágio de desenvolvimento do estigma (Brugière et al., 2000; Nasrallah, 2000).

No sistema esporofítico o pólen é trinucleado e a superfície do estigma é seca, além disso, distintamente do sistema gametofítico, a cutícula permanece intacta após polinização. Sendo assim, neste mecanismo, o pólen tem de ser capaz de retirar a água para sua germinação do protoplasto da célula papilar. A

principal função da capa polínica, neste caso, é absorver água do estigma. Em cruzamentos compatíveis, a capa do pólen e a parede da célula da papila interagem, permitindo que o tubo polínico penetre a parede celular estigmática. Até a passagem desta barreira, o estigma não distingue entre pólen compatível e incompatível (Bruckner et al., 2005). A reação de AI ocorre entre produtos do estigma e componentes do pólen, de origem esporofítica. A síntese dos produtos dos alelos S no sistema esporofítico ocorre supostamente antes da anáfase I (Mascarenhas, 1993) (Figura 2).

A maioria das pesquisas à cerca da AI esporofítica tem sido realizadas na família Brassicaceae em plantas como couve, couve-flor, brócolis e rabanete. Em períodos mais recentes, a batata doce, pertencente a família Convolvulaceae, passou a ser estudada à nível molecular, visando avaliar este tipo de reação. Estudos revelaram que o locus S é extremamente complexo, medindo cerca de 80 a 100 kb e contendo aproximadamente 17 genes (Watanabe et al., 2000). No entanto, apenas 2 genes, altamente polimórficos, são necessários para o processo de reconhecimento do pólen incompatível; um deles codifica um determinante masculino que é expresso em células do grão de pólen e o outro é um determinante feminino, o qual está presente no pistilo. As variações desse complexo gênico são denominados haplótipos S (Hiscock e McInnis, 2003).

Diversas maneiras de superar a AI têm sido descritas no sistema esporofítico, dentre elas está o manejo de fatores fisiológicos, como por exemplo, a autopolinização das flores na fase de botão, ou ainda a utilização de flores velhas ou pólen velho (Richards, 1997). Segundo este mesmo autor, nestes casos a reação de AI ainda não foi ativada ou está enfraquecida, facilitando, deste modo, a fertilização, utilizando pólenes portadores do mesmo genótipo. Em repolho, por exemplo, a polinização em botões florais é utilizada para a obtenção de linhas puras que, posteriormente, são cruzadas entre si para a produção de híbridos.

Fernandes et al. (1996) constataram que a fecundação incompatível pode também ser conseguida realizando-se duas autopolinizações no dia da antese, às 13 e às 17 horas. Hipoteticamente, a primeira autopolinização anula o efeito das proteínas, de maneira que a segunda consiga, em parte, fertilizar os óvulos. As linhagens poderão ser mantidas por autofecundações no estágio de botão ou por meio de propagação vegetativa. Cruzamentos entre plantas incompatíveis entre si

podem ser realizadas de maneira análoga às autopolinizações acima descritas.

Adicionalmente, tem-se relatos de outros mecanismos que corroboram para a inativação da AI, como exemplo podemos citar a utilização de irradiação, hormônios (Hasenstein e Zawada, 2001), altas temperaturas, soluções salinas (Carafa e Carratu, 1997) e aplicações de CO₂ (Lee et al., 2001); estas estratégias podem levar a um colapso fisiológico e temporário da AI, permitindo autopolinizações.

2.6.3 - Auto-incompatibilidade em Passifloraceae

A flor do maracujazeiro azedo embora seja hermafrodita, normalmente, é incapaz de produzir zigotos após a autopolinização, pois apresenta uma característica importante em sua biologia floral, a AI. Tal fator tem implicações importantes nas metodologias de melhoramento por induzir a alogamia e o alto grau de heterozigose, além de ter influências na compatibilidade entre cruzamentos (Allard, 1971). A AI faz com que o produtor deva ter no seu pomar grande número de plantas geneticamente distintas. Bruckner et al. (1995) concluíram que a auto-incompatibilidade do maracujazeiro é do tipo homomórfica esporofítica, de herança monofatorial. Entretanto, estudos realizados por Suassuna et al. (2003), em maracujazeiro, sugeriram que há um gene de efeito gametofítico associado ao sistema esporofítico.

Souza et al. (2006), estudando a biologia reprodutiva na cultura do maracujazeiro, constataram que o estigma desta espécie é seco, sendo o estilete do tipo sólido. Acredita-se que estas características estejam relacionadas ao mecanismo de AI descrita para esta espécie. Estigmas secos possuem uma importante função biológica no sistema de AI esporofítica, pois permitem uma interação célula-célula entre o pólen e o estigma, sendo, deste modo, o sítio de reconhecimento ou rejeição do pólen. Rêgo (1997) verificou, em maracujá amarelo, que as proteínas responsáveis pela AI são encontradas no estigma e na parte superior do estilete dois dias antes da antese, aumentando gradativamente até o momento da abertura da flor.

Embora a AI seja uma característica da biologia reprodutiva da maioria das espécies do gênero *Passiflora*, há espécies de determinados subgêneros que

apresentam auto-compatibilidade como a *P. tenuifila*, *P. elegans*, *P. capsularis*, *P. villosa*, *P. suberosa* e *P. foetida*. (Junqueira et al., 2005).

2.6.4 - Genes envolvidos no processo de auto-incompatibilidade no sistema esporofítico

2.6.4.1 - Determinante feminino da auto-incompatibilidade

As pesquisas que revelaram a existência de um determinante feminino no mecanismo de AI se iniciaram em *Brassica*, com a identificação imunológica de um antígeno específico do haplótipo S presente no estigma, seguido pela identificação bioquímica de uma glicoproteína S (SLG). Em *Brassica*, a SLG possui massa molecular em torno de 50 a 60 kDa e doze resíduos de cisteína conservados (Nasrallah et al., 1987). A caracterização das SLGs levaram a identificação de um segundo gene do locus S, o SRK, receptor quinase do locus S (Stein et al., 1991).

Sabe-se que o gene SRK é o determinante feminino da AI esporofítica e codifica formas alélicas de um receptor quinase expresso em células da papila do estigma (Stein et al., 1996). A proteína SRK possui tamanho aproximado de 120 kDa e se estende da membrana plasmática da papila até a parede celular. Estudos utilizando plantas transgênicas mostraram que a SRK sozinha determina a especificidade-S no estigma (Silva et al., 2001).

As glicoproteínas oriundas da expressão do gene SLG são secretadas no estigma e estão localizadas mais especificamente nas paredes celulares da papila (Nasrallah et al., 1988). Takasaki et al. (2000) afirmaram que a SLG não é essencial para o reconhecimento do pólen incompatível, no entanto, há evidências de que a ação da SLG e a SRK em conjunto aumenta a força da resposta de incompatibilidade.

2.6.4.2 - Determinante masculino da auto-incompatibilidade

Foi identificado em *Brassica* um determinante masculino do sistema de AI esporofítica; uma pequena proteína de 6 kDa, rica em cisteína. Esta foi identificada independentemente por um grupo dos Estados Unidos e outro do Japão (Schopfer et al., 1999; Takayma et al., 2000) e, devido a este fato, é possuidora de dois nomes distintos: SCR (proteína rica em cisteína do locus S) e SP11 (proteína 11 do pólen do locus S). A descoberta desta proteína foi de fundamental importância na pesquisa da AI por haver sido a primeira vez que um determinante de incompatibilidade presente no pólen foi caracterizado. Até o presente momento, acredita-se que os determinantes de AI masculino e feminino sejam codificados por diferentes genes do locus S.

A SCR/SP11 é expressa esporofiticamente em células somáticas do tapete da antera e, gametofiticamente, nos micrósporos haplóides; porém, em pólen recessivo do haplótipo S, a expressão do SCR/SP11 é exclusivamente esporofítica em células do tapete. Estudos imunocitoquímicos mostraram que, quando a SCR/SP11 é expressa em micrósporos, é incorporada dentro da “capa” do pólen, isto indica que há duas vias para a translocação de SCR/SP11, uma controlada esporofiticamente e outra gametofiticamente. Porém, as razões e consequências destas diferentes vias ainda não foram esclarecidas (Iwano et al., 2003).

2.6.4.3 - Interação entre os determinantes masculino e feminino

A expressão dos genes SRK, SCR/SP11 e SLG são rigorosamente regulados, sendo indetectáveis em botões florais jovens, porém alcançam níveis máximos de expressão pouco antes da antese, período quando as flores tornam-se AI. Deste modo, quando a flor se abre, ela está preparada para discriminar entre o próprio pólen e pólenes com genótipos distintos. O reconhecimento da autopolinização ocorre à nível de interação proteína-proteína dos determinantes feminino e masculino, e a resposta incompatível ocorre quando os dois determinantes se originam do mesmo haplótipo S (Takayama e Isogai, 2005).

No estigma antes de ocorrida a polinização, a SRK aparentemente

encontra-se associada com duas proteínas tioredoxina-H, THL 1 e THL 2 (Giranton et al., 2000; Cabrillac et al., 2001). A interação da THL 1 e, provavelmente, da THL 2, com o domínio quinase da SRK *in vivo*, a mantém em estado inativo. A transição do complexo SRK para o estado ativo é desencadeado rapidamente pela presença de grãos de pólen na superfície estigmática, através da interação haplótipo específica entre o domínio SCR/SP11 e o domínio receptor da SRK (Iwano et al., 2003; Cabrillac et al., 2001). Esta interação resulta em uma rápida autofosforilação dos resíduos serina e tirosina, no domínio quinase da SRK (Takayma et al., 2001), hipoteticamente, como consequência imediata, ocorre uma dissociação da THL 1 e THL 2 (Cabrillac et al., 2001). A ativação da SRK é necessária para iniciar a cascata de sinalização dentro das células da papila através da interação do domínio quinase com proteínas citosólicas específicas, tendo como produto final a rejeição do pólen incompatível.

No entanto, estudos revelaram que a proteína SCR/SP11 sozinha não é capaz de desencadear a resposta de incompatibilidade quando aplicada diretamente no estigma, acredita-se que este fato seja em decorrência da incapacidade desta em difundir-se através da cutícula estigmática (Iwano et al., 2003). Esta observação sugere que um fator adicional do pólen seja necessário para que se estabeleça a interação entre a SCR/SP11 e a SRK.

2.6.5 - Transdução de sinal no sistema de auto-incompatibilidade

A cascata de sinalização que desencadeia a resposta de AI, ainda não foi completamente elucidada. No entanto, duas moléculas sinalizadoras foram identificadas como mediadoras da via, que é iniciada pela ativação da SRK e culmina na resposta de AI (Figura 3). Uma delas é a ARC 1, uma proteína presente no estigma; acredita-se que ela interaja com o domínio citoplasmático da SRK (Muzzurco et al., 2001). O papel da ARC 1 como molécula sinalizadora da resposta de AI foi investigado por meio de experimentos realizados por Stone et al. (1999). Neste caso, foi utilizado plantas transgênicas expressando uma construção na orientação anti-sentido do cDNA da ARC 1; como resultado foi observado que houve uma perda parcial da resposta de AI, indicando que a ARC 1 exerce um papel importante na via de sinalização que ativa os genes

responsáveis pelo processo de AI. Portanto, a perda incompleta da resposta de AI sugere que há outras moléculas envolvidas nesta via de sinalização.

Mais recentemente, foi identificada uma proteína quinase denominada MLPK em uma variedade auto-compatível de *Brassica rapa*, que se localiza na membrana das células papilares (Murase et al., 2004). Foi observado que esta variedade era portadora de uma mutação que resultava na perda da atividade quinase desta proteína. Contudo, as pesquisas concluíram que a expressão correta da proteína em questão poderia restaurar a habilidade de a papila celular rejeitar o próprio pólen. Deste modo, estas análises sugerem que a MLPK é um mediador da sinalização da AI.

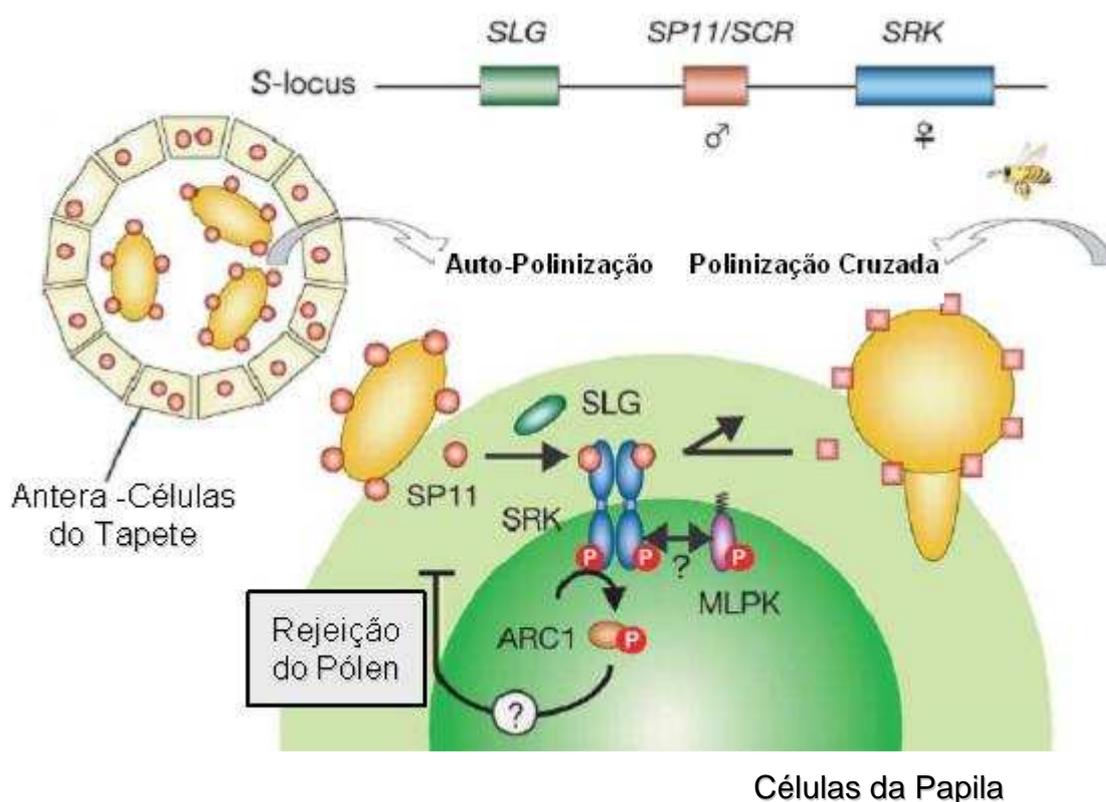


Figura 3: Modelo molecular da resposta de auto-incompatibilidade esporofítica. Adaptado de Takayama e Isogai (2005).

2.7 - Melhoramento genético de *Passiflora*

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujazeiro azedo (*P. edulis* Sims); o cultivo desta fruteira é uma atividade econômica em 652 municípios de 23 Estados (IBGE, 2002). A produção em escala comercial no país tem origem relativamente recente na década de 70. Atualmente, o agronegócio do maracujá no Brasil gera 500 milhões de reais ao ano, empregando aproximadamente 250.000 pessoas e pode disponibilizar de 5 a 6 empregos diretos e indiretos por hectare no decorrer de 2 anos; desta forma, tal cultura oferece uma excelente opção de investimento para pequenos e médios agricultores. O maracujazeiro azedo é uma das 8 espécies frutíferas mais extensivamente cultivadas na região sudeste, sendo precedida apenas pelas culturas da laranja, banana, limão, manga, tangerina, abacaxi e uva (Piza Júnior, 1998).

Contudo, apesar da grande importância da cultura, há uma escassez na literatura no que diz respeito a produção científica básica e aplicada, principalmente na área de melhoramento genético. Este fato culmina em número reduzido de cultivares homogêneos e produtivos, tolerantes as principais moléstias que afetam esta espécie. Normalmente, os produtores reutilizam sementes de plantios anteriores, este fato é um entrave que limita a qualidade e produtividade dos pomares. Por ser uma espécie alógama, por excelência, os métodos de melhoramento a serem utilizados no desenvolvimento de cultivares devem ser os recomendados de acordo com o sistema reprodutivo da espécie. Segundo Meletti et al. (2005), os primeiros trabalhos de melhoramento utilizaram o método da seleção massal que é eficiente para caracteres de fácil mensuração e que possuam considerável herdabilidade como formato do fruto, teor de suco, teor de sólidos solúveis totais, dentre outros.

Os primeiros cultivares de maracujá tornaram-se disponíveis a partir da década de 1990; entretanto, antes dessa década várias seleções foram utilizadas como a seleção Maguary, mais cultivada em Minas Gerais, 'Composto IAC-270', mais utilizado em São Paulo; a seleção *Golden Star*, utilizada no Rio de Janeiro e Espírito Santo (Meletti et al., 2005)

Essas seleções foram importantes para o desenvolvimento de materiais mais promissores, sendo que em 1999 foram disponibilizadas as primeiras cultivares de maracujá azedo. Essas cultivares foram desenvolvidas visando o

mercado de frutas in natura e a agroindústria, por isso elas apresentam características definidas e distintas. A cultivar IAC-273 e IAC-277 foi disponibilizada para o mercado de frutas frescas e IAC-275 para a indústria (Meletti et al., 2005).

Recentemente, foram lançados três novos híbridos de maracujazeiro azedo: BRS Sol do Cerrado, BRS Gigante Amarelo e o BRS Ouro Vermelho (Faleiro et al., 2008). Esses materiais foram obtidos via melhoramento populacional por seleção recorrente e obtenção e avaliação de híbridos interespecíficos. Apresentam como principais características alta produtividade, tolerância a várias doenças da parte aérea, menor dependência da polinização manual e ótimas características físico-químicas de frutos.

A América do Sul é considerada o local de origem de pelo menos 95% das espécies de maracujá, sendo o Brasil o maior centro de distribuição geográfica do gênero *Passiflora* (Vanderplank, 1996). Deste modo, o país é possuidor de uma ampla variabilidade natural extremamente valiosa como fonte de germoplasma para o melhoramento genético. Determinadas espécies silvestres, têm apresentado características importantes que podem contribuir em programas de melhoramento, dentre elas podemos observar fenótipos de resistência a doenças ou pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, maior período de florescimento e concentração ampliada de componentes químicos de interesse a indústrias farmacêuticas (Meletti et al., 2005). Outra vantagem é que estas espécies podem ser uma alternativa para diversificar o mercado de consumo *in natura*, e também podem ser empregadas como plantas ornamentais.

Segundo Oliveira e Ferreira (1991), as metodologias de introdução de plantas, hibridação, seleção massal e seleção com teste de progênies são ideais para explorar a grande variabilidade genética presente no maracujazeiro. Além disso, a propagação vegetativa é apontada como uma alternativa para sobrepor os transtornos causados por patógenos presentes no solo. Habitualmente é empregado como estratégia outras espécies do gênero como porta-enxertos resistentes (Menezes et al., 1994).

Nos tempos atuais, é possível observar contribuições às metodologias tradicionais, a exemplo do notório avanço no âmbito da pesquisa nas áreas de biologia molecular, associada ao melhoramento e a genética, possibilitando a

elucidação de mecanismos biológicos envolvidos na transmissão de características de uma geração para outra. A combinação de técnicas de biologia molecular, culturas de tecidos *in vitro* e transferência exógena de genes representa uma importante ferramenta para introdução de novas características no organismo de interesse. Genes oriundos de diferentes espécies vegetais, animais ou microorganismos podem ser implantados de forma controlada em um genoma vegetal receptor, de modo independente da fertilização (Gander et al., 1996).

Utilizando esta abordagem, já é possível encontrar hoje pesquisas bem sucedidas que obtiveram como produto plantas de maracujá transgênicas oriundas de uma transformação com um RNA derivado do genoma do *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. Segundo dados apresentados pelos autores, as plantas portadoras desse gene apresentaram um fenótipo de resistência ao vírus de endurecimento do fruto (Alfenas et al., 2005). Contudo, atualmente, a geração dos organismos geneticamente modificados tem sido alvo de polêmica e discussão nos diversos segmentos da sociedade. No entanto, o uso dos transgênicos deve ser analisado quanto às suas vantagens, desvantagens e contribuição à melhoria da qualidade de vida, levando sempre em consideração a questão do fluxo gênico que pode ocorrer, especialmente por ser o Brasil um país centro de origem e de diversidade primária das Passifloras e também pelo fato de fácil obtenção de híbridos entre algumas espécies de Passiflora com a forma cultivada.

No presente trabalho, utilizamos o maracujá, *P. edulis* Sims, espécie que atualmente apresenta maior importância comercial. A grande variabilidade genética existente em maracujazeiro, o ciclo reprodutivo relativamente curto e a ascensão da procura desta fruta pelo mercado consumidor são apenas alguns dos fatores favoráveis a esta cultura. Deste modo, é evidente que o maracujá necessita de incrementos em melhoramento genético com o intuito de viabilizar o aumento da produtividade, a qualidade adequada de frutos e resistência a doenças.

Por ser uma espécie alógama, a obtenção de híbridos seria o caminho natural para aumentar a produtividade da cultura, mas considerando a questão da AI, que impede a autopolinização e obtenção de linhagens, este tipo de material ainda não foi obtido pelos pesquisadores. Apesar de a utilização da AI no melhoramento de plantas ser realizada a longa data, em maracujazeiro ainda

existe uma lacuna entre o grau de conhecimento teórico, como as bases genética e molecular, e a aplicação deste conhecimento nesta área de pesquisa. Sendo assim, a proposta deste trabalho consiste em elucidar alguns pontos relacionados a esse mecanismo, que venham acrescentar em conhecimento que possam ser empregados posteriormente pelo melhorista.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi identificar os processos celulares e moleculares envolvidos no reconhecimento e na rejeição do pólen incompatível em maracujazeiro azedo. Os objetivos específicos foram:

- a) Analisar a nível morfológico e ultra-estrutural a interação pólen-estigma após polinizações compatíveis e incompatíveis;
- b) Caracterizar a anatomia e a ultra-estrutura dos tubos polínicos compatíveis e incompatíveis;
- c) Analisar a estrutura de grãos de pólen após polinizações compatíveis e incompatíveis;
- d) Analisar o desenvolvimento *in vivo* de tubos polínicos após polinizações compatíveis e incompatíveis;
- e) Caracterizar alterações na estrutura e no crescimento do tubo polínico entre interações compatíveis e incompatíveis;
- f) Realizar a análise genômica do sistema de AI presente no maracujazeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material Vegetal

Esta pesquisa foi realizada com amostras coletadas em plantas oriundas de uma população de meio irmãos de maracujá azedo. A população foi estabelecida no campo experimental do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF, localizado na Escola Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos do Goytacazes, região Norte do Estado do Rio de Janeiro. As plantas foram conduzidas no sistema de espaldeira vertical, com mourões de 2,5 metros de altura, espaçados a 4 metros e com um fio de arame número 12 a 1,80 metros de altura em relação ao nível do solo. A distância entre linhas de plantio foi de 3,5 metros. O método de irrigação utilizado foi o de microaspersão (Silva et al., 2009).

4.2 - Polinização

Para as metodologias realizadas com grãos de pólen compatíveis e incompatíveis foram realizados cruzamentos manuais. Para tal, botões florais (receptores) foram marcados em fase de antese (10 botões para cada cruzamento) e protegidos com sacos de papel entre os horários de 10:00 e 11:30. As polinizações foram efetuadas a partir das 14:00 horas. Foram executadas autopolinizações e polinizações cruzadas. Após as polinizações, as

flores foram protegidas novamente com sacos de papel, até o momento da coleta. O vingamento do cruzamento foi avaliado 48 horas após quando o ovário se apresentava intumescido e ainda fixo no pedúnculo. Combinações cujo cruzamento não vingaram foram consideradas auto-incompatíveis ou de genótipo similar para a auto-incompatibilidade.

4.3 - Análise morfológica e ultraestrutural

4.3.1 - Fixação e desidratação do estigma para análise microscópica

Amostras de estigmas, polinizados com pólenes compatíveis e outros polinizados com pólenes incompatíveis, foram fixadas por duas horas em solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído nascente 4% e tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes, por 45 minutos, no mesmo tampão e pós-fixadas por duas horas em solução de tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão cacodilato 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Após três lavagens de 45 minutos no mesmo tampão seguiu-se uma série ascendente de desidratação cetônica (50%, 70%, 90% e três vezes em 100%), por uma hora cada etapa.

4.3.2 - Infiltração e inclusão do material

Para infiltração do estigma, a acetona foi substituída gradualmente pela resina Epóxi (Poli-bed). As amostras em Epon puro foram colocadas em fôrmas e levadas à estufa, 65°C, por um período de 48 horas para que ocorresse a polimerização. Após essas duas etapas, os tecidos infiltrados foram seccionados de acordo com o tipo de microscopia utilizado para a análise.

4.3.3 - Microscopia óptica

Em ultramicrótomo, Reichert ultracuts, os tecidos incluídos em resina foram submetidos a cortes semi-finos entre 0,60 e 0,70 μm de espessura com o auxílio de faca de diamante. As secções foram coradas com azul de toluidina à 1 % e as lâminas seladas com Entelan[®]. Em seguida, o material foi observado e as imagens foram capturadas em microscópio óptico Olympus BX 60.

4.3.4 - Microscopia eletrônica de transmissão

Após as etapas de infiltração e inclusão foram feitos cortes ultra finos nos tecidos, utilizando ultramicrótomo e faca de diamante; os cortes ultrafinos, entre 70 a 90 nm de espessura, foram coletados em grades de cobre de 300 mesh. Em seguida, os cortes foram contrastados com acetato de uranila 5% por 20 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS – TEM 900, a uma voltagem de 80 kV.

4.3.5 - Microscopia eletrônica de varredura

Com a finalidade de observar a interação pólen-estigma em polinizações compatíveis e incompatíveis, amostras dos estigmas, após as etapas de fixação, pós-fixação e desidratação, detalhadas anteriormente, foram submetidas ao ponto crítico de secagem com o auxílio do aparelho Bal-Tec Critical Point Dryer CPD 030 através da substituição de toda acetona por CO_2 líquido, em condições de alta pressão até atingir o ponto crítico para CO_2 . Em seguida, os fragmentos oriundos deste tecido foram fixados com fita adesiva de carbono em suportes cobertos com uma fina camada de ouro de 20 nm com a finalidade de aumentar a condutividade eletrônica do material. As amostras foram observadas e eletromicrografadas no microscópio eletrônico de varredura Zeiss – DSEM 962, a uma voltagem de 25 KV.

4.4 - Análise da interação pólen-pistilo *in vivo*

Com o intuito de observar o desenvolvimento do tubo polínico *in vivo*, foram realizados cruzamentos compatíveis e incompatíveis, bem como autopolinizações em flores no estágio de botão, onde o pólen era proveniente de uma flor doadora em antese e era possuidor do mesmo genótipo do pistilo receptor. Após as polinizações, os estigmas foram tratados seguindo a metodologia proposta por Dafni (1992).

Assim, as flores foram coletadas nos períodos correspondentes a 1, 2, 12 e 24 horas após a polinização e tiveram seu pistilo removido e fixado em FAA (Formalina 37%, Acido Acético e Álcool 70%) na proporção 5:5:90, respectivamente, por um período de 24 horas.

Após esse período o material foi lavado em água destilada e transferido para solução de etanol 70%, onde permaneceram armazenados. O estigma, estilete e ovário foram imersos em solução de hidróxido de sódio (NaOH) por um período de 8 horas, com a finalidade de amaciar os tecidos; posteriormente, estes foram lavados em água destilada por 5 vezes, com 5 minutos de duração cada lavagem. Em seguida, o material foi corado em solução composta por azul de anilina clarificada à 0,1% diluída em acetato de potássio (0,1 M) por 4 horas. Os tecidos corados foram colocados em lâminas e esmagados com o auxílio de uma lamínula. A observação foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, equipado com filtro de ultravioleta.

4.5 - Detecção da deposição de calose como resposta a auto-incompatibilidade

Estigmas submetidos previamente a polinizações compatíveis e incompatíveis foram utilizados para análise da detecção de calose; para isto, as amostras foram fixadas e lavadas como descrito no item 4.2.1. Em sequência, os estigmas foram expostos à desidratação alcoólica nas concentrações de 50%, 70%, 90 % e 100 %, permanecendo por uma hora em cada etapa. A infiltração foi realizada substituindo gradualmente o álcool pela solução de infiltração da resina

Leica Historesin. O material foi incluído em solução de embebedimento da resina como determinado pelo fabricante, sendo sua polimerização realizada em temperatura ambiente em cápsulas de gelatina. Após processado, com auxílio do micrótomo rotatório (Cut 4050 Slee Mainz) e faca de aço; foram obtidos cortes finos de 4 μm de espessura. Os cortes foram transferidos para lâmina e corados com azul de anilina clarificada à 0,1%, diluída em acetato de potássio (0,1 M) por 1 hora. As amostras coradas foram observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, equipado com filtro de ultravioleta.

4.6 - Análise molecular

4.6.1 - Extração do DNA genômico

O DNA genômico de *P. edulis* Sims e de *Brassica oleracea* foi extraído do tecido foliar utilizando o DNazol (Gibco), seguindo as instruções do fabricante. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido até atingirem a consistência de um pó fino; cerca de 0,1 g do macerado foi transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 300 μL de DNazol e 300 μL de clorofórmio. Em seguida, após centrifugação de 10 minutos a 12000 x g, a fase aquosa da solução foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 225 μL de etanol absoluto. Posteriormente, a solução foi incubada por 5 minutos e centrifugada a 5000 x g por mais 5 minutos. Em sequência, o sobrenadante foi descartado, sendo o precipitado lavado inicialmente com uma mistura de DNazol e etanol absoluto (1:0,75) e numa próxima etapa com etanol 75% (v/v). Essa solução foi centrifugada por 5 minutos a 4000 x g e o precipitado foi solubilizado com 50 μL de água ultrapura.

4.6.2 - Quantificação do DNA

Com a finalidade de determinar a concentração final do DNA obtido após processo de extração, amostras do mesmo foi aplicado em um gel de agarose 1% juntamente com concentrações conhecidas de um marcador (vetor SuperScript KS) fabricado pela Invitrogen. Por comparação da intensidade do sinal da amostra e das bandas do marcador, estimou-se a concentração aproximada do DNA.

4.6.3 - Desenho de iniciador degenerado para identificação de genes envolvidos com a auto-incompatibilidade

Com o intuito de investigar a base genética da AI em maracujá azedo foram desenhados oligonucleotídeos degenerados, a partir de sequências conservadas de proteínas determinantes da AI esporofítica (SLG e SRK) de diferentes espécies vegetais descritas na literatura. Para isso, efetuamos a conversão dos aminoácidos para a correspondente sequência em nucleotídeos, visando, posteriormente, a amplificação de tais sequências via PCR. Os iniciadores utilizados para a detecção de genes envolvidos com a AI foram: FW1 [5´ TT (CT) (CT)T TGG CA(AG) (AT)(GC) TT(CT) GA 3´], FW2 [5´ CC(AG) (CT)GA (CT)AC (CT)T(CT) T 3´], FW3 [5´ TA(CT) ATG (AT)(GC)C CGA (AG)TA (CT)GC 3´], FW4 [(AT)(GC)G TGT TGG ATG (CT)TG G(AT) 3´], REV [5´ CC(AG) TTC CAG GCC 3´].

4.6.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para o ensaio de PCR foram utilizados 10 ng de DNA genômico de *P. edulis* Sims e de *Brassica oleracea* como molde. As reações utilizaram tampão para enzima Taq DNA Polimerase (1x concentrado) (MBI Fermentas, Lituânia); 1,5 mM de cloreto de magnésio; 0,2 mM de dNTP, 10 pmoles de cada iniciador, 1 U de

Taq DNA polimerase (MBI Fermentas, Lituânia) e água ultra pura q.s.p 20 µL. As condições de amplificação se procederam durante 40 ciclos, compostos de: 95°C por 45 segundos, 47°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos. As amostras amplificadas foram analisadas por fracionamento em gel de agarose 1 %, e registradas em fotodocumentador *Mini Bis pro* (Bioamerica).

4.6.5 - Purificação do fragmento amplificado

Para a purificação do fragmento obtido *P. edulis* Sims via PCR, foi utilizado o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* fabricado pela Promega. Inicialmente a amostra foi submetida a separação eletroforética em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, sendo a banda de DNA visualizada contra luz UV. Em seguida, a banda de interesse foi recortada do gel e transferida para um tubo de microcentrífuga. A execução do processo de purificação seguiu as instruções fornecidas pelo fabricante. Primeiramente o fragmento de gel contendo a banda de interesse foi pesado e para cada 10 mg de gel foram adicionados 10 µL da solução *membrane binding solution* constituída de acetato de potássio 0,5 M; pH 5,0 e isotiocianato de guanidina 4,5 M. O tubo contendo o gel e a solução foi incubado a 60°C com a finalidade de dissolver completamente o gel. A amostra foi inserida em uma mini-coluna, onde permaneceu por 1 minuto à temperatura ambiente, logo após, a coluna foi centrifugada a 10.000 g por 1 minuto; sendo o volume que passou através da mesma descartado. Posteriormente, foi adicionado a coluna 700 µL da solução *membrane wash solution*, composta por acetato de potássio 10 mM, pH 5,0; etanol 80% e EDTA 16,7 µM, pH 8,0. Em seguida, a coluna foi centrifugada em condições equivalentes a etapa anterior; sendo o volume que passou pela mesma descartado, então, foram adicionados mais 500 µL da solução *membrane wash solution* na coluna. Após esta etapa, a coluna foi mais uma vez centrifugada a 10.000 g por 5 minutos e ao final do processo ela foi transferida para um tubo coletor. À coluna foram adicionados 50 µL de água ultra-pura, e essa foi deixada em contato com a coluna por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esta etapa a coluna foi centrifugada a 10.000 g por 1 minuto, e o material coletado foi

armazenado a - 20°C. Posteriormente, a concentração da amostra foi estimada para a realização dos ensaios seguintes.

4.6.6 - Clonagem do fragmento amplificado no vetor PCR[®]2.1

Para a clonagem do fragmento purificado foi utilizado o vetor PCR[®]2.1, parte constituinte do *kit TA Clone*, fabricado pela Invitrogen (Figura 4); o protocolo utilizado foi fornecido pelo fabricante. A reação de clonagem foi composta por 50 ng do vetor, 1 µL de tampão de ligação 10X, 40 ng do fragmento de DNA purificado, 1 µL de T4 DNA liga se e água ultra-pura q.s.p. 10 µL. A solução foi gentilmente homogeneizada e incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente, antes de ser transferida para banho de gelo. Os vetores ligados ao fragmento foram utilizados posteriormente para ensaio de transformação de células competentes.

4.6.7 - Produção de células competentes de *E. Cali*, linhagem DH 5α via cloreto de rubídio

Para a produção de células competentes foi produzido inicialmente um pré-inóculo constituído por uma colônia fresca de *E. coli* linhagem DH 5α; esta foi inoculada em um tubo contendo 10 mL de meio SOB, o qual foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação moderada de 250 rpm. Posteriormente, foi retirado uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo e adicionado a um erlenmeyer contendo 100 mL de meio SOB. O erlenmeyer foi mantido sob agitação de 250 rpm a uma temperatura de 37°C até atingir densidade ótica de aproximadamente 0,4, as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 600 nm. Ao atingir a densidade desejada a cultura foi transferida para banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspenso em 1/3 do volume inicial da cultura em

solução RF1 composta de acetato de potássio 30 mM pH 7,5; RbCl 100 mM; MnCl₂ 50 mM; CaCl₂ 10 mM; e glicerol 15%; sendo mantido em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, a ressuspensão foi centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e o sedimento de células foi ressuspenso em tampão RF2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15%), na proporção 1/125 do volume original da cultura. As células foram homogeneizadas gentilmente e incubadas em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, alíquotas de 200 µL da solução foram transferidas para tubos de microcentrífugas previamente autoclavados e resfriados. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a - 70°C.

4.6.8 - Transformação de células competentes de *E. coli* com o vetor ligado ao fragmento amplificado

Como passo inicial para a transformação das células competentes, 200 µL das células armazenadas a - 70°C foram descongeladas em banho de gelo. Após esta etapa, a elas foram adicionados 5 µL da reação de clonagem descrita no item 4.5.6; em seguida, a mistura foi homogeneizada gentilmente e então o tubo foi incubado por 15 minutos em banho de gelo. Após esse período, o tubo contendo as células e o vetor foi transferido do gelo para uma temperatura de 42°C por um período de 90 segundos e posteriormente foi retornado ao banho de gelo por mais 10 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados 800 µL de meio SOB e 16 µL de glicose estéril às células e, então, essas foram incubadas a 37°C por 50 minutos. Após esse período de incubação, 50 µL, 100 µL e 150 µL das células foram plaqueadas em três placas de Petri contendo meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL⁻¹) e recobertas com X-gal (2µg). Ao final do plaqueamento as três placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

Após este período, foram obtidas colônias que receberam apenas o vetor sem o fragmento amplificado, estas apresentavam coloração azul; e colônias que receberam o vetor pCR[®]2.1 ligado ao fragmento de interesse, que apresentavam coloração branca. Para a análise das colônias foram utilizadas todas as colônias

brancas e uma colônia azul foi utilizada como controle negativo.

4.6.9 - Identificação dos clones positivos, extração e digestão dos vetores

Com o intuito de confirmar que os clones positivos que possuíam o vetor pCR[®]2.1 contendo o fragmento amplificado, os vetores foram extraídos das células bacterianas e submetidos a uma digestão com enzima de restrição para que ao final do processo fosse liberado o fragmento de interesse. O procedimento teve início com a transferência de uma alíquota de cada um dos inóculos provenientes das colônias positivas (brancas) e uma negativa (azul) para tubos de microcentrífugas distintos, sendo centrifugados, em seguida, a 9 000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e aos sedimentos celulares foram adicionados 300 µL de TENS (Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaOH 0,1 M e SDS 25 mM) e as amostras foram agitadas por 10 segundos para que ocorresse a lise das células. Após a lise celular, 150 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 foram adicionados e novamente as amostras foram agitadas por mais 10 segundos, em seguida as mesmas foram centrifugadas a 13.200 g por 4 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo, e os precipitados foram descartados. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 100% gelado. As amostras foram homogeneizadas gentilmente e incubadas por 1 minuto a temperatura ambiente, sendo centrifugadas posteriormente, seguindo as mesmas condições já descritas acima. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados, lavados com 1 mL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados secos em banho seco a 37°C por um período aproximado de 10 minutos. Após secagem, os precipitados foram ressuspensos em 40 µL de TE contendo RNase A (Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0; EDTA 1 mM e RNase A 20 µg.mL⁻¹) e incubados nesse tampão por 1 hora a 37°C.

Ao final deste procedimento, alíquotas dos precipitados ressuspensos foram submetidas a uma digestão com enzima de restrição *EcoR* I para que o fragmento de interesse fosse liberado do vetor. O procedimento da digestão consistiu na adição de 5 µL da solução contendo os precipitados ressuspensos a

qual continha os vetores pCR[®]2.1 contendo o fragmento inserido, 2 µL de tampão da enzima 10X (Tris-HCl 660 mM, pH 7,6; MgCl₂ 66 mM; DTT 100 mM e ATP 660 µM), 0,29 µL de *EcoRI* 17 u.µL⁻¹ (5u) e água ultrapura q.s.p. 20 µL. As amostras foram homogeneizadas e então incubadas a 37°C por 2 horas. Após esse processo, as mesmas foram analisadas em gel de agarose 1%.

4.6.10 - Sequenciamento dos fragmentos

Para o preparo dos clones para sequenciamento, três clones positivos foram submetidos a procedimentos descritos no item 4.6.9. Posteriormente, a concentração do DNA extraído foi estimada como descrito no item 4.6.2. Para o sequenciamento foram montadas duas reações, uma composta de 10 ng dos vetores e 3,2 pmol do iniciador *reverse* (5´CAGGAAACAGCTATGAC 3´) para o sítio M13 *reverse* do vetor e outra contendo 10 ng dos mesmos vetores e 3,2 pmol do iniciador *forward* (5´ GTAAAACGACGGCCAG 3´) para o sítio M13 *forward* do vetor, para que as fitas pudessem ser sequenciadas separadamente. A reação de amplificação foi preparada com o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) segundo informações fornecidas pelo fabricante. A reação procedeu-se em termociclador, com um aquecimento inicial de 92°C por 3 minutos e, então, foi submetido a 35 ciclos, baseados na seguinte programação: 92°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Ao final dos 35 ciclos programados, as amostras passaram por um período de extensão de 72°C por 30 minutos e, em seguida, foram resfriadas a 4°C, ainda no termociclador.

Após realizada a reação de amplificação, a amostra foi transferida para um tubo de microcentrífuga novo, onde foi adicionado 40 µL de isopropanol 65%, solução foi homogeneizada e mantida por 30 minutos em temperatura ambiente com o intuito de precipitar o DNA. Os tubos contendo as amostras foram então centrifugados por 25 minutos a 12 000 rpm. Ao final deste processo, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram vertidos em papel para eliminar o restante do sobrenadante. Em seguida, os precipitados foram lavados com 200 µL de etanol 60% gelado e centrifugados por 5 minutos a 12 000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e o etanol restante foi eliminado pela

inversão do tubo em papel, seguido de secagem em banho seco 60°C por 10 minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 10 µL de formamida, sendo agitados vigorosamente. Após esta etapa, a solução foi transferida para a placa do sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems), para a determinação da sequência de nucleotídeos.

4.6.11 - Análise das seqüências de nucleotídeos

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta do algoritmo do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/Blast>) e do Clustal (<http://www.expasy.org>).

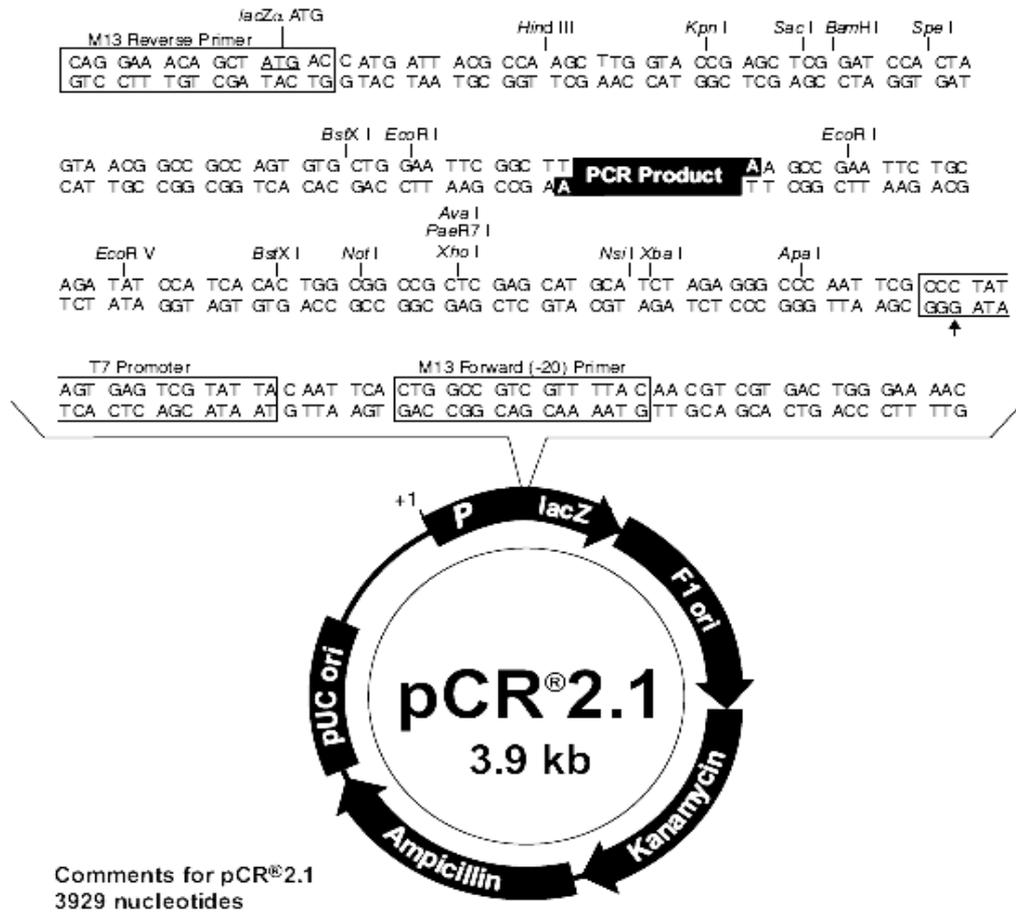


Figura 4. Mapa do sítio de policlonagem do vetor pCR[®]2.1-TA Cloning, mostrando os sítios de enzimas de restrição. Caixas mostram as posições dos sítios M13 *reverse* e *forward*, usados para sequenciar o fragmento clonado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Análise da interação pólen-estigma após polinizações compatíveis e incompatíveis

As interações pólen-estigma em plantas de maracujá azedo foram avaliadas e podemos ter uma visão geral do estigma na presença de grãos de pólen compatíveis, após 1 hora de polinização compatível na Figura 5A, onde se observa o grão de pólen após germinação emitindo o tubo polínico sobre o estigma receptivo. Pode-se também visualizar que, de modo distinto da maioria das espécies, em maracujá, o tecido estigmático não forma papilas; estas definem-se por serem uma extensão da parede de células do estigma e, no presente trabalho, observamos que a projeção do estigma é constituída por várias células independentes. Porém, Souza et al. (2006) definem estas projeções estigmáticas como papilas do tipo multicelular e multiseriada.

Um outro diferencial observado neste estudo, é que o tubo polínico cresce em direção ao ovário dentro das projeções do estigma e não entre elas (Figuras 5 B e 5 C). Contudo, na maioria das espécies descritas, a inserção do tubo polínico ocorre entre as papilas estigmáticas; este fato pode ser visualizado na espécie *Senecio squalidus* L., dentre os eventos ocorridos após polinização (Hiscoch et al., 2002). Nesta espécie, os tubos polínicos compatíveis sempre crescem entre as papilas estigmáticas, penetram no estigma através da região basal da epiderme da papila, onde a cutícula está ausente, não atuando como uma

barreira. Sendo assim, a penetração do tubo polínico no estigma em *Senecio*, se dá fisicamente e não envolve processos enzimáticos para a degradação da cutícula. Segundo Hiscock e Allen (2008), a cutícula exerce importante função no estigma, atuando na proteção contra patógenos, e é a principal barreira para a penetração dos tubos polínicos, embora, aparentemente, seja permeável a água e moléculas grandes, como proteínas. No entanto, esta permeabilidade é que a distingue das demais cutículas presentes em outras células epidérmicas de plantas. Lolle e Cheung (1993), em estudos prévios, demonstraram que mutantes possuidores de cutículas permeáveis em outros órgãos, que não o estigma, permitiam a hidratação e germinação de grãos de pólen até mesmo em folhas.

Em *Ipomoea trifida*, espécie silvestre relacionada a batata doce, a germinação do pólen ocorre poucos minutos após a realização de polinizações compatíveis, sendo possível observar o desenvolvimento do tubo polínico entre 10 e 20 minutos após o cruzamento (Kowyama et al., 2000). Em contraste com esses resultados está a espécie *Casuarina equisetifolia*, a qual, ao contrário da maioria das angiospermas, possui um tempo não usual entre o período de germinação do grão de pólen e a efetuação da fecundação. Este processo pode levar mais de um mês para se concluir (Sogo et al., 2004). Geralmente, nas interações compatíveis, a fertilização acontece entre 24 a 48 horas após a polinização. Contudo, este tempo pode ser ainda menor, em *Elaeis guineensis*, por exemplo; quando estabelecida a interação pólen-estigma, os grãos germinam e o tubo penetra no estigma avançando ao longo do canal do estilete, e após um período entre 18 e 20 horas, já é possível observar os óvulos sendo fertilizados (Tandon et al., 2001).

Em nossos experimentos observamos que a resposta de incompatibilidade no maracujazeiro azedo induz um crescimento reduzido do tubo polínico proveniente de pólen possuidor de genótipo similar ao apresentado pelo pistilo, fato visível após 1 hora de polinização incompatível (Figura 5 D). Essas observações são similares a resultados descritos nas famílias Brassicaceae, Compositae e Convolvulaceae, que apresentam sistema de AI esporofítico, como o maracujazeiro. Uma característica comum de plantas que possuem este tipo de AI é a rápida inibição do tubo polínico incompatível que ocorre na interface pólen-estigma (Nasrallah e Nasrallah, 1993), contudo o tempo de rejeição varia de acordo com a espécie avaliada. Em concordância com estes resultados está a

pesquisa realizada por Hiscock et al. (2002), em ensaios utilizando a espécie *Senecio squalidus*. Os autores constataram que os grãos de pólen incompatíveis, quando hidratados, obtiveram um reduzido crescimento do tubo polínico após germinação. Dados apresentados em *Ipomoea trifida* também mostram uma resposta de AI em um curto espaço de tempo, poucos minutos após a polinização. Esta reação ocorre assim que o pólen entra em contato com a superfície do estigma, após esta fase a germinação é bloqueada (Kowyama et al., 2000).

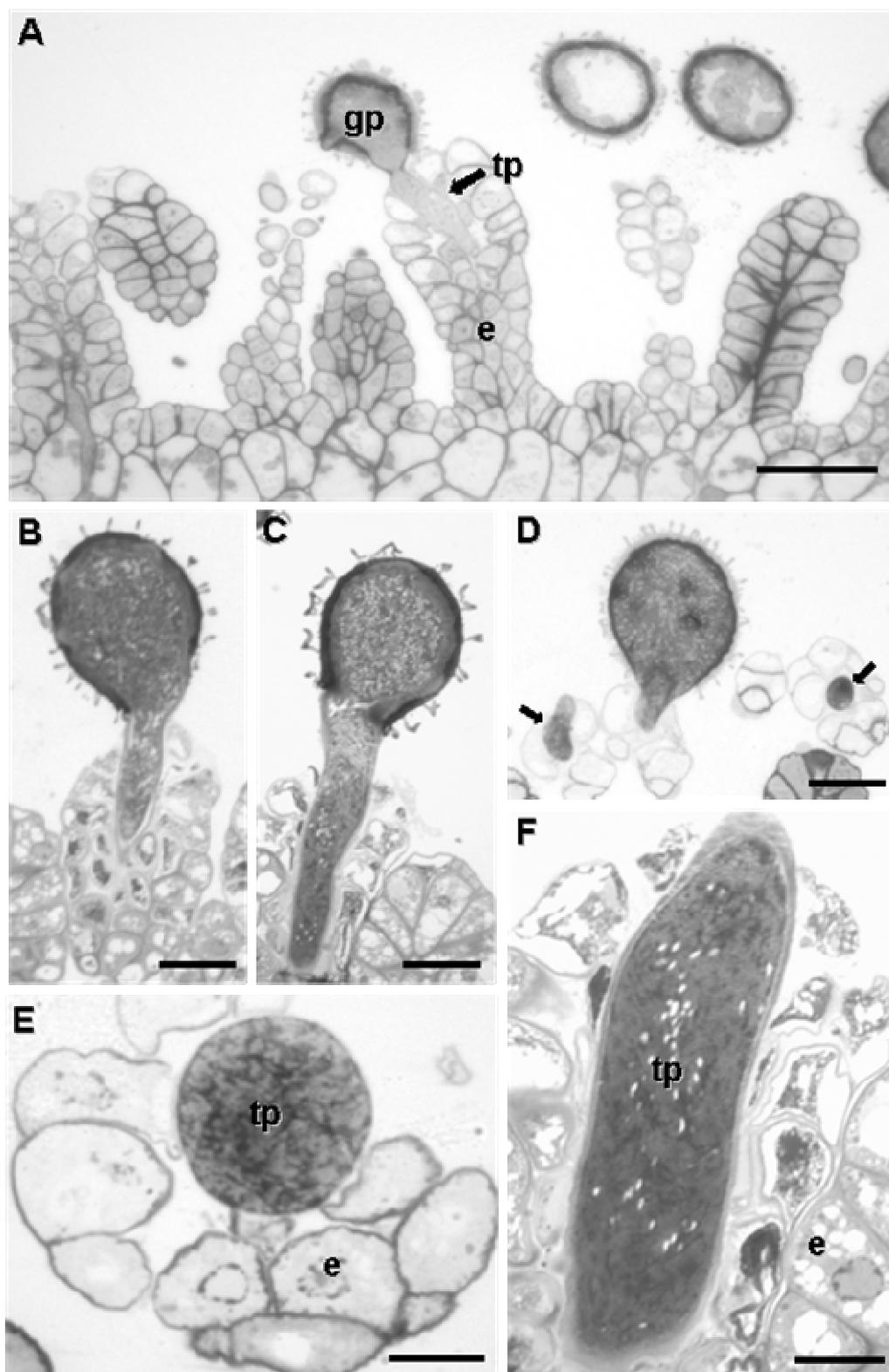
Em *Brassica*, a resposta de incompatibilidade é dada imediatamente e, como consequência, raramente o tubo polínico consegue penetrar no estigma, geralmente a inibição ocorre ainda no estágio de hidratação (Dickinson, 1995). Ainda em concordância com os dados apresentados; em diversas espécies de Rubiaceae, que apresenta AI esporofítica, porém heteromórfica, os tubos polínicos incompatíveis também tiveram o crescimento interrompido ainda na região do estigma (Coelho e Barbosa, 2004; Klein, 2009). Esta rápida reação de AI observada no sistema esporofítico é distinta das espécies possuidoras do sistema de AI gametofítica. Este fato pode ser observado em determinadas espécies presentes na família Solanaceae, onde a rejeição do pólen incompatível ocorre tardiamente. Geralmente, o tubo polínico nestas situações são inibidos ao alcançarem o estilete (Newbiggin et al., 1993).

Um outro exemplo deste tipo de AI pode ser observado em *Chaenomeles japonica*, onde nas interações incompatíveis o crescimento do tubo polínico é retardado e, geralmente, são bloqueados no estilete. Porém, apesar desta espécie ser possuidora do sistema de AI gametofítica, alguns tubos polínicos oriundos de pólenes incompatíveis conseguem alcançar os óvulos e efetuar a fertilização; contudo a viabilidade dos óvulos fecundados é muito baixa (Kaufmane e Rumpunen, 2002). Observações semelhantes foram detectadas em estudos realizados por Sage et al. (2001), que relataram a presença de AI em espécies de *Trillium grandiflorum* e *Trillium erectum*; nestes modelos foi observado que a reação de incompatibilidade era iniciada 10 minutos após a polinização, no início da emissão do tubo polínico. Todavia, em contraste com os resultados descritos para o sistema de incompatibilidade esporofítico, em *Trillium erectum* a reação de AI não é completa e, deste modo, alguns tubos polínicos foram detectados, entrando nos óvulos e efetuando a fertilização. Neste caso, foram observados baixos níveis de formação de sementes.

Extendendo nossas análises, foi possível observar que após um período de interação pólen-estigma, como resposta à reação de incompatibilidade, o tubo polínico desencadeia um processo de desorganização do protoplasma, apresentando-se em formato circular, contrariando o modelo de crescimento normal observado em tubos compatíveis (Figura 5 D). A Figura 5 E revela em maior detalhe a desestruturação na organização celular ocorrida no tubo polínico incompatível. Em contraposição, na Figura 5 F podemos observar um detalhe de um tubo polínico com desenvolvimento normal após 1 hora de polinização compatível.

Geitmann et al. (2000) relataram uma correlação entre alterações no citoesqueleto de tubos polínicos com a reação de AI em *Papaver rhoeas*. Neste estudo os pesquisadores avaliaram o efeito de proteínas provenientes da expressão de genes-S com a actina, um dos componentes do citoesqueleto. Os resultados revelaram que a actina dos tubos polínicos incompatíveis é rapidamente e drasticamente rearranjada durante a resposta de AI, tanto nas análises *in vitro* quanto *in vivo*. Os autores mostraram ainda que a inibição não específica do crescimento dos tubos polínicos, com a adição de compostos químicos, resultam num rearranjo do citoesqueleto distinto daqueles induzidos pela resposta de AI. Corroborando com estas observações, Snowman et al. (2002) relataram que a AI estimula intensas alterações na actina do citoesqueleto do tubo polínico. Este estudo mostrou que o processo de AI estimula uma redução dos níveis de actina. Observações semelhantes foram detectadas por Staiger e Franklin-Tong (2003), contudo os autores diagnosticaram que a reação de incompatibilidade também induzia um processo de despolimerização dos filamentos de actina. Em conjunto, esses dados sugerem fortemente um papel da actina como um alvo para vias de sinalização envolvendo a resposta de AI.

Figura 5: Interação pólen-estigma em maracujá azedo. **A.** Grão de pólen emitindo tubo polínico (indicado pela seta) sobre o estigma 1 hora após polinização compatível. Barra = 50 μm . **B.** Detalhe do tubo polínico penetrando o estigma 1 hora após polinização compatível. Barra = 20 μm . **C.** Como em B, após um período de 2 horas após polinização compatível. Barra = 20 μm . **D.** Seção através de grão de pólen incompatível com tubo polínico apresentando crescimento reduzido. Barra = 30 μm . **E.** Tubo polínico coletado 1 hora após polinização incompatível evidenciando uma desorganização à nível celular. Barra = 10 μm . **F.** Tubo polínico 1 hora após polinização compatível. Barra = 10 μm . Legenda: gp = grão de pólen, tp = tubo polínico, e = estigma.



5.2 - Análise ultraestrutural das interações compatível e incompatível em maracujá azedo

Os resultados da análise de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que as estruturas celulares do tubo polínico compatível permaneceram sem deformações ao penetrarem através das células estigmáticas; 1 hora após realizada a polinização (Figura 6 A). O citoplasma do tubo exibe a presença de várias vesículas em sua extensão. Esta última observação também foi detectada em *Arabidopsis*. Análises verificaram que os grãos de pólen desta espécie, antes de submetidos a interação com o estigma, apresentavam uma distribuição relativamente uniforme das organelas. Contudo, após esta etapa, o pólen inicia um processo de mudanças estruturais que culminará na emissão do tubo, e uma das características mais marcantes deste período é o acúmulo de vesículas (Kandasamy et al., 1994).

A presença de vesículas derivadas do Golgi estão diretamente associadas ao crescimento do tubo, o qual é restrito a região apical, diferente do crescimento da maioria das demais células de plantas. O citoplasma de tubos polínicos na região anterior da zona de crescimento contêm mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e vesículas (Mascarenhas, 1993). Entretanto, na região apical, onde ocorre o crescimento desta estrutura, podemos observar um grande número de vesículas e ausência de organelas (Figura 6 A). As vesículas associadas ao crescimento são derivadas do complexo de Golgi e contêm materiais precursores de parede. Estas fusionam com a membrana celular da zona apical do tubo, contribuindo, deste modo, para o seu crescimento (Mascarenhas, 1993).

Nas interações compatíveis podemos observar, ainda, que as células do estigma não sofreram alterações evidentes após o contato com o grão de pólen, permanecendo túrgidas; e com o citoplasma apresentando organelas bem organizadas, dentre elas podemos evidenciar a presença de mitocôndrias e do complexo de Golgi. Em contraposição, em decorrência da polinização incompatível, após transcorrido o mesmo período de tempo, é possível observar que o tubo polínico desencadeou uma resposta celular drástica. Uma característica evidente foi uma intensa desestruturação celular e do sistema de membrana do tubo, como resposta a AI; outra característica ultraestrutural

observada em decorrência da reação de incompatibilidade, foi o distanciamento do tubo polínico e o estigma, propondo uma provável deposição de calose nas paredes celulares do tubo e do estigma (Figura 6 B).

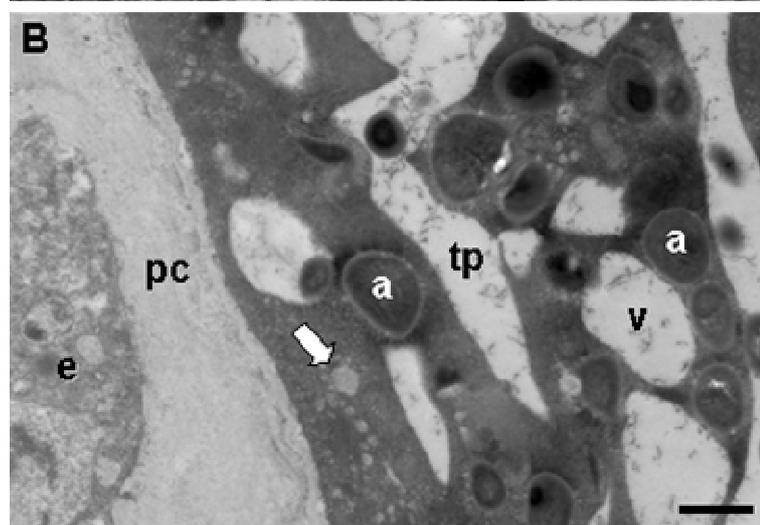
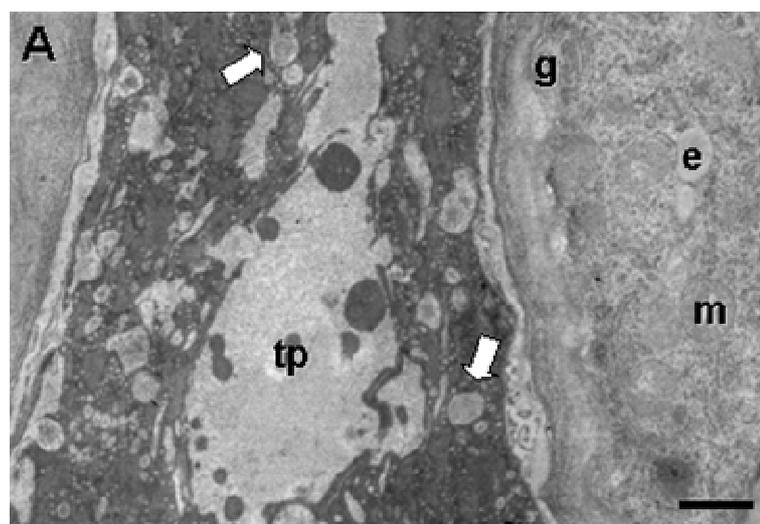
O tubo polínico incompatível apresentou ainda a presença de grandes vacúolos, sugerindo o início de um processo de morte celular. Além disso, é possível observar também a presença de vesículas autofágicas e de amiloplastos apresentando diversos grãos de amido, os quais posteriormente serão provavelmente degradados. As células do estigma que se apresentavam em contato direto com o tubo incompatível apresentaram-se menos túrgidas e com citoplasma desorganizado (Figura 6 B); características não observadas na interação compatível (Figura 6A). O citoplasma do tubo polínico incompatível apresenta-se eletrodense. Estudos realizados por Klein et al. (2009) em *Psychotria nuda* corroboram com observações presentes em nosso trabalho. Em dados apresentados pelo autor, verifica-se uma disposição ultraestrutural diferenciada entre tubos polínicos compatíveis e incompatíveis. Uma das características visualizadas como resposta a reação de AI foi a presença de organelas degradadas na região apical do tubo incompatível, além da presença de diversos vacúolos.

Pesquisas recentes têm sugerido que o processo de morte celular programado pode ser induzido especificamente pela reação de AI, sendo desencadeado pela presença do tubo polínico incompatível. A fragmentação do DNA nuclear é considerado ser um dos eventos posteriores, em resposta a este processo. Esta etapa é detectada apenas algumas horas após a indução da AI (Rudd e Franklin-Tong, 2003). A sugestão do envolvimento da morte celular programada como uma das respostas a reação de incompatibilidade é reforçada por Reape et al. (2008).

Esta capacidade refinada de evitar a auto-polinização entre as plantas possuidoras de sistema de incompatibilidade está associada a mecanismos que interrompem o crescimento dos tubos polínicos, através de interações específicas entre receptores e eliciadores que culminam na ativação de uma cascata intracelular para a destruição do tubo, seja por atividades de RNAses ou pela indução da morte celular programada; indicando uma associação deste sistema com a imunidade inata. Nasrallah (2005) afirma que os eventos relacionados as interações hospedeiro-patógeno são similares a reações de AI. Uma evidência é a

similaridade estrutural entre o determinante da AI masculina e as defensinas, sugerindo uma ligação entre estas moléculas numa escala evolutiva (Sanabria et al., 2008).

Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a zona de contato entre o tubo polínico e o estigma após polinizações compatíveis e incompatíveis. **A.** Interação pólen-estigma 1 hora após a polinização compatível. **B.** Reação de auto-incompatibilidade do tubo polínico 1 hora após a polinização incompatível. Barra = 1 μm . Legenda: tp = tubo polínico, e = estigma, m = mitocôndria, g = complexo de Golgi, a = amido, v = vacúolo, pc = parede celular. As setas indicam a presença de vesículas.



5.3 - Análise comparativa de grãos de pólen de maracujá azedo através de microscopia eletrônica de varredura

Para corroborar com as investigações a respeito das respostas estruturais relacionadas as reações de incompatibilidade em maracujá azedo, empregamos análises comparativas de grãos de pólen antes do processo de polinização e após polinizações compatíveis e incompatíveis, com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 7 A, podemos observar que os grãos de pólen de maracujá azedo que não foram submetidos a interação direta com o estigma, quando maduros, apresentam-se isolados, com aparente forma esférica, com colpos longos; sendo a exina, estrutura mais externa da parede do pólen, heteroreticulada. O retículo apresenta muros sinuosos, altos, formando lúmens grandes com vários báculos em seu interior (Figura 7 B). Após 1 hora de polinização compatível, o pólen apresentou estrutura muito similar àquele evidenciado anteriormente, o qual não foi submetido a interação com células estigmáticas (Figura 7 C-D). Contudo, os grãos de pólen em polinizações incompatíveis, ao permanecerem em contato com o estigma durante o período de 1 hora, apresentaram alterações na sua forma. Como resposta a AI, é possível visualizar a formação de protuberâncias dentre as ornamentações da exina (Figura 7 E-F). Ao todo foram analisados trinta grãos de pólen incompatíveis, e todos apresentaram esta alteração em sua estrutura.

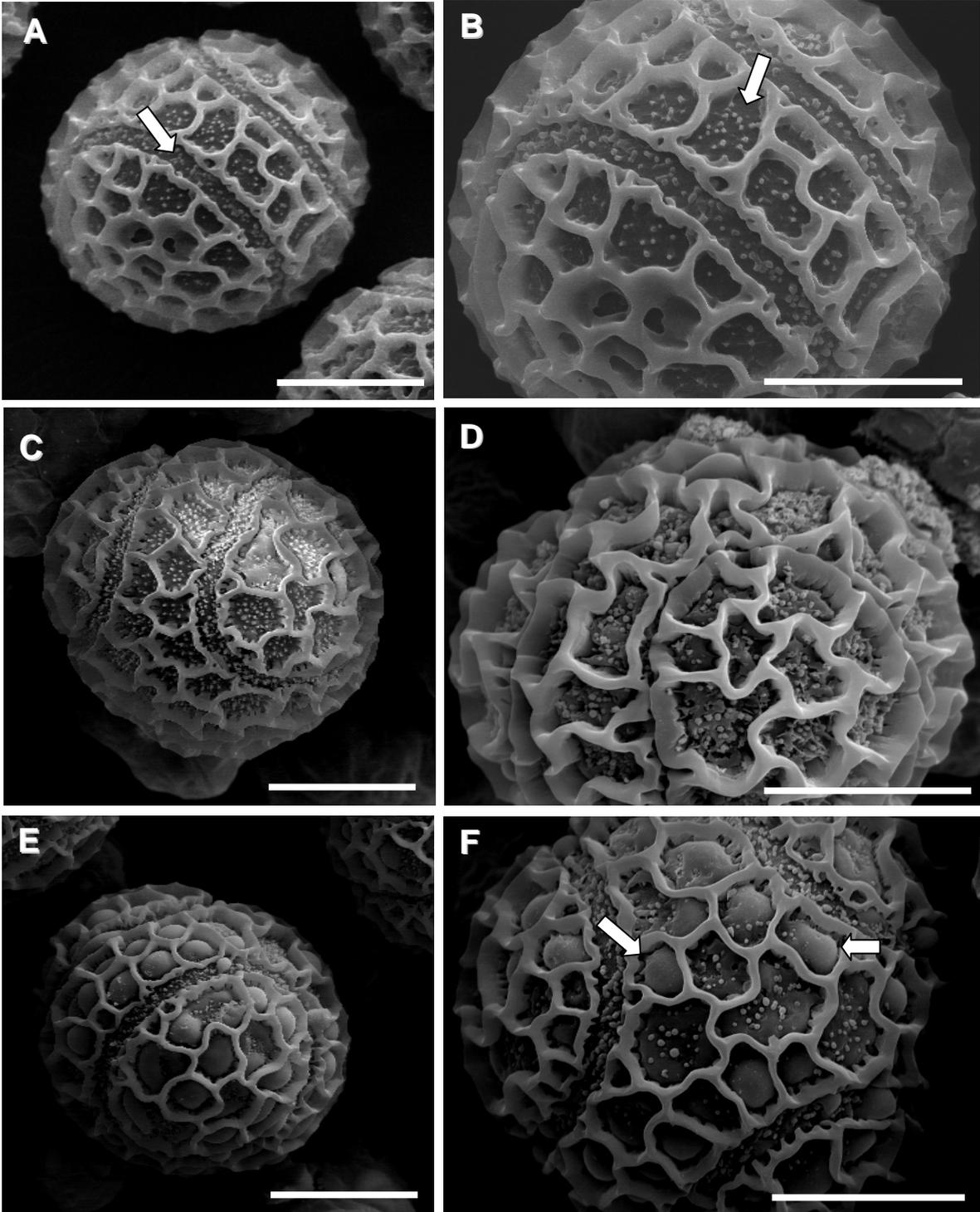
Milward-de-Azevedo et al. (2004), estudando a paliotaxonomia em oito espécies de *Passiflora* do subgênero *Decaloba* presentes no sudeste do Brasil, observaram que, em sua maioria, os grãos de pólen eram de tamanho médios ou grandes, isopolares, prolato-esferoidais, com âmbito circular, e área polar muito pequena. As amostras avaliadas possuíam de 6 a 12 colpos, sendo estes muito longos, com pseudopérculos, endoaberturas alongadas. A exina apresentou-se com forma heteroreticulada. Os resultados referentes a espécie *P. capsularis* apresentaram algumas semelhanças àqueles observados em nossas análises. A vista equatorial do pólen desta espécie exibe uma significativa semelhança com a do maracujá amarelo, fato que não é observado quando comparamos com os grãos de pólen de *P. misera*. Contudo, a vista polar dos grãos de pólen de *P. capsularis* é distinta daquela observada em maracujá azedo. Dados recentes, apresentados por Amorim (2009), em avaliações realizadas no sul da Bahia,

contrastam quanto à morfologia do pólen de *P. capsularis*. A vista equatorial do grão é distinta daquela observada por Milward-de-Azevedo et al. (2004).

García et al. (2002) analisaram a ontogenia e a palinologia de seis espécies de *Passiflora* pertencentes a três subgêneros; *Passiflora*, *Dysosmia* e *Decaloba*. Os resultados encontrados por esses autores evidenciaram que as espécies *P. caerulea*, *P. mooreana*, *P. foetida* e *P. chrysophylla* possuem 6 colpos; resultados concordantes com os observado em nossos estudos. Enquanto a *P. misera* e a *P. suberosa* apresentam 12 colpos. A morfologia dos grãos de pólen de *P. caerulea* e *P. mooreana* é semelhante àqueles avaliados em nossos estudos. A quantidade e disposição dos colpos dessas espécies também se apresentam de forma idêntica. Este nível de semelhanças, provavelmente, está associado ao fato de que estas espécies são do mesmo subgênero, *Passiflora*.

O número de pesquisas de paleontologia de espécies de *Passiflora* ainda são escassos e relacionados a AI são raros. Deste modo, no presente trabalho, toda discussão quanto à análise polínica está associada aos grãos de pólen antes da polinização. Não foram encontrados dados na literatura que relacionasse detalhes da superfície polínica com interações compatíveis e incompatíveis.

Figura 7: Caracterização estrutural dos grãos de pólen de maracujá azedo via microscopia eletrônica de varredura. **A.** Superfície do grão de pólen; a seta indica a localização do colpo. **B.** Detalhe da estrutura da exina; a seta indica a presença de báculos. **C.** Grão de pólen 1 hora após polinização compatível. **D.** Grão de pólen em interação compatível, exibindo detalhes da ornamentação da parede. **E.** Grão de pólen 1 hora após polinização incompatível. **F.** Reação de Al apresentada na superfície do pólen 1 hora após a interação incompatível (indicado pelas setas). Barra = 20 μm .



5.4 - Análises da interação pólen-pistilo de maracujá azedo *in vivo*

As interações pólen-pistilo *in vivo* em maracujá azedo após polinizações compatíveis e incompatíveis foram avaliadas neste estudo. O processo de polinização se inicia na deposição de grãos de pólen na superfície do estigma. Esta etapa pode ser visualizada na Figura 8 A, onde é possível observar detalhes da ornamentação da exina de pólenes de maracujá azedo.

As análises de estigmas submetidos a polinização compatível revelaram que os grãos de pólen que entram em contato com células da superfície estigmática, após 1 hora de interação, são hidratados e germinam emitindo tubos polínicos que penetram o estigma (Figura 8 B). Resultados foram observados em *Senecio squalidus*. Neste modelo, depois de efetuadas polinizações compatíveis os tubos polínicos podem ser vistos claramente penetrando o estigma (Hiscock, 2000). Em nossas análises podemos visualizar que os tubos polínicos subsequentemente se estendem através do tecido de transmissão do estilete. A medida que ocorre este processo tampões de calose são formados ao longo destes. A função dos tampões é isolar as zonas onde o citoplasma é menos ativo daqueles de intensa atividade, além de manter o citoplasma restrito às zonas apicais, já que durante o crescimento dos tubos polínicos não ocorre aumento de massa intracelular (Appizzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro, 2006).

Em análises de imunomarcação realizadas por Ferguson et al. (1998) em *Nicotiana tabacum*, foi observado que a calose é depositada nos grãos de pólen compatíveis após 4 horas de germinação. A síntese deste composto aumenta gradualmente nas primeiras 18 horas. Os autores determinaram ainda que a calose não estava presente em grãos não germinados. No presente estudo, nossos resultados evidenciaram que, depois de 24 horas após a polinização compatível, os tubos alcançam o ovário, onde estão presentes os óvulos, e em seguida estes irão se direcionar ao saco embrionário efetuando a fertilização (Figura 8 C).

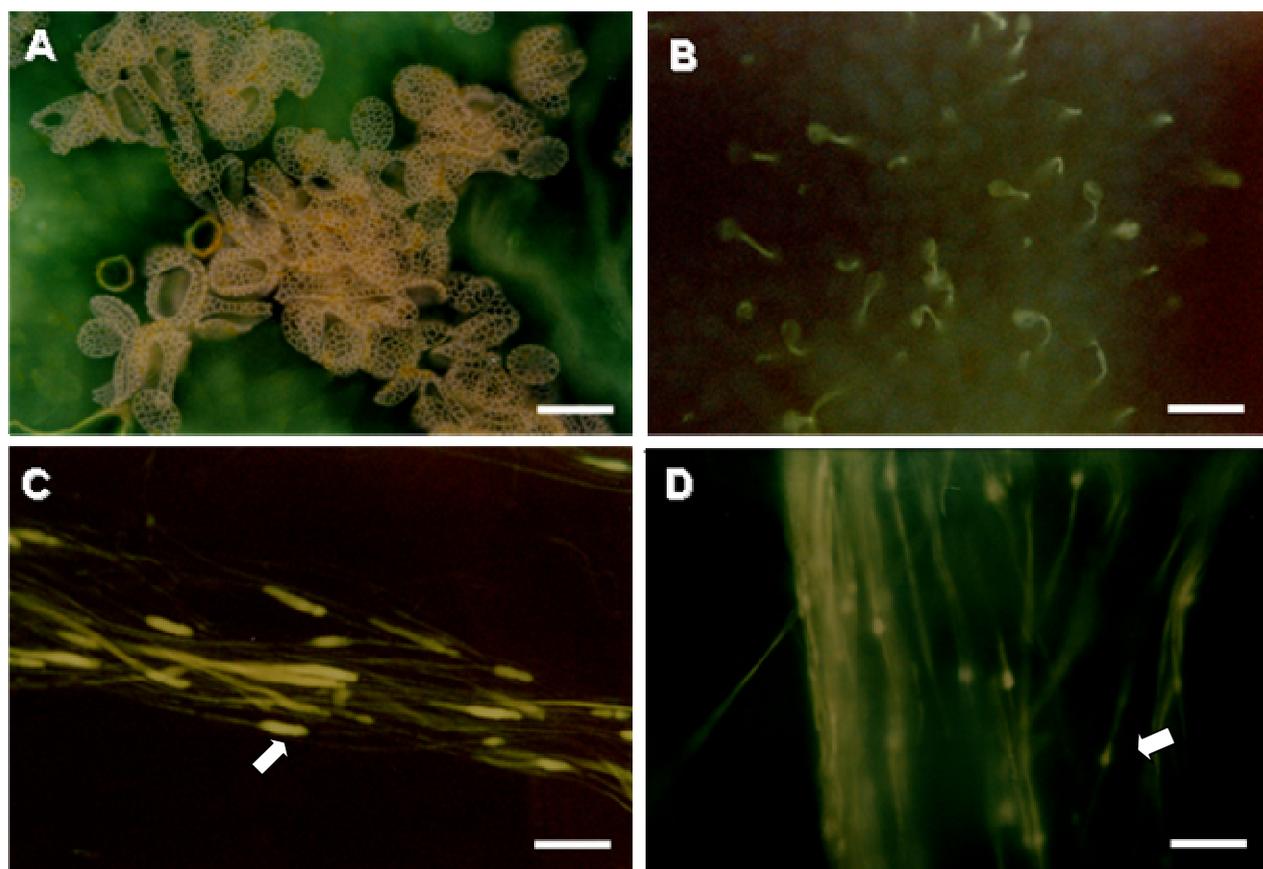
As observações da interação pólen-pistilo revelaram uma correlação entre o estágio de desenvolvimento do pistilo e a rejeição do pólen incompatível. Assim como em outras espécies possuidoras do sistema de auto-incompatibilidade esporofítica, em maracujá amarelo a reação de incompatibilidade está diretamente associada a idade do estigma. Polinizações

realizadas em estigmas 2 dias antes da antese com grãos de pólen maduros e incompatíveis mostraram que estes conseguem penetrar as células estigmáticas e alcançam o estilete seguindo em direção ao ovário (Figura 8 D). Estes resultados sugerem que na maturidade o pistilo produz sinais que são responsáveis pela reação de AI. Deste modo, observamos que é possível realizar polinizações utilizando pólen com mesmo genótipo, desde que o estigma esteja imaturo. Bruckner et al. (1995) realizaram auto-polinizações em botões florais de maracujazeiro amarelo e notificaram a obtenção de 14,8% de frutificação. Essas observações estão de acordo com aquelas já descritas em *Brassica*, Nasrallah e Nasrallah (1993), observaram que estigmas imaturos são incapazes de discriminarem o pólen auto-incompatível daqueles provenientes de cruzamentos. Os autores concluíram que os botões florais são auto-compatíveis e apenas tornam-se auto-incompatíveis 1 dia antes da abertura da flor. Estas evidências geram indícios de que a manipulação dos períodos de desenvolvimento floral permitem a geração e manutenção de homozigotos para o locus S através da polinização em botão.

Um estudo da receptividade de botões florais imaturos foi conduzido por Kandasamy et al. (1994) em plantas de *Arabidopsis* não possuidoras de AI, tendo sido avaliada a receptividade do estigma de acordo com a idade do mesmo. As análises foram efetuadas em botões com 13 estádios de desenvolvimentos distintos. Os dados mostraram que polinizações em botões mais jovens foram mal sucedidas já que pouquíssimos grãos de pólen conseguiram aderir e germinar. Contudo, polinizações em botões florais no período de 1 a 2 dias antes da antese mostraram-se altamente receptivos aos grãos de pólen e os tubos polínicos conseguiram penetrar o estigma com sucesso.

No entanto, ao contrário das avaliações conduzidas em *Brassica* e outras espécies possuidoras do sistema de AI esporofítico, Kowiyama et al. (2000) mostraram que em pesquisas realizadas com *Ipomoea trifida* a reação de incompatibilidade presente nesta espécie não é afetada por tratamentos como altas temperaturas, CO₂, nem pela polinização em fase de botão. Segundo discussão apresentada pelos autores, acredita-se que neste caso as reações de AI observadas não são características genéticas quantitativas, mas sim qualitativas.

Figura 8: Interação pólen-pistilo *in vivo* em maracujá azedo. **A.** Grãos de pólen sobre a superfície estigmática. Barra = 50 μm . **B.** Crescimento de tubos polínicos sobre a superfície estigmática 1 hora após polinização compatível. Barra = 100 μm . **C.** Tubos polínicos presentes no ovário 24 horas após polinização compatível. Barra = 50 μm . **D.** Tubos polínicos se alongando paralelo ao eixo do estilete 12 horas após polinização incompatível sobre estigma imaturo. Barra = 100 μm . As setas evidenciam a presença de tampões de calose.



5.5 - Deposição de calose em resposta a reação de incompatibilidade

A calose está presente geralmente na parede celular e é composta geralmente de β 1,3 glucano, podendo ser detectada por diferentes metodologias. A síntese deste composto pode estar associada a diferentes situações, sendo que uma delas é a reação de incompatibilidade. Em sistemas de AI esporofítica, o reconhecimento do pólen incompatível culmina na rejeição do mesmo, e uma das respostas a este fenômeno inclui a deposição de calose principalmente na zona apical do tubo polínico. No presente trabalho utilizamos a coloração fluorescente de azul de anilina para observarmos a deposição deste polissacarídeo em tubos polínicos em resposta à polinização compatível e incompatível.

Podemos observar que 2 horas após polinização compatível não é possível detectar a presença da calose no tubo polínico emitido pelo pólen possuidor de genótipo distinto ao genótipo do estigma (Figura 9 A). Por outro lado, é visível que o acúmulo de calose ocorre no sítio de rejeição do tubo polínico em fenômenos incompatíveis (Figuras 9 B–9 D). Na Figura 9 B é possível visualizar a deposição deste composto, representado pela coloração verde, no tubo polínico incompatível após 1 hora da polinização. A resposta de AI associada a deposição de calose também foi observada em *Cosmos bipinnatus*; de modo similar as nossas análises, nesta espécie a reação ocorre na superfície do estigma, onde a germinação do tubo polínico incompatível é seguida pela deposição do polissacarídeo no tubo nascente. Contudo, neste modelo, as células das papilas estigmáticas que se encontram em contato direto com o tubo também sintetizam calose (Howlett et al., 1975).

Analogamente, em *Senecio squalidus*, o tubo polínico em reação incompatível teve seu crescimento cessado ao germinar sobre o estigma. A interrupção do crescimento do tubo foi acompanhada pela deposição de calose dentro do tubo polínico e nas células da papila embaixo dos grãos de pólen abortados (Hiscock et al., 2002). De modo distinto, dados apresentados por Kowyama et al. (2000) mostraram que em *Ipomoea trifida*, espécie que também apresenta AI esporofítica, a reação de incompatibilidade estava associada com a deposição de calose apenas nas células da papila estigmática. Em revisão apresentada por Bell (1995), o autor afirma que pólenes em reação incompatível geralmente são incapazes de hidratarem, ou este processo ocorre muito

lentamente. Caso ocorra a germinação, o tubo penetra a cutícula da papila estigmática, induzindo a formação de calose na parede celular do tubo; culminando, assim, numa polinização ineficiente.

Em nossos estudos, encontramos um fato inesperado: dentre as polinizações incompatíveis, um tubo polínico conseguiu crescer em maior extensão, quando comparados aos demais. No entanto, embora tardiamente, uma resposta de auto-incompatibilidade foi emitida e seu crescimento foi cessado pela deposição de calose no mesmo (Figura 9 C). Estudos prévios realizados em *Brassica* demonstraram que a velocidade da resposta de incompatibilidade dentre os membros da espécie é bastante variável. De um modo geral, os tubos polínicos das espécies presentes neste gênero são inibidos no estágio da hidratação, e apenas raramente são observados penetrando o estigma (Dickinson, 1995).

Uma outra característica observada em nossas análises como resposta as polinizações incompatíveis foi a desestruturação na organização celular do tubo polínico, apresentando-se este em forma circular. Neste caso, também é possível detectar a síntese de calose na parede do tubo polínico (Figura 9 D). Estes resultados sugerem uma possível associação entre a deposição de calose e a resposta a expressão dos genes S, que confere a reação de AI. Os resultados obtidos em nossas análises morfológicas estão de acordo com aqueles indicados por Geitmann et al. (1995) ao avaliarem localização de calose em tubos de *Brugmansia suaveolens*, onde os autores afirmam que as principais características observadas no tubo polínico incompatível são o seu crescimento reduzido, um citoplasma aparentemente circular, e a deposição de calose de forma irregular culminando no espessamento da parede interna do tubo polínico. É importante explicitar que a calose sintetizada como resposta a reação de incompatibilidade, exerce função completamente distinta daquela observada durante o crescimento do tubo compatível. No primeiro caso, a deposição ocorre rapidamente ainda na superfície do estigma, como forma de restringir o crescimento do tubo incompatível. Nas interações compatíveis os tampões de calose são formados somente várias horas após a germinação do tubo, quando estes ultrapassaram o estigma e já alcançam o estilete. Neste caso, este composto está associado na elongação do mesmo. Antes disso, não é possível detectar a presença de calose em tubos polínicos compatíveis quando estes se

encontram ainda presente no estigma.

Outros dados presentes na literatura corroboram com os nossos resultados. Análises realizadas por Kerhoas et al. (1983) evidenciaram que no sistema esporofítico de *Raphanus* o fenótipo de rejeição incluiu a deposição de calose no periplasma das papilas do estigma adjacentes ao pólen incompatível, além de haver um acúmulo dessa substância dentro do tubo polínico, especialmente no ápice desta estrutura. Contudo, em polinizações compatíveis, pouca ou nenhuma calose é formada na interação pólen-estigma. Deste modo, os autores afirmam que a produção de calose ocorre como uma resposta a expressão do gene S, uma vez que sua produção é induzida apenas na presença de grão de pólen com genótipo similar ao pistilo. Em discussão apresentada pelos autores, acredita-se que receptores associados a superfície do estigma interagem com sinalizadores que induzem a síntese de calose.

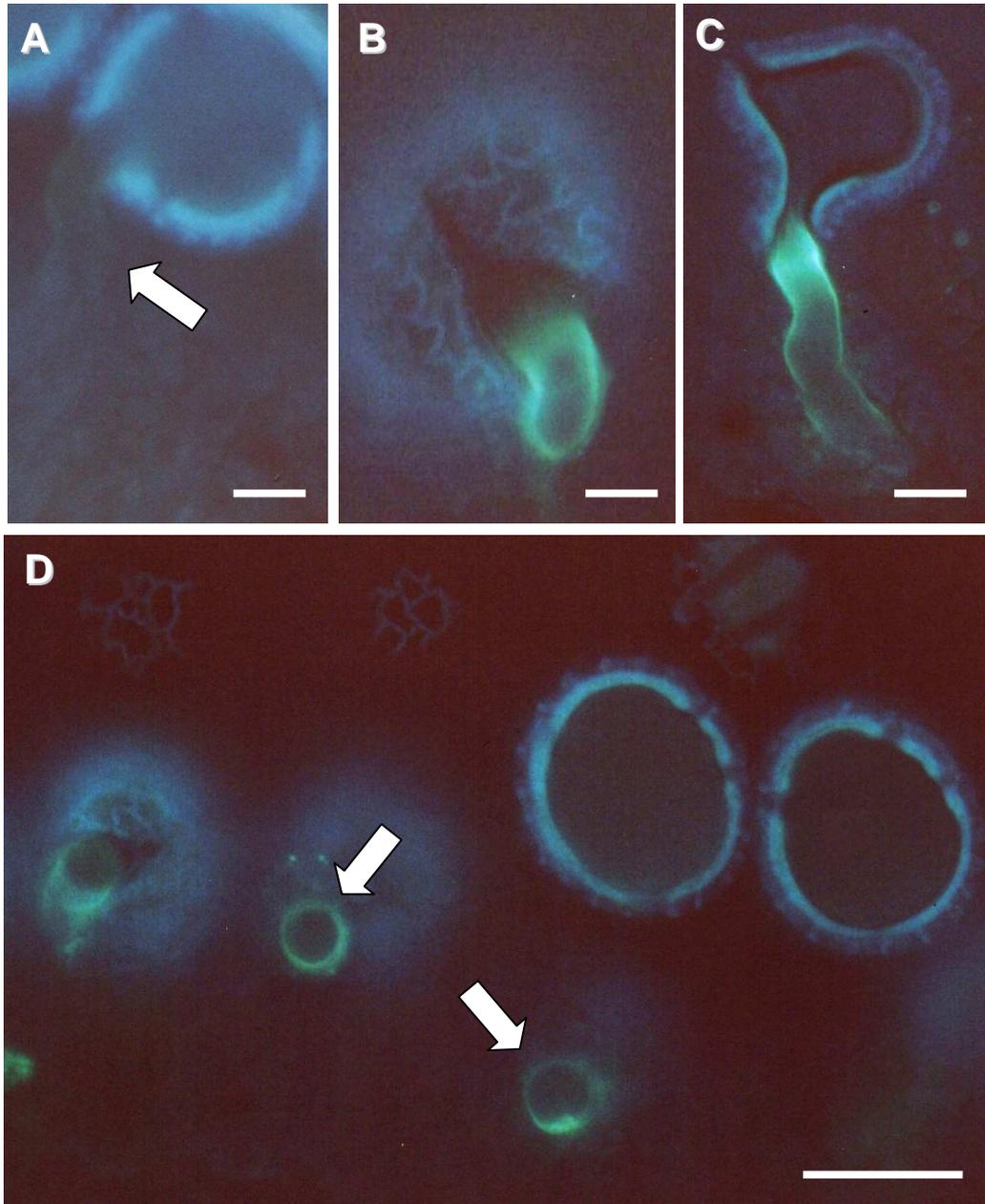
Esta afirmação foi baseada em pesquisas realizadas por Nishio e Hinata (1982), os quais concluíram que tratamentos químicos e físicos responsáveis por reprimir a resposta de incompatibilidade pode ter efeito similar a resposta de calose. Altos níveis de CO₂, por exemplo, pode atuar bloqueando a resposta de incompatibilidade em *Brassica*. Neste caso, foi observado que não ocorreu síntese de calose no grão de pólen incompatível. Outras análises corroboram com esta conclusão, em estigmas tratados com lectina e concavalina A, substâncias que se associam a película presente neste órgão, apresentaram como resultado um bloqueio da resposta de incompatibilidade quando efetuada polinização. Além disso, quando o estigma foi submetido ao tratamento com o detergente Triton X-100, analogamente, também ocorreu à inibição da reação de Al. Em todos os casos apresentados, além do bloqueio da reação, não foi observado a síntese de calose (Dumas et al., 1983). Segundo Harris et al. (1984), a deposição de calose é considerada uma consequência secundária do processo de inibição de crescimento do tubo e não a causa.

O acúmulo de calose também foi observado em outras situações de incompatibilidade. Gaget et al. (1984), ao cruzarem diferentes espécies de *Populus*, constataram que nos cruzamentos incompatíveis a rejeição foi caracterizada pelo inchaço da extremidade do tubo polínico e pela síntese de calose nas paredes dos grãos de pólen rejeitados. Nestas análises, os pesquisadores conseguiram observar ainda que os tubos polínicos provenientes

de cruzamentos incompatíveis que conseguiram alcançar o estilete provocaram a deposição de calose nas paredes do tecido de transmissão das células adjacentes.

O papel da calose na reação de rejeição do tubo incompatível até o presente momento é indefinida (Franklin et al., 1995). Contudo, há uma teoria apresentada por Lewis (1980), a qual defende a idéia onde as interações incompatíveis possuem similaridades com as interações hospedeiro-parasita. O autor explicitou um modelo onde o boro é sequestrado pela calose, fato que ocasiona a deficiência desta substância culminando numa alteração no metabolismo de polifenol. Sendo assim, componentes como a fitoalexina podem ser sintetizados. A fitoalexina é uma substância frequentemente utilizada para inibir o crescimento de tubos polínicos *in vitro*. Além disso, várias análises já indicaram que o boro é uma substância necessária para o desenvolvimento do tubo polínico. Dumas e Knox (1983) acreditam que no sistema de AI a produção de calose seja uma das respostas provenientes da expressão do gene S.

Figura 9: Detecção de calose durante interações pólen-estigma seguindo polinizações incompatíveis. **A.** Grão de pólen compatível emitindo tubo polínico sobre estigma receptivo; a seta indica o tubo polínico na ausência de síntese de calose. Barra = 20 μm . **B.** Grão de pólen exibindo síntese de calose 1 hora após polinização incompatível. Barra = 20 μm . **C.** Reação de auto-incompatibilidade tardia 2 horas após polinização incompatível. Barra = 20 μm . **D.** Detecção de calose em grãos de pólen incompatíveis 1 hora após polinização, com tubos polínicos apresentando protoplasma desestruturado, exibindo formato circular. Barra = 30 μm . As setas indicam os tubos polínicos desestruturados com deposição de calose.



5.6 - Análise molecular do sistema de auto-incompatibilidade em maracujazeiro azedo

Com o objetivo de investigar a base genética da AI em *Passiflora* foram desenhados oligonucleotídeos degenerados, a partir de sequências conservadas de proteínas determinantes da AI esporofítica feminina (SLG e SRK) de espécies descritas na literatura, visando à amplificação de tais sequências via PCR. Várias combinações de iniciadores foram testadas, no entanto, obtivemos uma única amplificação satisfatória exibindo banda intensa. Estes iniciadores foram obtidos de sequências conservadas de genes que codificam a proteína SLG e são descritos a seguir: FW1 [5´ TT (CT) (CT)T TGG CA(AG) (AT)(GC) TT(CT) GA 3´], REV [5´CC(AG) TTC CAG GCC 3´].

Ensaio de amplificação realizados com amostras de DNA genômico de maracujá amarelo, utilizando os iniciadores SLG, revelaram uma banda amplificada de aproximadamente 200 pb (Figura 10). Como controle positivo, foi utilizado nas reações uma amostra do DNA genômico da espécie *Brassica oleracea*, onde foi observada amplificação semelhante. O fragmento resultante da amplificação de iniciadores SLG degenerados utilizando DNA de maracujá amarelo via PCR foi purificado, clonado e, posteriormente, submetido a análises de sequenciamento. Como resultado, observamos uma alta similaridade destas seqüências com genes envolvidos com AI esporofítica de diversas espécies de *Brassica* (Figuras 11 e 12). É possível visualizar em nossas análises várias regiões conservadas, e características físico-químicas muito similares ao comparar a seqüência obtida em nossos resultados com aquelas provenientes de distintas espécies de *Brassica* as quais são possuidoras de mesmo sistema de AI. Contudo, o fragmento obtido em nossos resultados é relativamente pequeno, e este fato dificultou a realização de estudos percentuais relacionados a similaridade destas seqüências, uma vez que a análise estatística do programa leva em consideração toda a seqüência do gene utilizado como referência.

Outro caráter evidenciado em nossa pesquisa foi o fato de as seqüências obtidas apresentarem características comuns tanto com proteínas oriundas da expressão do gene SLG, quanto a proteínas oriundas da expressão de genes SRK. Estes resultados podem ser explicados segundo o fato de que parte da seqüência da proteína SRK é altamente similar a SLG. Juntos, tais resultados

geram indícios de que o sistema de auto-incompatibilidade observado em *Passiflora* contém similaridades com aquele já caracterizado para o gênero *Brassica*.

Durante muitos anos, o gênero *Brassica* tem sido utilizado como modelo para as análises de AI esporofítica. Nessas pesquisas, três genes têm sido associados com o fenótipo de incompatibilidade. O primeiro codifica uma glicoproteína que é secretada dentro da parede celular das papilas, a SLG. O segundo codifica um receptor quinase (SRK), e o terceiro é um determinante masculino, sendo expresso em grãos de pólen (SP11/SCR). A SRK é uma proteína trans-membrana presente na membrana plasmática das células da papila, contudo seu domínio receptor é altamente similar a SLG (Cui et al., 2000). Como já discutido anteriormente, este fato explica o alto nível de homologia das sequências geradas em nossas análises por iniciadores provenientes de regiões conservadas da proteína SLG, com proteínas expressas pelo gene SRK. Atualmente, acredita-se que apenas a SRK seja o determinante feminino responsável pelo reconhecimento e rejeição do pólen incompatível. Esta conclusão foi divulgada por Takasaki et al. (2000) como resultado de suas avaliações utilizando plantas transgênicas de *Brassica rapa*. Os autores observaram que os mutantes que apresentavam deficiência na expressão do gene SRK não eram capazes de rejeitar o pólen incompatível. Por outro lado, os mutantes impossibilitados de expressarem a SLG não perderam a capacidade de discernir entre os pólenes de mesmo genótipo e aqueles provenientes de cruzamentos. Contudo, quando ambos os genes estavam sendo expressos uma resposta de incompatibilidade muito mais forte foi detectada. Deste modo, acredita-se que a SLG seria necessária para potencializar a atividade da SRK na resposta de AI. Outros autores geraram dados que associam a SLG ao processo de adesão pólen-estigma, etapa fundamental para que ocorra o reconhecimento e a discriminação de grãos de pólenes compatíveis e incompatíveis (Luu et al., 1999).

Um outro modelo de AI esporofítica foi descrito em *Ipomoea trifida*. Análises moleculares foram realizadas nesta espécie com a finalidade de avaliar o modelo molecular envolvido no sistema de AI presente desta planta (Kowyama et al., 1996). Para isto, os autores utilizaram uma estratégia semelhante àquela abordada em nossos estudos. Nesta investigação, os pesquisadores utilizaram

amplificação de RNAm extraídos de tecidos estigmáticos, através da técnica de RT-PCR. Assim como em nossos ensaios, os autores utilizaram para a reação iniciadores correspondentes a regiões conservadas de SLG de *Brassica*. Os resultados revelaram quatro fragmentos amplificados. Porém, as sequências de aminoácidos mostraram um baixo grau de similaridade quando comparados a SLG e SRK de *Brassica*. Além disso, os pesquisadores utilizaram uma técnica que permite identificar marcadores moleculares ligados a características fenotípicas e assim associá-las a um locus; como resultado foi observado que a região amplificada não possuía relação genética com o locus S. Como conclusão, os autores sugeriram que apesar de a espécie *Ipomoea trifida* apresentar AI esporofítica, acredita-se que esta família apresente um mecanismo molecular de AI distinto daquele apresentado no gênero *Brassica*.

No presente estudo, tivemos como um dos objetivos averiguar a base molecular que culmina na resposta da AI em maracujazeiro azedo. Contudo, as análises neste âmbito ainda estão em fase inicial, e técnicas que permitam a avaliação da expressão gênica e localização tecidual do transcrito podem vir a corroborar com os nossos estudos iniciais. Além disso, várias metodologias têm sido utilizadas para avaliar a funcionalidade de genes de interesse. Uma das estratégias empregada para estudar o sistema de AI é a utilização de mutantes auto-compatíveis. Esta via facilita a clonagem molecular e ao mesmo tempo a análise funcional dos genes envolvidos com a AI (Nasrallah et al., 2000). No entanto, no sistema esporofítico a obtenção de exemplares auto-compatíveis, geralmente, é proveniente de mutações naturais, ou pela produção de plantas transgênicas. No mecanismo gametofítico, mutantes auto-compatíveis podem ser gerados pela indução de estresses abióticos, tratamentos químicos, ou até mesmo pela indução de ploidias. Este último caso é relatado na espécie *Lycopersicon peruvianum* por Chawla et al. (1997). Nesta pesquisa foi observado que nesta espécie as formas poliplóides são auto-compatíveis, enquanto os diplóides apresentam AI.

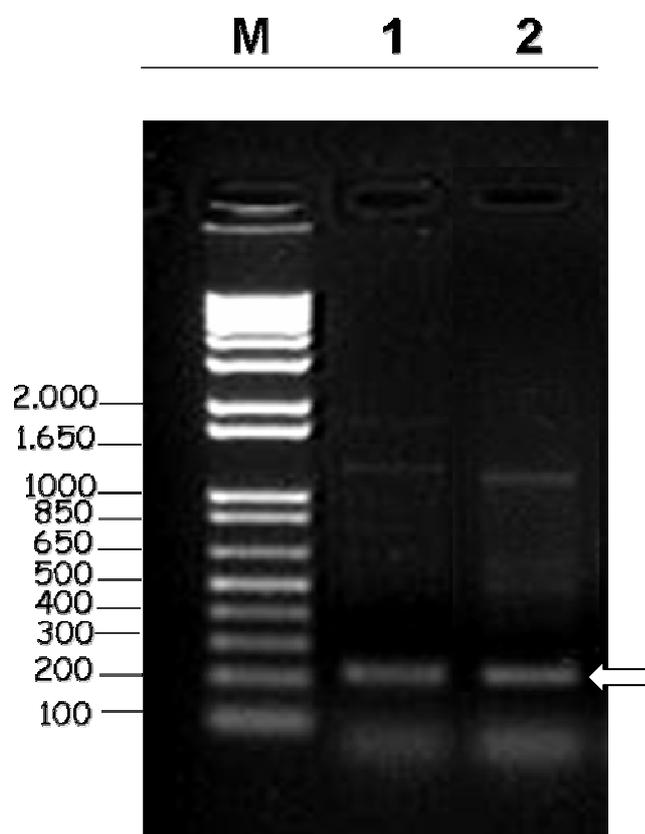


Figura 10: Análise em gel de agarose dos ensaios de amplificação via PCR realizados com amostras de DNA genômico de *Brassica* (1) e *Passiflora* (2), utilizando iniciadores para SLG. M = Marcador molecular.

```

bosrk CTCTGGTTGGTATCTCGGGATATGGTACAAGAAAGTCTCCTACAGAACCTAC----- 216
brsrk TTCTGGTTGGTATCTCGGGATATGGTACAAGAAAGTCTCCTACAGAACCTCC----- 163
bnslg TTCTCCTTGGTATCTCGGGATATGGTACAAGCAACTCTCCGAGAGAACCTAT----- 162
bcslg TTCTCCTTGGTATCTCGGGATATGGTACAAGCAACTCTCCGAGAGAACCTAT----- 162
rssrk TTCTCGTTGGTATCTCGGGATATGGTACAAGAAAATCTCCCGAAGAACCCTAC----- 219
brslg TTCTCGTTGGTATCTCGGGATGTGGTACAAGAAATTGTCCGGCAGAACCTAT----- 3520
cgsrk -----AGAACCTAT----- 9
boslg TTCTCGTTGGTACCTCGGAATATGGTACAAGGAATTGTCCAACAGAACCTAC----- 226
rsslg CTCGCGTTGGTATCTAGGAATATGGTATAAGAAAAACTCCTGGAAATTTTACCCATGGGT 263
bnsrk TTCTCGTTGGTATCTCGGGATATGGTACAAGAAAGTCTACTTCAGAACCTAC----- 342
peslg CTACCAGTTG-AGGTAGACCGCCGTGAATATCAAGTCTGAGAGTTATGTCACTAG----- 100
*

bosrk -GTATGGGTGGCCAACAGAGATAGCCCTCTCTTCAATGCCATTGGAACCCCTCAAAAATCTC 275
brsrk -GTATGGGTGGCCAACAGAGATAGCCCTCTCTTCAATGCCATTGGAACCCCTCAAAAATCTC 222
bnslg -GTATGGGTGGCCAACAGAGATAGCCCTCTCTCCAATGCCATGGGAATCCTCAAAAATCTC 221
bcslg -GTATGGGTGGCCAACAGAGATAGCCCTCTCTCCAATGCCATGGGAATCCTCAAAAATCTC 221
rssrk -GTATGGGTGGCCAACAGAGATAATCCTCTCTCCAGTGCCGTTGGAACCCCTCAAAAATCTC 278
brslg -GTATGGGTGGCCAACCGAGATAACCCTCTCTCCAATTCCATTGGAACCCCTCAAAAATCTC 3579
cgsrk -GCATGGGTGGCCAACAGAGATAACCCTCTCTCCAATTCCATTGGAACCCCTCAAAAATCTC 68
boslg -GTATGGGTGGCCAACAGAGATAACCCTCTTTCCAATTGCATTGGAACCCCTCAAAAATCTC 285
rsslg CGCATGGGTGGCCAACAGAGACAGCCCTCTCTCCAATTCCATTGGAACCCCTCAAAAATCTC 323
bnsrk -GTATGGGTGGCCAACAGAGATAACCCTCTCTCCCGTTCCATTGGAACCCCTCAGAATCTC 401
peslg GGGATGGGTCATCAGCACTGCTC-CAAGCTGTCAAATACCTTT----CCTGTGCGACTCGT 155
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bosrk TGGCAATAATCTTGTTCTCCGAGGCCAATCCAATAAATCTGTTTGGTTCGACCGAT-CTTA 334
brsrk TAGCAATAATCTTGTTCTCCGAGGCCAATCCAATAAATCTGTTTGGTTCGACGAAT-CTTA 281
bnslg TGGCAATAATCTTGTCATCCTTGATCACTCCAATAAATCTGTTTGGTCAACGAAT-CTTA 280
bcslg TGGCAATAATCTTGTCATCCTTGATCACTCCAATAAATCTGTTTGGTCAACGAAT-CTTA 280
rssrk AGGCAATAATCTTGTCCTCCTTGGTGACTCCAATAAATCTGTTTGGTTCGACGAAT-CTGA 337
brslg CAACATGAACCTTGTCCTCCTCGATCACTCTAATAAATCTGTTTGGTTCGACCAAT-CTTA 3638
cgsrk CAACATGAACCTTGTCCTCCTTGATTACTGTAATAAATCTGTTTGGTTCGACGAAT-CTAA 127
boslg CAACATGAACCTTGTCCTCCTGGATCACTCTAATAAATCTGTTTGGTCAACGAAT-CTTA 344
rsslg TGGCAACAATCTTGTCCTGCTATGTCAGTCTAATAAATCTGTTTGGTTCGACAAAT-ATTA 382
bnsrk CAACATGAACCTGGTCCTCCTTGATCACTCTAATAAATCTGTTTGGTTCGACGAAT-CTTA 460
peslg CAGGTTCCATCCCATCCTCATGCCCGGTAACAGTGTATCTGATGGGTGATCGAACGTTTG 215
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 11: Alinhamento da sequência de nucleotídeos obtidos a partir de fragmento amplificado de *Passiflora edulis* Sims (pe) utilizando iniciadores SLG, com sequências de proteínas que conferem o fenótipo de AI em espécies de *Brassica*. *B. rapa* (br), *Capsella glandifolia* (cg), *B. oleracea* (bo), *B. napus* (bn), *B. campestris* (bc), *Raphanus sativus* (rs). SLG = glicoproteína S; SRK = proteína quinase S. (*) Sequência conservada.

```

brslg SVWSTNLTRNVR-SPVVAELLANGNFVVRDP-----SGFLWQSFYPTDTLLPEMKLGY 165
cgsrc SVWSTNLTRGNERSSPVVAELLANGNFLMRDR-----SGVLWQSFYPTDTLLPEMKLGY 90
boslg SVWSTNLTRRNER-SPVVAELFANGNFVMRDS-----SEFLWQSFYPTDTLLPEMKLGY 161
bnslg SVWSTNLTRGNER-SPVVAELLANGNFVMRDSNNNDASGFLWQSFYPTDTLLPEMELGY 168
bcslg SVWSTNLTRGNER-SPVVAELLANGNFVMRDSNNNDASGFLWQSFYPTDTLLPEMKLGY 168
bosrk SVWSTDLTRGNER-FPVVAELLANGNFVIRYSNKNDASGFLWQSFYPTDTLLPEMKLGY 163
brsrk SVWSTNLTRGNER-FPVVAELLANGNFVIRYSNKNDASGFLWQSFYPTDTLLPEMKLGY 145
rssrk SVWSTNLTRGNER-SPVVAELLANGNFVIRYSNNNDASGFLWQSFDFPTDTLLPEMKLGY 164
rsslg TVWSTNITRGNAR-SSVIAELLPNGNFVMRYSDNKDSSGFLWQSFDFPTDTLLPEMKLGY 179
bnsrk SVWSTNLTRGNVS-SPVVAELLPNGNFVMRYSNNDTPSGFLWQSFDFPTDTLLPGMKLGY 174
peslg -----FLWQTFDHPDSTLLPGMRMGW 21
      .***:**.*:***** *.:*:

brslg DLKTGLNRFLVSWRSSDDPSSGDFSYKLDIQRGLPEFYTFKDNTLVHRTGPWNGIRFSGI 225
cgsrc DLKTGRNRFLTSWRSSDDPSSGEFSYKLDNKMGLPEFYLFKDDFRVHRSGPWNGIRFSGI 150
boslg DLKTRNRFLTSWRSSDDPSSGEISYKLDVQRGMPEFFLLDNGFI IHRSGPWNGVQFSGI 221
bnslg DLKTRLNRFLTSWKNSDDPSSGEISYKLDTQRGLPEFYLLKDGRLAQRSGPWNGVKFSGI 228
bcslg DLKTRLNRFLTSWKNSDDPSSGEISYKLDTQRGLPEFYLLKDGRLAQRSGPWNGVKFSGI 228
bosrk DLKTEQNRFLTSWRNSDDPSSGEISYFLDTESGMPEFYLLKSGLRAYRSGPWNGVRFSGI 223
brsrk DLKTEQNRFLTSWRNSDDPSSGEISYFLDTESGMPEFYLLKSGLRAYRSGPWNGVRFSGI 205
rssrk DLKKGLNRFLTSWKNSDDPSSGEISYQLDIQRGMPEFFLLKNGFRGYRSGPWNGVRFNGI 224
rsslg DLETGRNRFLTSWRSYDDPDSGNYTYKLDIRRGLEPEFFVYNDIELYRGGPWNGIEFSGI 239
bnsrk HRKTGRSRFLTSWRSSDDPSSGYFTYELDTRRGLEPEFFVYNDIELYRGGPWNGIEFSGI 234
peslg NLTSRQERYLTAWSSADDPSPDITLRLDIHGGLPQLVVIKGSVKTFRGGPWN----- 74
      . . .*:~:* . ***... : ** . *~~~: : .. * ****

```

Figura 12: Alinhamento da sequência de aminoácido deduzida a partir de fragmento amplificado de *Passiflora edulis* Sims (pe) utilizando iniciadores SLG, com sequências de proteínas que conferem o fenótipo de AI em espécies de *Brassica*. *B. rapa* (br), *Capsella glandifolia* (cg), *B. oleracea* (bo), *B. napus* (bn), *B. campestris* (bc), *Rapahus sativus* (rs). SLG = glicoproteína S; SRK = proteína quinase S. (*) Sequência conservada. (:) Características físico-químicas muito similares. (.) Características físico-químicas pouco similares.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Aspectos estruturais e citoquímicos do estigma e dos grãos de pólen, e detalhes da interação pólen-pistilo após polinização compatível e incompatível foram investigadas em maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims). Nossas observações deixaram evidente que o sítio da resposta de incompatibilidade em *Passiflora* é a superfície do estigma, característica comum em espécies possuidoras de AI esporofítica. Os tubos polínicos presentes em interações incompatíveis apresentam rápida resposta citológica. A reação de incompatibilidade induz um crescimento reduzido do tubo polínico. Este caráter é acompanhado pela desorganização do protoplasma desta estrutura que é verificada em diferentes posições do protoplasma, fato não observado em tubos compatíveis. Análises ultraestruturais revelaram ainda que células do estigma em contato com pólen incompatíveis apresentaram-se desestruturadas. Outro fator registrado foi que a superfície dos grãos de pólen mostram-se diferenciadas após polinizações compatíveis e incompatíveis. O fenótipo de rejeição incluiu ainda a deposição de calose dentro dos tubos polínicos incompatíveis, indicando que a produção deste composto, neste contexto, pode estar associada à expressão de genes envolvidos com a AI. Contudo, o estágio da inibição do desenvolvimento do tubo polínico incompatível apresentou-se variável; embora nenhum deles tenham conseguido ultrapassar a região do estigma. Estudos citológicos indicaram que a capacidade de discriminar entre o pólen da mesma planta e um pólen

proveniente de cruzamentos, neste sistema de AI, é afetado pelo estágio de desenvolvimento do estigma. Estas avaliações mostraram ainda que os tubos polínicos compatíveis de *P. edulis* levam aproximadamente 24 horas para alcançarem o ovário e efetuarem o processo de fertilização. As análises moleculares geraram indícios de que em *P. edulis* há genes com alta similaridade com àqueles envolvidos com AI esporofítica em *Brassica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, P.F., Braz, A.S.K., Torres, L.B., Santana, E.N., Nascimento, A.V.S., Carvalho, M., Otoni, W.C., Zerbini, F.M. (2005) Transgenic passion fruit expressing RNA derived from cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passion fruit woodiness disease. *Fitopatol. Bras.* 30:33-38.
- Akamine, E.K., Girolami, G. (1959) Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. Havai: University of Hawaii (Technical bulletin, 39) 44p.
- Allard, R.W. (1971) *Princípios do melhoramento genético de plantas*. New York: Edgard Blücher Ltda, 381p.
- Amorim, J.S. (2009) *Caracterização citogenética, molecular, morfológica e reprodutiva de Passiflora capsularis Linn e Passiflora rubra Linn*. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Ilhéus – BA, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, 100p.
- Appezato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S. M. (2006) *Anatomia Vegetal*. In: Mariath, J.E.A. Anatomia dos Órgãos Reprodutivos. Viçosa: UFV, 438 p.
- Bell, P.R. (1995) Incompatibility in flowering plants: adaptation of an ancient response. *Plant Cell*, 7:5–16.
- Bernacci, L.C., Soares-Scott, M.D., Junqueira, N.T.V., Passos, I.R.S., Meletti, L.M.M. (2008) *Passiflora edulis* Sims: a maneira taxonômica correta de referir-se ao maracujá-amarelo (e aos de outras cores). *Rev. Bras. Frutic.* 30:566-576.

- Brewbaker, J.L. (1957) Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *J. Heredity*, 48:271-277.
- Bruckner, C.H. (1997) *Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro*. In: Abel, R.S., Bruckner, C.H., Manica, I., Hoffmann, M. Melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia. Porto Alegre: Cinco Continentes, 70p.
- Bruckner, C.H., Casali, V.W.D., Moraes, C.F., Regazzi, A.J., Silva, E.A.M. (1995) Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Hortic.* 370:45-57.
- Bruckner, C.H., Suassuna, T.M.F., Rêgo, M.M., Nunes, E.S. (2005) Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Brasília: EMBRAPA – Cerrados. 677p.
- Brugière, N., Cui, Y., Rothstein, S.J. (2000) Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Trends Plant Sci.* 5:432-438.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C., Gaude, T. (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, 410:220–23.
- Carafa, A.M., Carratu, G. (1997) Stigma treatment with saline solutions: a new method to overcome self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Hortic. Sci.* 72:531-535.
- Chawla, B., Bernatzky, R., Liang, W., Marcotrigiano, M. (1997) Breakdown of self-incompatibility in tetraploid *Lycopersicon peruvianum*: inheritance and expression of S-related proteins. *Theor. Appl. Genet.* 95:992–996.
- Coelho, C.P., Barbosa, A.A.A. (2004) Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta Bot. Bras.* 18: 481-489.
- Cui, Y., Bi, Y., Brugière, N., Arnoldo, M., Rothstein, S.J. (2000) The S locus glycoprotein and the S receptor kinase are sufficient for self-pollen rejection in *Brassica*. *PNAS*, 97:3713-3717.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 250p.

- De Nettancourt, D. (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sex. Plant Reprod.* 10:185-199.
- Degener, O. (1932) *Passiflora edulis*. Flora Hawaiiensis, Honolulu, family 250.
- Doughty, J., Dixon, S., Hiscock, S., Willis, A.C., Parkin, I.A., Dickinson, H.G. (1998) PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *The Plant Cell*, 10:1333-1347.
- Dickinson, H. (1995) Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 8:1-10.
- Dumas, C., Knox, R.B. (1983) Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor Appl Genet.* 67:1-10.
- Dumas, C., Knox, R.B., Gaude, T. (1984) Pollen–pistil recognition: new concepts from electron microscopy and cytochemistry. *Intern. Rev. Cytology*, 90:239–272.
- Entani, T., Takayama, S., Iwano, M. (1999) Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 63:1882-1888.
- Faleiro, F.G, Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Peixoto, J.R. (2008) Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisas 2005-2008. Embrapa cerrados Planaltina-DF.
- Ferguson, C., Teeri, T.T., Siika-aho, M., Read, S.M., Bacic, A. (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 206:452-460.
- Fernandes, A.A., Rêgo, M.M., Bruckner, C.H.; Pereira, K.J.C., Rangel, A.R.P. (1996) Comparação entre técnicas de auto-fecundação em maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*, Curitiba. p.334.
- Franklin-Tong, V.E., Holdaway-Clarke, T.L., Straatman, K.R., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. (2002) Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* 29:333 – 345.

- Franklin, F.C.H., Lawrence, M.J., Franklin-Tong, V. E. (1995) Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Intern. Rev. Cytology* 158:1-64.
- Gaget, M., Said, C., Dumas, C., Knox, R.B. (1984) Pollen-pistil interactions in interspecific crosses of *Populus* (sections aigeiros and leuce): pollen adhesion, hydration and callose responses. *J. Cell Sci.* 72:173-184.
- Gander, E.S., Marcellino, L.H., Zumstein, P. (1996) Biotecnologia para pedestres. Brasília: Embrapa - SPI, 66p.
- García, M.T.A., Galati, B.G., Anton, A.M. (2002) Microsporogenesis, microgametogenesis and pollen morphology of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 139:383-394.
- Geitmann, A., Hudák, J., Vennigerholz, F., Walles, B. (1995) Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens*—Implications for the self-incompatibility reaction. *J. Plant Physiol.* 147:225–235.
- Geitmann, A., Snowman, B. N., Emons, A. M. C., Franklin-Tong, V. E. (2000) Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell.* 12:1239-1252.
- Giranton, J.L., Dumas, C., Cock, J.M., Gaude, T. (2000) The integral membrane S-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:3759–3764.
- Goldman, M.H.S., Goldman, R.B., Mariani, C. (1994) Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO Journal*, 13:2976–2984.
- Haring, V., Gray, J.E., McClure, A. (1990) Self-incompatibility: a self-recognition system in plants. *Science*, 250:937-941.
- Harris, P.J., Anderson, M.A., Bacic, A., Clarke, A.E. (1984). Cell-cell recognition in plants with special reference to the pollen-stigma interaction. *Plant Mol. Cell Biol.* 1:161-203.

- Hasenstein, K.H., Zawada, M.S. (2001) Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao*. *Physiol. Plantarum*, 112:113-118.
- Heslop-Harrison, Y., Shivanna, K.R. (1977) The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41:1233–1258.
- Hiscock, S.J. (2000) Self-incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Ann. Bot.* 85:181-190.
- Hiscock, S.J., Dickinson, H.G. (1993) Unilateral incompatibility within the Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (S)-locus. *Theor. Appl. Genet.* 86:744-753.
- Hiscock, S.J., Allen, A.M. (2008) Diverse cell signalling pathways regulate pollen–stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist*, 179: 286–317.
- Hiscock, S.J., McInnis, S.M. (2003b) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends Plant Sci.* 12:606–613.
- Hiscock, S.J., Hoedemaekers, K., Friedman, W.E., Dickinson, H.G. (2002b) The stigma surface and pollen–stigma interactions in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae) following cross (compatible) and self (incompatible) pollinations. *Int. J. Plant Sci.* 163:1–16.
- Howlett, B.J., Knox, R.B., Paxton, J.H., Heslop-Harrison, J. (1975) Pollen-wall proteins: physicochemical characterization and role in self incompatibility in *Cosmos bipinnatus*. *Proc. R. Soc. Br.* 188:167-182.
- IBGE <http://www.ibge.gov.br>
- ITI TROPICALS. Disponível em: www.passionfruitjuice.com
- Iwano, M., Shiba, H., Funato, M., Shimosato, H., Takayama, S., Isogai, A. (2003) Immunohistochemical studies on translocation of pollen S-haplotype determinant in self-incompatibility of *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.* 44: 428–36.
- Junqueira, K.P., Gelape, F.F., Junqueira, N.T.V., Bellon, G., Ramos, J.D., Braga, M.F., Souza, L.S. (2008) Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero passiflora por meio de marcadores RAPD. *Rev. Bras. Frutic.* 30:191-196.

- Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Bernacci, L.C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. *In*: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Brasília: EMBRAPA – Cerrados. 677p.
- Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E. (1994) Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development*, 120:3405-3418.
- Kaufmane, E., Rumpunen, K. (2002) Pollination, pollen tube growth and fertilization in *Chaenomeles japonica* (Japanese quince). *Scie. Horticulturae* 28:257-271.
- Kerhoas, C., Knox, R.B., Dumas, C. (1983) Specificity of the callose response in stigmas of *Brassica*. *Ann. Bot.* 52:597-602.
- Klein, D.E., Freitas, E.L., Da Cunha, M. (2009) Self-incompatibility in a distylous species of Rubiaceae: is there a single incompatibility response of the morphs? *Sex. Plant Reprod.* 22:121-131.
- Knight Jr., R.J. (1991) Development of tetraploid hybrid passion fruit clones with potencial for the north temperate zone. *Hortscience*, 26:1541-1543.
- Kowyama, Y., Tsuchiya, T., Kakeda, K. (2000) Sporophytic self-incompatibility in *Ipomoea trifida*, a close relative of sweet potato. *Ann. Bot.* 85:191-196.
- Kowyama, Y., Kakeda, K., Kondo, K., Imada, T., Hattori, T. (1996) A Putative Receptor Protein Kinase Gene in *Ipomoea trifida*. *Plant Cell Physiol.* 37:681-685.
- Lee, S.H., Hong, M.Y., KIM, S. (2001) Controlling self-incompatibility by CO₂ gas treatment in *Brassica campestris*: structural alteration of papillae cell and differential gene expression by increased CO₂ gas. *Mol. Cells*, 11:186-191.
- Lewis, D.H. (1980) Boron, lignification and the origin of vascular plants - A unified hypothesis. *New Phytol.* 84:261-270.
- Lima, A.A., Borges, A.L., Cardoso, C.E.L., Barbosa, C.J., Costa, D.C., Santos-Filho, H.P., Fancelli, M., Sanches, N.F. (1999) *A cultura do maracujá*. Brasília: EMBRAPA-SPI, (Coleção Plantar), 107p.

- Lima, A.A., Junqueira, N.T.V., Veras, M.C.M., Cunha, M.A.P. (2002) Tratos culturais. *In: Maracujá produção: aspectos técnicos*. Brasília: EMPRAPA-SCT, (Frutas do Brasil). 103p.
- Lolle, S.J., Cheung, A.Y. (1993) Promiscuous germination and growth of wild-type pollen from *Arabidopsis* and related species on the shoot of the *Arabidopsis* mutant fiddlehead. *Dev. Biol.* 155:250–258.
- Lush, W.M., Spurck, T., Joosten, R. (2000) Pollen tube guidance by the pistil of a Solanaceous plant. *Ann. Bot.* 85:39–47.
- Luu, D.T., Marty-Mazars, D., Trick, M., Dumas, C., Heizmann, P. (1999) Pollen–Stigma Adhesion in Brassica spp. Involves SLG and SLR1 Glycoproteins. *Plant Cell*, 11:251-262.
- Mascarenhas, J.P. (1993) Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell*, 5:1303-1314.
- Meletti, L.M.M., Santos, R.R., Minami, K. (2000) Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do ‘Composto IAC-27’. *Sci. Agric.* 56:491-498.
- Meletti, L.M.M., Soares-Scott, M.D., Bernacci, L.C., Passos, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. (2005) *In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Brasília: EMBRAPA – Cerrados. 677p.
- Melo, N.F., Cervi, A.C., Guerra, M. (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Syst. Evol.* 226:69-84.
- Menezes, J.M.T., Oliveira, J.C., Ruggiero, C., Banzatto, D.A. (1994) Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à "morte prematura de plantas". *Científica*, 22:95-104.
- Milward-de-Azevedo, M.A., Gonçalves-Esteves, V., Baumgratz, J.F.A. (2004) Palinotaxonomia das espécies de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no Sudeste do Brasil. *Rev. bras. Bot.* 27:655-665.
- Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.S., Watanabe, M. (2004) A membrane anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*, 303:1516–1519.
- Muzzurco, M., Sulaman, W., Elina, H., Cock, J.M., Goring, D.R. (2001) Further analysis of the interactions between the *Brassica* S receptor kinase and three

- interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* 45:365–76.
- Nasrallah, J.B. (2000) Cell-cell signaling in the self-incompatibility response. *Current Opinion Plant Biol.* 3:368-373.
- Nasrallah, J.B. (2005) Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility: comparisons to animal histocompatibility *Trends Immunol.* 26:412-418.
- Nasrallah, J.B. Kao, T-H., Chen, C.H., Goldberg, M.L., Nasrallah, M. E. (1987) Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica oleracea*. *Nature*, 326:617–619.
- Nasrallah, J.B. Nasrallah, M.E. (1993) Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell*, 5:1325-1335.
- Nasrallah, J.B. Yu, S.M.; Nasrallah, M.E. (1988) Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: expression, isolation and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5551-5555.
- Nasrallah, M.E., Kandasamy, M.K., Chang, M., Stadler, Z., Lim, S., Nasrallah, J.B. (2000) Identifying genes for pollen-stigma recognition in crucifers. *Ann. Bot.* 85:125-132.
- Newbigin, E., Anderson, M.A., Clarke, E. (1993) Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*, 5:1315-1324.
- Nishio, T., Hinata, K. (1982) Comparative studies on s-glycoproteins purified from different s-genotypes in self-incompatible *Brassica* species - purification and chemical-properties. *Genetics*, 100:641–647.
- Oliveira, J.C., Ferreira, F.R. (1991) *Melhoramento genético do maracujazeiro*. In: São José, A.R., Ferreira, F.R., Vaz, R.L. Cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, 247p.
- Pereira, T., Louro, R., Hoffmann, M. (1996) Análise da biologia reprodutiva de flores sem curvatura de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). Anais do Congresso Nacional de Botânica, Nova Friburgo, p.398.
- Piza Júnior, C.T. (1998) *A cultura do maracujá na região Sudeste do Brasil*. In: Maracujá: do plantio à colheita. Jaboticabal: Funep, 388p.

- Reape, T.J., Molony, E.M., McCabe, P.F. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J. Exp. Bot.* 5:1-10.
- Rêgo, M.M. (1997) Genética, interação pólen-pistilo e expressão de proteínas na auto-incompatibilidade do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims). Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV. 66p.
- Richards, A.J. (1997) *Plant breeding systems*. London : Chapman and Hall, 529p.
- Rudd, J.J., Franklin-Tong, V.E. (2003) Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* 54:141-148.
- Ruggiero, C. (1973) *Estudos sobre a floração e polinização do maracujá amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.)*. Tese (Doutorado em Agronomia) - Jaboticabal, - SP, Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal – FCAV, 92p.
- Ruggiero, C., Lam-Sanchez, A., Miguel, S. (1976) Estudo sobre a fertilidade de grãos de pólen de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.). Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura, Rio de Janeiro, p.515–519.
- Ruggiero, C., Lam-Sanches, A., Lipoli, A.C. (1978) Estudos sobre auto-polinização desenvolvimento do ovário e curvatura dos estiletos em flores de maracujá amarelo *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Deg.). Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura, Salvador, p. 257-264.
- Sage, T.L., Griffin, S.R., Pontieri, V., Drobac, P., Cole, W.W. Barrett, S.C.H. (2001) Stigmatic self-incompatibility and mating patterns in *Trillium grandiflorum* and *Trillium erectum* (Melanthiaceae). *Ann. Bot.* 88:829-841.
- Sanabria, N., Goring, D., Nürnberger, T., Dubery, I. (2008) Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytol.* 178:503–514.
- São José, A.R., Souza, I.V.B., Duarte Filho, J., Leite, M.J.N. (1994) *Formação de mudas de maracujazeiros*. In. São José, A.R. Maracujá produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. 255p.
- Schifino-Wittmann, M.T., Dall’Agnol, M. (2002) Auto-incompatibilidade em plantas. *Ciência Rural*, 32:1083-1090.

- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286:1697–700.
- Silva, M.G.M., Viana, A.P., Gonçalves, G.M., Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G. (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: alternativa de capitalização de ganhos genéticos. *Ciênc. Agrotec.* 33:170-176.
- Silva, N.F., Stone, S.L., Christie, L.N., Sulaman, W., Nazarian, K.A.P. (2001) Expression of the S receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allelespecific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Mol. Gen. Genomics*, 265:552–59.
- Snowman, B.N., Kovar, D.R., Shevchenko, G., Franklin-Tong, V.E., Staiger, C.J. (2002) Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell*, 14:2613–2626.
- Soares-Scott, M.D., Meletti, L.M., Bernacci, L.C., Passos, I.R.S., Fregonezi, J.N., Vanzela, A.L.L., Junqueira, N.T.V., Recco-Pimentel, S.M. (2003) Caracterização cromossômica e identificação de genomas parentais em híbrido interespecífico de *Passiflora*. Anais do Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Maracujazeiro, Campos dos Goytacazes: UENF, p.95.
- Sogo, A., Jaffré, T., Tobe, H. (2004) Pollen-tube growth and fertilization mode in *Gymnostoma* (Casuarinaceae): their characteristics and evolution. *J. Plant Res.* 117:249-251.
- Souza, 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* Sims f. *flavicarpa* Deg. (Passifloraceae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49:93-98.
- Staiger, C.J., Franklin-Tong, V.E. (2003) The actin cytoskeleton is a target of the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* 54:103-113.
- Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8816-8820.

- Stein, J.C., Dixit, R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. (1996) SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to plasma membrane in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 10:429– 445.
- Stone, S.L., Arnoldo, M., Goring, D.R. (1999) A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science*, 286:1729 –1731.
- Suassuna, T.M.F., Bruckner, C.H., Carvalho, C.R., Borém, A. (2003) Self-incompatibility in passion fruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theor. Appl. Gen.* 106:298 - 302.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 403:913–916.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.S. (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:1920–1925.
- Takayama, S., Isogai, A. (2005) Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:467 – 489.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F.S. (2001) Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 413:534 – 538.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 403:913 – 916.
- Tandon, R., Manohara, T.N., Nijalingappa, B.H.M., Shivanna, K.R. (2001) Pollination and Pollen-pistil Interaction in Oil Palm, *Elaeis guineensis*. *Ann. Bot.* 87: 831-838.
- Vanderplank, J. (1996) Passion Flowers. Massachusetts: Press, 224p.
- Vallini, P.C., Ruggiero, C., Lam-Sanches, A., Ferreira, F.R. (1976) Studies on the flowering period of yellow passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. *Acta Hort.* 57:233-236.

- Watanabe, M., Ito, A., Takada, Y., Ninomiya, C., Kakizaki, T. (2000) Highly divergent sequences of the pollen self-incompatibility (S) gene in class-I S haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *FEBS Lett.* 473:139–144.
- Wheeler, M.J., Franklin-Tong, V.E., Franklin, F.C.H. (2001) The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytol.* 151:565–584.