

Cristina Maria Cortez Duarte

**Imunolocalização de proteínas arabinogalactânicas
no pistilo de *Amaranthus hypochondriacus* L.**



**Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2001**

Cristina Maria Cortez Duarte

**Imunolocalização de proteínas arabinogalactânicas
no pistilo de *Amaranthus hypochondriacus* L.**



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Para obtenção do grau de Mestre em Biologia*

**Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2001**

Agradecimentos

À Doutora Sílvia Coimbra, minha orientadora, por toda a ajuda e disponibilidade que manifestou sempre que solicitei o seu apoio. A sua ajuda foi imprescindível no aperfeiçoamento das técnicas utilizadas. Pela leitura atenta da dissertação e pela confiança manifestada que estimulou a realização deste trabalho.

A todos os professores que leccionaram as disciplinas da parte escolar do mestrado pela partilha de conhecimentos.

Aos investigadores e funcionários do grupo de investigação de “Stress em Plantas” do IBMC, pela disponibilidade e simpatia que sempre demonstraram.

À Dona Andreia Costa pela ajuda dada na realização de algumas técnicas e na revelação fotográfica.

Aos colegas do mestrado pelo apoio e solidariedade em todas as situações.

Aos amigos por estarem presentes e pelo incentivo continuado.

À família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional.

Ao Rui pelo estímulo, confiança e apoio dado em todas as horas.

Resumo

O crescimento e direcção do tubo polínico através dos tecidos do pistilo é um processo crítico para a fecundação e portanto para o sucesso da reprodução sexuada. No entanto, os mecanismos subjacentes a este processo ainda não são bem conhecidos. As proteínas arabinogalactânicas (PAGs) são uma família de proteoglicanos altamente glicosiladas e ricas em hidroxiprolina que nos últimos anos têm sido implicadas em inúmeros processos relacionados com o desenvolvimento das plantas, nomeadamente com as interacções pólen-pistilo.

Neste trabalho foi determinada a localização tecidular dos epítomos das PAGs reconhecidos pelos anticorpos monoclonais JIM8, JIM13 e MAC207 no pistilo de *Amaranthus hypochondriacus* L., recorrendo a microscopia óptica de fluorescência. Estes estudos de imunolocalização mostram que os epítomos das PAGs, reconhecidos por estes anticorpos, estão distribuídos em padrões distintos ao longo do pistilo. Uma das observações mais relevantes é a ausência de marcação no tecido de transmissão do estilete com o AcM JIM8, enquanto que os AcM JIM13 e MAC207 estão presentes em praticamente todas as células do estigma, estilete e ovário. Esta ausência pode reflectir diferenças funcionais entre as células do tecido de transmissão e as restantes células do pistilo. No óvulo, verificámos que a presença dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais JIM8 e JIM13 é diferente nos tecidos esporofíticos e no saco embrionário. Ambos os AcM marcam as células do funículo e dos tegumentos, mas no nucelo a marcação é selectiva, estando presente apenas nas células do nucelo micropilar. No saco embrionário as sinérgidas e o respectivo aparelho filiforme aparecem intensamente marcadas. Há também uma intensa marcação na oosfera e na parede de todo o saco embrionário, coincidente com a parede da célula central. A expressão dos epítomos destes dois conjuntos de PAGs parece estar alinhada com a via de crescimento do tubo polínico desde o micrópilo do óvulo até às sinérgidas. Estes resultados são discutidos relacionando-os com as possíveis funções das PAGs na adesão do pólen, crescimento, nutrição e direcção do tubo polínico através dos tecidos do pistilo.

Através de microscopia electrónica de transmissão foi determinada a localização subcelular dos epítomos das PAGs reconhecidos pelos AcM JIM8 e JIM13 nas células de alguns tecidos do pistilo. As observações microscópicas revelaram que os epítomos reconhecidos pelo AcM JIM8 aparecem principalmente associados à membrana plasmática das células e mais esporadicamente a alguns conteúdos celulares.

Relativamente aos epítomos reconhecidos pelo AcM JIM13, verificámos que a sua distribuição é mais ampla. Para além da membrana plasmática os epítomos também aparecem associados, em alguns casos, à parede celular e a vários conteúdos celulares, como por exemplo, aos grãos de amido e ao vacúolo no caso das células do tegumento externo do óvulo e do ovário respectivamente. Estes dados são consistentes com funções das PAGs relacionadas com o desenvolvimento celular e interacção entre as células. A presença em vários conteúdos celulares poderá reflectir um sistema activo de síntese e degradação destas moléculas nestes tecidos. Foi também observada marcação nos tubos polínicos a crescer através do tecido de transmissão do estilete e do nucelo micropilar. Verifica-se que ao atravessar o tecido de transmissão o tubo polínico aparece apenas marcado com o AcM JIM13. Em contraste no nucelo micropilar o tubo aparece fortemente marcado com o AcM JIM8, o que indica funções diferentes para estes conjuntos de PAGs nestes dois tecidos. Outra observação relevante foi a marcação dos elementos traqueais do xilema em diferenciação em que o AcM JIM8 reconhece epítomos presentes nas porções citoplasmáticas em degeneração destas células, enquanto que o AcM JIM13 marca a parede secundária em formação destas células. Estes resultados são discutidos em função da diferenciação celular e da morte celular programada.

Em *A. Hypochondriacus* a abundância das PAGs nos tecidos do pistilo e a sua distribuição selectiva, são a base para considerar que esta classe de proteoglicanos desempenha funções importantes na reprodução sexuada desta planta.

Índice

Abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	9
1.1. Reprodução sexuada nas plantas com flor.....	9
1.1.1. Estrutura geral do pistilo.....	9
1.1.2. Estrutura geral do grão de pólen / tubo polínico.....	13
1.1.3. Crescimento e direcção do tubo polínico.....	16
1.1.3.1. Interações entre o pólen e o estigma.....	17
1.1.3.2. Interações entre o pólen e o estilete.....	19
1.1.3.3. Interações entre o pólen, o ovário e o óvulo.....	22
1.2. Proteínas arabinogalactânicas.....	24
1.2.1. Distribuição e localização.....	24
1.2.2. Estrutura e biossíntese.....	25
1.2.2.1. Núcleo polipeptídico.....	26
1.2.2.2. Porção glicídica.....	30
1.2.3. Ligação com os reagentes de Yariv.....	31
1.2.4. Os anticorpos monoclonais.....	32
1.2.5. Estabilidade e reciclagem.....	33
1.2.6. Funções.....	33
1.3. Objectivos.....	38
2. Material e métodos.....	39
2.1. Material biológico.....	39
2.1.1. Preparação do material biológico.....	39
2.2. Anticorpos.....	40
2.3. Imunolocalização das PAGs.....	40
2.3.1. Em microscopia óptica.....	40
2.3.2. Em microscopia electrónica.....	41
3. Resultados.....	43
3.1. Descrição geral da estrutura do pistilo de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L..	43

3.2. Imunolocalização das PAGs no pistilo, em microscopia óptica.....	45
3.3. Imunolocalização das PAGs no pistilo, em microscopia electrónica.....	62
4. Discussão.....	75
4.1. As PAGs no estigma.....	75
4.2. As PAGs nos tecidos do estilete.....	76
4.2.1. No tecido de transmissão.....	76
4.2.2. No xilema.....	80
4.3. As PAGs no ovário e no óvulo.....	83
5. Conclusões.....	89
6. Bibliografia.....	91

Abreviaturas

A – Amido

AcM – Anticorpo monoclonal

Af - Aparelho filiforme

Ala - Alanina

Ara – Arabinose

Asn - Asparagina

Cc – Célula central

Cys- Cisteína

D-Galp - Galactopirranose

E - Estigma

Ep – Epiderme

Es – Estilete

ET – Elementos traqueais

Fu – Funículo

FITC – Fluoresceína iso-tiocianato

Gal – Galactose

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

GPRH – Glicoproteína rica em hidroxiprolina

Hyp- Hidroxiprolina

IgG - Imunoglobulina

L-Araf – Arabinofuranose

M – Membrana citoplasmática

MEC – Matriz extracelular

MET – Microscópio electrónico de transmissão

Nu – Nucleo

Nm – Nucleo micropilar

O – Óvulo

Oo – Oosfera

Ov – Ovário

p - Papilas

PAG – Proteína arabinogalactânica

PBS – Solução salina tamponada fosfatada

Pc- Parede celular

Pl – Parênquima lacunoso

Pro – Prolina

PRP- Proteína rica em prolina

Ps – Parede secundária

PTLne – Proteínas não específicas de transferência de lípidos

Si – Sinérgida

Se – Saco embrionário

Ser – Serina

TBS – Solução Tris salina tamponada

Te – Tegumento externo

Thr - Treonina

Ti – Tegumento interno

Tp – Tubo polínico

TT – Tecido de transmissão

V - Vacúolo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Reprodução sexuada nas plantas com flor

O ciclo de vida das plantas é caracterizado pela alternância de gerações entre um esporófito diplóide e um gametófito haplóide. O esporófito produz esporos, que se desenvolvem em gametófitos que por sua vez produzem os gâmetas masculinos ou os gâmetas femininos. O gametófito masculino (grão de pólen ou microgametófito) desenvolve-se na antera, enquanto que o gametófito feminino (saco embrionário ou megagametófito) é um produto do óvulo, que se desenvolve no interior do ovário, no pistilo¹. Assim, a reprodução sexuada nas plantas com flor requer o desenvolvimento coordenado de dois dos seus órgãos reprodutores, a antera e o pistilo. É um processo de grande complexidade que depende de interacções altamente específicas entre os grãos de pólen e o pistilo de modo a garantir os processos de polinização e fecundação (Mascarenhas 1993). Para que ocorra a fecundação o tubo polínico tem de localizar, entrar e libertar o seu conteúdo no local exacto do gametófito feminino (Russell 1996). De que modo se dá o direccionamento do tubo polínico desde o estigma até ao saco embrionário? Que fenómenos estão envolvidos neste direccionamento? Estudos recentes identificaram alguns dos componentes que poderão participar em interacções compatíveis pólen-pistilo (para uma revisão ver Cheung 1996, Wilhelmi e Preuss 1997). Os resultados obtidos em alguns destes estudos serão discutidos tendo em vista explorar como é que o pólen e os componentes extracelulares do pistilo podem interactuar e como é que estas interacções extracelulares poderão ser transduzidas nas actividades necessárias ao crescimento e direccionamento do tubo polínico.

1.1.1. Estrutura geral do pistilo

No pistilo maduro considera-se a existência de três zonas estruturais principais: o estigma, o estilete e o ovário (Fig. 1.1). O estigma apresenta uma superfície receptiva, à qual os grãos de pólen aderem e que fornece condições para os grãos de pólen

¹As partes femininas de uma flor são designadas por gineceu, o qual é constituído por uma ou mais folhas carpelares. O termo pistilo também é utilizado para descrever a porção feminina da flor e refere-se a um único carpelo num gineceu apocárpico (pistilo simples) ou a todo o gineceu de um gineceu sincárpico (pistilo composto) - para uma revisão ver Esau 1977. No caso particular de *Amaranthus hypochondriacus* a designação pistilo será utilizada para referir um carpelo num gineceu apocárpico.

compatíveis germinarem (Cresti et al. 1992, Cheung 1995). A morfologia do estigma maduro é muito diversa. Distinguem-se duas categorias principais de estigmas, uns que secretam fluídos em abundância, os estigmas húmidos, e outros com baixa produção de secreções, os estigmas secos. Os estigmas húmidos apresentam uma superfície receptiva com papilas pequenas ou médias, ou sem papilas. As células estigmáticas são glandulares e na maturidade secretam um exsudado que cobre completamente a superfície. A composição do exsudado é muito variável entre as espécies. Geralmente contém substâncias lipofílicas e polissacarídeos, mas também podem ser encontrados outros componentes, alguns dos quais são, por vezes, adicionados ao exsudado, como resultado da degeneração das células estigmáticas. Os estigmas secos podem ser subdivididos em estigmas com superfícies sem papilas e com papilas e estas podem ser unicelulares ou pluricelulares. A superfície estigmática seca tem uma cutícula coberta com uma membrana que consiste numa película extracelular proteica hidratada proveniente das células estigmáticas (Cresti et al. 1992).

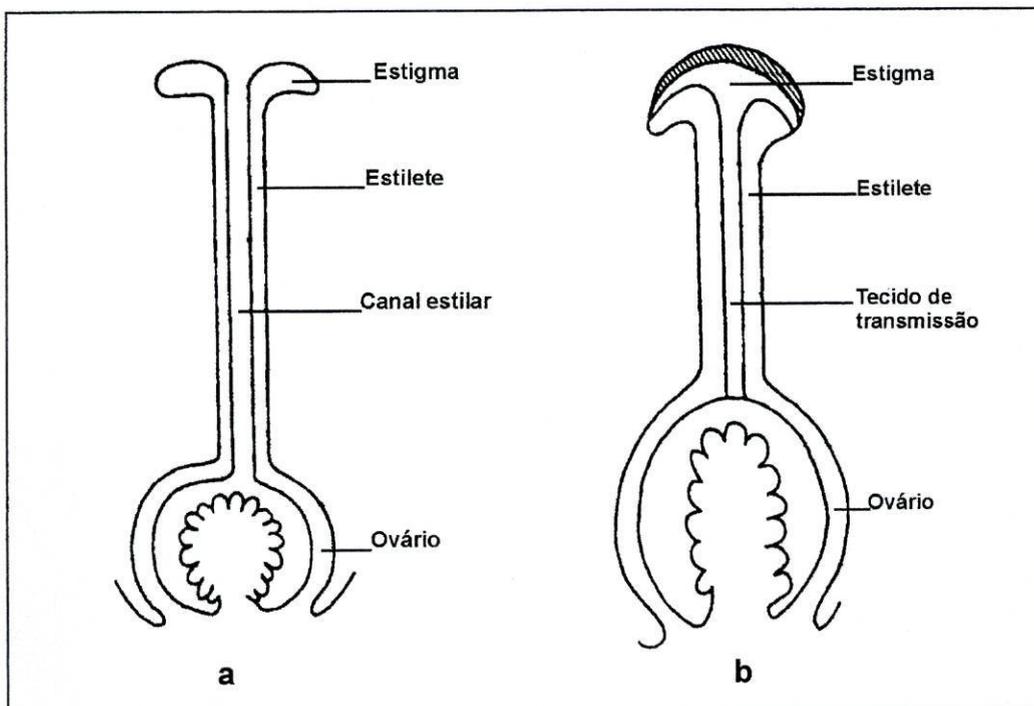


Fig. 1.1 – Esquemas ilustrativos da estrutura geral do pistilo. O pistilo é constituído por três partes distintas, o estigma, o ovário com os óvulos no seu interior, e o estilete a separar as duas primeiras estruturas. **a.** pistilo com estigma seco e estilete oco; **b.** pistilo com estigma húmido e estilete sólido com tecido de transmissão (adaptado de Cresti et al. 1992).

A ligar o estigma ao ovário encontra-se o estilete, estrutura através da qual os tubos polínicos crescem até chegar aos óvulos (Esau 1977). Em geral distinguem-se dois tipos principais de estiletos: os abertos ou ocos e os sólidos. Os estiletos ocos, contêm um canal revestido por uma epiderme glandular cujas células são ricas em organelos. Com frequência, as paredes celulares das células que revestem o canal apresentam extensões, semelhantes àquelas das células de transferência. Estas células secretam um exsudado líquido que enche o canal durante a maturação. O exsudado líquido fornece o substrato para o crescimento dos tubos polínicos através do canal. Os estiletos sólidos têm tecido de transmissão, que serve de via de crescimento para os tubos polínicos. O tecido de transmissão é constituído por células alongadas em que as paredes longitudinais ou têm uma camada espessada de parede primária, ou um espessamento da lamela mediana, ou uma substância intercelular adicional que é depositada entre as células. É através destes compartimentos extracelulares que os tubos polínicos crescem em direcção ao ovário. As paredes transversais entre as células são geralmente muito finas e apresentam um grande número de plasmodésmios (Cresti et al. 1992, Gasser e Robinson-Beers 1993). As secreções produzidas pelas células do tecido de transmissão são frequentemente descritas como uma mucilagem ou um fluído em que estão presentes vários compostos. Em geral estes incluem açúcares, aminoácidos, polipeptídeos, compostos fenólicos, ácidos gordos, glicoproteínas e polissacarídeos (Sanders e Lord 1992).

No ovário podemos considerar uma parede e um ou vários lóculos onde se encontram os óvulos. Estes últimos são estruturas especializadas, derivadas da parede do ovário, constituídos por três zonas básicas: o nucelo, um ou dois tegumentos e o funículo (Fig. 1.2a). O nucelo é um tecido multicelular esporogénico, localizado na extremidade de um pedúnculo, o funículo. Este tecido é envolvido por um ou dois tegumentos deixando uma pequena entrada, o micrópilo, através da qual o tubo polínico pode passar. A região oposta ao micrópilo é a zona da calaza, onde os tegumentos se unem. O óvulo pode tornar-se curvado ou invertido durante o desenvolvimento. No arranjo mais comum, o óvulo é completamente invertido, de tal modo que o micrópilo está posicionado próximo da placenta, havendo uma rotação de 180°. Este óvulo designa-se anátropo (Cresti et al. 1992).

No óvulo, mais concretamente no nucelo, uma única célula diferencia-se num megasporócito que vai sofrer meiose. Dos quatro megasporos resultantes, um ou mais desenvolvem-se no saco embrionário (Gasser e Robinson-Beers 1993). O saco embrionário maduro (Fig. 1.2b) geralmente contém sete células: a oosfera, no polo

micropilar, duas sinérgidas junto da oosfera, a célula central no centro do saco embrionário e três antípodas, no polo calázico (Cresti et al. 1992, Reiser e Fischer 1993). Pode-se considerar o óvulo como um conjunto de células esporofíticas diplóides que rodeiam fisicamente o gametófito feminino haplóide.

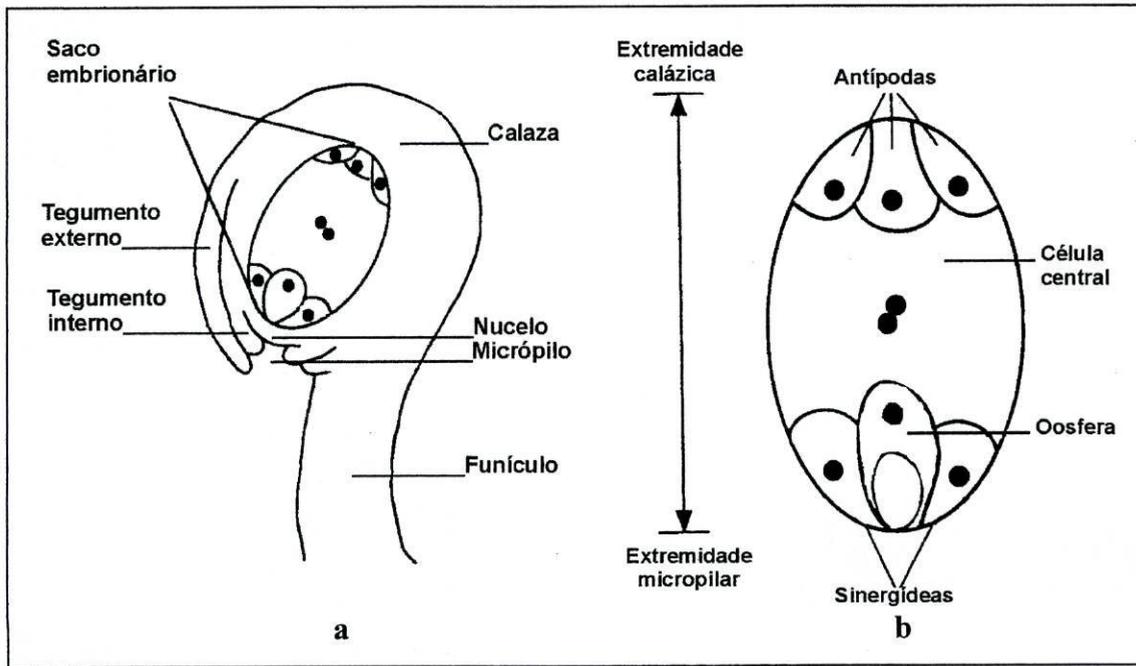


Fig. 1.2 – a. Esquema ilustrativo de um óvulo anátropo, onde se distingue as suas estruturas constituintes: o nucelo, os tegumentos e o funículo. Observa-se o micrópilo, abertura através da qual passa o tubo polínico, a calaza, zona oposta ao micrópilo e na zona central do óvulo o saco embrionário do tipo *Polygonum* contendo sete células ou oito núcleos. b. Organização do saco embrionário; a oosfera e as sinérgidas estão localizadas na extremidade micropilar, onde o tubo polínico entra no saco embrionário; três antípodas estão localizadas na extremidade calázica; na zona média observamos os dois núcleos da célula central (adaptado de Reiser e Fischer 1993).

Na espécie *Amaranthus hypochondriacus* o pistilo é formado por um estigma trilobado, um estilete muito curto e um ovário com um único óvulo no seu interior. Os estigmas estão cobertos por papilas multicelulares e unisseriadas, que apresentam a sua superfície seca na maturidade. Os três lobos estigmáticos unem-se num estilete do tipo sólido. Este é constituído por uma epiderme, por parênquima lacunoso e por uma zona central de tecido de transmissão. As células do tecido de transmissão são poliédricas com pequenos espaços intercelulares, preenchidos por uma substância de natureza não determinada. A cavidade unilocular do ovário contém um único óvulo ligado à placenta por um largo funículo. O óvulo é crassinucelado e anátropo. É constituído pelo nucelo e

por dois tegumentos bem desenvolvidos que o rodeiam. No óvulo a partir de uma célula do nucelo, o megasporócito, desenvolve-se num saco embrionário monospórico do tipo *Polygonum* (Coimbra 1998).

1.1.2. Estrutura geral do pólen / tubo polínico

O grão de pólen desenvolve-se na antera, por divisão mitótica dos micrósporos haplóides (Bedinger 1992). Na maturidade contém os produtos da expressão dos genes da geração esporofítica, provenientes da parede da antera, mais concretamente do tapete, e os da geração gametofítica, representada pelos núcleos vegetativo e germinativo (Taylor e Hepler 1997). A célula germinativa acabará por se dividir dando origem a dois gâmetas. No caso das espécies de plantas com pólen bicelular esta divisão ocorre após a germinação do grão de pólen, enquanto que nas plantas com grãos de pólen tricolulares esta divisão ocorre durante a maturação do pólen (Cresti et al. 1992).

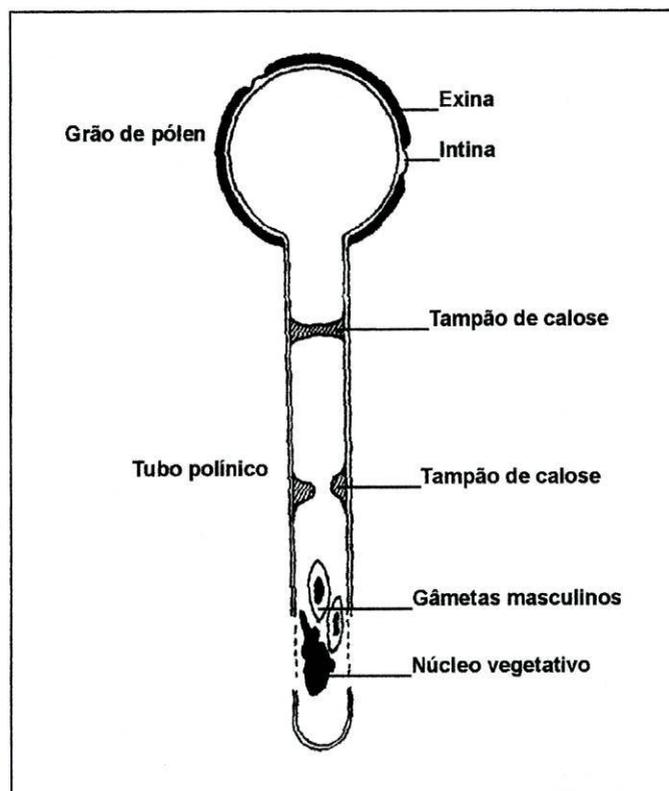


Fig. 1.3 – Esquema ilustrativo de um grão de pólen germinado. O grão de pólen germina num tubo polínico que transporta os dois gâmetas masculinos e o núcleo vegetativo até ao megagametófito. Tampões de calose separam as porções mais velhas do tubo da extremidade em crescimento (adaptado de Cresti et al. 1992).

Os grãos de pólen maduros estão bem protegidos e completamente equipados para completar a sua função como transportadores dos gâmetas masculinos. A parede do grão de pólen maduro é composta por uma camada externa pigmentar de esporopolenina sintetizada e secretada pela antera, a exina, e uma camada interna polissacarídica, a intina (Fig. 1.3). A estrutura interna e a morfologia da superfície da exina é altamente variável e específica. A forma está relacionada com o modo de dispersão do pólen, entre outros factores. Na polinização pelo vento, a espessura, o padrão superficial e a adesividade da exina são geralmente reduzidos. Em plantas polinizadas bioticamente a exina é geralmente elaborada e os grãos de pólen são muito pegajosos, permitindo que adiram uns aos outros, ao vector e à superfície estigmática (Cresti et al. 1992). Ao longo da superfície da exina estão embebidos lípidos e proteínas que constituem uma camada designada trifina. Na altura da deiscência o grão de pólen acumula grãos de amido e desidrata, reduzindo o seu conteúdo em água para aproximadamente metade (Bedinger 1992).

Após a maturação e deiscência da antera, os grãos de pólen são transportados até ao estigma, onde passam por uma série de reorganizações ao nível celular e morfológico. O RNA, as proteínas e outras moléculas armazenadas permitem a rápida germinação e crescimento de um tubo polínico através da extrusão polarizada dos conteúdos citoplasmáticos da célula vegetativa. Esta célula apresenta um crescimento extremamente rápido, sendo este crescimento restrito exclusivamente à extremidade do tubo polínico, isto é, trata-se de um crescimento apical.

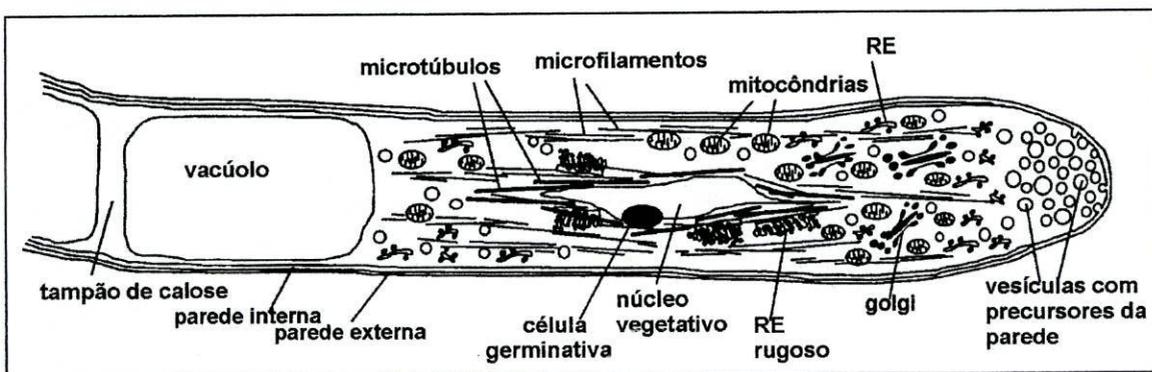


Fig. 1.4 – Representação esquemática de um tubo polínico. Consideram-se os componentes e características que geralmente estão presentes no ápice em crescimento dos tubos polínicos (adaptado de Franklin-Tong 1999).

À medida que o tubo polínico alonga, o citoplasma, o núcleo vegetativo (que activamente transcreve mensagens necessárias ao processo de crescimento) e os gâmetas (com núcleos condensados e inactivos) são transportados no ápice do tubo (Fig. 1.3) utilizando para isso redes de actina e miosina (Bedinger 1992, Cresti et al. 1992, Mascarenhas 1993). Este alongamento implica a deposição contínua, no ápice, de materiais da parede e da membrana, materiais esses que são transportados através de vesículas secretoras derivadas do Golgi (Mascarenhas 1993). Na figura 1.4 está representada a estrutura básica de um tubo polínico. Os tubos polínicos apresentam zonas citológicas distintas. O citoplasma do tubo polínico na região anterior ao ápice tem grande quantidade de mitocôndrias, dictiosomas, retículo endoplasmático, componentes do citoesqueleto e algumas vesículas. Inversamente a região apical contém um grande número de vesículas e uma ausência de outros organelos. As estruturas citoplasmáticas parecem estar alinhadas paralelamente ao eixo maior do tubo excepto no ápice onde estão mais distribuídos ao acaso. O volume do tubo polínico permanece relativamente constante devido à deposição periódica de tampões de calose atrás da região citosólica do tubo (Wilhelmi e Preuss 1997, Franklin-Tong 1999) que selam completamente a porção mais recente do tubo, podendo ocorrer a fecundação mesmo que o grão de pólen e as porções mais antigas do tubo sejam excisadas (Jauh e Lord 1995). A parede do tubo é constituída por uma camada fibrilar externa maioritariamente composta por pectina, hemicelulose e celulose e uma camada mais interna de calose (Mascarenhas 1993). Esta última camada está ausente na extremidade do tubo.

O cálcio desempenha um papel fundamental no crescimento dos tubos polínicos. Estudos recentes revelaram a existência de um gradiente de concentração de cálcio citosólico na extremidade do tubo polínico, na zona designada domínio apical, gradiente esse crítico não só para o crescimento do tubo, como também para a sua orientação (Pierson et al. 1994, Malhó e Trewavas 1996, Pierson et al. 1996). Alterações do crescimento do tubo polínico correlacionam-se com oscilações neste gradiente de cálcio e ao eliminar-se este gradiente o crescimento pára. Este gradiente resulta do influxo localizado de cálcio que é mantido por uma actividade assimétrica dos canais de cálcio existentes na membrana plasmática na zona do domínio apical do tubo polínico.

1.1.3. Crescimento e direcionamento do tubo polínico

Após a formação do tubo polínico este fica em contacto íntimo com a matriz extracelular do pistilo. Começa por penetrar através das camadas de células estigmáticas e posteriormente no estilete, chegando eventualmente ao ovário (Fig. 1.5). Entra no micrópilo do óvulo, penetra numa das sinérgidas do saco embrionário e aí liberta os gâmetas masculinos onde um se funde com a oosfera e outro com a célula central para formar, respectivamente, o zigoto diplóide e o endosperma triplóide (Cresti et al. 1992, Faure et al. 1996, Taylor e Hepler 1997).

Desde muito cedo que se pode considerar a existência de uma tendência direccional no processo de crescimento do tubo polínico, isto é, o crescimento do tubo polínico é direccionado do estigma para os óvulos, e ocorre inteiramente na matriz extracelular dos tecidos do pistilo até chegar ao saco embrionário onde penetra numa das sinérgidas (Lord e Sanders 1992, Cheung 1995, Cheung 1996, Park et al. 2000).

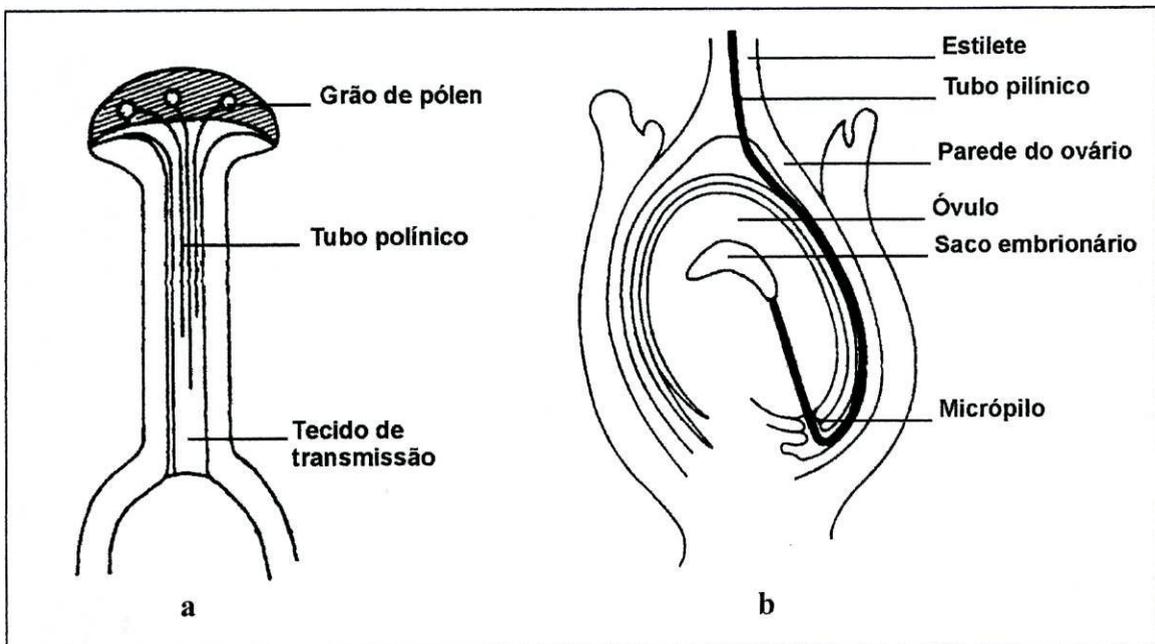


Fig. 1.5 – Esquemas ilustrativos do crescimento do tubo polínico através dos tecidos do pistilo. **a.** Os grãos de pólen depois de pousarem no estigma germinam e formam um tubo polínico que penetra através das células estigmáticas e do tecido de transmissão do estilete. **b.** O tubo polínico chega ao ovário, entra no micrópilo do óvulo e dirige-se para o saco embrionário onde vai libertar os gâmetas masculinos (adaptado de Cresti et al. 1992).

O direcionamento do tubo polínico ao longo dos tecidos do pistilo inclui-se num processo de direcionamento de longo alcance de uma célula para um determinado alvo.

O direcionamento celular pode envolver pelo menos dois mecanismos distintos. A célula direcionada pode responder a um gradiente químico de sinais positivos ou negativos que emanam do alvo ou das células que o envolvem (Hülkamp et al. 1995b, Ray et al. 1997), ou alternativamente, a célula direcionada pode mostrar um crescimento polarizado ao longo de uma via pré-estabelecida (Sanders e Lord 1989, Sanders e Lord 1992). O direcionamento do tubo polínico tem fases distintas que podem ser mecanicamente diferentes envolvendo um, ou o outro, ou ambos os processos referidos.

1.1.3.1. Interações entre o pólen e o estigma

A polinização inicia-se com a deposição dos grãos de pólen na superfície estigmática. Aí germinam e os tubos polínicos formados penetram a cutícula das células e invadem a matriz extracelular (MEC) das células secretoras subjacentes. Algumas células estigmáticas degeneradas poderão facilitar esta penetração. A matriz extracelular fornece suporte nutricional e possivelmente sinais que direcionam o tubo polínico (Cheung 1996).

Num primeiro momento de interação entre o pólen e o estigma as células desta estrutura produzem secreções com propriedades adesivas que facilitam a captura dos grãos de pólen do ar ou de agentes polinizadores bióticos (Gasser e Robinson-Beers 1993). No entanto, de todos os grãos de pólen que aí se depositam apenas alguns conseguem germinar e formar o tubo polínico. No decurso do processo evolutivo muitas espécies de plantas desenvolveram mecanismos que favorecem a polinização cruzada dentro da espécie, isto é, mecanismos que levam à rejeição do pólen de outras espécies (incompatibilidade interespecífica) e/ou rejeição do pólen proveniente da mesma planta (auto-incompatibilidade) (Nasrallah e Nasrallah 1993, Herrero e Hormaza 1996, Pruitt 1997). Tal significa que no estigma ocorre a secreção de compostos que estão envolvidos na rejeição de grãos de pólen incompatíveis e na promoção do crescimento de tubos polínicos de grãos de pólen compatíveis (Gasser e Robinson-Beers 1993).

A importância da zona estigmática na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico é demonstrada pela ablação deste tecido através de transformações genéticas em plantas do tabaco (Goldman et al. 1994). Nestas plantas transgênicas, os grãos de pólen germinam com uma eficiência reduzida, e os tubos não conseguem penetrar no tecido de

transmissão do estilete. A aplicação de exsudados estigmáticos de pistilos selvagens na zona excisada aumenta a eficiência de germinação do pólen e restabelece o crescimento do tubo.

A influência do exsudado estigmático na hidratação, germinação e penetração do tubo polínico no estigma é fundamental no caso dos estigmas húmidos; por sua vez, em espécies com estigmas secos, é o revestimento externo do grão de pólen que desempenha um papel fundamental (Preuss et al. 1993, Taylor e Hepler 1997). Assim, o exsudado permite que os tubos cresçam directamente para o estigma, enquanto que a parede externa do grão de pólen estabelece o contacto com o estigma (Wolters-Arts et al. 1998). Em estigmas húmidos, geralmente os grãos de pólen hidratam e germinam imediatamente enquanto que em estigmas secos, as células das papilas são estimuladas a secretar exsudados para a superfície estigmática (Cheung 1996).

Nos últimos anos tem vindo a ser feito um esforço para identificar possíveis moléculas envolvidas no processo de hidratação e germinação do grão de pólen. Em 1992 Mo et al. verificaram que flavonóides produzidos tanto pelo pólen como pelo pistilo eram essenciais para que a germinação do pólen ocorresse com sucesso. Mutantes de milho deficientes em flavonóides e plantas transgênicas de *Petunia hybrida* com níveis suprimidos de flavonóides no pólen eram estéreis, não germinavam. Verificaram ainda que um flavenóide da superfície do pólen, o Kaempferol, restabelecia a germinação e o crescimento do tubo polínico tanto *in vivo* como *in vitro*, e restabelecia a fertilidade das plantas deficientes em flavonóides. Este flavenóide é encontrado nos exsudados estigmáticos de pistilos de plantas do tipo selvagem em concentrações suficientes para suportar a germinação de grãos de pólen deficientes em flavonóides.

Mais recentemente lípidos que fazem parte quer do revestimento externo do grão de pólen quer do exsudado do estigma têm sido implicados na hidratação e germinação do pólen. Por exemplo, pode-se referir que lípidos de cadeias longas existentes no revestimento externo do grão de pólen são importantes para as interacções iniciais entre o pólen e o pistilo, necessárias à iniciação da germinação do grão de pólen. O pólen dos mutantes *cer* e *pop-1* de *Arabidopsis thaliana* não possui os lípidos de cadeias longas que existem na camada de trifina do pólen selvagem. Estes grãos de pólen não estimulam a secreção de água pelo estigma e assim não hidratam e portanto não germinam (Preuss et al. 1993, Hülskamp et al. 1995a). Condições de humidade elevada, ou uma mistura com pólen do tipo selvagem (ou com extractos da parede do pólen do tipo selvagem), podem

levar à hidratação destes grãos de pólen e restabelecer a fertilidade. Os autores citados sugerem que os lípidos podem agir tanto directamente na sinalização pólen-estigma como indirectamente estabilizando outros componentes.

Outro aspecto essencial na germinação do pólen é a absorção de água. Lush et al. (1998) propõem que um gradiente de água presente nos exsudados do estigma funciona como um sinal direccionado para o crescimento dos tubos polínicos nessa estrutura do pistilo. Para que tal aconteça o exsudado deve ser suficientemente permeável para que ocorra a hidratação do pólen mas não tão permeável que o fornecimento de água se torne não direccionado.

Sendo assim, a explicação para o direccionamento do tubo polínico no estigma está relacionada com a presença de determinados lípidos que controlam o fluxo de água (Lush 1999). Wolters-Arts et al. (1998) ao aplicarem óleos a pistilos sem estigma de plantas transgénicas estéreis de *Nicotiana tabacum* demonstraram a importância da natureza química do exsudado, já que verificaram que a função do estigma podia ser restaurada pela aplicação de alguns triacilglicerídeos. Experiências realizadas pelos mesmos autores mostram que a penetração dos tecidos estigmáticos por tubos polínicos depende da presença de lípidos no revestimento externo do pólen ou no exsudado estigmático, e pode ocorrer independentemente do tipo de célula que o pólen encontra. Concretamente, lípidos do tipo triacilglicerídeos cis-insaturados e a parede externa do grão de pólen permitem o crescimento de tubos polínicos em tecidos especializados (estigmas húmidos ou secos) e não especializados (folhas). O contacto hidráulico entre o grão de pólen e o tecido subjacente é estabelecido pela parede externa do grão de pólen ou pelo exsudado. Estes autores propõem que os lípidos direccionam o crescimento do tubo polínico controlando o fluxo de água para o pólen em espécies com stigmas secos e húmidos. Isto explica porque é que o crescimento direccionado do tubo polínico *in vivo* e *in vitro* ocorre apenas quando há um fornecimento direccionado de água. Concluindo, a força do gradiente de água, que nas interacções pólen-estigma é determinado pela composição dos lípidos, direcciona o crescimento.

1.1.3.2. Interacções entre o pólen e o estilete

Ao entrar no estilete, os tubos polínicos ficam confinados a uma região central de transmissão: eles ou alongam na matriz extracelular das células de transmissão, que

preenchem os estiletos sólidos de algumas plantas, ou na superfície secretora do canal de transmissão nos estiletos ocos de outras plantas (Cheung 1996, Herrero e Hormaza 1996).

O tecido de transmissão apresenta uma matriz extracelular abundante enriquecida com materiais de secreção. Durante a polinização e penetração dos tubos polínicos, a quantidade de hidratos de carbono bem como o conteúdo em amido dos amiloplastos do tecido de transmissão diminui. Com frequência algumas células do tecido de transmissão ficam destituídas do citoplasma e muitas vezes rebentam. O crescimento do tubo polínico tem uma exigência metabólica significativa, sendo provavelmente o tecido de transmissão o fornecedor de nutrientes para este processo (Cheung 1996, Wilhelmi e Preuss 1997).

Permanece pouco claro se os tubos polínicos comunicam activamente com as células do estilete ou se fluem passivamente através de uma via pré-estabelecida pelos tecidos esporofíticos (Malhó 1998). Experiências feitas com contas de latex por Sanders e Lord (1989) apoiam a última hipótese. Estas contas, comparáveis em diâmetro com as extremidades dos tubos polínicos, foram aplicadas à superfície do estilete de três espécies diferentes, após excisão do estigma. Verificou-se que independentemente da orientação do estilete, o transporte das contas em direcção ao ovário, incluindo o trajecto e a taxa de migração, era semelhante ao do crescimento dos tubos polínicos. Estas observações sugerem que o movimento dos tubos polínicos no estilete é apenas controlado pelos tecidos femininos da flor através de um mecanismo desencadeado pela matriz extracelular e que orienta os tubos polínicos do estigma até ao micrópilo do óvulo o que implica a existência de uma matriz extracelular com propriedades adequadas para suportar um processo semelhante ao do crescimento do tubo polínico.

Certas vias de investigação procuram demonstrar a existência de sinais de direccionamento que permitam o alongamento dos tubos polínicos em direcção ao ovário (Cheung 1996, Wilhelmi e Preuss 1997). Assim, verificou-se que *in vitro*, moléculas de baixa massa molecular e iões, tais como a glucose (Reger et al. 1992) e o cálcio (Mascarenhas e Machlis 1962) têm uma actividade quimiotrópica no crescimento do tubo polínico em muitas espécies, sendo estas moléculas abundantes no tecido de transmissão.

Alguns autores propõem que no estilete, poderá ocorrer um fenómeno de adesão que poderá fornecer a ligação entre a célula do tubo polínico e as células do tecido de transmissão e que permite a sinalização entre os dois tipos de células (Cheung 1996,

Taylor e Hepler 1997). Jauh et al. (1997) propõem que a polinização em *Lilium* é um caso de adesão e movimento celular. Estes investigadores desenvolveram uma matriz extracelular artificial aplicando extractos do tecido de transmissão do estilete a membranas de nitrocelulose. Verificaram que quando tubos polínicos a crescer *in vitro* eram aplicados a essa matriz, aderiam pelos ápices à área do exsudado do estilete rica em proteínas arabinogalactânicas. Uma vez aderidos cresciam a taxas superiores à de outros sistemas de culturas *in vitro*. Foi proposto que um gradiente no factor de adesão do topo para a base dos estiletos funcionaria como um sinal de direcção. A partir daqui foi possível isolar duas fracções das matrizes extracelulares do tecido de transmissão do estigma/estilete que são necessárias à adesão: uma cuja análise do cDNA veio a revelar ser homóloga a proteínas não específicas de transferência de lípidos (PTLne) das plantas e a outra que apresenta uma composição glicídica de uma PAG. Isoladamente nenhuma destas moléculas é adesiva; é necessária a combinação das duas para induzir a adesão de tubos polínicos a outros tubos polínicos e à matriz *in vitro* (Park et al. 2000).

As proteínas TTS (proteínas específicas do tecido de transmissão) pertencem à família das PAGs e estão presentes nos espaços intercelulares do tecido de transmissão de *N. tabacum*. Estas proteínas são um forte candidato para o papel de sinal de direcção ao nível do estilete (Cheung et al. 1995, Wu et al. 1995). Uma das primeiras observações realizadas foi a de que a quantidade das proteínas TTS vai aumentando à medida que o pistilo se vai desenvolvendo atingindo o máximo no momento da antese (momento em que o tecido de transmissão está mais receptivo para os tubos polínicos), e que esse aumento é maior na zona basal do que na zona mais próxima do estigma (Wang et al. 1993). Posteriormente a hipótese de que as proteínas TTS são importantes no crescimento e direcção do tubo polínico foi reforçada a partir de observações usando tubos polínicos isolados a crescer *in vitro* na presença de proteínas TTS que actuavam como estimuladores de crescimento. Verificaram também que estas proteínas atraíam os tubos polínicos em culturas *semi-in vivo* (Cheung et al. 1995). Estes investigadores mostraram ainda que o crescimento do tubo polínico é fortemente reduzido em plantas transgénicas que apresentam níveis baixos de proteínas TTS (Cheung et al. 1995).

Outro aspecto significativo é o de as proteínas aderirem à superfície do tubo polínico em toda a sua extensão e ao ápice, sugerindo que possam servir de substrato adesivo para o crescimento do tubo polínico. As proteínas TTS também são incorporadas na parede

dos tubos polínicos *in vivo* e são desglicosiladas por eles, sugerindo que possam fornecer nutrientes para este processo. Wu et al. (1995) sugerem que uma diferença na glicosilação possa ser o sinal de direcção, já que as proteínas TTS são menos glicosiladas na extremidade estigmática do estilete do que na extremidade ligada ao ovário.

Recentemente, a partir de *N. alata* foi purificada uma glicoproteína do estilete rica em galactose (GaRSGP) homóloga das proteínas TTS (Sommer-Knudsen et al. 1998). Verificou-se, no entanto, que aparentemente não atraem os tubos polínicos e não existe um gradiente de glicosilação destas proteínas no estilete, como acontece para as proteínas TTS, o que veio contrariar os resultados obtidos pelo grupo de investigação da Professora Alice Cheung. Posteriormente este mesmo grupo de investigadores (Wu et al. 2000) verificou que as proteínas GaRSGP representam uma pequena parte de um grupo de outras proteínas, as proteínas NaTTS, em tudo semelhantes às proteínas TTS. Verificaram ainda que as GaRSGP são em média menos glicosiladas que a maioria das outras PAGs deste grupo o que explica os dados obtidos por Sommer-Knudsen et al. (1998). Assim, continuam a ser aceites todas as hipóteses relativas às funções das proteínas TTS no tecido de transmissão do estilete.

1.1.3.3. Interacções entre o pólen, o ovário e o óvulo

Cada tubo polínico emerge da base do estilete para entrar no ovário. Dentro do ovário os tubos polínicos continuam a crescer ao longo da superfície da placenta à qual os óvulos estão ligados. O seu crescimento basípeto continua até que têm acesso a um óvulo através do micrópilo, por vezes modificando a sua direcção de crescimento até 90°. Após a chegada ao micrópilo o ápice do tubo polínico penetra através do nucelo, entra no saco embrionário através de uma sinérgida e liberta os gâmetas, que migram para a oosfera e para a célula central para ocorrer a fecundação (Cheung 1996, Wilhelmi e Preuss 1997).

Em algumas espécies o trajecto para os óvulos é marcado por uma pista de material secretado, mas mais frequentemente, os tubos viajam num ambiente relativamente seco ao longo da superfície das células que fisicamente suportam o óvulo. Em alguns casos, os micrópilos estão cobertos com exsudados enriquecidos com compostos glicosilados, que eventualmente são importantes na atracção dos tubos polínicos para os óvulos (Cheung 1996).

Estudos recentes levantam a hipótese de os sinais essenciais para o direcção dos tubos polínicos serem provenientes, muito provavelmente, dos próprios óvulos. Com

efeito Hulskamp et al. (1995) fizeram uma série de observações que indicam que o direcionamento do tubo polínico para fora do tecido de transmissão e através do ovário necessita de sinais direccionais. Assim, com muita frequência os tubos polínicos depois de emergirem do tecido de transmissão dirigem-se para o primeiro óvulo disponível; mutantes com óvulos deficientes mostram um direcionamento aberrante, com os tubos polínicos a vaguearem pelo ovário; os defeitos mais graves no direcionamento ocorrem quando os óvulos não têm saco embrionário. Portanto, a fase final do direcionamento parece ocorrer como resposta a um sinal ou sinais, ainda não identificados, provenientes das células do óvulo. Ray et al. (1997) levantam a hipótese de ser o saco embrionário haplóide o componente do óvulo com a actividade de grande alcance que controla o direcionamento do tubo polínico, tendo-se baseado em observações de que os tubos são apenas direccionados para os óvulos que têm um saco embrionário funcional. Logo, pelo menos a fase final do desenvolvimento do tubo polínico é controlada pelo saco embrionário. Estes resultados levantam questões relacionadas com a origem precisa e a natureza do sinal de direcionamento. Deixam em aberto a possibilidade de o sinal direccional ser produzido tanto pelo megagametófito como por algumas células esporofíticas após indução pelo megagametófito (Ray et al. 1997, para uma revisão ver Smyth 1997).

Wilhelmi e Preuss (1996) referem que a reemergência do tubo polínico na superfície celular interna do ovário, e subsequente direcionamento do tubo para um óvulo, necessita de genes que são expressos tanto no esporófito materno como no gametófito masculino e a adesão do tubo polínico à superfície celular esporofítica deve desempenhar um papel importante neste processo.

Coimbra e Salema (1997) propõem que as proteínas arabinogalactânicas, reconhecidas pelos anticorpos monoclonais JIM8 e MAC207, são provavelmente o sinal direccional para o crescimento do tubo polínico no interior do óvulo de *A. hypochondriacus*, que é um óvulo crassinucelado. Baseiam-se no facto de a expressão dos epítomos destas glicoproteínas no óvulo aparecer alinhada com a zona por onde passa o tubo polínico, nomeadamente através das células do nucelo micropilar.

1.2. Proteínas arabinogalactânicas (PAGs)

A classe das proteínas arabinogalactânicas (PAGs) cobre um vasto grupo de moléculas que basicamente preenchem três critérios, designadamente: (i) possuem um núcleo proteico rico em hidroxiprolina/prolina, alanina, serina e treonina; (ii) possuem cadeias glicídicas do tipo II arabino-3,6-galactano; (iii) ligam-se aos reagentes de Yariv. No entanto, alguns autores sugerem que algumas moléculas apesar de não preencherem os três critérios devem ser consideradas PAGs. Tal facto, pode ser indicativo de que a classificação das PAGs com base na composição química pode ser inadequada. Em vez disso, uma classificação das moléculas com base na função pode vir a ser mais fidedigna (Kreuger e van Holst 1996).

Genericamente as PAGs pertencem a uma superfamília de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (GPRH), família esta que também inclui as extensinas, as proteínas ricas em prolina (PRPs) e as lectinas das Solanaceae (Showalter 1993). Estas outras glicoproteínas diferem das PAGs, entre outras características, na proporção e organização dos monossacarídeos e na natureza da ligação entre a porção glicídica e a porção proteica (para uma revisão ver Fincher et al. 1983, Cassab 1998).

Estas moléculas têm vindo a atrair interesse devido à sua ampla distribuição nas plantas, estando representadas por uma grande família de genes numa ampla variedade de angiospérmicas, e ao seu potencial envolvimento como marcadores da identidade celular e diferenciação (Kohorn 2000).

1.2.1. Distribuição e localização

As PAGs encontram-se amplamente distribuídas no reino vegetal, ocorrendo, provavelmente, em todas as células de todas as plantas, desde as briófitas até às angiospérmicas (Fincher et al. 1983, Majewska-Sawka e Nothnagel 2000).

Aparecem em vários órgãos das plantas incluindo as folhas, caules, raízes, flores e sementes (Fincher et al. 1983). São ainda extremamente abundantes nos tecidos reprodutores do pistilo e nos tubos polínicos (Cheung e Wu 1999). Algumas PAGs são secretadas em grandes quantidades em certas zonas da planta. É o que acontece no tecido de transmissão do estilete e nas células secretoras que produzem gomas (Clarke et al. 1979, Fincher et al. 1983, Jauh et al. 1997). Também culturas de células *in vitro*

derivadas de tecidos de embriões, endosperma, raízes e folhas produzem e secretam PAGs para o meio (Fincher et al. 1983, Pennell et al. 1989).

A nível subcelular as PAGs encontram-se na superfície celular o que inclui a membrana plasmática (Pennell et al. 1989, Jauh e Lord 1996), o espaço entre a membrana plasmática e a parede celular, a própria parede celular (Serpe e Nothnagel 1994) e o espaço ou matriz extracelular (Cheung e Wu 1999). Relativamente à membrana plasmática, Gens et al. (2000) apresentam-nos evidências de que as PAGs possam ocorrer num arranjo poliédrico no folheto externo da membrana plasmática. Podem ainda encontrar-se em invaginações multivesiculares da membrana plasmática, também conhecidas por plasmalemasomas, e em corpos multivesiculares intracelulares (Herman e Lamb 1992, Ferguson et al. 1999). Aparecem ainda associadas a corpos multilamelares nos vacúolos (Ferguson et al. 1999). Também tem havido indicações de que alguns epítomos das PAGs estão associados com endomembranas, nomeadamente com o retículo endoplasmático, com o complexo de Golgi e com o tonoplasto (Pennell et al. 1989, Samaj et al. 2000).

1.2.2. Estrutura e biossíntese

As PAGs constituem uma família de proteoglicanos, isto é, polissacarídeos ligados covalentemente a uma proteína (Fincher et al. 1983, Showalter 1993). São complexas macromoléculas de elevado peso molecular (60 – 300 KDa) caracterizadas por uma alta proporção de glicídios (90 a 98%), em que a galactose (Gal) e a arabinose (Ara) são os monossacarídeos predominantes (Fincher et al. 1983, Chasan 1994, Du et al. 1994, Youl et al. 1998) e um pequeno núcleo polipeptídico (1-10%) geralmente rico em hidroxiprolina (Hyp), alanina (Ala), serina (Ser) e treonina (Thr) (Chen et al. 1994, Du et al. 1994, Gerster et al. 1996, Majewska-Sawka e Nothnagel 2000). Os aminoácidos referidos podem representar mais de 75% do total de resíduos (Chen et al. 1994), no entanto, o conteúdo em aminoácidos pode variar entre as PAGs de diferentes espécies e tecidos (Cassab 1998). Supõe-se também que nestas moléculas existe uma pequena porção lipídica (Fig. 1.6) (Majewska-Sawka e Nothnagel 2000).

As propriedades físicas das PAGs irão depender da estrutura tanto do polipeptídeo como dos polissacarídeos. A falta de informação precisa relativamente à ligação estabelecida entre a porção glicídica e o núcleo proteico e à organização destas moléculas torna difícil prever o seu comportamento físico. A estrutura das PAGs demonstra um

grande potencial para se ligar a outros componentes da parede celular (Baldwin et al. 1993, Serpe e Nothnagel 1995).

1.2.2.1. Núcleo polipeptídico

Os núcleos polipeptídicos variam em tamanho molecular e podem consistir numa única cadeia ou várias cadeias com ligações cruzadas. Estas diferenças levam a diferentes graus de flexibilidade do núcleo polipeptídico (Fincher et al. 1983).

Até 1994 não tinha havido qualquer relato de cDNAs relativos a sequências peptídicas de PAGs, embora algumas dessas sequências peptídicas já fossem conhecidas. Desde essa altura e até ao momento já foram caracterizados vários cDNAs que codificam o núcleo polipeptídico de PAGs (Chen et al. 1994, Du et al. 1994, Pogson e Davies 1995, Gerster et al. 1996, Li e Showalter 1996, Schultz et al. 1997, Gao et al. 1999, Loopstra et al. 2000).

Estes cDNAs codificam proteínas relativamente pequenas (12-13 KDa). A análise da composição dos aminoácidos destes clones revela uma baixa homogeneidade entre eles, no entanto é possível distinguir alguns aspectos comuns. Todos estes cDNAs (i) codificam polipeptídeos com uma sequência sinal N-terminal para entrar na via secretora, isto é, que levará à secreção da proteína codificada e (ii) uma sequência central hidrofílica rica em resíduos de Pro/Hyp, Ala, Ser e Thr (Fig. 1.7) (Chen et al. 1994, Du et al. 1994, Gerster et al. 1996, Sommer-Knudsen et al. 1997). Não existe consenso em relação às sequências no núcleo proteico das PAGs quanto à hidroxilação e glicosilação dos resíduos de prolina (Du et al. 1996). A maioria dos resíduos de prolina, nas sequências peptídicas, estão hidroxilados, sugerindo que ocorre maioritariamente uma O-glicosilação na parte central da proteína. A abundância de locais potenciais de O-glicosilação é consistente com o alto teor em glicídios (Chen et al. 1994, Du et al. 1994).

A presença destes dois domínios parece ser relativamente consensual, o mesmo não acontecendo ao resto da estrutura proteica das PAGs (Majewska-Sawka e Nothnagel 2000). Assim, as estruturas do núcleo proteico estão divididas em PAGs clássicas e não clássicas (Du et al. 1994, Knox 1999).

PAGs clássicas

Clones correspondendo a PAGs clássicas codificam polipeptídeos com pelo menos três domínios distintos, dois dos quais já foram referidos: a sequência sinal de secreção N-terminal e um domínio central que contém a maioria dos resíduos de Pro/Hyp.

Algumas PAGs clássicas contêm um domínio curto rico em aminoácidos básicos, que interrompe o domínio rico em Pro/Hyp, Ala, Ser e Thr (Gao et al. 1999). De acordo com sequências de cDNAs, o núcleo proteico das PAGs clássicas contém ainda um domínio transmembranar hidrofóbico na extremidade C-terminal (Chen et al. 1994, Du et al. 1994, Gerster et al. 1996). Os domínios hidrofílicos e hidrofóbicos poderão conferir propriedades de formação de micelas às PAGs (Chen et al. 1994).

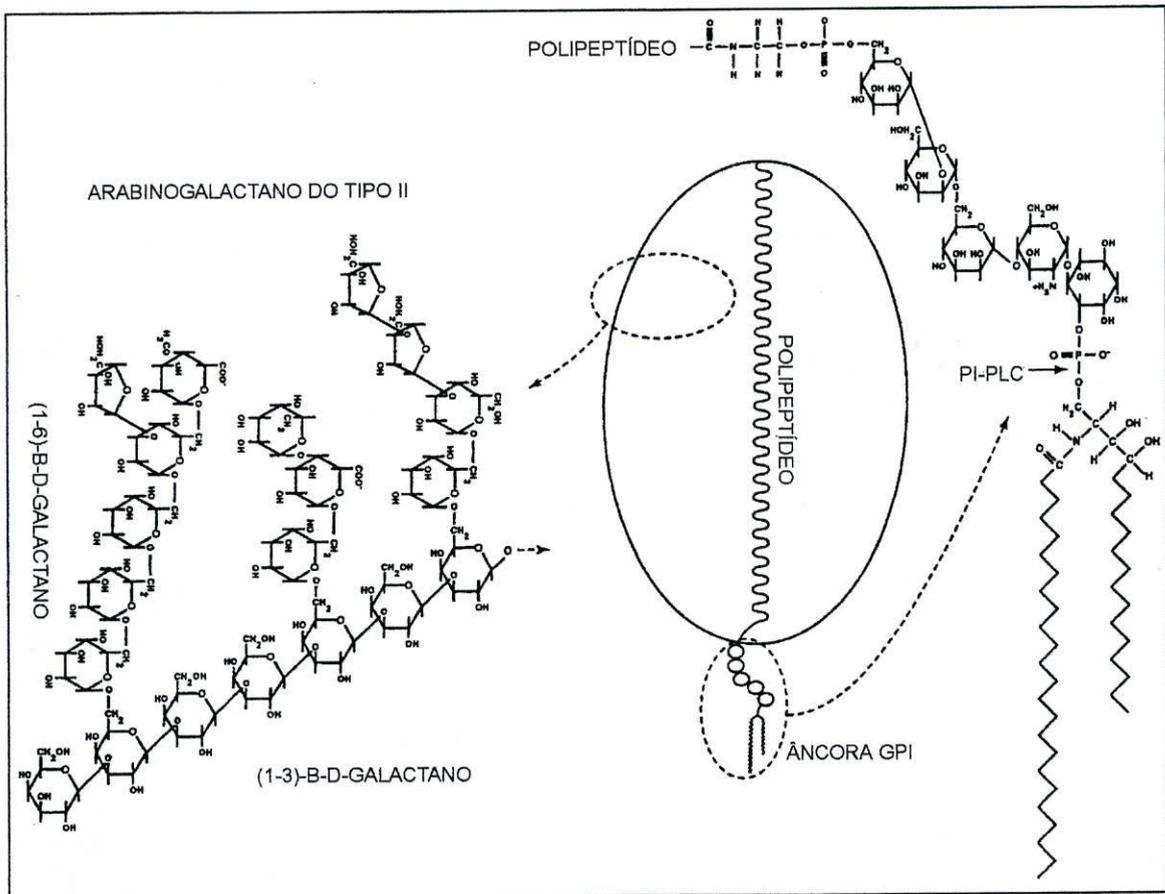


Fig. 1.6 - Modelo hipotético de uma PAG clássica com uma âncora lipídica GPI. A elipse representa as dimensões de uma PAG da cenoura e que são de 15 por 25nm. A linha ondulada representa o núcleo proteico, que para uma PAG de 141 KDa contendo 5,6% de proteína tem um comprimento estimado de 24nm, basicamente o mesmo comprimento da elipse. A âncora GPI está esquematizada aproximadamente à escala. O local de clivagem por uma fosfolipase C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) está indicado. As cadeias de arabinogalactano do tipo II consistem em 30 a 150 resíduos de açúcar e estão ligados a muitos resíduos Hyp, Ser e/ou Thr do núcleo polipeptídico. As cadeias laterais do núcleo (1-3)-β-D-galactano são baseadas em oligossacarídeos caracterizados a partir de várias PAGs, mas a sua localização é hipotética. Ainda não foi descoberta a estrutura completa para nenhuma PAG (adaptado de Serpe e Nothnagel 1999 in Majewska-Sawka e Nothnagel, 2000).

Todavia, numa PAG madura este domínio hidrofóbico está ausente e é substituído por uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Youl et al. 1998). A existência da âncora GPI sugere que a molécula possa estar ancorada na membrana plasmática, com a parte central exposta para a face extracelular (Chen et al. 1994, Gerster et al. 1996, Oxley e Bacic 1999, Majewska-Sawka e Nothnagel 2000).

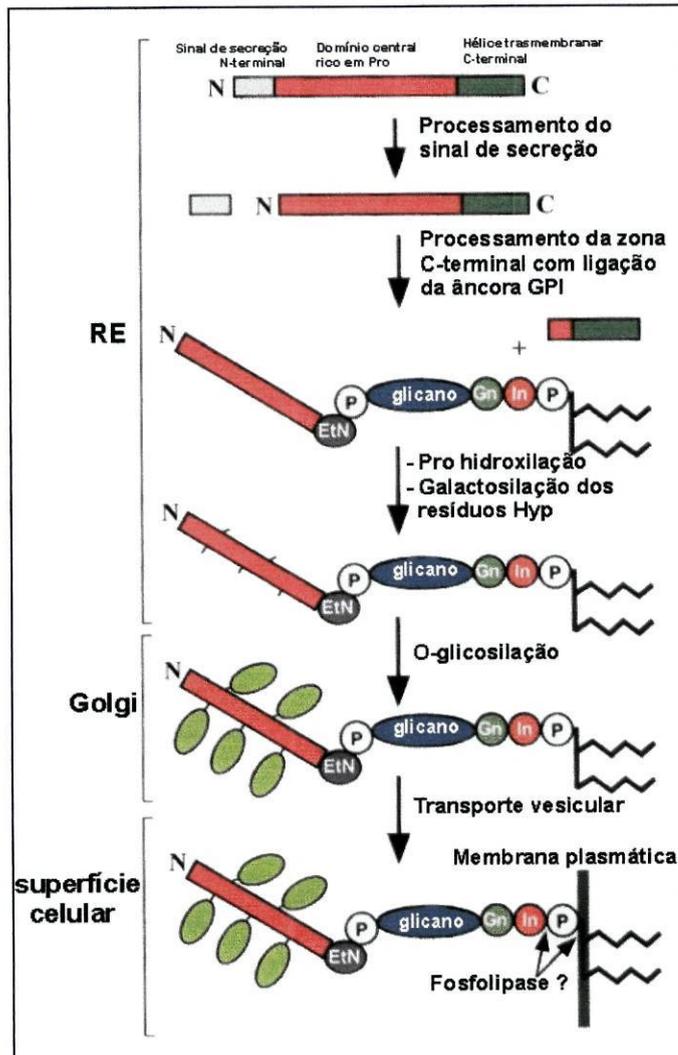


Fig. 1.7 – Representação esquemática da síntese e processamento das PAGs clássicas. A síntese do núcleo proteico ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RE). Aí o sinal de secreção N-terminal é clivado e o domínio transmembranar C-terminal é processado, havendo a adição de uma âncora GPI através de uma transamidase. Ainda no RE, os resíduos de Pro são hidroxilados, por uma hidroxilase da prolina e O-glicosilados por uma galactosil transferase. A PAG é então transportada para o complexo de Golgi onde a O-glicosilação é terminada de modo a ficarem completas as cadeias de arabinogalactano do tipo II. É então transportada para a superfície celular através de vesículas. A PAG poderá ser libertada da superfície celular para o espaço extracelular através da acção de uma fosfolipase (setas). EtN– etanolamina, Gn– glucosamina, In– inositol, P- fosfato (adaptado de Youl et al. 1998).

Muito recentemente têm sido efectuados vários estudos no sentido de verificar a existência nas PAGs das âncoras GPI e conhecer a sua constituição. Youl et al. (1998) verificaram que dois membros pertencentes à classe das PAGs clássicas, *NaAGP1* dos estiletos de *Nicotiana glauca* e *PcAGP1* de células de cultura em suspensão de *Pyrus communis*, sofrem um processamento ao nível da extremidade C-terminal envolvendo âncoras membranares de glicosilfosfatidilinositol (Fig. 1.7), ou seja, a hélice transmembranar da extremidade C-terminal, prevista a partir do cDNA que codifica estas proteínas não está presente. Um exame das sequências de aminoácidos deduzidas de núcleos proteicos de outras PAGs clássicas sugere que as âncoras GPI podem ser uma característica comum desta classe de PAGs.

Supõem-se que a âncora GPI é importante na ligação à membrana plasmática mas que o seu processamento pode levar à libertação da PAG modificada para as paredes celulares, meios de cultura ou espaços intercelulares (Oxley e Bacic 1999, Gao et al. 1999). A âncora pode ser clivada à superfície da célula, provavelmente por uma fosfolipase, à semelhança do que acontece nas células das leveduras onde a composição da parede celular é modulada pela libertação enzimática de glicoproteínas com âncoras lipídicas (Kohorn 2000). Este processo de síntese e processamento do núcleo polipeptídico ocorre no retículo endoplasmático (Fig. 1.7) (Youl et al. 1998).

A clivagem proteolítica pode ser responsável pela libertação das PAGs para o meio extracelular numa fase específica do desenvolvimento (Chen et al. 1994), o que pode explicar a regulação de alguns epítomos das PAGs associados à membrana plasmática durante o desenvolvimento (Knox et al. 1991, Pennell et al. 1991, Kreuger e van Holst 1993). Todavia, não é clara qual a relação entre as PAGs com âncoras lipídicas e aquelas que são completamente secretadas, e qual delas é mais afectada pelo reagente de Yariv (Kohorn 2000).

PAGs não clássicas

As PAGs não clássicas apresentam domínios ricos em outros aminoácidos que não a hidroxiprolina, como é o caso de regiões C-terminal ricas em cisteína (Cys) ou ainda um ou dois domínios ricos em asparagina (Asn) que vêm a seguir ou a rodear o domínio rico em Pro/Hyp, Ala, Ser e Thr (Knox 1999). Nenhuma das PAGs não-clássicas codifica uma

mudança GPI, nem contém um domínio C-terminal hidrofóbico, podendo no entanto ter uma região variável C-terminal hidrofílica.

1.2.2.2. Porção glicídica

Como já foi referido os monossacarídeos mais importantes são a galactose, na forma (D-Galp²) e a arabinose na forma (L-Araf³), podendo aparecer pequenas quantidades de outros açúcares. A proporção (Gal:Ara) varia entre 10:90 e 85:15 com a maioria das amostras a conter mais Gal do que Ara (Fincher et al. 1983).

Os resíduos de hidroxiprolina, existentes no núcleo proteico, são geralmente substituídos por cadeias glicídicas (5-25 KDa) (Chasan 1994, Schultz et al. 1998) que são do tipo II arabino-3,6-galactano (Fig. 1.6). Assim, uma das características bioquímicas associada às PAGs e que tem sido usada para as distinguir de outras glicoproteínas ricas em hidroxiprolina que também são ricas em arabinose e galactose é a presença de uma moldura polissacarídica altamente ramificada que consiste numa estrutura base de (1→3)-β-D-galactopiranosose, substituída por cadeias laterais (1→6)-β-D-galactopiranosose na posição 6 com resíduos terminais de arabinofuranose e outros monossacarídeos menos abundantes, incluindo a xilose, a ramanose, a fucose e o ácido glucorónico (Fincher et al. 1983, Oxley e Bacic 1999).

Os locais precisos de ligação e o número de ligações por núcleo proteico permanecem por determinar, embora ligações galactosil-O-hidroxiprolina, arabinosil-O-hidroxiprolina e galactosil-O-serina tenham sido referidas para várias PAGs, isto é, as cadeias glicídicas laterais, nomeadamente os resíduos de arabinose e de galactose estão primariamente ligadas por O-glicosilação aos grupos OH dos resíduos de Ser e da Hyp do núcleo proteico (Kreuger e van Holst 1996). Estas cadeias laterais podem ser constituídas por mais de 50 monossacarídeos (Cassab 1998). Em princípio, a variação no tipo de ramificações das cadeias laterais pode ser ilimitado. Como consequência existem poucos dados acerca da natureza precisa da estrutura das cadeias laterais. Assim, as PAGs podem diferir no tipo de cadeias glicídicas e no número e localização de locais de glicosilação ao longo do núcleo proteico (Du et al. 1994).

Majewska-Sawka e Nothnagel (2000) propõem que a informação necessária para a síntese de cadeias glicídicas longas e ramificadas reside em especificidades de glicosiltransferases: uma glicosiltransferase em particular é necessária para adicionar o

² Galp- galactopiranosose

³ Araf- arabinofuranose

primeiro monossacarídeo a um aminoácido do núcleo proteico e então glicosiltransferases adicionais são necessárias para formar cada tipo de ligação entre monossacarídeos à medida que a cadeia de glicano cresce. Os autores argumentam que para a síntese de cadeias altamente complexas (Fig. 1.6) são necessárias muitas glicosiltransferases e, portanto, muitos genes. Não é provável que tal investimento ao nível do genoma tenha sobrevivido à evolução a não ser que proporcione funções essenciais. Este processo complexo de O-glicosilação ocorre no Golgi (Fig. 1.7.).

1.2.3. Ligação com os reagentes de Yariv

Uma característica distintiva das PAGs é ligarem-se e serem precipitadas especificamente por uma classe de fenilglicosídeos vulgarmente conhecidos por reagentes de Yariv, podendo estes ser usados como reagentes citoquímicos (Yariv et al. 1967). Os reagentes de Yariv (β -D-glucosil)₃ e (β -D-galactosil)₃, ligam especificamente a porção glicídica das PAGs de modo não-covalente e precipitam-nas (Gao e Showalter 1999). Moléculas relacionadas com os arabinogalactanos, que se assemelham à parte glícídica das PAGs mas que não contém o núcleo proteico, não são precipitadas com o reagente de Yariv (β -D-glucosil)₃, todavia podem interferir com a precipitação das PAGs (Kreuger e van Holst 1996). Estes reagentes podem ser usados para isolar PAGs e em estudos de localização nos tecidos. A interacção entre as PAGs e estes reagentes indicam que estas glicoproteínas também são β -lectinas com uma ampla especificidade de ligação dirigida para ligações β -D-glicopiranosil (Showalter 1993). Para além dos reagentes de Yariv (β -D-Glc)₃ e (β -D-Gal)₃ que reagem com as PAGs existem outros dois fenilglicosídeos de Yariv, o (β -D-Man)₃ e o (α -D-Gal)₃ que não reagem com as PAGs sendo utilizados, em inúmeros trabalhos, como controlo.

O reagente de Yariv não é um anticorpo mas reage de modo semelhante. Uma das limitações do reagente de Yariv está relacionada com o facto de este reagente reagir indiferenciadamente com todas as PAGs, sendo portanto impossível determinar qual a PAG envolvida no processo em estudo, no entanto tem sido muito utilizado para tentar determinar algumas das possíveis funções das PAGs.

1.2.4. Os anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são uma ferramenta poderosa para caracterizar e determinar as funções das PAGs. Até ao momento praticamente todos os anticorpos têm sido dirigidos para a porção glicídica das PAGs (Knox et al. 1991). No entanto, a estrutura precisa destes epítomos ainda não foi determinada (Knox 1995), embora já se tenha dado um primeiro passo no sentido de elucidar a complexa estrutura oligossacarídica de alguns destes epítomos (Yates et al. 1996, para uma revisão ver Knox 1997). Recentemente foram sintetizados anticorpos dirigidos para o núcleo proteico (Gao et al. 1999).

Fracções isoladas por ligação com anticorpos monoclonais (à semelhança do que acontece por precipitação com os reagentes de Yariv) podem conter PAGs com diferentes núcleos proteicos mas com composição em monossacarídeos e com arranjos de ligações semelhantes. Neste caso estaremos a trabalhar com uma mistura de PAGs relacionadas entre si (Du et al. 1994). Assim, não constitui surpresa o facto de certos anticorpos monoclonais tanto reagirem com as PAGs secretadas como com as que se encontram associadas à membrana. Knox (1995) sugere que de futuro será necessário preparar anticorpos monoclonais que reconheçam estruturas oligossacarídicas bem definidas.

Entre outros aspectos os anticorpos monoclonais têm sido usados para localizar epítomos das PAGs em diferentes tecidos o que veio demonstrar que as PAGs podem ser expressas de uma maneira específica em órgãos, tecidos e células (Knox 1995). Assim, numerosas investigações têm demonstrado que a expressão das PAGs no desenvolvimento é regulada tanto espacialmente (diferentes órgãos, tecidos ou tipos de células estão associados a um subconjunto característico de PAGs) (Chasan 1994) como temporalmente (um tecido ou órgão produz diferentes PAGs em diferentes fases do desenvolvimento) (Gell et al. 1986, Majewska-Sawka e Nothnagel 2000). Por exemplo um epítomo de uma PAG tem uma expressão modulada temporal e espacialmente em flores e embriões de *Brassica napus* (Pennell et al. 1991). Ainda não é possível compreender por completo o significado dos padrões de desenvolvimento dos epítomos das PAGs. Parece, no entanto, que a modulação dos epítomos poderá ser um reflexo do metabolismo das PAGs (Knox 1995).

1.2.5. Estabilidade e reciclagem

As PAGs são quimicamente estáveis, resistentes a altas temperaturas, a tratamentos pelo frio e com substâncias alcalinas (Kreuger e van Holst 1996) e à proteólise no seu estado nativo. São também extremamente solúveis na água (Fincher et al. 1983).

Certas experiências indicam que o tempo durante o qual as PAGs estão presentes nos tecidos é curta (Cassab 1998). Presumivelmente tal facto dever-se-á à existência de um sistema activo de degradação e reciclagem. Esta hipótese é apoiada pelo facto de se terem encontrado PAGs nas membranas internas de corpos multivesiculares (Herman e Lamb 1992) e no vacúolo (Schindler et al. 1995, Ferguson et al. 1999), reflectindo provavelmente o movimento das glicoproteínas da membrana plasmática na via endocítica (Pennell et al. 1989). Os corpos multivesiculares podem-se fundir com o tonoplasto (Herman e Lamb 1992) libertando as PAGs e levando eventualmente à degradação destas moléculas.

1.2.6. Funções

Apesar da sua abundância e ampla distribuição nas plantas, faltam provas conclusivas acerca das funções desempenhadas pelas PAGs. No entanto, tudo aponta para que as PAGs sejam importantes em múltiplas fases do crescimento e desenvolvimento, desde a embriogénese até à fecundação.

As PAGs não estão ligadas covalentemente à parede celular (Serpe e Nothnagel 1995), são com frequência secretadas em grandes quantidades e portanto não parecem desempenhar uma função estrutural (Pennell et al. 1989, Kreuger e van Holst 1996). No entanto, é ainda discutido se estes proteoglicanos funcionam como receptores da superfície celular para moléculas constituintes da matriz da parede celular, nomeadamente polissacarídeos (Pennell et al. 1989, Kohorn 2000), isto porque possuem muitos locais potenciais de O-glicosilação.

Ao nível do desenvolvimento das plantas podemos considerar três processos fundamentais: a divisão, a expansão e a diferenciação celular. A análise clonal mostra que, pelo menos ao nível da diferenciação celular, a posição da célula é um factor mais importante do que a linhagem celular. Portanto, o destino de uma célula em particular

depende mais da identidade das suas células vizinhas do que da identidade da sua célula mãe. Isto implica que a informação posicional possa ser comunicada pelos componentes da parede celular durante o desenvolvimento e a diferenciação.

O largo espectro de distribuição das PAGs nas plantas, particularmente na superfície celular, pode ser um bom indicativo de que estes proteoglicanos estejam envolvidos em funções mediadas pela superfície celular, o que faz delas boas candidatas para actuarem como marcadores da posição (Showalter 1993, Oxley e Bacic 1999) e da identidade celular (Knox et al. 1991, Pennell et al. 1991, Gao et al. 1999) ou como mensageiros em interacções entre as células durante o desenvolvimento das plantas (Fincher et al. 1983, Kreuger e van Holst 1993, McCabe et al. 1997). Supõe-se que desempenham funções ao nível da sinalização, comunicação e reconhecimento celular, adesão entre as células e entre as células e a matriz, devido à sua forte adesividade, e interacções entre as células e o ambiente (Clarke et al. 1979, Pennell et al. 1991, Sanders e Lord 1992).

Quando durante os processos de desenvolvimento ocorre uma mudança nos sinais da superfície celular, caso a molécula sinalizadora seja uma PAG, a remodelação pode ser rapidamente acompanhada pela clivagem das âncoras GPI para libertar as PAGs da membrana plasmática (Majewska-Sawka e Nothnagel 2000).

Como já foi referido, tem sido proposto que as PAGs intervêm na diferenciação celular (Knox et al. 1991, Schindler et al. 1995, Kreuger e van Holst 1996). Uma evidência da sinalização entre as células durante a diferenciação celular resulta de alguns estudos em que o tratamento de culturas em suspensão com PAGs exógenas ou agentes que ligam especificamente as PAGs influencia a proliferação celular e a embriogénese.

As PAGs podem induzir ou inibir a embriogénese somática nas plantas, dependendo das PAGs e linhas celulares de cultura utilizadas. Kreuger e van Holst (1993) verificaram que o padrão das PAGs secretadas por uma linha celular de cenoura muda à medida que o seu potencial embriogénico muda, e a adição de PAGs secretadas por uma linhagem celular embriogénica de cenoura a uma linhagem não embriogénica pode induzir um potencial embriogénico nessa linhagem. Inversamente, a adição de PAGs de uma linhagem não embriogénica pode impedir uma cultura de *explants* de cenoura de se tornarem embriogénicos.

Certas evidências levantam a possibilidade de as PAGs estarem envolvidas na regulação do crescimento. Dentro do contexto do desenvolvimento, o envolvimento das PAGs na proliferação celular pode reflectir a sua participação na expansão da parede

celular (Zhu et al. 1993, Schindler et al. 1995) ou pode reflectir um efeito mais directo na divisão celular (Serpe e Nothnagel 1994). Para verificar o papel das PAGs nestes processos tem sido utilizado o reagente de Yariv, que ao ligar-se a estas moléculas as perturba alterando o alongamento e a divisão celular.

Evidências para o envolvimento das PAGs na expansão celular provêm de estudos como os de Zhu et al. (1993) que demonstram que a expansão de células de tabaco em culturas adaptadas a NaCl é reduzida quando comparada com células inadaptadas, e que esta redução está relacionada com a quantidade do complexo $(\beta\text{-D-Glc})_3\text{-PAG}$. Por outro lado Serpe e Nothnagel (1994) verificaram que células de cultura em suspensão de rosa tratadas com o fenilglicosídeo $(\beta\text{-D-Glc})_3$ que liga as PAGs, inibe o crescimento celular de forma reversível, sendo esta inibição dependente da concentração. Já um fenilglicosídeo que não liga as PAGs como o $(\beta\text{-D-Man})_3$ ou o $(\alpha\text{-D-Gal})_3$ não tem qualquer papel na proliferação celular. O mecanismo de inibição do crescimento deve envolver a supressão da divisão celular já que o tamanho das células não diminui. De modo inequívoco a divisão celular e a expansão celular são processos ligados e a inibição do último pelo $(\beta\text{-D-Glc})_3$ pode indirectamente impedir o primeiro processo.

As PAGs poderão ainda participar em interacções intermoleculares da superfície celular (Gao et al. 1999). O uso de anticorpos monoclonais contra as PAGs e dos reagentes de Yariv demonstrou que ligações cruzadas entre PAGs à superfície da célula podem levar a uma inibição da proliferação celular e crescimento radicular (Schultz et al. 1998). Todavia, permanece a questão: serão as PAGs ou serão as ligações cruzadas entre uma grande variedade de moléculas à superfície das células que perturbará o crescimento das células? (Schultz et al. 1998).

Knox et al. (1991) verificaram que há epítomos de PAGs que são expressos na raiz em desenvolvimento segundo padrões especiais restritos que reflectem a posição celular e não a linhagem celular e que essa expressão muda durante o desenvolvimento radicular. Assim, os epítomos das PAGs podem reflectir um padrão tecidular determinado pela posição celular. Isto levanta a questão: será que os diferentes epítomos das PAGs são apenas o resultado da diferenciação ou será que podem causar a diferenciação, ou talvez ocorram ambos os fenómenos?

A descoberta de que a adição do reagente de Yariv $(\beta\text{-D-galactosil})_3$ a culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* inibia o crescimento das células porque

induzia a morte celular programada, implicou as PAGs na morte celular programada em plantas indicando que estas podem ser um componente importante na via de transdução do sinal para este processo. Tal fenómeno parece estar relacionado com a perturbação das PAGs localizadas na interface membrana plasmática – parede celular (Gao e Showalter 1999). As PAGs poderão ser um componente importante para o crescimento das células e sua sobrevivência. Por exemplo, uma PAG codificada pelo gene *LeAGP-1* parece ter um papel importante no desenvolvimento do xilema (Gao et al. 1999).

A pronunciada capacidade de adesão e de retenção de água das PAGs sugere um vasto leque de outras possíveis funções para estas moléculas. Assim, as PAGs poderão simplesmente controlar o balanço de água (Chasan 1994), actuar como lubrificantes ou contribuir para a estrutura gelificante das matrizes extracelulares (Knox 1995). Outra função será a da internalização de material periplasmático para degradação mediada pelo vacúolo. Tal função é sugerido pela descoberta de que um anticorpo monoclonal que reage com um epítopo associado à membrana que marca não só a membrana plasmática mas também corpos multivesiculares derivados da membrana plasmática que podem fazer parte de uma via endocítica. A capacidade adesiva das PAGs pode permitir que adiram, e portanto medeiem a destruição de moléculas estranhas e mesmo agentes patogénicos, da matriz extracelular (Herman e Lamb 1992).

Uma das PAGs mais bem conhecidas é a goma arábica secretada por *Acacia senegal*. Após injúria estas PAGs são secretadas em grandes quantidades actuando como uma barreira física por produzirem um tampão de gel que previne o ataque por potenciais agentes patogénicos (Kreuger e van Holst 1996, Cassab 1998). Hoje em dia gomas contendo PAGs semelhantes à goma arábica e outros compostos relacionados, ainda são usados na indústria alimentar como aditivos devido à sua capacidade de agregar e gelificar (Kreuger e van Holst 1996).

Como já foi referido anteriormente o reagente de Yariv tem sido utilizado para determinar algumas funções das PAGs. Assim verifica-se que este reagente tem um claro efeito inibitório sobre o desenvolvimento das plantas: pode inibir o crescimento celular; o crescimento apical do tubo polínico (Jauh e Lord 1996, Roy et al. 1998); o crescimento radicular (Willats e Knox 1996); e o crescimento celular em culturas de tecidos (Willats e Knox 1996, Langan e Nothnagel 1997, Gao e Showalter 1999).

A prevalência das PAGs nos tecidos reprodutores levanta a hipótese de estas glicoproteínas desempenharem importantes funções na reprodução sexuada das plantas, (Cheung e Wu 1999).

Relativamente aos tubos polínicos Li et al. (1992) e Jauh e Lord (1996) verificaram que as PAGs se depositam nas suas paredes. Há também uma associação das PAGs com as células vegetativas do grão de pólen (Pennell et al. 1989) e com os gâmetas masculinos (Pennell et al. 1991). Há algumas evidências de que estes proteoglicanos possam estimular e direccionar o crescimento dos tubos polínicos (Wu et al. 1995). PAGs codificadas por dois genes, no pólen de *Brassica napus*, parecem ter um papel importante na maturação, germinação e crescimento do tubo polínico, podendo estar envolvidos na síntese da parede celular durante estes processos (Gerster et al. 1996).

Estudos feitos com os reagentes de Yariv (Jauh e Lord 1996, Roy et al. 1998) têm mostrado que as PAGs estão envolvidas no crescimento apical dos tubos polínicos. Roy et al. (1998) usaram o reagente de Yariv (β -D-glucosil)₃ para perturbar as PAGs existentes na interface membrana plasmática – parede celular do ápice dos tubos polínicos de *Lilium longiflorum* e verificaram que o reagente de Yariv inibia o crescimento da parede celular através da formação de complexos PAG/(β -D-glucosil)₃. Estes autores propõe que estes complexos são os responsáveis pela falta de estruturação da parede celular. Estes dados confirmam a importância das PAGs no crescimento dos tubos polínicos e enfatizam o seu papel na deposição de subunidades na parede celular previamente sintetizada. Mais recentemente estudos feitos com uma PAG codificada pelo gene LeAGP-1 do tomate vieram confirmar que esta PAG pode ter um papel importante no direccionamento dos tubos polínicos ou servir como fonte de nutrientes para os tubos polínicos em crescimento (Gao et al. 1999).

Várias investigações vieram mostrar que um grande número de angiospérmicas apresentam PAGs em abundância nos tecidos do estigma, estilete e ovário (Clarke et al. 1979, Gleeson e Clarke 1980, Gane et al. 1995). Tal observação levou os investigadores a sugerirem que as PAGs são importantes na reprodução sexuada. Assim, a sua abundância no pistilo bem como a sua capacidade adesiva e alto conteúdo em açúcares levou a especular que possam estar envolvidas no processo de reconhecimento dos grãos de pólen e sua adesão ao estigma e que poderão servir de nutrientes e substratos adesivos para o

crescimento e direccionamento dos tubos polínicos (Cheung e Wu 1999). Muitas destas funções foram já referidas no contexto das interacções entre o pólen e o pistilo.

1.3. Objectivos

Este trabalho apresenta estudos de imunolocalização de proteínas arabinogalactânicas no pistilo de *Amaranthus hypochondriacus* utilizando os anticorpos monoclonais MAC207, JIM8 e JIM13. Os locais de ligação destes AcM foram analisados num grande número de flores utilizando um microscópio de epifluorescência e um microscópio electrónico de transmissão. Os resultados são discutidos relacionando-os com as possíveis funções das PAGs na adesão do pólen, crescimento, nutrição e direccionamento do tubo polínico através dos tecidos do pistilo e com a diferenciação dos elementos traqueais do xilema presentes no estilete.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Foram utilizadas sementes de *Amaranthus hypochondriacus* L. do tipo grão de mercado, identificadas com o número PI-568179 do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Beltsville, MD, E.U.A.

As sementes foram colocadas a germinar em dois meios diferentes: em água e em solução de Hogland. Verificou-se que ao fim de cinco dias as plântulas a crescer em solução de Hogland, apresentavam um crescimento mais acentuado. Assim que estas plântulas atingiram cerca de 2 cm de altura foram transferidas para vasos com terra. Os vasos foram então colocados numa estufa com um fotoperíodo de 9h de luz e uma temperatura de cerca de 25°C.

2.1.1. Preparação do material biológico

As flores femininas, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram colhidas e fixadas numa solução fixadora constituída por paraformaldeído a 2% (preparada imediatamente antes de ser usada) e glutaraldeído a 2.5% em tampão fosfato (0.025 M, pH 7, com uma microgota de Tween 80). A solução foi colocada em vácuo durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois foi colocada de um dia para o outro, sem vácuo, a 4°C. Após a fixação o material biológico foi lavado 3 vezes em tampão fosfato, 20 minutos de cada vez.

Seguiu-se a desidratação do material numa série ascendente de álcool (25%, 35%, 50% e 70%, 10 minutos cada; 90%, 2 vezes, 10 minutos cada; 100%, 4 vezes, 10 minutos cada). A impregnação foi feita com LR white (medium grade, London Resin company, Reading, Reino Unido) e álcool (nas proporções 1:3; 1:2; 1:1; 2:1; 3:1; 100% LR white; sendo cada mudança de pelo menos 24 h). O material foi então colocado em cápsulas de gelatina com LR white, e levado a polimerizar a 55°C durante 24 h.

2.2. Anticorpos

Os anticorpos usados, JIM8, JIM13 e MAC207, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Keith Roberts do Departamento de Biologia Celular do Instituto John Innes, Norwich, Inglaterra. O anticorpo secundário, utilizado para microscopia óptica de fluorescência foi a imunoglobulina (IgG) anti-rato conjugada com fluoresceína isotiocianato (FITC) (F-1763; Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). O anticorpo secundário utilizado para imunolocalização em microscopia electrónica foi a IgG anti-rato conjugada com ouro coloidal (10 nm) (Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.).

2.3. Imunolocalização das PAGs

2.3.1. Em microscopia óptica

A partir dos blocos foram obtidas secções semi-finas do material biológico, com cerca de 0.5 μm de espessura, utilizando facas de vidro num ultramicrotomo LKB 2188 Nova. Os cortes seriados, sempre do mesmo bloco, foram colados a quente em lâminas de vidro desengorduradas com álcool e acetona (1:1), separados utilizando uma caneta PAP (PAP PEN, Zymed Laboratories, Inc., S. Francisco, U.S.A.), como está ilustrado na figura 2.1.

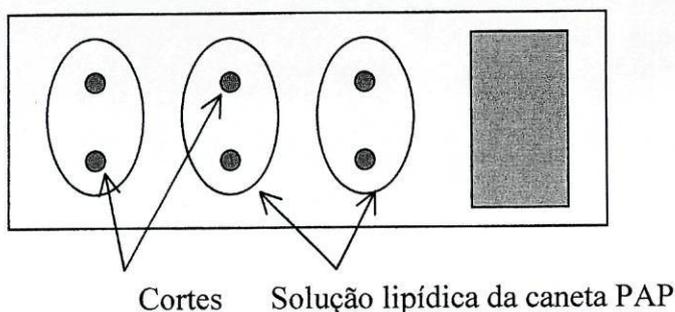


Fig. 2.1 – Esquema ilustrativo da disposição dos cortes seriados nas lâminas, rodeados pela solução lipídica da caneta PAP para evitar misturas entre os anticorpos e as várias soluções utilizadas nos tratamentos subsequentes. Dois dos conjunto de cortes vão a incubar com anticorpos monoclonais diferentes (JIM8, JIM13 ou MAC207) e o terceiro conjunto de cortes funciona como controlo, onde é omitido o tratamento com qualquer dos anticorpos primários.

Os cortes foram tratados do seguinte modo: 5 minutos com solução bloqueadora (PBS⁴ com leite em pó filtrado a 5%) e incubação com os anticorpos monoclonais JIM 8, JIM 13 e MAC 207 (diluídos 1:5 em solução bloqueadora), de um dia para o outro, a 4°C. Após duas lavagens com solução tampão (PBS), os cortes foram incubados com a anticorpo secundário (diluído 1:100 em solução bloqueadora), durante 4 h no escuro. Seguiram-se duas lavagens, durante 5 minutos cada, com PBS e duas lavagens, durante 5 minutos cada, com água bidestilada.

A celulose foi localizada nas paredes celulares através da incubação com o corante fluorescente Calcofluor (Fluorescent Brightener 28 filtrado a 0.01%; Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.), durante 5 minutos, a que se seguiram duas lavagens com água bidestilada. As lâminas foram montadas com meio de montagem (Sigma Diagnostics, St. Louis, U.S.A.). Nos controlos omitiu-se o tratamento com o anticorpo primário. Foi verificada a inexistência de autofluorescência.

As observações foram feitas com um microscópio de epifluorescência Leica DM LB equipado com uma lâmpada de 50W de vapor de mercúrio e filtros apropriados para luz azul e luz ultravioleta. Foram obtidas fotografias das preparações com um filme 400 ASA.

2.3.2. Em microscopia electrónica

A partir dos blocos foram obtidos cortes ultra-finos do material biológico, utilizando uma faca de diamante. Os cortes seriados do mesmo bloco foram recolhidos em grelhas de níquel com membrana de formvar e carbono. As grelhas foram então tratadas, durante 10 minutos, com uma solução bloqueadora constituída por 20% de soro fetal de bovino em TBS⁵. De seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (JIM8 e JIM13) diluído 1:5 na solução bloqueadora, durante 17h à temperatura ambiente. Depois as grelhas foram lavadas com solução bloqueadora (5 vezes, 10 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-rato conjugada com ouro coloidal (10 nm) diluído 1:25, durante 1h, à temperatura ambiente. As grelhas foram então lavadas com solução bloqueadora (5 vezes, 10 minutos) e com água bidestiladas (5 vezes, 10 minutos). Contrastaram-se com acetato de uranilo (5 minutos) e com citrato de chumbo (5 minutos). No final de cada contrastação as grelhas foram lavadas com água bidestilada.

⁴PBS – 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 1,44% Na₂HPO₄, 0,024% K₂HPO₄ em 100mL de água a pH 7,4

⁵TBS - 0,8% NaCl; 0,002% KCl; 0,3% Trismabase em 100 mL de H₂O a pH 7,4

Foram efectuados, para cada caso, experiências de controlo em que foi omitido o anticorpo primário. As observações foram feitas num microscópio ZEISS 10 CR e as fotografias obtidas com filme Agfa-Scientia.

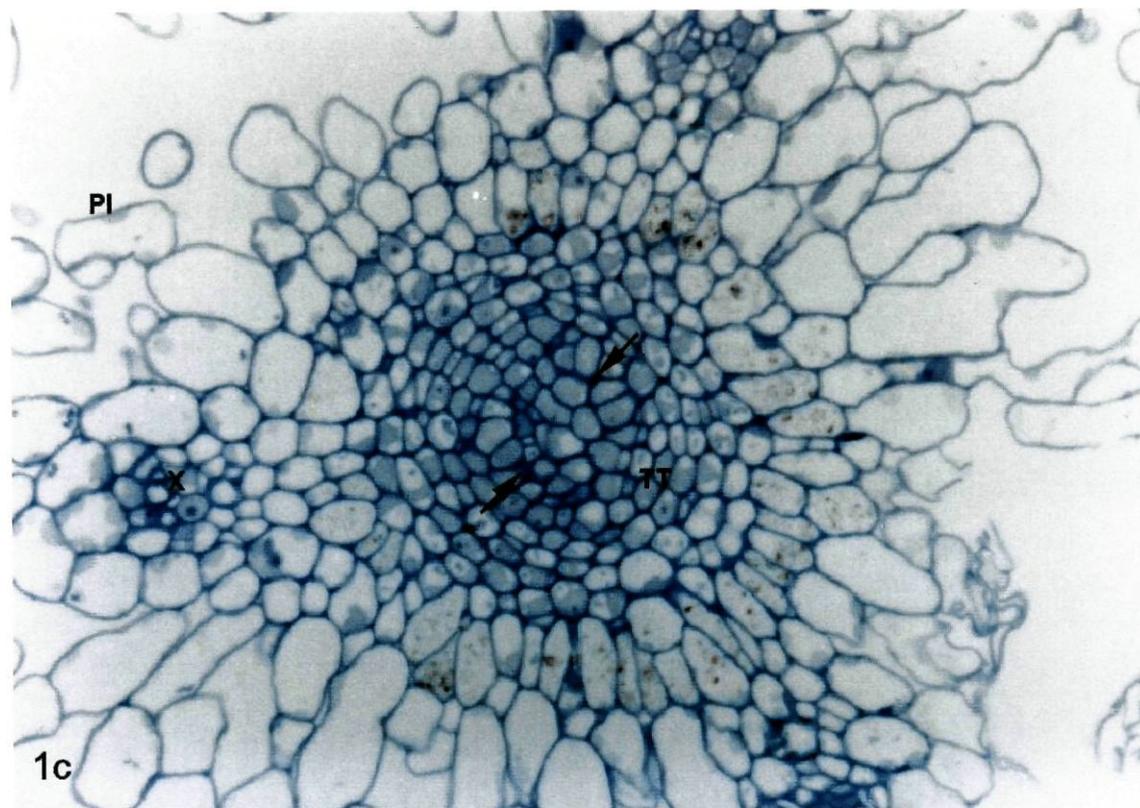
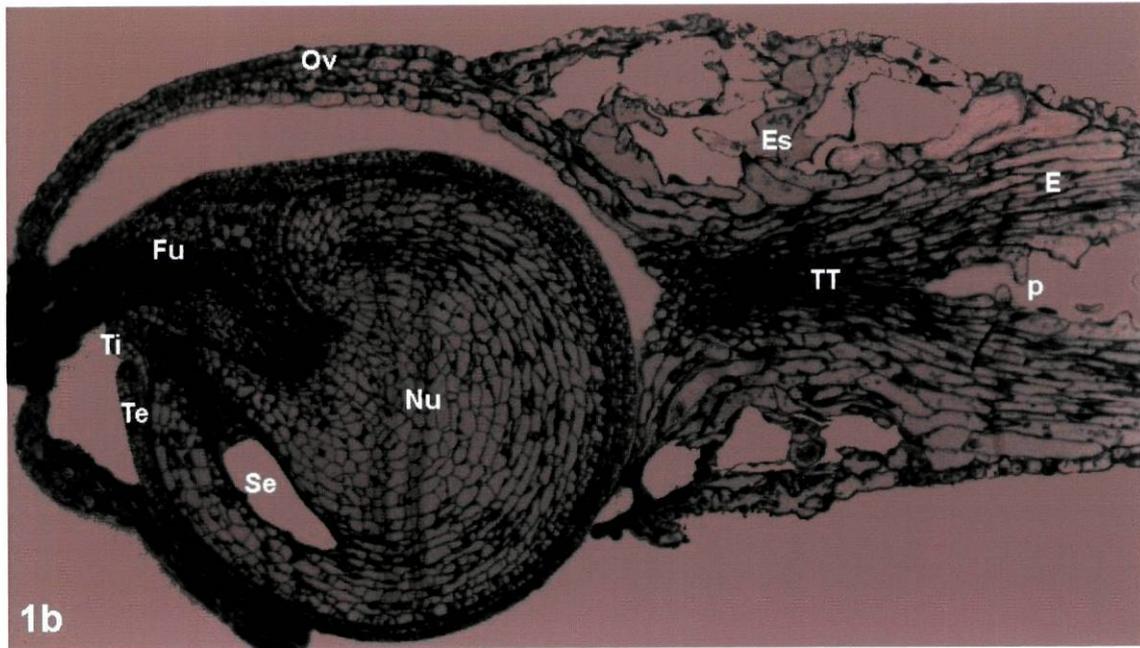
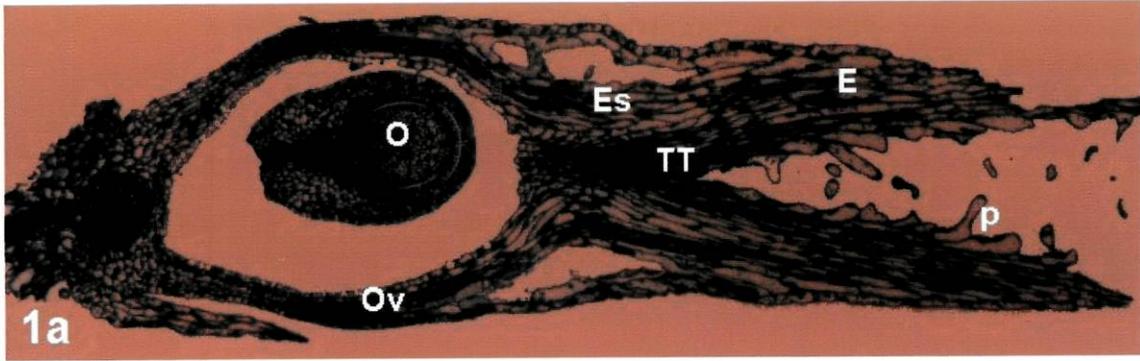
3. RESULTADOS

Neste estudo foram utilizados os anticorpos monoclonais (AcM) MAC207, JIM8 e JIM13 para localizar diferentes epítomos das PAGs nos tecidos do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus*, através de microscopia óptica e microscopia electrónica de transmissão (MET). Os AcM MAC207, JIM13 e JIM8 reconhecem, respectivamente, epítomos que contêm L-arabinose e D-ácido glucurónico e que se encontram associados com a face extracelular da membrana plasmática das células vegetais (Pennell et al. 1989); epítomos competitivos com o trissacarídeo β -D-Glc ρ UA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpUA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha (Knox et al. 1991) e um sub-grupo de PAGs presentes na membrana plasmática (Pennell et al. 1991).

Em microscopia óptica a marcação dos anticorpos primários foi reconhecida pela coloração verde-amarelada dada pelo anticorpo secundário ligado ao fluorocromo FICT (fluoresceína iso-tiocianato). Em microscopia electrónica a marcação dos anticorpos primários foi reconhecida pela presença do anticorpo secundário ligado a ouro coloidal de 10 nm.

3.1. Descrição geral da estrutura do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus*

A estrutura geral do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus* é mostrada na fig. 1. A figura ilustra a organização característica das diferentes estruturas do pistilo, nomeadamente o estigma, o estilete e o ovário com um óvulo no seu interior. Nas figuras 1a e 1b é possível observar dois dos três lóbulos constituintes do longo estigma, que se encontram cobertos em algumas zonas por papilas. O estilete é curto e do tipo sólido, sendo constituído, do exterior para o interior, por uma epiderme, por parênquima lacunoso e por uma zona central de tecido de transmissão. As células do tecido de transmissão são poliédricas com pequenos espaços intercelulares (Fig. 1c). A cavidade unilocular do ovário contém um só óvulo. Na figura 1b é possível observar que este óvulo se encontra ligado à placenta por um largo funículo e é anátropo. O óvulo é crassinucelado e o nucelo aparece rodeado por dois tegumentos (interno e externo) bem desenvolvidos, sendo a zona micropilar constituída apenas pelo tegumento interno. O saco embrionário, monospórico do tipo *Polygonum* já está desenvolvido.



Figs. 1a e 1b- Secções longitudinais do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus*, corados com Azur A/Azur B, onde se pode distinguir: o estigma (E), cujos dois lóbulos visíveis estão cobertos por papilas estigmáticas (p); o estilete do tipo sólido (Es) com o tecido de transmissão (TT) na zona central, revelando células com um citoplasma mais denso do que o das células de parênquima que as rodeiam e o ovário (Ov) com um único óvulo (O) no seu interior. 200x. Na **Fig. 1b.** ilustra-se um óvulo anátropo com nucelo (Nu), os tegumentos interno (Ti) e externo (Te) e a ligação do óvulo à placenta através do funículo (Fu). Distingue-se no interior do óvulo a cavidade do saco embrionário (Se). **Fig. 1c** – Secção transversal do pistilo ao nível do estilete, onde é possível observar o tecido de transmissão (TT) numa posição central rodeado por parênquima lacunoso (PI). O tecido de transmissão é formado por células com uma forma mais ou menos poliédrica e deixando espaços intercelulares (setas) entre elas. É ainda possível observar feixes de xilema (x). 1000x.

3.2. Imunolocalização das PAGs no pistilo, em microscopia óptica

A imunolocalização dos epítomos reconhecidos pelos AcM MAC207, JIM8 e JIM13, em microscopia óptica, teve por principal objectivo verificar a sua distribuição tecidular e celular. Os controlos nunca apresentaram qualquer marcação.

Os epítomos das PAGs reconhecidos pelos AcM JIM8, JIM13 e MAC207 aparecem localizados em todas as células do estigma (Fig.2). Nestas células a marcação é muito forte à superfície (Figs. 2a, 2c, 2e), ocorrendo também marcação em alguns espaços intercelulares. Nas papilas a marcação nem sempre surge homogénea, sendo, por vezes, mais intensa num dos lados da célula do que no outro (Figs. 2b, 2d, 2f).

No estilete os epítomos reconhecidos pelos AcM MAC207 e JIM13 foram detectados em todas as células, inclusive nas células do tecido de transmissão onde apresentam uma marcação muito forte à superfície, sendo também observável alguma marcação no interior das células (Figs. 3b, 3c). Já no caso do AcM JIM8 a marcação aparece na epiderme e no parênquima lacunoso estando completamente ausente das células do tecido de transmissão (Figs. 3a e 5).

No ovário, com o AcM JIM8, surge uma marcação à superfície de algumas células, e uma marcação selectiva em alguns conteúdos celulares (Figs. 4a e 5). Foi encontrado o mesmo padrão de marcação para os AcM JIM13 (Fig. 4b) e MAC207 (Fig. 4c), embora com este último a marcação seja mais fraca.

Como foi referido, nestas três estruturas do pistilo verifica-se uma marcação intensa na superfície de algumas células, com os AcM utilizados. No entanto, as observações de microscopia óptica não permitem distinguir o local exacto de marcação à superfície das células, isto é, se a marcação aparece associada à parede celular ou à membrana plasmática.

O funículo, zona que liga o óvulo à placenta (Figs. 6a e 7a), evidencia uma marcação forte com o AcM JIM8 (Fig. 7b), mas contrariamente às outras células do pistilo em que a marcação é sobretudo evidente na superfície celular, aqui a marcação surge associada principalmente a corpos multivesiculares que se encontram no interior de algumas células. Existe alguma marcação na superfície celular mas é relativamente fraca. Foi encontrado o mesmo padrão de marcação utilizando os AcM MAC207 (Fig. 7c) e JIM13 (Figs. 6b), embora com estes dois AcM a marcação na superfície celular seja praticamente inexistente.

A figura 8a mostra parte da estrutura de um óvulo de *Amaranthus hypochondriacus* onde é visível o nucelo bem desenvolvido, envolvido pelos tegumentos interno e externo, e a cavidade do saco embrionário. O tegumento externo está ausente da zona micropilar.

No polo micropilar do saco embrionário (Figs. 8b e 12a) é possível observar a oosfera, que se estende mais ligeiramente para a extremidade calázica, e ao seu lado uma das duas sinérgidas mais próxima da extremidade micropilar. Na fig. 8b é possível verificar que a oosfera está completamente envolvida pela parede celular, e que esta estrutura está ausente na extremidade calázica da sinérgida. Em contraste, na figura 12a é possível observar uma secção de um outro saco embrionário, mas neste caso a parede celular encontra-se completamente ausente da extremidade calázica da oosfera e da sinérgida.

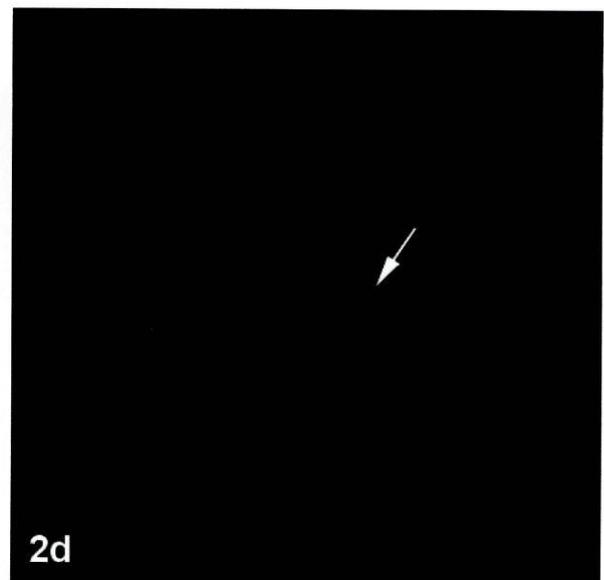
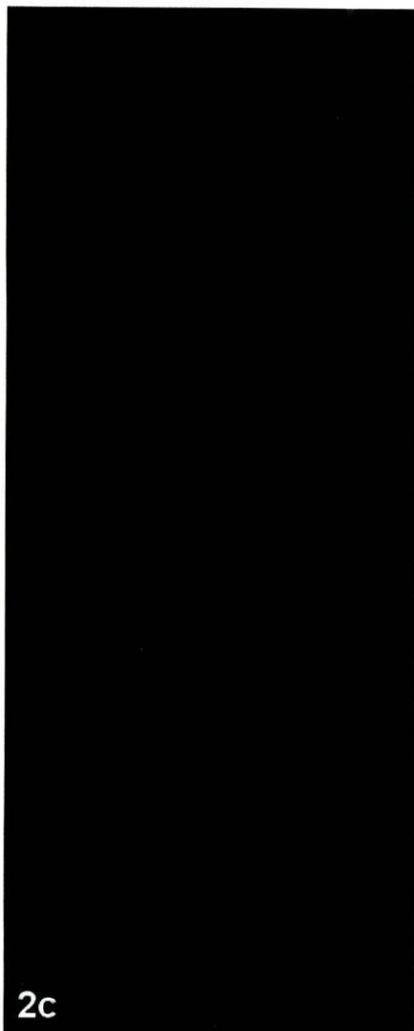
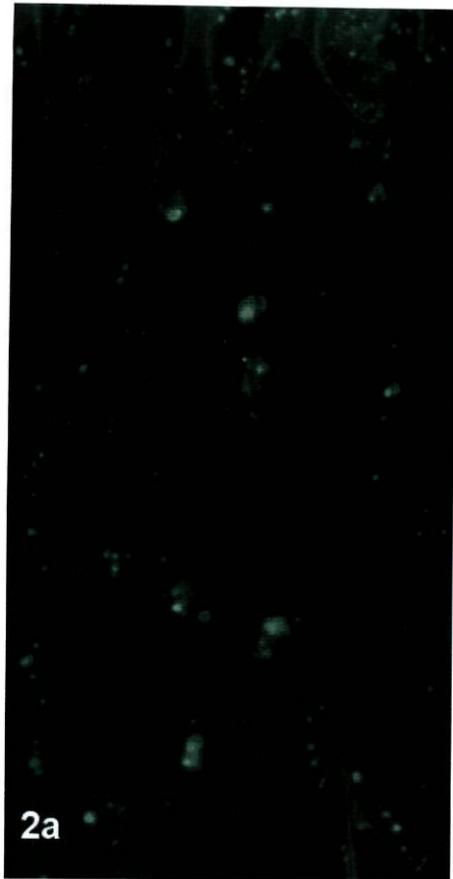
Uma característica distintiva das sinérgidas é a presença, na extremidade micropilar, de um aparelho filiforme (Figs. 8b e 12a). Esta estrutura consiste numa grande quantidade de projecções da parede celular que se estendem profundamente para o interior da célula, aumentando grandemente a superfície da membrana plasmática nessa área. Esta estrutura contacta com a região do nucelo micropilar.

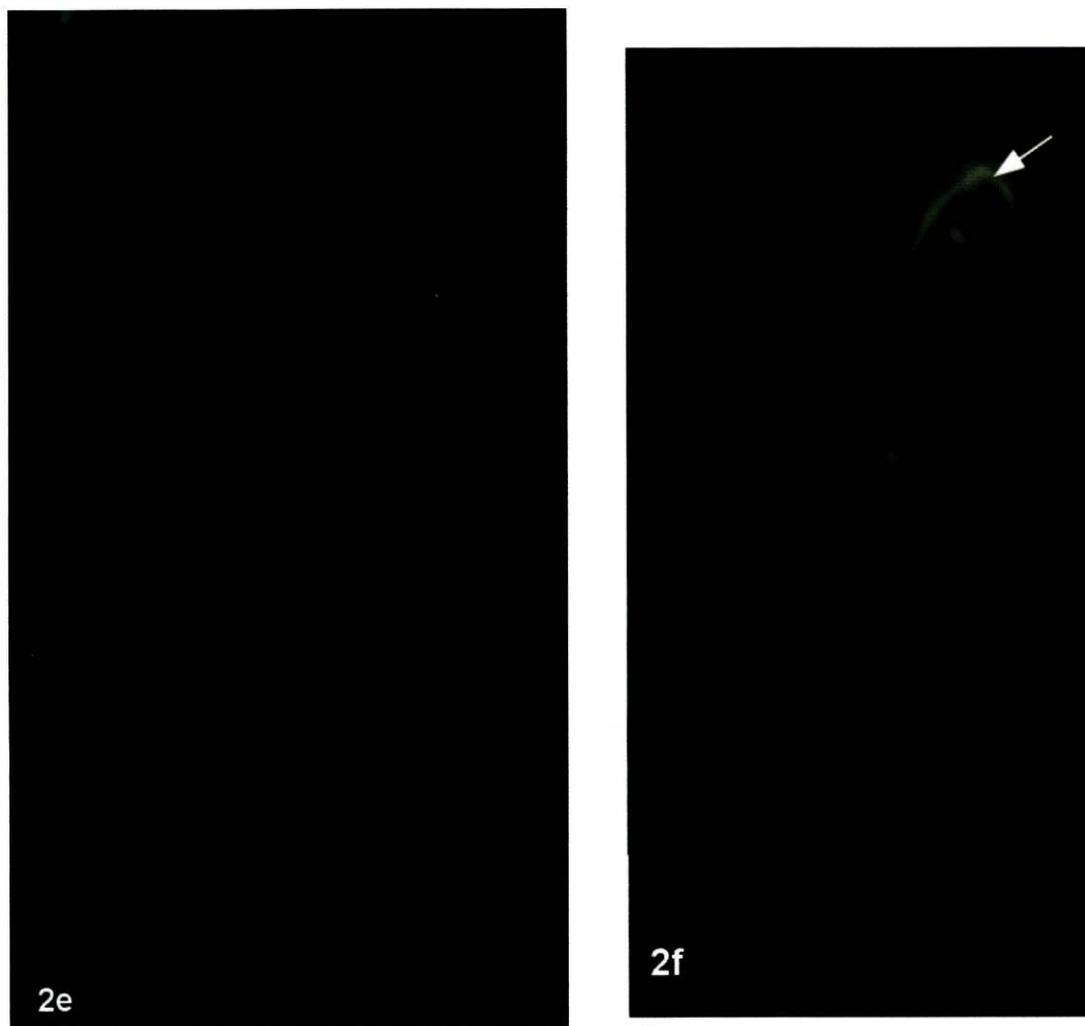
Através da análise das figuras 9a e 10 verifica-se que os anticorpos monoclonais JIM8 e JIM13, respectivamente, marcam algumas células dos tegumentos ao nível da superfície celular, sendo esta marcação mais evidente com o AcM JIM13. As células do

nucelo praticamente não apresentam marcação com exceção de algumas células do nucelo micropilar. Esta marcação selectiva no tecido nucelar é muito evidente com os dois anticorpos monoclonais JIM13 (Fig. 9c) e JIM8 (Fig.12b). O epítipo é expresso nas células isodiamétricas que estão alinhadas com o micrópilo. A marcação estende-se ao aparelho filiforme (Figs. 9b, 9c e 12b) bem como à parede das sinérgidas e da oosfera que aparece fortemente marcada. Há ainda a salientar a forte marcação em toda a parede do saco embrionário, nomeadamente nas invaginações da parede da célula central que ocupa praticamente toda a zona calázica do saco embrionário. Na célula central é ainda observável a forte marcação de alguns conteúdos celulares (Figs. 9b, 9c e 12b) com ambos os anticorpos.

Na figura 12a é de salientar a existência de um espaço entre o saco embrionário e o tecido nucelar, espaço este que aparece fortemente marcado como AcM JIM8 (Fig. 12b).

Na fig. 11 é possível observar um corte transversal de um óvulo marcado com o AcM JIM13, onde se distingue claramente que este AcM marca as células gametofíticas, mas não marca as células esporofíticas envolventes e que constituem o nucelo.





Figs. 2 a 6, 7b, 7c, 9, 10, 11 e 12b – Imagens de microscopia de fluorescência de porções de estruturas do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus* L. marcadas com os AcM JIM8, JIM13 e MAC207. O anticorpo primário foi ligado a um anticorpo secundário conjugado com FITC, aparecendo a marcação com uma coloração amarelo - esverdeado.

Fig. 2 – Imunolocalização das PAGs nas células do estigma e nas papilas com os AcM JIM8 (Figs. 2a, 2b), JIM13 (Figs. 2c, 2d) e MAC207 (Figs. 2e, 2f). **Figs. 2a, c, e** - A marcação é evidente à superfície de todas as células estigmáticas. 1000x. **Figs. 2b, d, f** - As papilas aparecem intensamente marcadas à superfície, sendo esta marcação mais intensa num dos lados da célula (setas). 1000x.

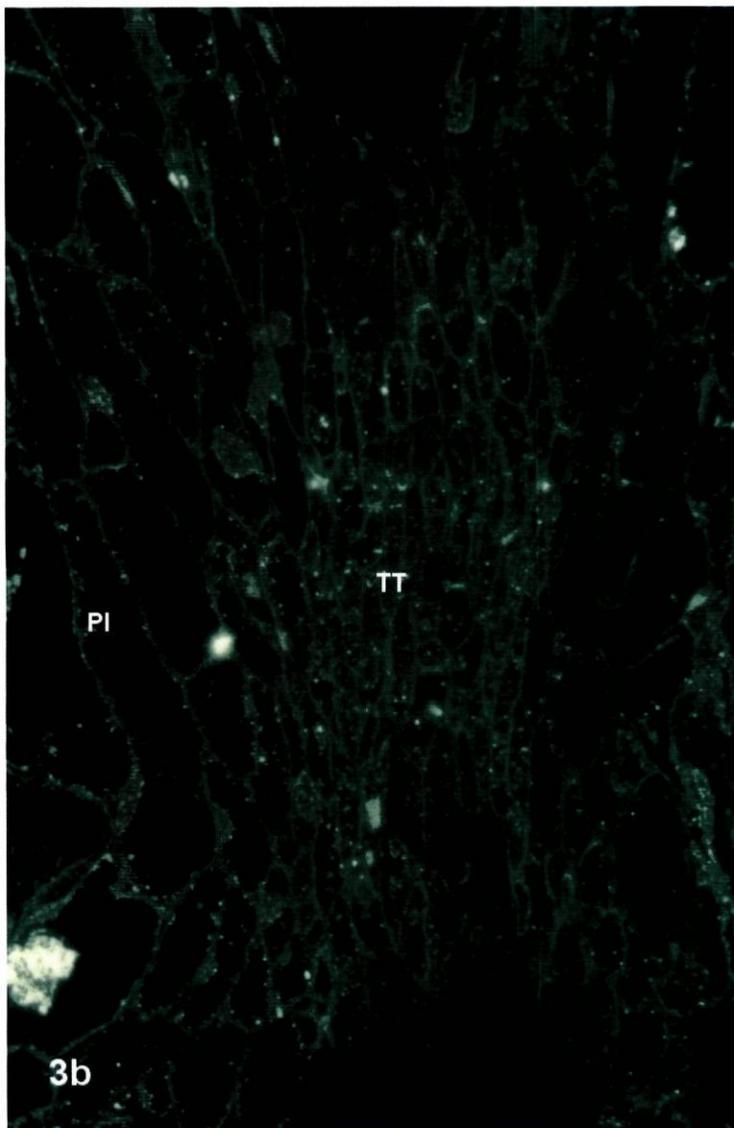
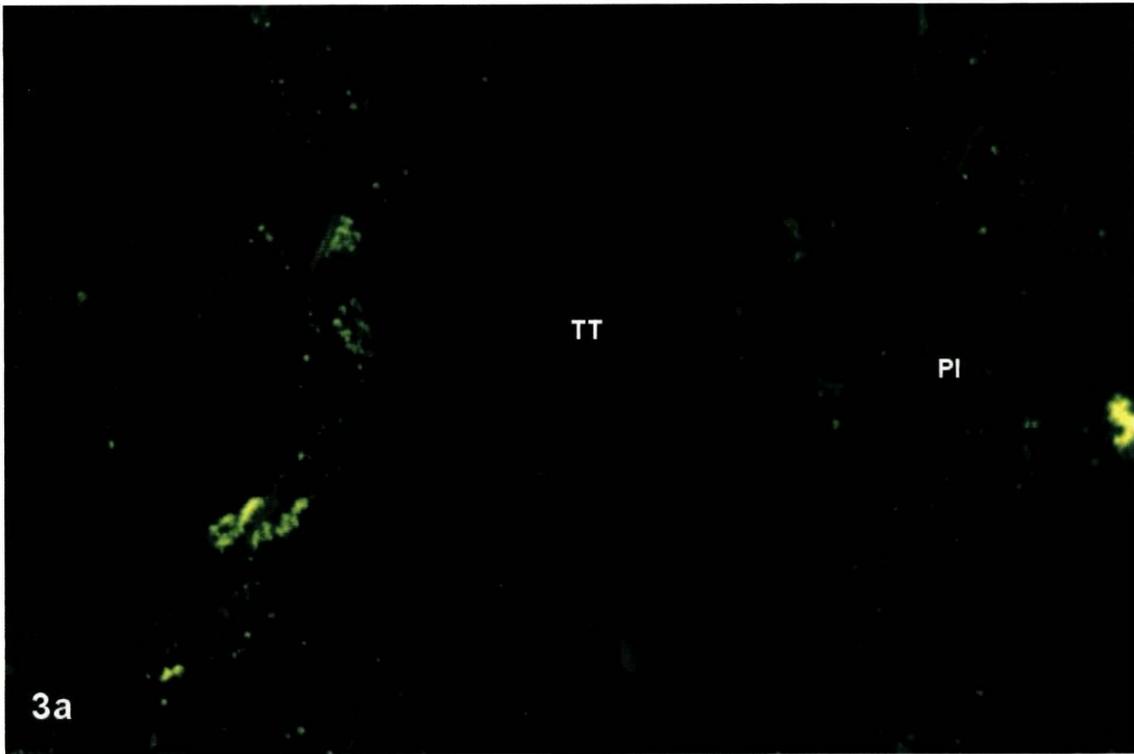




Fig. 3 - Imunolocalização das PAGs no estilete com os AcM JIM8 (Fig. 3a), JIM13 (Fig. 3b) e MAC207 (Fig. 3c). **Fig. 3a** - Com o AcM JIM8 a marcação é evidente à superfície das células do parênquima lacunoso (PI) mas está completamente ausente das células do tecido de transmissão (TT). 1000x. **Figs. 3b e 3c** - Os epítomos reconhecidos pelos AcM JIM13 e MAC207 aparecem à superfície de todas as células do estilete, inclusive nas células do tecido de transmissão. Ao nível do tecido de transmissão também é patente alguma marcação no interior das células. PI – parênquima lacunoso; TT – tecido de transmissão. 1000x.

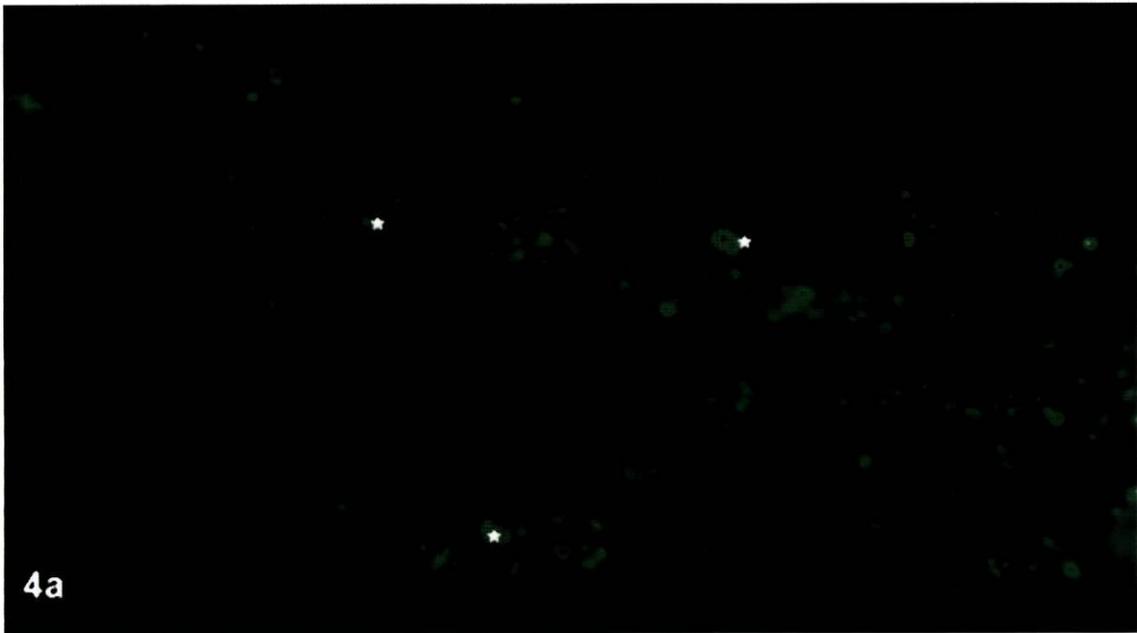




Fig. 4 - Imunolocalização das PAGs na parede do ovário com os AcM JIM8 (Fig. 4a), JIM13 (Fig. 4b) e MAC207 (Fig.4c). Observa-se marcação à superfície de algumas células e também aparece uma marcação selectiva em alguns conteúdos celulares (exemplos realçados com *). A marcação com o AcM MAC207 é mais fraca do que com os outros dois AcM. 1000x.

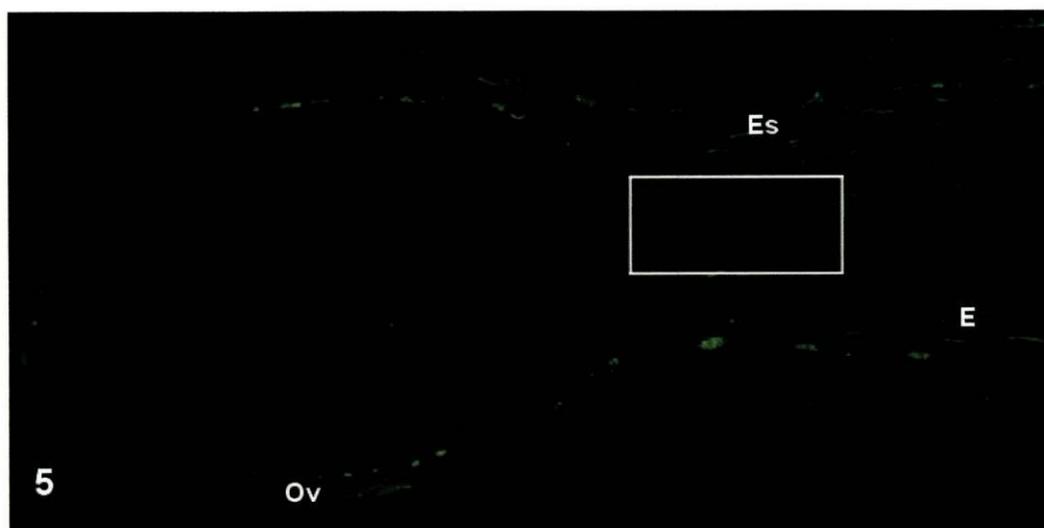


Fig. 5 – Imunolocalização das PAGs no pistilo com o AcM JIM8. As células da parede do ovário (Ov) aparecem marcadas, bem como as células da epiderme e do parênquima lacunoso do estilete (Es); a marcação estende-se às células do estigma (E). De notar que na parede do ovário a marcação não é homogénea, aparecendo uma marcação mais forte em alguns conteúdos celulares. As células do tecido de transmissão não apresentam qualquer marcação (zona envolvida pelo rectângulo). 100x.

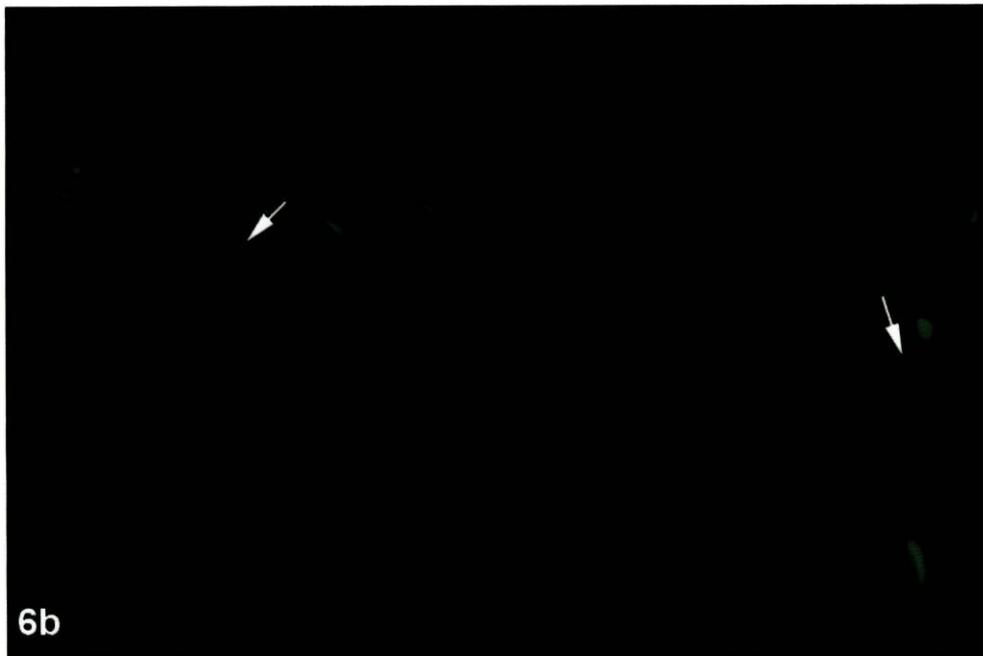
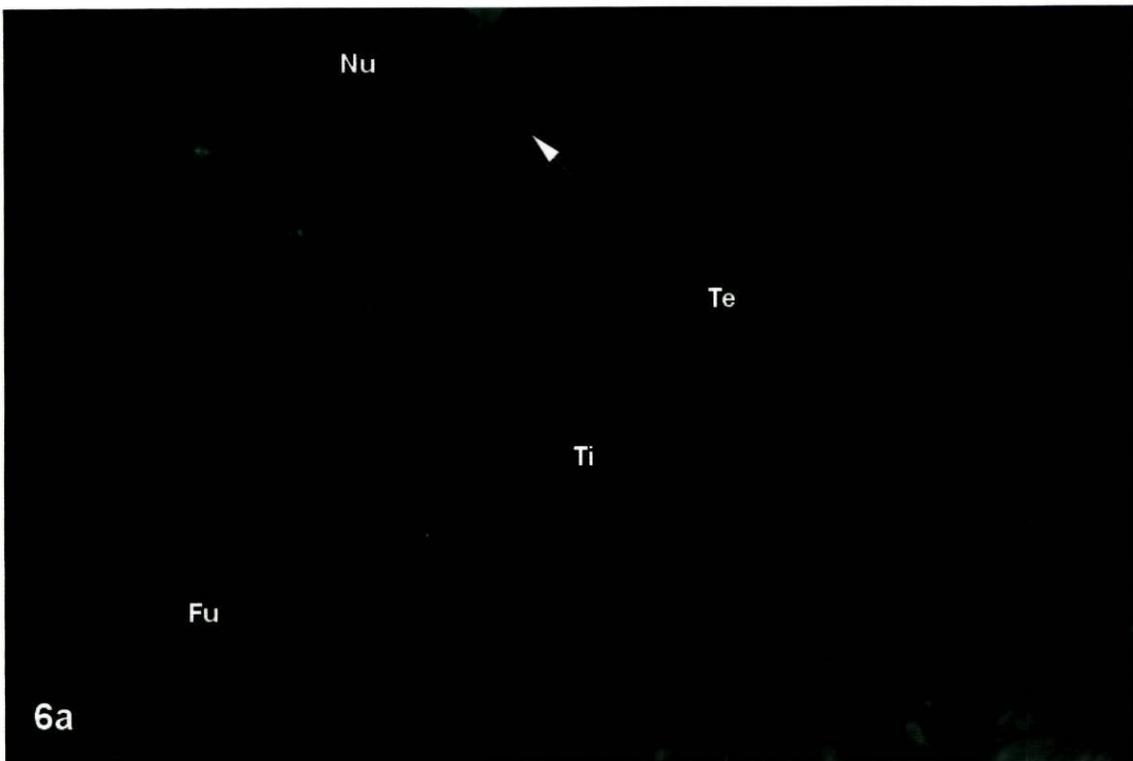
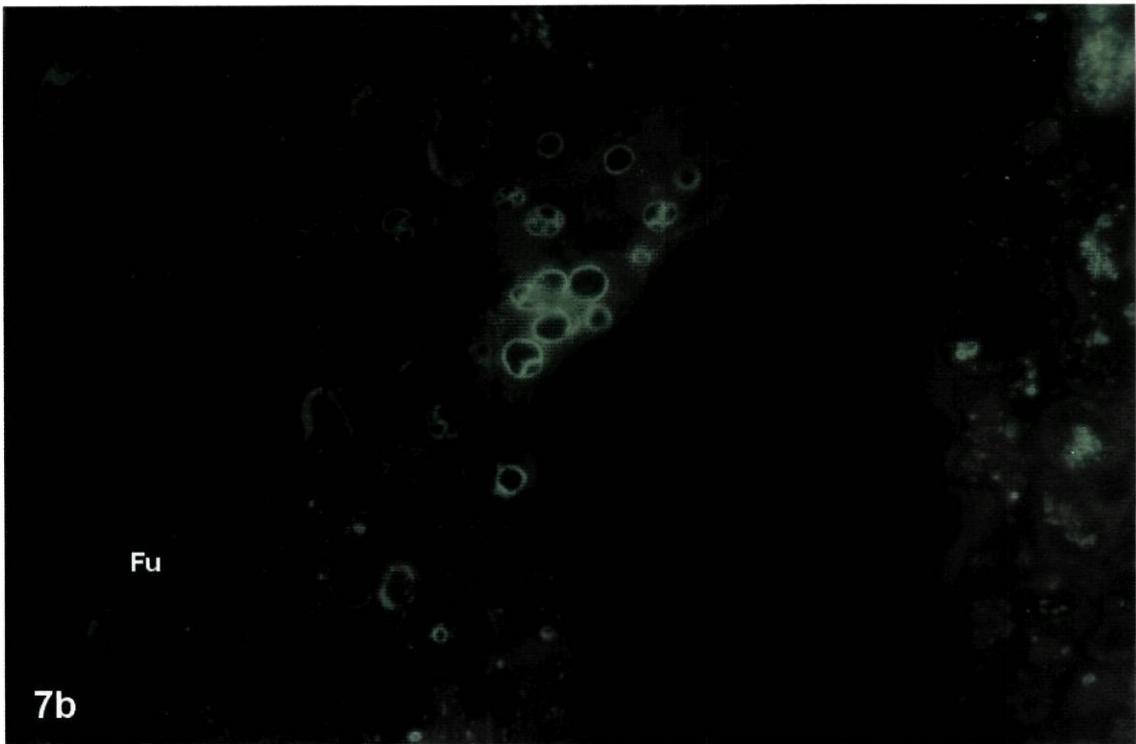
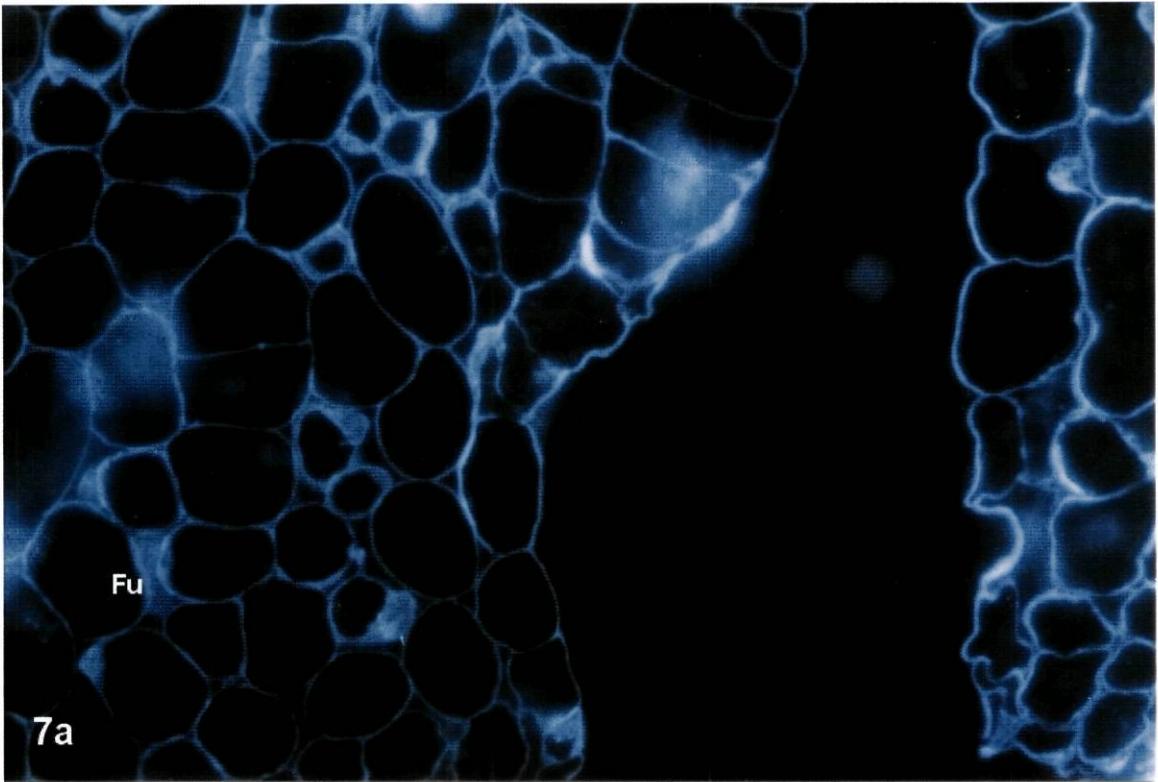


Fig. 6a – Secção longitudinal de um óvulo marcado com o AcM JIM13 onde se observa a ligação do óvulo à placenta através do funículo (Fu). É de notar a marcação selectiva do nucelo micropilar (seta). Nu – nucelo; Te – tegumento externo; Ti – tegumento interno. 400x. **Fig. 6b** – Imunolocalização das PAGs numa secção do funículo com o AcM JIM 13. A marcação aparece associada a corpos multivesiculares (exemplos realçados por setas) que se encontram no interior das células. 1000x.



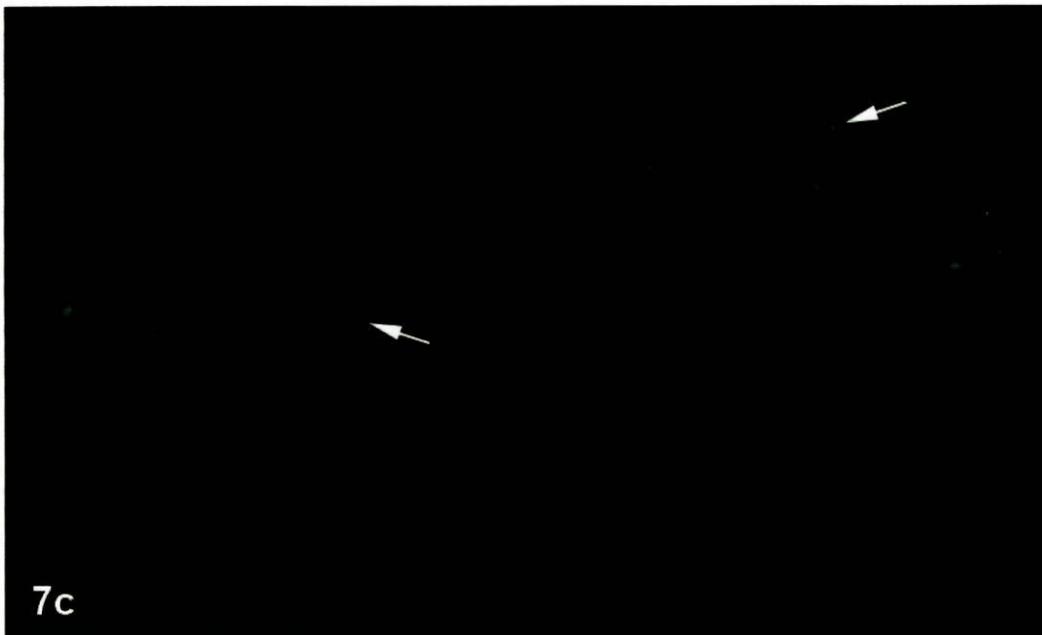


Fig. 7a – Imagem de microscopia de fluorescência do funículo de *Amaranthus hypochondriacus* corado com calcofluor. O calcofluor é um corante específico das paredes celulares aparecendo com uma fluorescência azul. 1000x. **Figs. 7b, 7c** – Imunolocalização das PAGs numa secção do funículo com os AcM JIM8 (Fig. 7b) e MAC207 (Fig. 7c). A marcação surge associada a corpos multivesiculares (setas) que se encontram no interior das células. Com o AcM JIM8 aparece alguma marcação na superfície celular mas é relativamente fraca. 1000x.

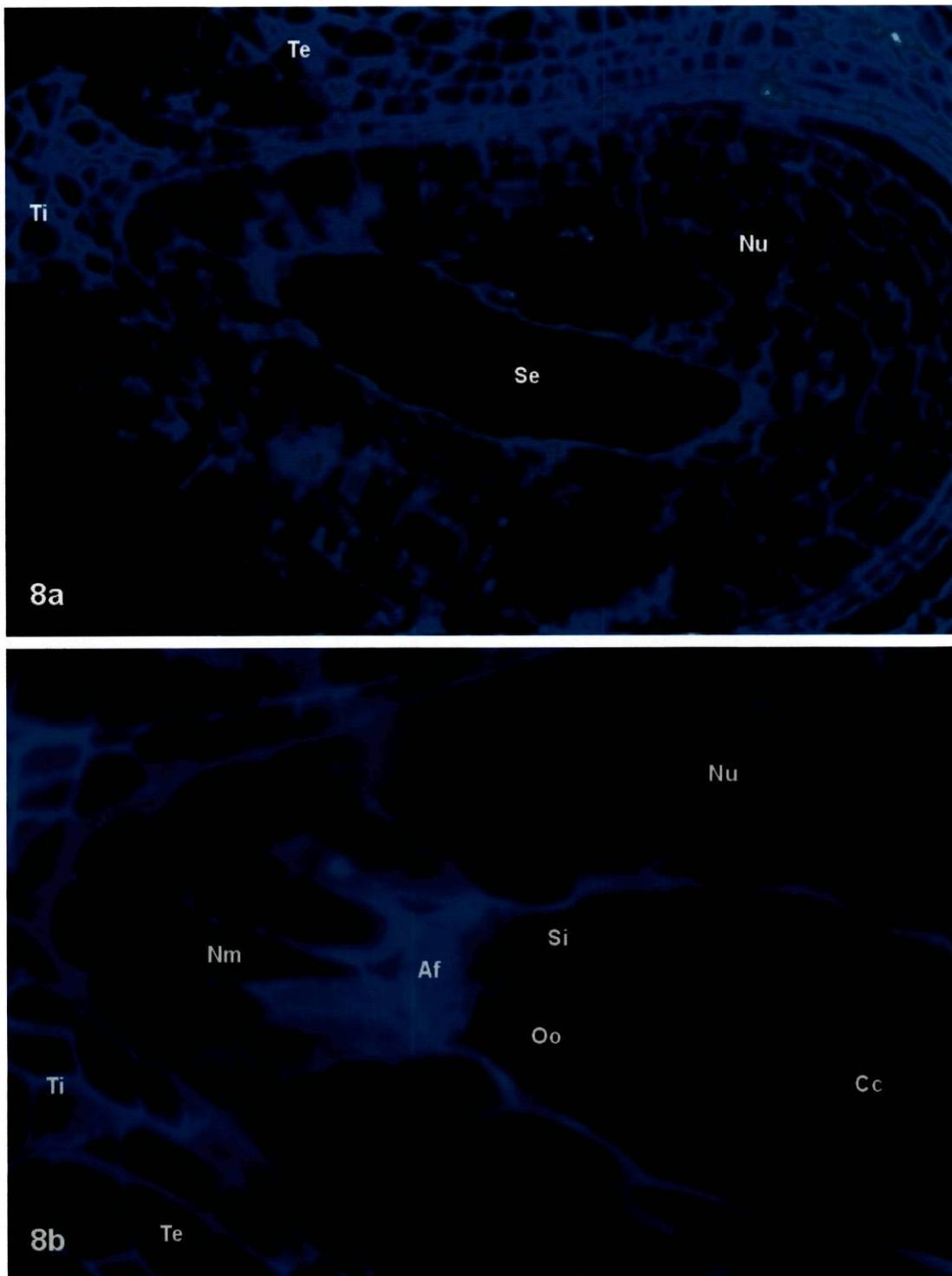
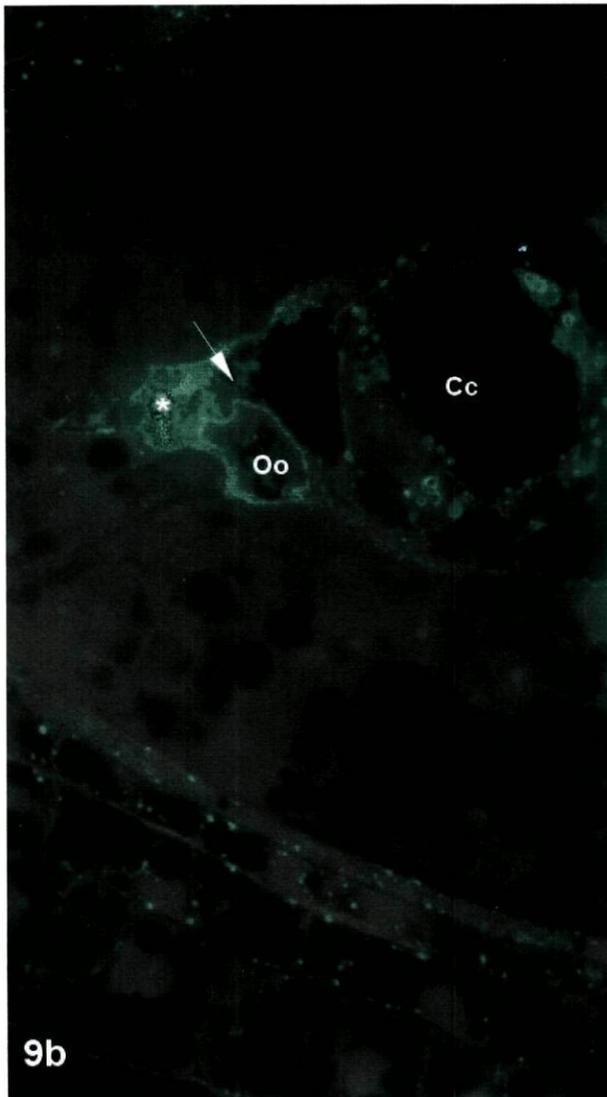
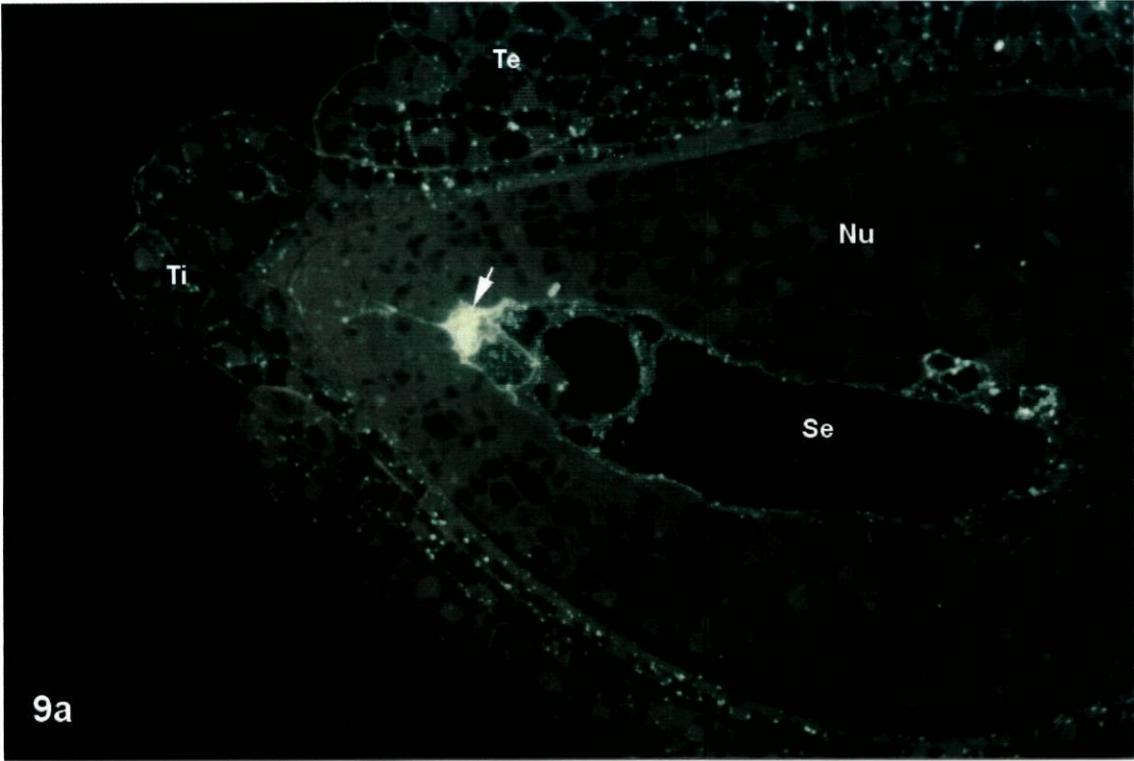


Fig. 8 – Imagens de microscopia de fluorescência de secções longitudinais do óvulo de *Amaranthus hypochondriacus* coradas com calcofluor. **Fig. 8a** - Óvulo com tegumento externo (Te), tegumento interno (Ti) e nucelo (Nu). O tegumento externo não existe na zona micropilar. Na zona central é visível o saco embrionário (Se). 400x. **Fig. 8b** – Ampliação da zona do saco embrionário, onde é visível a oosfera (Oo) envolvida pela parede celular e uma sinérgida (Si) onde está ausente a parede celular na extremidade caláptica. O aparelho filiforme surge intensamente corado. Ti – tegumento interno; Te – tegumento externo; Nu – nucelo; Nm – nucelo micropilar; Cc – célula central. 1000x.



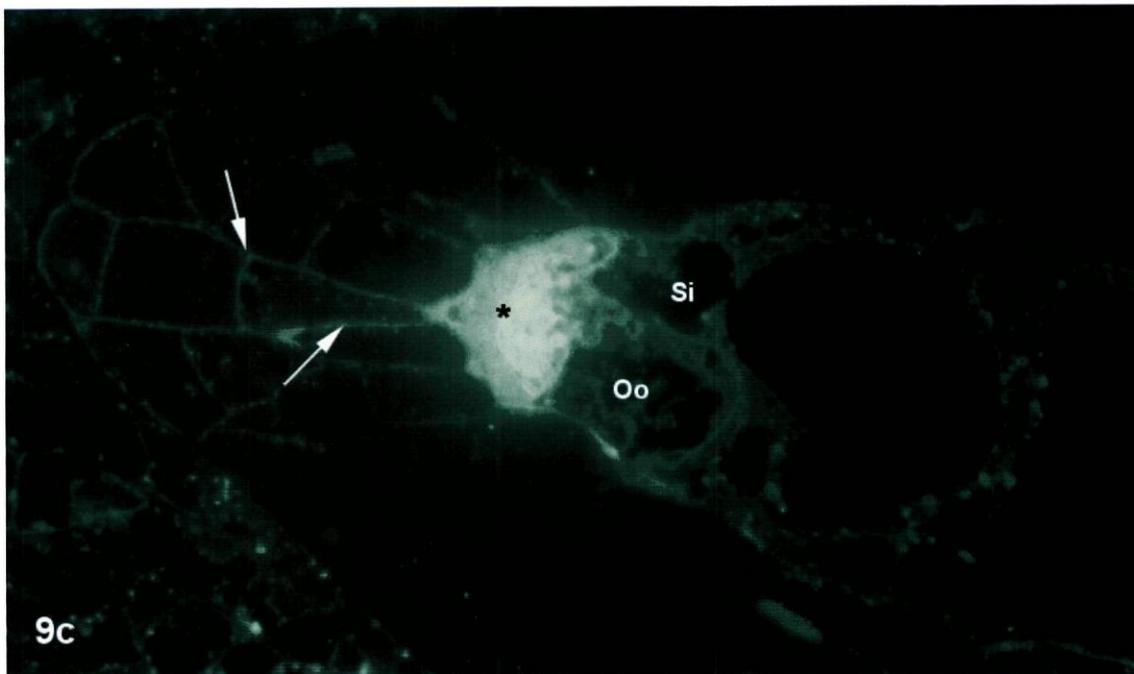


Fig. 9 – Imunolocalização das PAGs no óvulo, ilustrado na figura 8, com os AcM JIM8 (Figs. 9a, b) e JIM13 (Fig. 9c). **Fig. 9a** – A marcação aparece na superfície celular de algumas células dos tegumentos interno (Ti) e externo (Te) e está praticamente ausente das células do tecido nucelar (Nu) com exceção de algumas células da zona micropilar. Aparece uma forte marcação no aparelho filiforme (seta) e na parede de todo o saco embrionário (Se). 400x. **Fig. 9b** – Ampliação de parte do saco embrionário marcado com JIM8. Marcação muito intensa no aparelho filiforme (*) e na parede da sinérgida (seta) e da oosfera (Oo). Há ainda uma marcação muito forte em alguns conteúdos celulares da célula central (Cc). 1000x. **Fig. 9c** – Ampliação de parte do saco embrionário marcado com JIM13. No tecido nucelar a marcação surge selectivamente na região do nucelo micropilar (setas), que se estende ao aparelho filiforme (*). Observa-se ainda marcação nas paredes da sinérgida (Si), da oosfera (Oo) e da célula central (Cc). Nesta última ainda observamos marcação em alguns conteúdos celulares. 1000x.

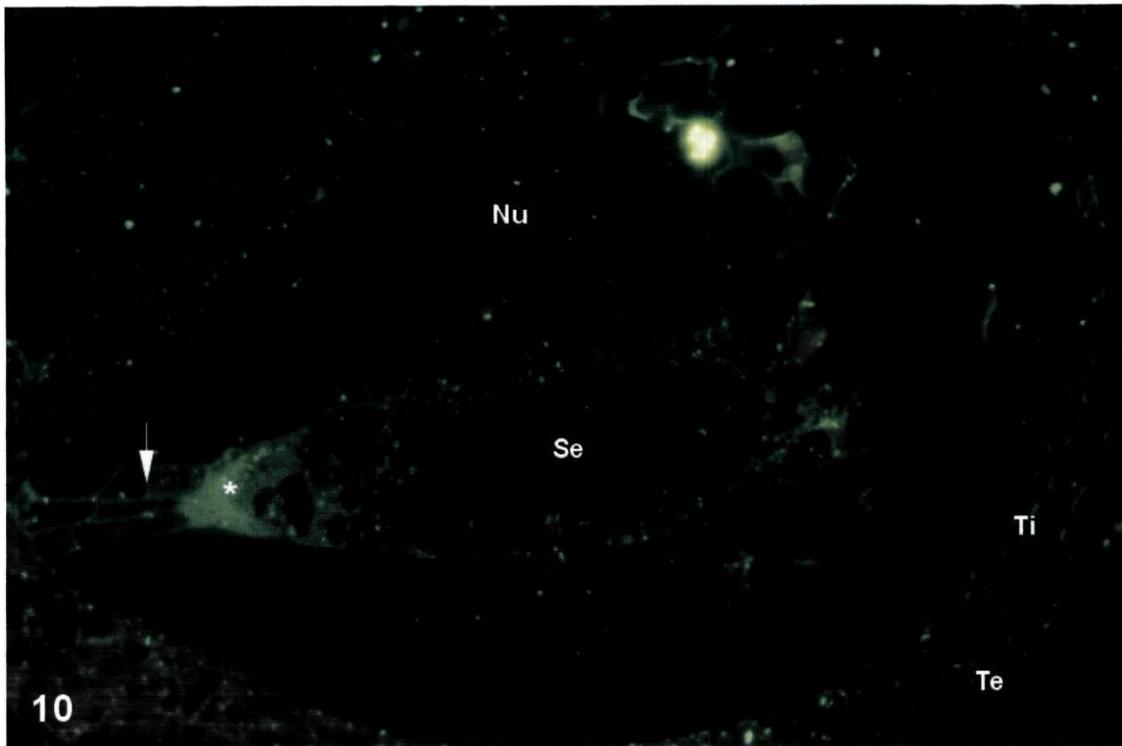


Fig. 10 – Óvulo com tegumento externo (Te), interno (Ti), nucelo (Nu) e saco embrionário (Se) marcado com o AcM JIM13. Verifica-se a ausência de marcação em praticamente todas as células do nucelo, sendo, no entanto, patente uma marcação muito forte na zona do nucelo micropilar (seta) que se estende ao aparelho filiforme (*). Toda a parede do saco embrionário também está intensamente marcada. Os tegumentos (interno e externo) encontram-se igualmente marcados. 400x.

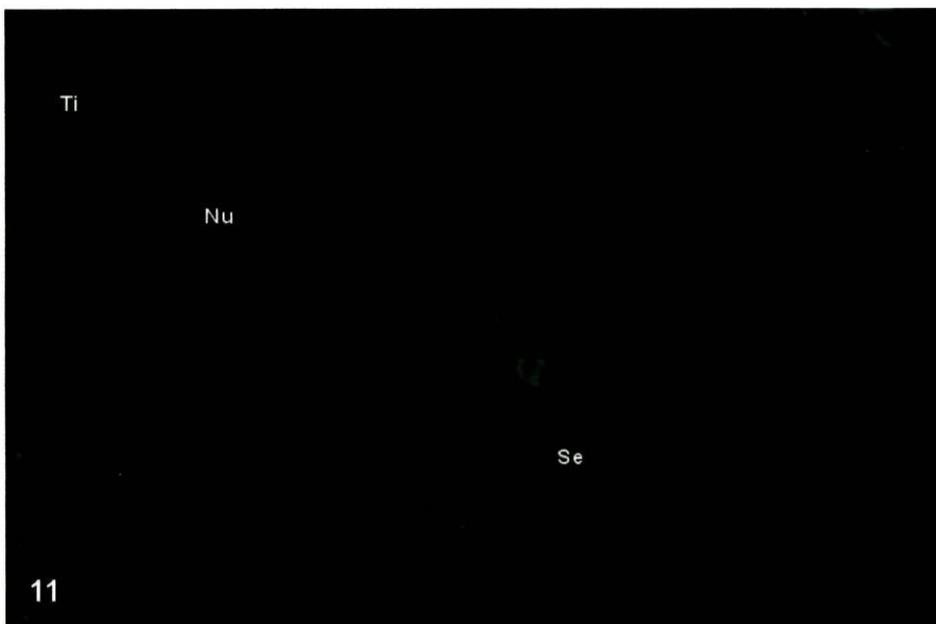


Fig. 11 - Imunolocalização das PAGs numa secção transversal do óvulo com o AcM JIM13. Na zona central onde se desenvolve o saco embrionário (Se) a marcação é muito forte, contrastando com as células do nucelo (Nu) que o rodeiam e que não apresentam qualquer marcação. São ainda visíveis algumas células do tegumento interno (Ti) que aparecem ligeiramente marcadas. 1000x.

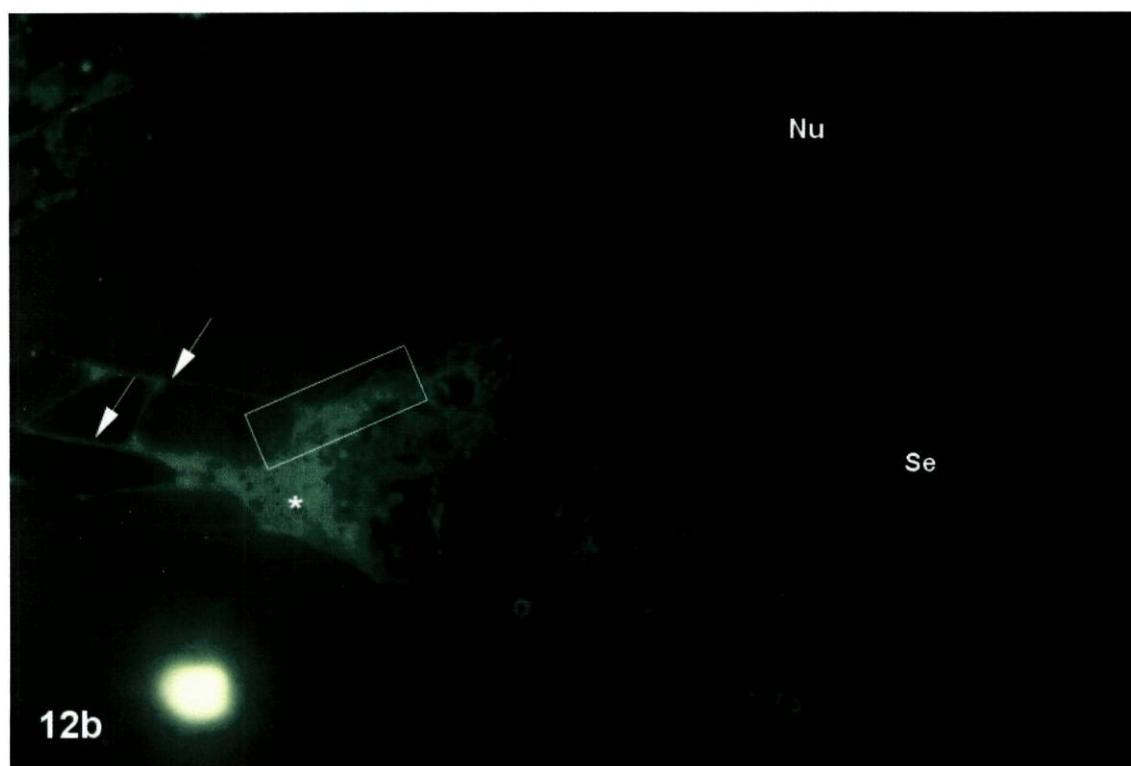
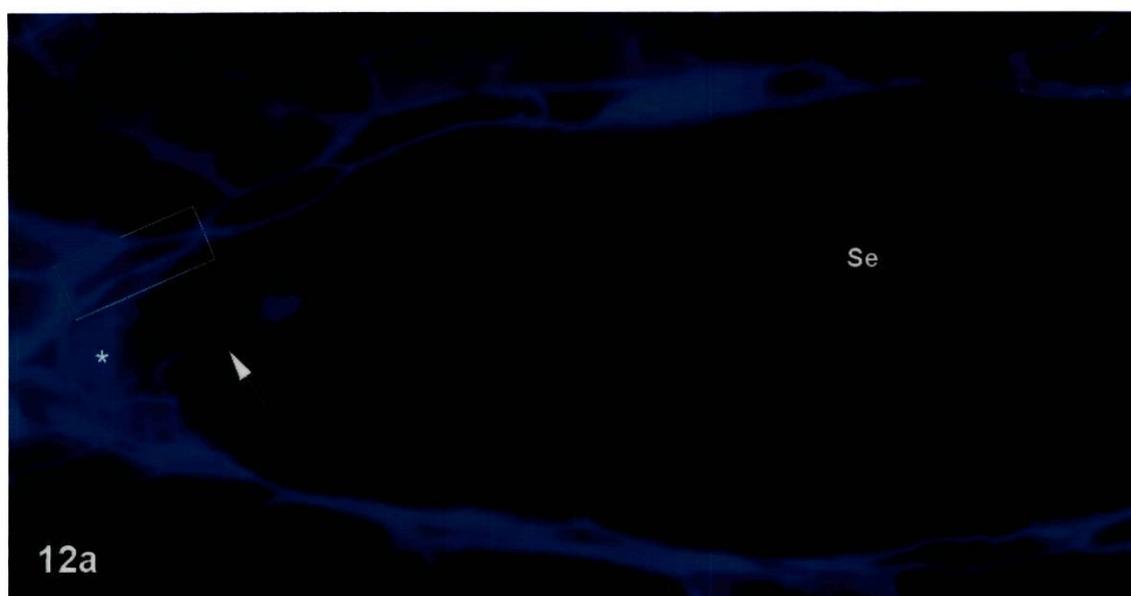


Fig. 12a – Imagem de microscopia de fluorescência de uma porção do óvulo, ilustrado na figura 10, com o saco embrionário (Se) corado com calcofluor. No saco embrionário é visível a parede celular entre a oosfera e a sinérgida (seta). É de notar a ausência de parede na extremidade calázica destas células. É também bem visível o aparelho filiforme (*). 1000x. **Fig. 12b** – Secção da mesma flor marcada com o AcM JIM8, apresentando uma forte marcação no nucelo micropilar (setas), no aparelho filiforme (*) e em alguns conteúdos celulares da célula central. Salienta-se a zona rectangular que em **12a** está preenchida por um aparente espaço entre o saco embrionário e as células do nucelo, espaço esse intensamente marcado com o AcM JIM8 (**12b**). Se – saco embrionário; Nu – nucelo. 1000x.

3.3. Imunolocalização das PAGs, em microscopia electrónica

A localização subcelular, nos tecidos do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus*, dos epítomos das PAGs reconhecidos pelos AcM JIM8 e JIM13 foi determinada por detecção imunocitoquímica de um anticorpo secundário ligado a ouro coloidal de 10 nm.

Os controlos, realizados para verificar a existência de marcação não específica, nunca apresentaram qualquer marcação.

As observações revelaram que a marcação à superfície das células, evidenciada em microscopia óptica, estava principalmente associada à membrana plasmática e só muito esporadicamente à parede celular, e neste caso apenas com o AcM JIM13. A marcação foi observada pontualmente ao longo da membrana plasmática das células, não tendo sido observado nenhum padrão particular de distribuição das partículas de ouro. Foi ainda observada, em algumas células de alguns tecidos, marcação em alguns conteúdos celulares, alguns dos quais não foi possível identificar devido ao baixo nível de contrastação obtido nos tecidos.

Nas células dos tecidos do estilete há uma clara marcação selectiva com o AcM JIM8. Para o tecido de transmissão, como era de esperar através dos resultados obtidos em microscopia óptica, não se observou qualquer marcação nas células, nem nos espaços intercelulares (Fig. 13a). A única marcação observada apareceu associada a um tubo polínico a crescer através da matriz extracelular deste tecido. No entanto, a marcação é pouco significativa (Fig. 14).

Na zona periférica do estilete os epítomos apareceram associados a algumas células do xilema, nomeadamente às porções citoplasmáticas em degeneração dos elementos traqueais em diferenciação e ao citoplasma de algumas células de parênquima xilémico (Fig. 16a). Nas células do parênquima lacunoso não foi observada marcação.

No tecido de transmissão do estilete com o AcM JIM13 a marcação aparece associada à membrana plasmática e a alguns conteúdos celulares, nomeadamente algumas formas vesiculares (Figs. 13b, c, d). Na secção onde aparece o tubo polínico a marcação é muito intensa, contrastando com as células à volta que aparecem muito menos marcadas (Fig. 15). Parece haver uma expressão diferencial do epítomo reconhecido pelo AcM JIM13 nas células do tecido de transmissão. O ouro encontra-se em maior quantidade na

membrana das células mais próximas do tubo polínico do que nas células em zonas mais afastadas desta estrutura. Nestas células o ouro também aparece associado à parede celular. O tubo polínico aparece fortemente marcado com este AcM (Fig. 15b).

Nos elementos traqueais em diferenciação, presentes junto do parênquima lacunoso, a marcação surge associada aos espessamentos da parede secundária em formação (Fig. 16b).

No ovário, com o AcM JIM8 a membrana plasmática das células aparece com alguma marcação. O ouro, em alguns casos, aparece associado a alguns conteúdos citoplasmáticos. Em qualquer dos casos a marcação não é muito significativa (Figs. 17a, b). Com o AcM JIM13 a marcação nas células do ovário é muito mais intensa e aparece associada quer à membrana plasmática quer à parede celular. Aparece ainda associada a muitos conteúdos celulares e ao vacúolo (Fig. 17c).

No óvulo a marcação com o AcM JIM8 é selectiva. Os tegumentos praticamente não apresentam marcação e no nucelo a marcação é inexistente em praticamente todas as células com excepção das células do nucelo micropilar. Nestas células a marcação aparece associada à membrana plasmática (Fig.20).

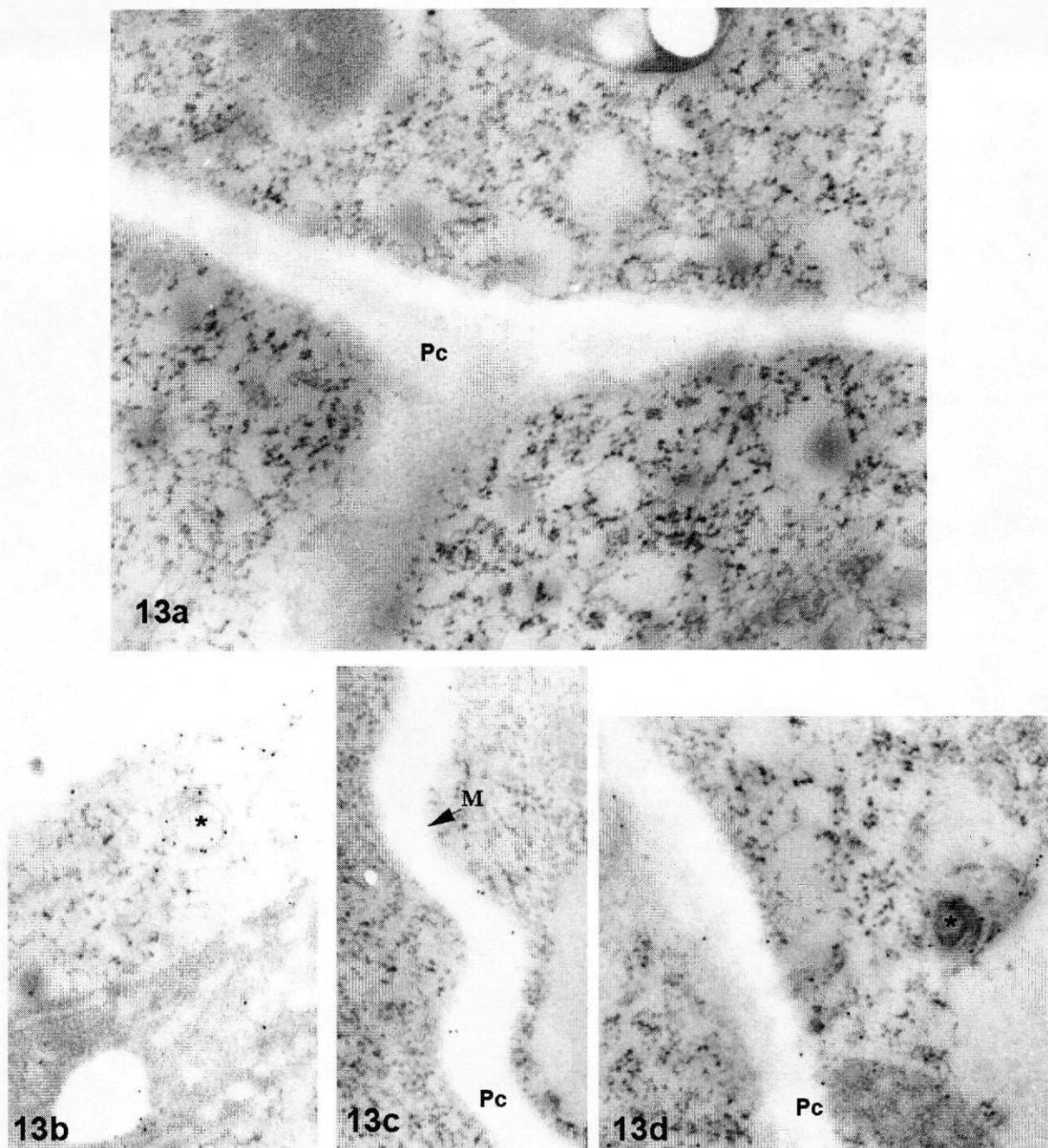
O aparelho filiforme das sinergídeas aparece intensamente marcado em toda a superfície observável (Fig. 22c). Numa das secções em estudo foi possível observar um tubo polínico na zona do nucelo micropilar, próximo do saco embrionário, onde a marcação era muito intensa (Fig. 22b).

Com o AcM JIM13 a marcação é relativamente inespecífica no tegumento externo na zona mais próxima do micrópilo do óvulo (apesar de nos controlos não aparecer marcação), já que esta aparece associada quer à parede celular quer à membrana plasmática, bem como a muitos conteúdos celulares, nomeadamente a toda a volta dos grãos de amido e à volta dos vacúolos (Fig. 18). Foram observadas outras zonas dos tegumentos, nomeadamente o tegumento interno, em que a marcação era menos intensa e mais selectiva, marcando apenas a membrana plasmática e alguns conteúdos celulares, mas em pequena quantidade (Fig. 19).

No nucelo a marcação é fraca e surge essencialmente associada à membrana plasmática. No nucelo micropilar a marcação é mais forte (Fig. 21). Com este AcM a

marcação não é tão selectiva como com o AcM JIM8 em que só as células do nucelo micropilar aparecem com marcação.

Não foi possível observar secções do aparelho filiforme nem tubos polínicos a crescer através do tecido nucelar marcadas com este anticorpo.



Figs. 13 a 22– Imagens de MET de células de vários tecidos do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus* marcadas com os AcM JIM8 e JIM13. O Ac primário foi ligado a um anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal de 10 nm.

Fig. 13 – Imunolocalização das PAGs nas células do tecido de transmissão do estilete com os AcM JIM8 (Fig. 13a) e JIM13 (Figs. 13b, c, d). **Fig. 13a** - As células deste tecido não apresentam qualquer marcação com o AcM JIM8, quer na superfície celular quer no interior das células. 44000x. **Figs. 13b, c, d** – Com o AcM JIM13 o tecido de transmissão aparece com uma marcação forte associada principalmente à membrana plasmática (M). Aparece ainda em alguns conteúdos celulares e associada a algumas formas vesiculares (*). Pc - parede celular. Figs. 13b, d – 44000x. Fig. 13c – 28000x.

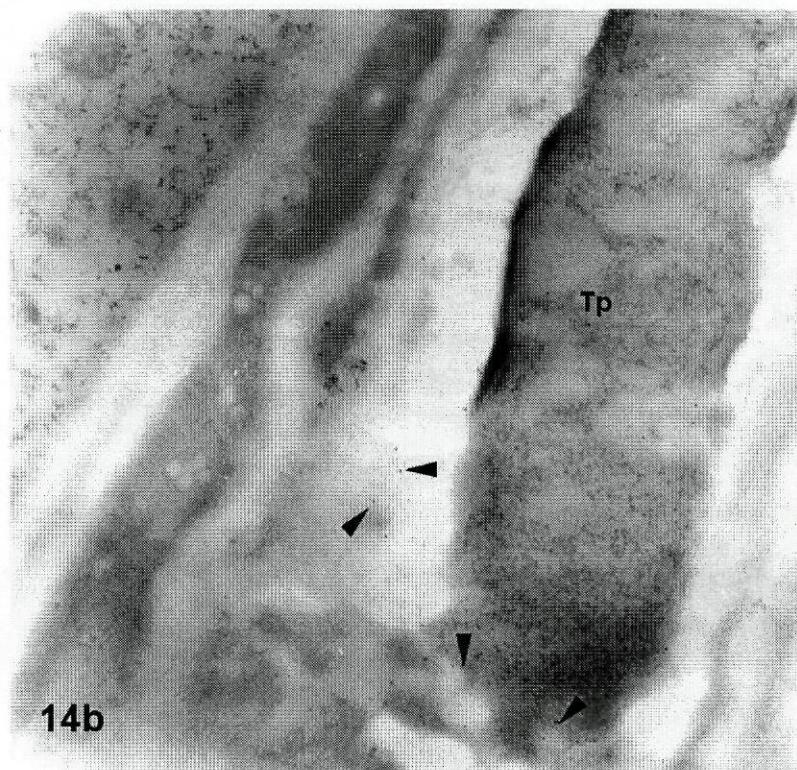
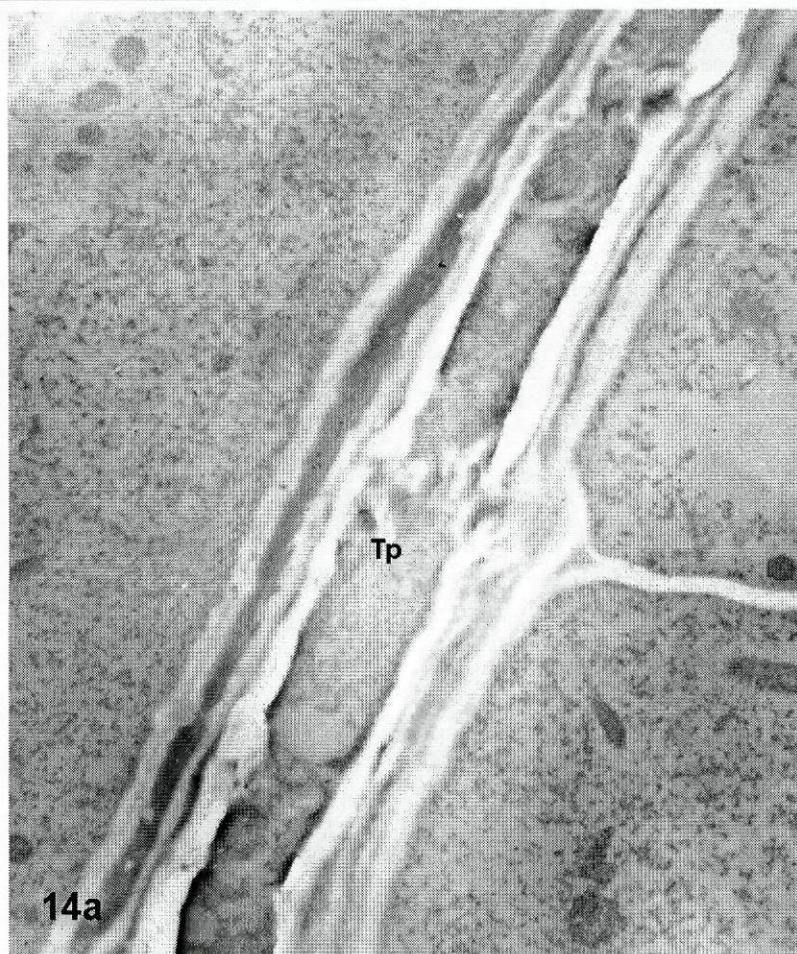


Fig. 14a – Imagem de MET de um tubo polínico (Tp) a crescer através do tecido de transmissão do estilete. 10800x. **Fig. 14b** – Ampliação de uma zona do tubo polínico ilustrado em 14a, onde se observa uma marcação não significativa com o AcM JIM8 (pontas de setas) próxima do tubo polínico. 44000x

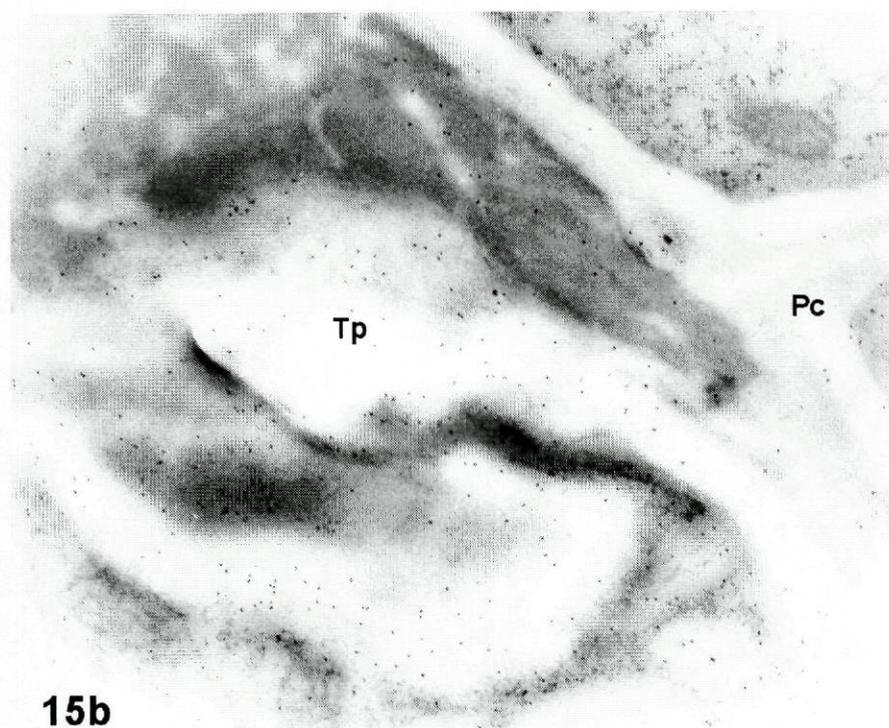
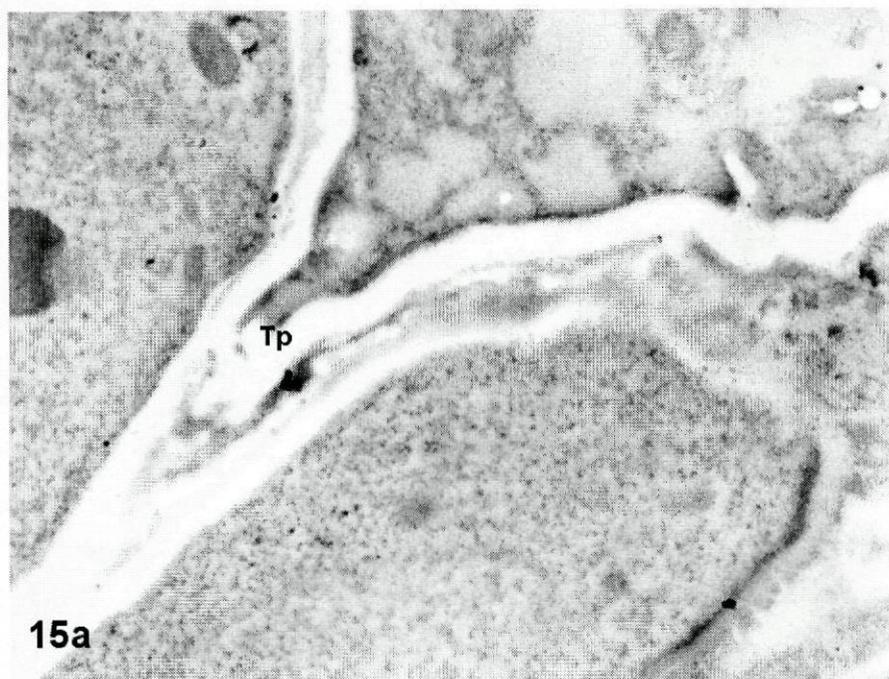


Fig. 15a – Imagem de MET de um tubo polínico a crescer através do tecido de transmissão do estilete, onde se realizou a imunolocalização das PAGs com o AcM JIM13. 8600x. **Fig. 15b** – Pormenor ampliado de 15a, onde se observa uma marcação muito forte com o AcM JIM13 ao nível do tubo polínico, da membrana citoplasmática e da parede celular das células que o rodeiam. 44000x.

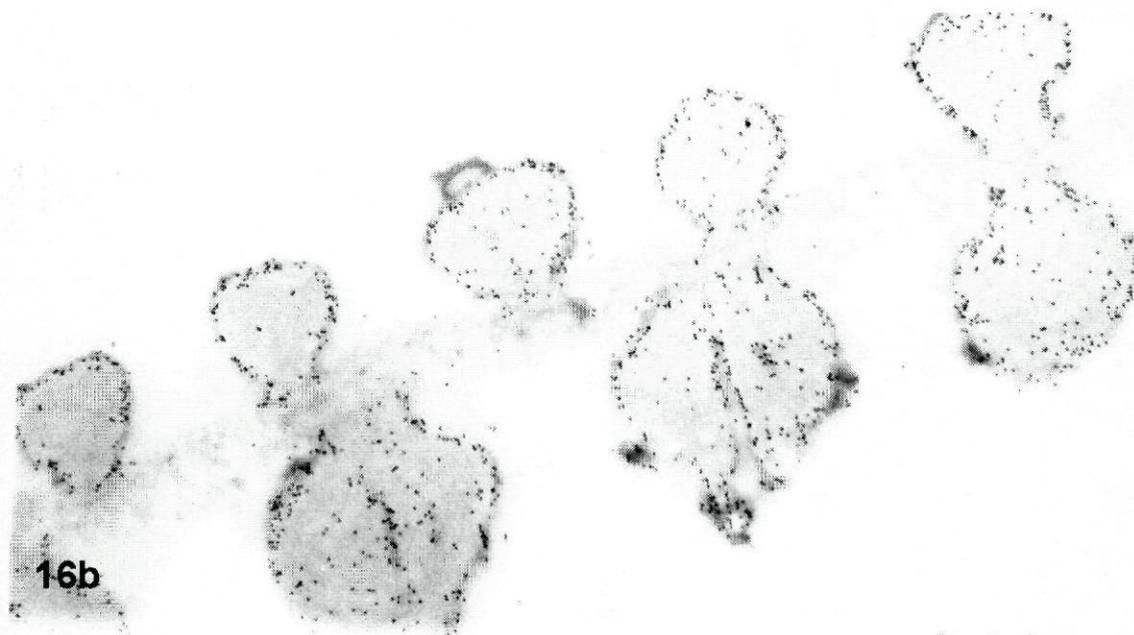


Fig. 16 – Imunolocalização das PAGs nos elementos traqueais do xilema em diferenciação com os AcM JIM8 (Fig. 16a) e JIM13 (Fig. 16b). 28000x. **Fig. 16a.** – A marcação é forte e aparece essencialmente associada às porções citoplasmáticas em degeneração dos elementos traqueais (ET). Também aparece alguma marcação associada ao citoplasma das células de parênquima (exemplos realçados por setas). Os elementos traqueais já diferenciados não apresentam marcação. Ps – parede secundária. **Fig. 16b** – Com o AcM JIM13, contrariamente ao que acontece com o AcM JIM8, a marcação surge associada aos espessamentos da parede secundária em formação.

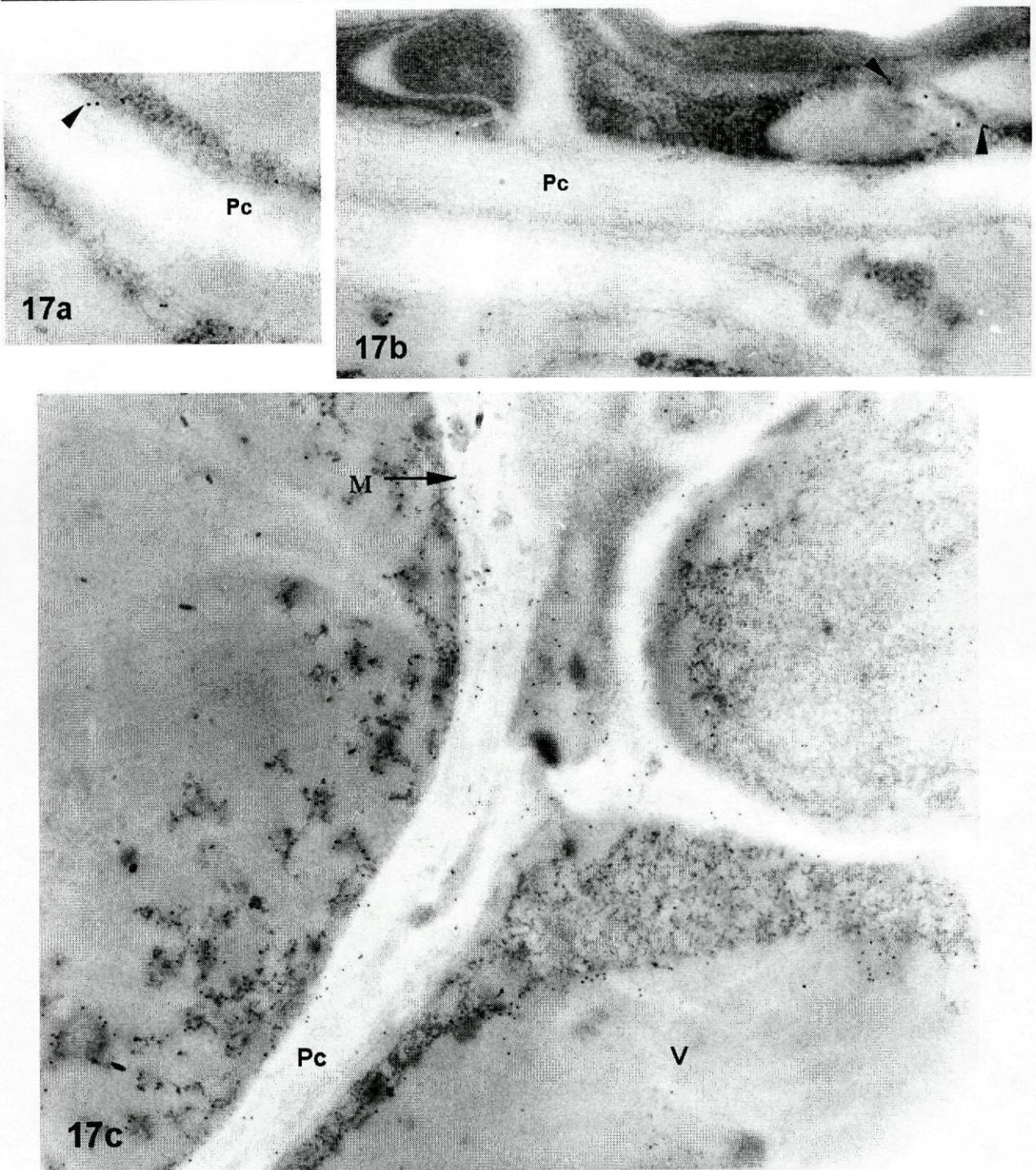


Fig. 17 – Imunolocalização das PAGs nas células do ovário com os AcM JIM8 (Fig. 17a, b) e JIM13 (Fig. 17c). **Figs. 17a, b** - As partículas de ouro (exemplos realçados por pontas de setas) indicam que o AcM JIM8 se ligou à membrana plasmática e a alguns conteúdos celulares, embora a marcação não seja muito significativa. 42000x. **Fig. 17c** – Com o AcM JIM13 a marcação é bastante mais forte do que com o AcM JIM8 e surge associada à membrana plasmática e também à parede celular. As partículas de ouro formam pequenos agregados associados a conteúdos citoplasmáticos que não identificamos. Aparecem também associadas ao vacúolo. 28000x.

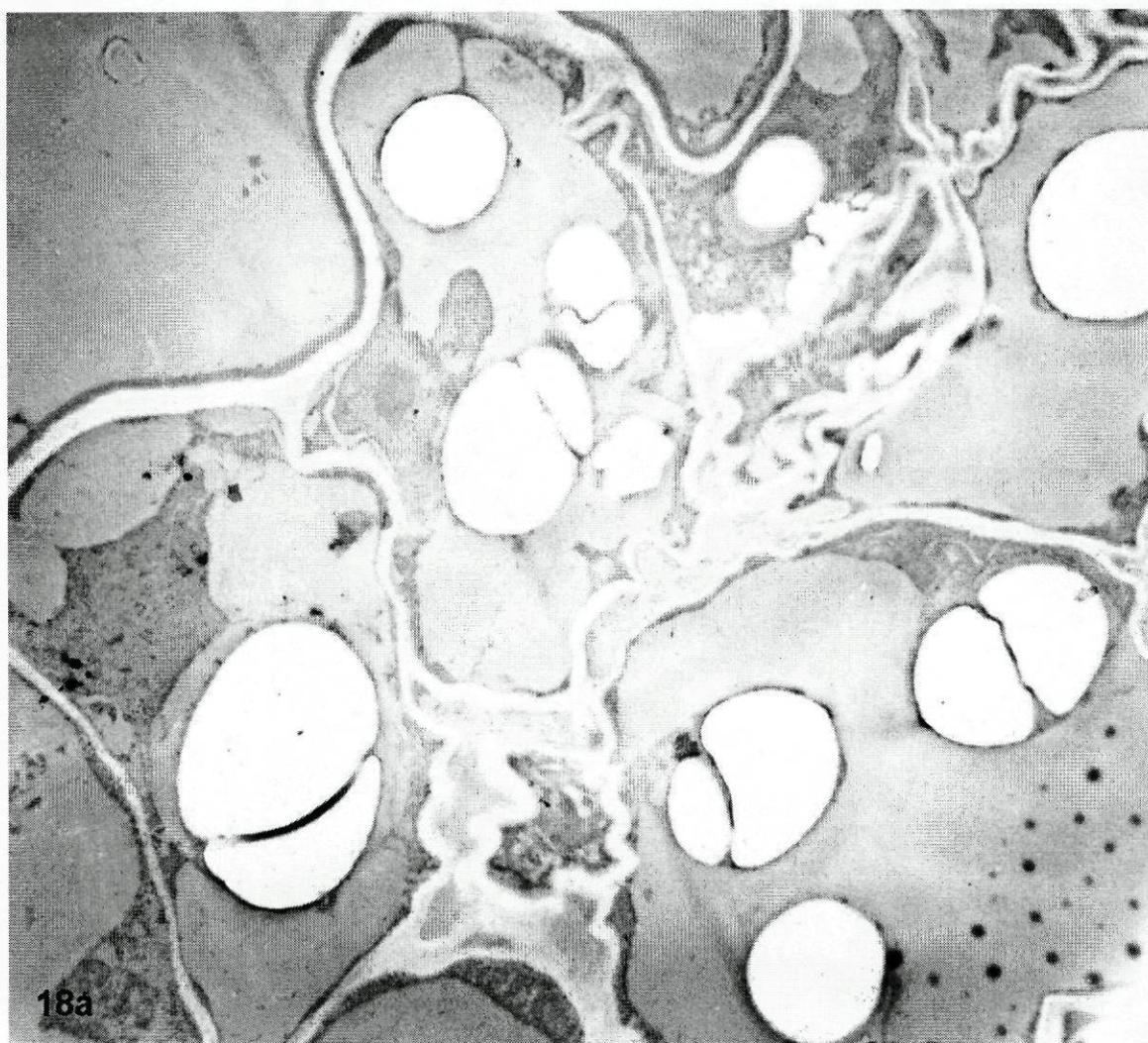




Fig. 18a – Imunolocalização das PAGs no tegumento externo do óvulo ilustrado na Fig. 10, numa zona próxima da extremidade micropilar, com o AcM JIM13. 8600x. **Fig. 18b** – Pormenor ampliado de 18a onde se observa uma marcação muito forte associada à membrana plasmática, à parede celular e a muitos conteúdos celulares, de onde se destacam os grãos de amido (A). 28000x.

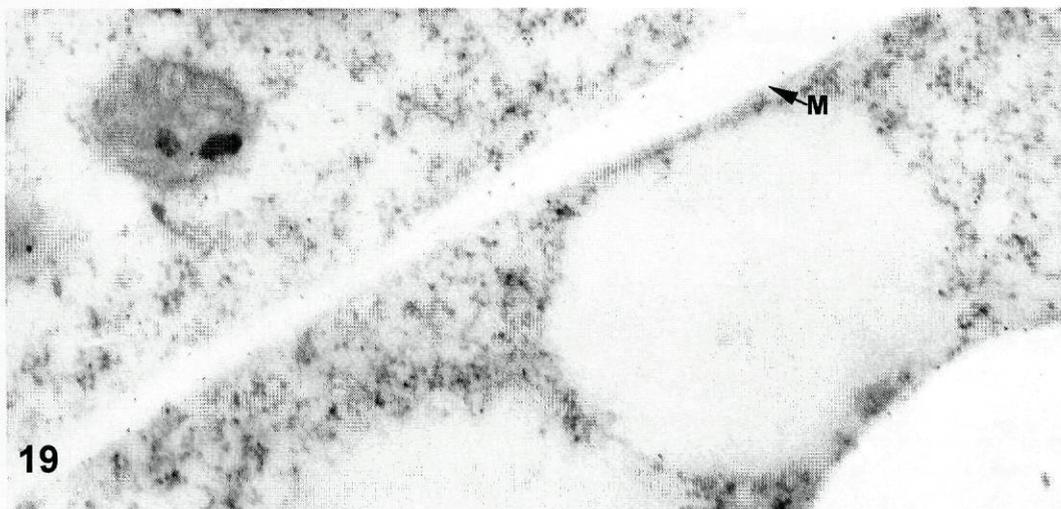
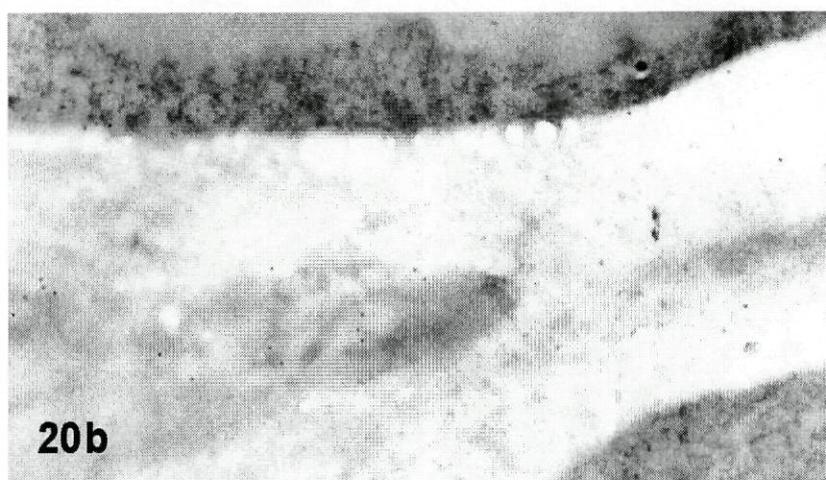
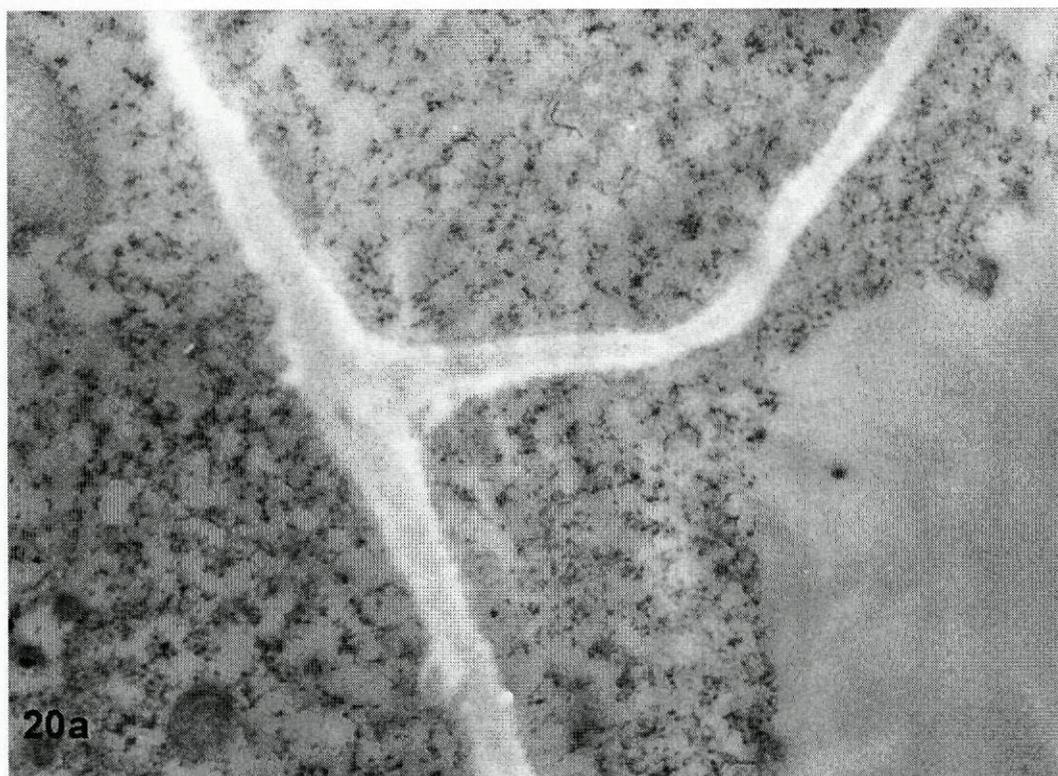


Fig. 19 – Imunolocalização das PAGs no tegumento interno do óvulo, com o AcM JIM13. Neste tegumento a marcação é menos intensa e está apenas associada à membrana plasmática (M) e a alguns conteúdos celulares. 44000x.



Figs. 20a, b – Imunolocalização das PAGs no nucelo com o AcM JIM8. A marcação neste tecido é selectiva. Só aparece marcação nas células do nucelo micopilar (Fig. 20b) onde está associada à membrana plasmática. Nas restantes células nucelares (Fig. 20a) não aparece qualquer marcação. 28000x.

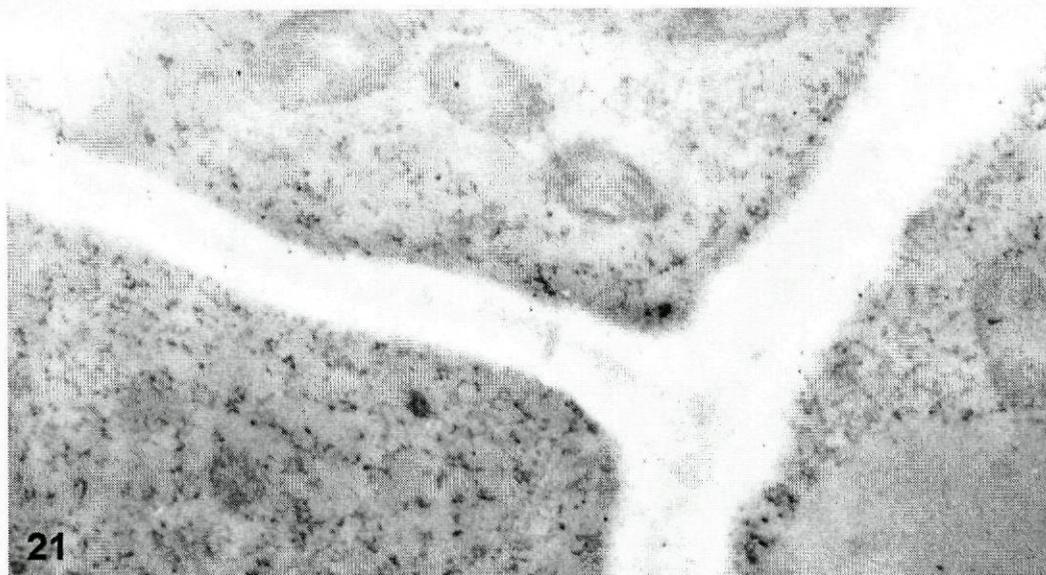


Fig. 21 – Imunolocalização das PAGs no nucelo micropilar com o AcM JIM13, onde a marcação aparece principalmente associada com a membrana plasmática. 44000x.



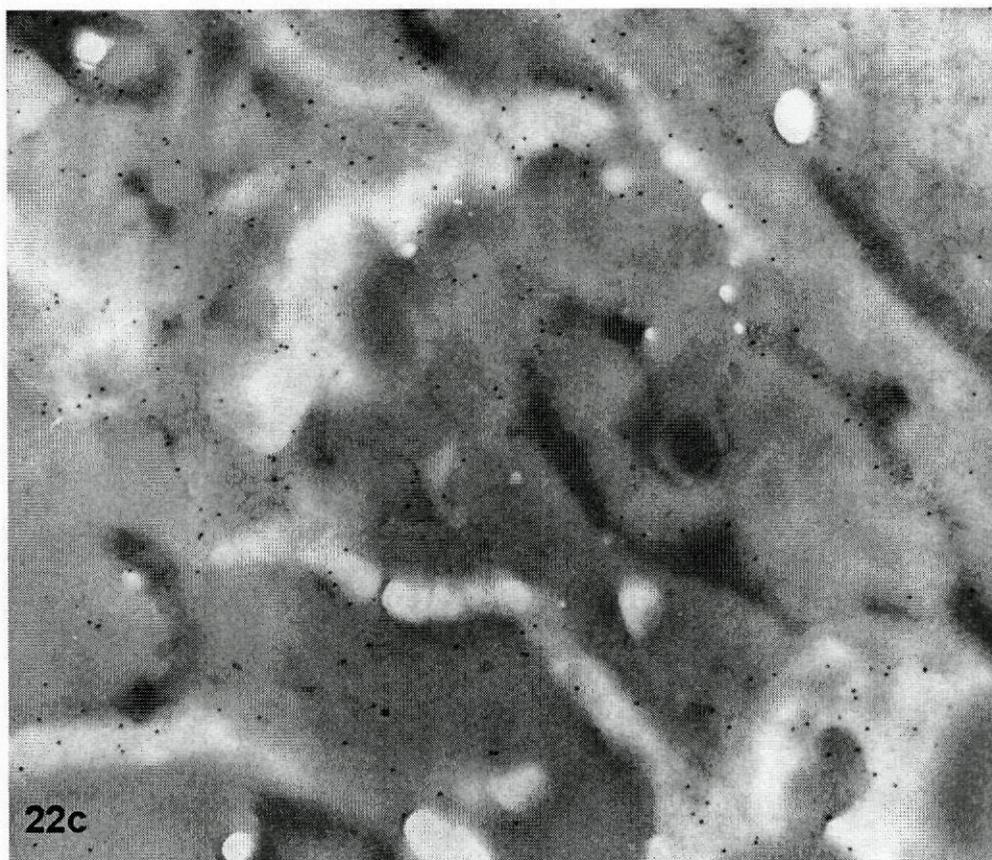
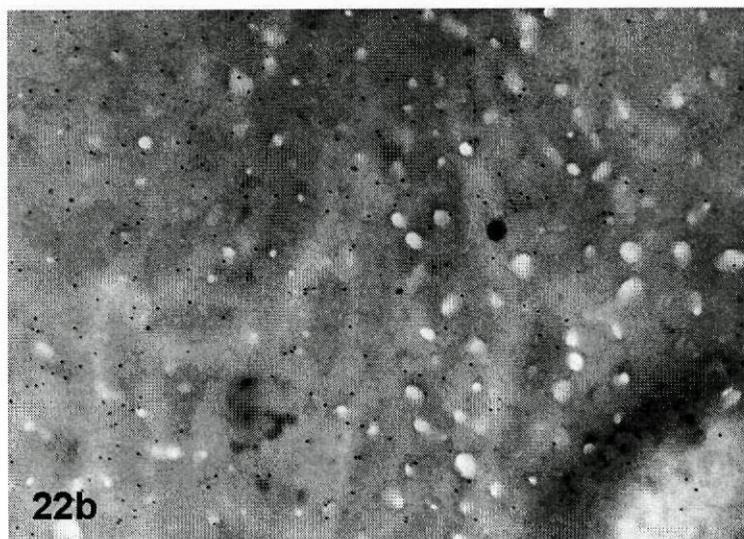


Fig. 22a – Imagem de MET do óvulo ilustrado nas Figs. 12a e 12b, onde é possível observar o aparelho filiforme (Af) de uma sinérgida e um tubo polínico (Tp) a crescer através do nucelo micropilar. 13800x. **Fig. 22b** – Ampliação da zona do tubo polínico ilustrado em 22a, onde se observa uma marcação muito intensa com o AcM JIM8. 28000x. **Fig. 22c** – Ampliação de uma porção do aparelho filiforme ilustrado em 22a, onde a marcação com o AcM JIM8 é muito forte. 44000x.

4. DISCUSSÃO

Alguns dos dados mais específicos relativamente à localização das PAGs têm sido fornecidos através de estudos de imunolocalização com anticorpos monoclonais anti-PAG. Os AcM JIM8, JIM13 e MAC207 reconhecem diferentes epítomos de PAGs, essencialmente associados com as membranas plasmáticas das células vegetais (Fincher et al. 1983, Pennell et al. 1989, Herman e Lamb 1992). Neste trabalho verificou-se qual a expressão dos epítomos reconhecidos por estes anticorpos nos tecidos e nas células do pistilo de *Amaranthus hypochondriacus*.

4.1. As PAGs no estigma

Em *Amaranthus hypochondriacus* os grãos de pólen, depois de libertados, pousam na superfície papilar do estigma. A primeira interacção entre o pólen e o pistilo ocorre ao nível de uma cutícula que cobre apenas o lado receptivo da papila e que se rompe quando a papila está receptiva, havendo a libertação de vesículas e de um exsudado que provoca a hidratação do grão de pólen. Depois da hidratação, o grão de pólen activado forma muito rapidamente o tubo polínico que emerge através de um dos muitos poros que a exina apresenta, e vai crescer ao longo da superfície papilar, até chegar ao estilete (Coimbra 1998).

No presente estudo confirma-se a presença de epítomos de PAGs nas células do estigma e nas papilas estigmáticas, reconhecidos pelos AcM MAC207, JIM8 e JIM13. Estudos anteriores (Clarke et al. 1979, Bacic et al. 1988) tinham já revelado a abundância de PAGs nos exsudados estigmáticos e posteriormente Du et al. (1996) levaram a cabo a purificação e caracterização de uma PAG do estigma de *Nicotiana glauca*.

Através da observação das papilas estigmáticas verifica-se que estas aparecem intensamente marcadas à superfície, mas que esta marcação é mais forte de um dos lados de algumas células. Provavelmente este lado da papila que aparece fortemente marcado coincide com o lado receptivo da papila, mais concretamente com a cutícula e a película subjacente que se rompe no momento da interacção pólen – papila estigmática. Assim, podemos colocar a hipótese de que as PAGs são necessárias para o processo de adesão do pólen às papilas. Este processo vai desencadear, através da libertação de um exsudado após a ruptura dessa cutícula, a germinação do grão de pólen.

Uma hipótese semelhante foi sugerida por Gell et al. (1986). Estes autores verificaram que o aparecimento e o aumento significativo das PAGs no estigma coincidia com o desenvolvimento da capacidade desta estrutura para receber pólen. É ainda possível que os elevados teores em açúcar das PAGs funcionem como um ambiente bioquímico ou físico favorável, fornecendo nutrientes ou lubrificantes para o crescimento dos tubos polínicos. Estas hipóteses não excluem a possibilidade de as PAGs também fornecerem pistas direccionais para a entrada do tubo polínico nas camadas de células imediatamente abaixo da superfície estigmática (Cheung e Wu 1999).

4.2. As PAGs nos tecidos do estilete

A existência de marcação em todas as células do estilete (epiderme, parênquima lacunoso e tecido de transmissão) com os AcM JIM13 e MAC207 e a ausência de marcação com o AcM JIM8 apenas no tecido de transmissão, ausência esta confirmada ao nível subcelular, sugere que existem pelo menos dois conjuntos diferentes de PAGs no estilete. Um que aparece em todas as células deste órgão e outro que está ausente das células do tecido de transmissão.

4.2.1. No tecido de transmissão

Relativamente aos conjuntos de PAGs reconhecidas pelos AcM MAC207 e JIM13, um dos aspectos mais interessantes encontrados no presente estudo é a intensa marcação no tecido de transmissão do estilete. Já outros trabalhos demonstraram a presença de PAGs no tecido de transmissão do estilete, em várias plantas. Inclusivamente, foi já purificada uma PAG do estilete de *Nicotiana alata* (Du et al. 1994) e várias glicoproteínas, com características das PAGs, da matriz extracelular do estilete de *Nicotiana alata* (Lind et al. 1994, Sommer-Knudsen et al. 1998, Wu et al. 2000) e de *Nicotiana tabacum* (Wang et al. 1993, Cheung et al. 1995, Wu et al. 1995, para uma revisão ver Sommer-Knudsen et al. 1997). Foi ainda identificada uma outra PAG nas células do tecido de transmissão do estilete do tomate (Gao et al. 1999).

Após a germinação do grão de pólen o tubo polínico vai crescer através da matriz extracelular do estilete. Através dos dados obtidos em MET verifica-se que nesta fase a marcação neste tecido com o AcM JIM13 é selectiva, isto é, na zona onde se encontra o

tubo polínico em crescimento a marcação é muito forte e vai diminuindo de intensidade à medida que nos afastamos desse local. Outro dado interessante é que só aparece marcação na parede celular das células do tecido de transmissão que estão imediatamente à volta do tubo polínico em crescimento, as restantes células do tecido de transmissão só apresentam marcação na membrana citoplasmática e em alguns conteúdos celulares. Verificamos também a existência de uma marcação muito intensa, com o AcM JIM13, no tubo polínico a crescer no tecido de transmissão, o que pode indicar que estas proteínas aderem à superfície do tubo contribuindo para a promoção da sua atracção e crescimento.

Foi observado um comportamento semelhante para uma glicoproteína de 120 KDa específica da matriz extracelular do pistilo de *N. alata* com características de PAG. Lind et al. (1996) verificaram que antes da polinização a glicoproteína está igualmente distribuída através da matriz extracelular do tecido de transmissão e que após a polinização aparece concentrada na matriz extracelular adjacente aos tubos polínicos. Observaram ainda que esta glicoproteína também aparece no citoplasma e na parede celular dos tubos polínicos a crescer nesse tecido. Estes autores sugerem que a glicoproteína presente nos tubos polínicos em crescimento no pistilo é derivada da matriz extracelular do tecido de transmissão, isto é, há a possibilidade de estas glicoproteínas serem retiradas e incorporadas na parede do tubo polínico à medida que materiais da parede são depositados na zona de crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Wu et al. (1995) para um outro conjunto de glicoproteínas com características de PAGs, as proteínas TTS do estilete de *N. tabacum*.

Os estudos citados e outras análises recentes (Cheung et al. 1995, Wu et al. 2000) apoiam a hipótese de que algumas PAGs podem desempenhar funções importantes na regulação do crescimento do tubo polínico. Uma destas classes de glicoproteínas, as proteínas TTS de *N. tabacum*, apresentam um gradiente de glicosilação na direcção de crescimento do tubo polínico e são desglicosiladas pelos tubos polínicos durante o seu crescimento, sugerindo que estas glicoproteínas possam contribuir para a criação de um gradiente responsável pelo direccionamento dos tubos polínicos. Além disso, a glicosilação diferencial de proteínas do tipo TTS ao longo do estilete já foi observada em *Nicotiana sylvestris* (Cheung e Wu 1999) e em *Nicotiana alata* (Wu et al. 2000), o que indica que este fenómeno poderá ser um processo comum a várias plantas. Muito recentemente Gao e Showalter (2000) verificaram que uma PAG do tomate (LeAGP-1) era menos glicosilada nas flores maduras comparativamente com flores imaturas. Isto demonstra a associação das PAGs com alguns dos processos envolvidos na reprodução

sexuada, nomeadamente a germinação e o crescimento do tubo polínico. Adicionalmente os autores colocam a hipótese de a desglicosilação das PAGs ocorrer durante a polinização tal como tinha sido proposto por Wu et al. (1995). O aumento do nível de glicosilação das proteínas TTS no tecido de transmissão, na mesma direcção do crescimento do tubo polínico, também está associada a um gradiente de acidificação crescente, porque a glicosilação acidifica as proteínas TTS (Wu et al. 1995). Cheung (1995) avança a hipótese de que este gradiente de cargas poder funcionar como um sinal de orientação para o crescimento do tubo polínico.

Com base nos estudos citados pode ser formulada uma hipótese relativamente às funções desempenhadas pelo conjunto de PAGs presentes no tecido de transmissão de *A. hypochondriacus* e que são reconhecidas pelo AcM JIM13. Esta possibilidade é apoiada pelo facto de as proteínas TTS e NaTTS (proteínas específicas do tecido de transmissão de *N. alata*, com características semelhantes às proteínas TTS) também serem reconhecidas pelo AcM JIM13 (Cheung e Wu 1999, Wu et al. 2000). Assim a hipótese que colocamos é que os tubos polínicos ao crescerem através do tecido de transmissão do estilete são orientados por um gradiente de concentração das PAGs, o que explica a marcação mais intensa na zona do tecido de transmissão do estilete que está a ser atravessada pelo tubo polínico relativamente a zonas mais afastadas. Além disso, os tubos polínicos ao atravessarem este tecido devem incorporar progressivamente as PAGs, ou a porção glicídica das PAGs, nas suas paredes, o que justifica a forte marcação observada no tubo polínico. Este fenómeno é possível admitindo que os tubos polínicos produzem hidrolases que actuam sobre as glicoproteínas desglicosilando-as. Em concordância, Wu et al. (1995) verificaram que existem enzimas desglicosiladoras ligadas aos tubos polínicos, eventualmente para assegurar que as moléculas de açúcar que são libertadas estejam imediatamente disponíveis para a utilização pelo tubo polínico. Neste caso uma das principais funções desempenhadas por este conjunto de PAGs é a de servirem de fonte de nutrientes para o crescimento do tubo polínico. As PAGs podem ainda funcionar como uma matriz adesiva que facilita o crescimento do tubo polínico, hipótese partilhada por Jauh e Lord (1996). Uma hipótese concorrente é colocada por Wu et al. (1995), segundo a qual os tubos serão capazes de perceber mudanças na concentração em açúcar e crescer em direcção às moléculas com maior conteúdo em açúcar, isto é, mais glicosiladas.

Através da imunolocalização em microscopia electrónica verifica-se que os epítomos reconhecidos pelo AcM JIM13 aparecem principalmente associados à membrana plasmática e a alguns conteúdos celulares. No entanto, o epítomo também aparece associado às paredes de algumas células, mas apenas àquelas que se encontram na zona onde se localiza o tubo polínico em crescimento.

Estes dados são consistentes com a localização celular já verificada para outras PAGs e para outras plantas. Jauh e Lord (1996) localizaram o epítomo reconhecido pelo AcM JIM13 na membrana plasmática e na parede celular das células epidérmicas do canal estilar, onde os tubos polínicos aderem. No caso da PAG imunolocalizada no tecido de transmissão do tomate, este epítomo aparecia associado às paredes das células e aos espaços intercelulares entre elas (Gao et al. 1999).

De acordo com o que afirmámos antes não é de estranhar a presença deste conjunto de PAGs tanto nas membranas plasmáticas como em variados conteúdos celulares. Se a sua função é tão relevante, então estas glicoproteínas têm de ser sintetizadas activamente pelas células deste tecido. Daí se explica a sua presença em vários conteúdos celulares, já que a sua síntese tem início no retículo endoplasmático, daí passam para o complexo de Golgi e acabam por ser secretadas para a membrana (Youl et al. 1998). Ao passarem para a parede celular, ficam na matriz extracelular e estão directamente disponíveis para os tubos polínicos. Esta pode ser uma evidência de que este conjunto de PAGs está efectivamente associado ao crescimento do tubo polínico, uma vez que a forma secretada destas PAGs para as paredes celulares é apenas observável na zona do tubo polínico em crescimento.

Em contraste com o que se observa com o AcM JIM13, verifica-se uma completa ausência de marcação neste tecido com o AcM JIM8. Mesmo na zona onde o tubo polínico está em crescimento a marcação é muito pouco significativa.

Relativamente ao conjunto de PAGs, cujos epítomos são reconhecidos pelo AcM JIM8 propomos uma hipótese que explica a sua ausência do tecido de transmissão do estilete, baseada em resultados obtidos por Wang et al. (1996). Muitas vezes as células têm de se ajustar a mudanças de certas condições, quer endógenas quer exógenas. É o que acontece às células do tecido de transmissão do estilete após a polinização, que sofrem degenerações moleculares e celulares induzidas pelo tubo polínico, que tem de atravessar este tecido para chegar ao óvulo. Os investigadores citados verificaram que a polinização

induzia a redução da extremidade poli-A de vários mRNAs específicos do tecido de transmissão, cuja quantidade diminuía após a polinização. No entanto, as proteínas TTS desse mesmo tecido não diminuam de quantidade o que levou a colocar a hipótese de que existem mecanismos no estilete polinizado para preservar mRNAs que sejam considerados essenciais para o processo de crescimento e direcionamento do tubo polínico.

Assim, uma explicação para a ausência dos epítomos das PAGs reconhecidos pelo AcM JIM8 é a de os mRNAs que codificam este conjunto de proteoglicanos, após indução pelo tubo polínico, sofrerem modificações que levam à sua degradação. Estes mRNAs não estão preservados de degradação porque as funções deste conjunto de PAGs não deve ser necessária no tecido de transmissão após a polinização. No entanto, os epítomos das PAGs reconhecidos pelo AcM JIM13 continuam presentes em grande quantidade no tecido de transmissão, o que levanta a hipótese de os seus mRNAs não sofrerem este processamento porque desempenham funções importantes nos processos referidos. Subsistem ainda outras hipóteses. Eventualmente uma mudança na glicosilação destas moléculas ou a interação com outras proteínas pode remover ou mascarar os epítomos. Pode ainda acontecer que esses epítomos nunca tenham estado presentes nesse tecido.

4.2.2. No xilema

Os epítomos das PAGs reconhecidos pelo AcM JIM8 estão ausentes das células do tecido de transmissão mas aparecem associados aos elementos traqueais do xilema presentes no estilete, mais concretamente às porções citoplasmáticas em degeneração das células em diferenciação. Já os epítomos reconhecidos pelo AcM JIM13 estão presentes apenas nos espessamentos da parede secundária dos elementos traqueais do xilema. Assim, nos elementos traqueais do xilema em diferenciação existem pelo menos dois conjuntos de PAGs, um que está associado aos conteúdos celulares que degeneram e outro associado aos espessamentos da parede secundária.

Já anteriormente outros estudos revelaram a presença de PAGs, cujos epítomos são reconhecidos pelo AcM JIM13, nos espessamentos da parede secundária de futuros elementos traqueais (Schindler et al. 1995), nas paredes das células iniciais do metaxilema (Dolan et al. 1995), na superfície celular de células de xilema em

desenvolvimento (Casero et al. 1998) e nos espessamentos da parede secundária de elementos traqueais do metaxilema em maturação e do xilema secundário (Gao et al. 1999, Gao e Showalter 2000). Recentemente foi clonada uma PAG de *Pinus taeda* L. que se expressa preferencialmente no xilema em diferenciação (Loopstra et al. 2000).

Tais estudos indicam que as PAGs estão envolvidas na formação dos padrões da parede celular e portanto na diferenciação celular do xilema (Gao e Showalter 2000, Loopstra et al. 2000). A formação da parede secundária durante a diferenciação dos elementos traqueais envolve a deposição de microfibrilas de celulose e outros polissacarídeos em locais específicos da parede primária, resultando num padrão de espessamentos típicos. A parede secundária destas células está habitualmente impregnada com lenhina. Kreuger e van Holst (1996) passam em revisão algumas das funções das PAGs na diferenciação das plantas e referem que estas glicoproteínas podem estar envolvidas na deposição de certas macromoléculas na parede, como por exemplo compostos fenólicos, necessários à formação da parede secundária. Assim, as PAGs poderão desempenhar um papel importante na deposição da lenhina.

Outro aspecto interessante a considerar é a ocorrência de fenómenos de comunicação entre as células que desencadeiam este processo de diferenciação. Neste processo de comunicação deve estar envolvida a parede celular. Neste caso a localização das PAGs na parede celular faz destas glicoproteínas boas candidatas para moléculas de sinalização entre as células, concretamente, entre os elementos traqueais em diferenciação. Assim, a hipótese colocada e partilhada por Kreuger e van Holst (1996) é que o transporte das PAGs ou dos seus epítomos através das paredes celulares de umas células para outras poderá resultar numa modificação da parede celular, o que poderá ter um impacto na diferenciação, resultando provavelmente numa nova via de desenvolvimento. Em apoio desta hipótese, muito recentemente Motose et al. (2001) verificaram que uma PAG está envolvida na comunicação intercelular necessária à diferenciação dos elementos traqueais de *Zinnia elegans* L.

Por outro lado, estas células sofrem um processo de morte celular programada como parte do seu desenvolvimento normal (Fukuda 1997, Pennell e Lamb 1997, Groover e Jones 1999) o que de algum modo as relaciona com as PAGs, uma vez que tem vindo a ser proposto que estes proteoglicanos podem identificar células que estão destinadas a sofrer morte celular programada. Em 1995, Schindler et al. sugeriram que as PAGs

podiam desencadear a morte celular das células vasculares em desenvolvimento nos coleótilos do milho e já em 1999, Gao e Showalter verificaram que quando o reagente de Yariv era adicionado a culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* ocorria a morte celular programada. Estes investigadores admitem o envolvimento das PAGs na morte celular programada de certas células das plantas e afirmam que este mecanismo poderá ser desencadeado, presumivelmente, pela perturbação das PAGs localizadas na interface membrana plasmática – parede celular.

A importância da morte celular programada durante o ciclo de vida das plantas está bem estabelecida (para uma revisão ver Greenberg 1996, Pennell e Lamb 1997) embora os mecanismos moleculares subjacentes a este fenómeno ainda não estejam bem definidos. Os elementos traqueais (ET) são células especializadas do xilema, responsáveis pela circulação de água e substâncias nela dissolvidas. Durante o seu processo de diferenciação os ET formam uma parede secundária rígida entre a parede primária e a membrana plasmática, que é acompanhada pela síntese de nucleases e proteases, vacuolização do citoplasma e influxo de cálcio. É este influxo de cálcio que está na base da execução da morte celular. Este influxo é morfológicamente marcado pelo colapso do vacúolo hidrolítico e mistura do seu conteúdo com o citoplasma, o que leva à degradação enzimática dos conteúdos celulares e do DNA (para uma revisão ver Fukuda 1997, Groover e Jones 1999).

Recentemente, Groover e Jones (1999) obtiveram evidências de que a morte celular durante a diferenciação dos elementos traqueais do xilema é controlada por um mecanismo sinalizador coordenado com a síntese da parede secundária. Propuseram um modelo em que durante a diferenciação da parede secundária são secretados precursores para a sua síntese e também é secretada uma protease da serina de 40 KDa, que activa o influxo de cálcio que medeia a morte celular. A acumulação da protease na matriz extracelular vai actuar como um mediador da progressão da síntese da parede secundária e activar a morte celular programada após apenas uma quantidade crítica da parede secundária estar sintetizada.

As proteínas com âncoras GPI, como é o caso de algumas PAGs, parecem estar envolvidas em processos de transdução de sinais porque (i) interagem com outras moléculas, que podem ter domínios intra ou extracelulares ou (ii) porque a glicoproteína pode ser separada da sua âncora lipídica, este processo tem o potencial de originar

mensageiros intra ou extracelulares, através da âncora lipídica ou do proteoglicano extracelular (Schultz et al. 2000). A hipótese que propomos é que um determinado conjunto de PAGs pode representar um alvo potencial para a acção da protease, isto é, as PAGs podem ser clivadas por estas proteases (por exemplo, ao nível da âncora lipídica GPI) e passar a funcionar como moléculas sinalizadoras difusíveis, que desencadeiam o influxo de cálcio através da actuação ao nível da membrana das células, o que inicia uma cadeia de reacções que culmina na morte celular programada dos elementos traqueais de xilema.

É interessante que exista um conjunto de PAGs na parede secundária em formação e um outro conjunto de PAGs nas porções citoplasmáticas em degeneração das células em diferenciação. Se existe uma coordenação entre a formação da parede secundária e o processo da morte celular programada, então provavelmente, e atendendo à sua localização, estes dois conjuntos de PAGs desempenharão funções diferentes mas coordenadas para se obter um elemento traqueal perfeitamente diferenciado.

4.3. As PAGs no ovário e no óvulo

A última fase de crescimento do tubo polínico é marcada pela mudança abrupta da sua direcção de crescimento. Os tubos polínicos passam do estilete para o interior do ovário crescendo até à sua base. Depois de chegarem à base do ovário deixam então de crescer basipetamente fazendo um ângulo de 90° de modo a ter acesso ao micrópilo do óvulo (Coimbra 1998).

Através de microscopia óptica observou-se marcação, com os AcM JIM8, JIM13 e MAC207, na superfície celular e em alguns conteúdos das células do ovário. Em microscopia electrónica verificamos, no entanto, que a marcação com o AcM JIM8 é pouco significativa. Já com o AcM JIM13 a marcação é muito forte e aparece associada à membrana citoplasmática, à parede celular, ao vacúolo e a muitos conteúdos celulares não identificados. Relativamente a estes últimos é de crer que sejam membranas, uma vez que de acordo com vários resultados obtidos em diversos estudos (Jauh e Lord 1996, Samaj et al. 2000), as PAGs têm sido sempre localizadas em membranas no interior das células, e não com os conteúdos dessas estruturas membranares. Para uma localização

mais específica terão de ser feitos estudos adicionais, nomeadamente melhorando a contrastação do material biológico.

A localização subcelular dos epítomos reconhecidos pelo AcM JIM13 nas células do ovário parece indiciar que estas PAGs, devem ser rapidamente sintetizadas, secretadas e depois recicladas neste órgão. De acordo com esta hipótese as PAGs são activamente sintetizadas no retículo endoplasmático, passam para o Golgi e através de vesículas são secretadas para a membrana e para a parede celular. Depois de desempenharem a sua função são internalizadas via corpos multivesiculares e degradadas no vacúolo. Tal hipótese vem ao encontro dos estudos de Herman e Lamb (1992), que propõem que a distribuição subcelular de um epítomo pode definir uma via endocítica, que estará envolvida na internalização e degradação de PAGs, mediada pelo vacúolo. Estes dados foram apoiados por estudos posteriores (Ferguson et al. 1999, Samaj et al. 2000). Este sistema activo de síntese e degradação das PAGs permitirá às células reagirem rapidamente a um ambiente em mudança, através da rápida síntese e remoção de novos tipos de PAGs (Kreuger e van Holst 1996). A mesma hipótese é também adequada para os tegumentos do óvulo, principalmente o tegumento externo, uma vez que também nestes tecidos a localização dos epítomos reconhecidos pelo AcM JIM13 é muito ubíqua ao nível subcelular.

Neste estudo foi possível observar óvulos maduros antes de serem fecundados e após a fecundação. Tal distinção foi feita atendendo à presença ou ausência de parede celular a rodear completamente a oosfera.

No estágio de óvulo maduro em que o saco embrionário está receptivo, a expansão e o alongamento do saco embrionário levam a uma redução na espessura das paredes celulares, acabando por ficar a zona calázica da oosfera e das sinérgidas apenas rodeada por membrana plasmática. As duas sinérgidas aparecem na extremidade micropilar, cada uma com um aparelho filiforme bem desenvolvido. A parede do saco embrionário lateralmente não é mais do que a parede da célula central, sendo a via apoplástica do fluxo de solutos do nucelo para o saco embrionário. As antípodas estão ausentes no saco embrionário maduro (Coimbra 1998).

Nesta fase de desenvolvimento do óvulo, as marcações dadas pelos AcM JIM8 e JIM13 são muito específicas. Secções tratadas com estes dois anticorpos mostram claramente uma marcação selectiva no tecido nucelar. Os epítomos surgem expressos essencialmente nas células alinhadas com o micrópilo. Nestas células, as partículas de

ouro aparecem associadas à membrana plasmática. A marcação é muito forte no aparelho filiforme, surgindo também nas células do funículo. No funículo a marcação aparece sob a forma de estruturas multivesiculares no interior das células. Não foi possível através de MET determinar que estruturas eram estas. Nas células dos tegumentos a marcação é praticamente inexistente com o AcM JIM8, e é muito forte com o AcM JIM13, aparecendo no tegumento externo associada a múltiplos conteúdos celulares.

Estudos anteriores já tinham revelado uma expressão diferencial dos epítomos reconhecidos por vários anticorpos, em tecidos do óvulo. Pennell e Roberts (1990) verificaram a expressão selectiva do AcM MAC207 no óvulo de *Pisum sativum* L. e observaram que o conjunto de células que dá origem ao saco embrionário e ao nucelo não apresentava marcação, contrariamente aos dois tegumentos que apareciam marcados. Num estudo posterior, os epítomos reconhecidos pelo AcM JIM8 foram detectados em óvulos de *Brassica napus* (Pennell et al. 1991). Os epítomos foram inicialmente detectados nas células do nucelo próximas da zona micropilar do óvulo mas em óvulos maduros, a marcação no nucelo estendia-se até à extremidade calázica, e a oosfera e as sinérgidas também apresentavam marcação. Em nenhuma das observações os tegumentos, a célula central e as antípodas apresentaram marcação. Assim estes investigadores verificaram que em flores maduras o AcM MAC207 marca células somáticas do óvulo e o AcM JIM8 marca certas células sexuais e algumas células somáticas que as rodeiam.

Os óvulos de *A. hypochondriacus* são do tipo crassinucelado, apresentando várias camadas de células de nucelo entre o micrópilo e o saco embrionário. Relativamente à marcação selectiva das células do nucelo micropilar, confirmam-se os resultados obtidos por Coimbra e Salema (1997) com o AcM JIM8, e obtêm-se um padrão de marcação semelhante para o AcM JIM13. Estes autores verificaram também que utilizando o AcM MAC207 se verificava uma marcação mais forte nas células do nucelo micropilar do que nas restantes células nucleares. No entanto, esta diferença não é tão evidente como para o JIM8.

Neste trabalho verificámos também a presença de um tubo polínico a atravessar o nucelo micropilar (Fig. 22), que em microscopia óptica corresponde ao espaço marcado entre o nucelo micropilar e o saco embrionário (Fig. 12), pelo que se confirma a passagem desta estrutura através desta zona do óvulo. Assim, o tecido nucelar desempenha uma função importante na fecundação devido à sua posição estratégica entre

o micrópilo e o saco embrionário. Esta importância é reforçada pelo facto de os epítomos reconhecidos pelos AcM JIM8 e JIM13 estarem presentes nas células do nucelo que se encontram nesse trajecto através do nucelo micropilar e estarem ausentes das restantes células nucleares. Por outro lado, a marcação do nucelo micropilar é acompanhada de uma marcação intensa do aparelho filiforme das sinérgidas e das invaginações da célula central. Assim, as PAGs parecem marcar um trajecto desde o micrópilo do óvulo, passando através do nucelo micropilar, e estendendo-se até ao saco embrionário, mais concretamente às sinérgidas

A organização ultraestrutural da oosfera fecundada aparenta uma actividade muito diferente daquela demonstrada antes da fecundação. Um desses aspectos é relativo à parede celular. Após a fecundação há a formação de uma parede celular a toda a volta do zigoto (para uma revisão ver Russell 1993). Logo, o facto de a célula identificada como a oosfera estar completamente rodeada por parede celular é indicativo de que ocorreu a fecundação. Nesta fase de desenvolvimento os padrões de marcação são semelhantes aos referidos para o óvulo antes da fecundação, mas a marcação no nucelo micropilar é mais fraca, particularmente para o AcM JIM8.

Hülkamp et al. (1995b) fizeram uma série de estudos que sugerem que as células do gametófito feminino são importantes no direccionamento do tubo polínico até ao micrópilo do óvulo. No entanto, era difícil distinguir se esse direccionamento era controlado directamente pelo gametófito feminino ou se era controlado por células esporofíticas que por sua vez controlavam o desenvolvimento do saco embrionário. No seguimento destes trabalhos Ray et al. (1997) determinaram que pelo menos a fase final de direccionamento do tubo polínico até ao óvulo é controlada pelo gametófito feminino, rejeitando a segunda hipótese colocada por Hülkamp et al. (1995b).

Assim, ao nível molecular foi encontrada uma evidência genética para uma actividade de longo alcance que orienta o tubo polínico. Todavia as células do saco embrionário e os genes gametofíticos envolvidos permanecem desconhecidos, bem como as proteínas que codificam e o modo como interactivam com os tubos polínicos (Wilhelmi e Preuss 1996).

Relativamente às células do saco embrionário, onde poderá ter origem esse sinal? As sinérgidas parecem ser um bom candidato. Estas células são altamente especializadas, com uma organização citoplasmática muito particular e possuem uma série de

modificações da parede na extremidade micropilar, o aparelho filiforme (Russell 1993). Pensa-se que atraem os tubos polínicos, recebem os seus conteúdos e promovem a passagem dos gâmetas masculinos para a oosfera e a célula central. Parecem ser fisiologicamente muito activas e estar envolvidas em funções de secreção e de transporte no saco embrionário. Destas funções, uma que parece consensual é a da secreção de materiais que atraem o tubo polínico e que sinalizam a receptividade do saco embrionário através da degeneração de uma ou de ambas as sinergídeas (Huang e Russell 1992).

A reforçar esta hipótese tem sido descrito para inúmeras plantas a presença de retículo endoplasmático e de dictiosomas activos associados a numerosas vesículas durante a formação do aparelho filiforme, cuja presença poderá estar relacionada com a síntese e secreção de substâncias quimiotrópicas (Huang e Russell 1992, Russell 1993), que poderão ser PAGs, uma vez que a síntese destas glicoproteínas ocorre no retículo endoplasmático e nos dictiosomas (Youl et al. 1998).

De acordo com tudo o que foi referido a hipótese colocada no trabalho é que o sinal que orienta o tubo polínico através do óvulo até ao saco embrionário é uma PAG ou um conjunto de PAGs que devem ser secretadas pelas sinergídeas. Em *A. hypochondriacus* a presença abundante de dictiosomas, de vesículas e a intensa actividade metabólica das sinergídeas (Coimbra 1998) pode estar relacionada com a síntese de PAGs que aparecem associadas à membrana plasmática e à parede celular do aparelho filiforme das sinergídeas.

A forte marcação com os AcM JIM8 e JIM13 nas sinergídeas, especialmente no aparelho filiforme, marcação que se estende ao nucelo micropilar, apoia a hipótese acima enunciada. O nucelo micropilar é a última zona a ser atravessada pelo tubo polínico antes de terminar o seu longo percurso no saco embrionário, e penetrar numa das sinergídeas. As sinergídeas ocupam a extremidade mais micropilar do saco embrionário, local que as coloca em posição preferencial para sinalizar a receptividade do saco embrionário e para atrair o tubo polínico.

Há ainda a salientar a forte marcação do tubo polínico a crescer no nucelo micropilar, com o AcM JIM8. Esta marcação intensa poderá indicar, tal como acontecia no tecido de transmissão do estilete (mas para o AcM JIM13), que o tubo polínico na sua passagem incorpora as PAGs presentes no nucelo micropilar e as utiliza para o seu crescimento.

Um aspecto interessante a considerar é a forte marcação no tegumento externo, numa zona próxima do micrópilo do óvulo, com o AcM JIM13. A ser uma marcação específica, estas células do tegumento, pela sua proximidade com a zona micropilar poderão estar relacionadas com o fornecimento de nutrientes para o tubo polínico, nomeadamente de PAGs. Baker et al. (1997) verificaram uma deficiência na fase final do direccionamento do tubo polínico em mutantes *ino* de *Arabidopsis thaliana*. Nestes mutantes o gametófito feminino e o tegumento interno são morfológicamente normais, mas as células do tegumento externo estão ausentes. Estes autores concluem que a existência de um gametófito feminino normal é necessário mas não suficiente para o direccionamento do tubo polínico até ao aparelho da oosfera.

Concluindo, os nossos resultados e os de outros que aqui discutimos parecem confirmar a importância das PAGs no crescimento e direccionamento do tubo polínico através dos tecidos do pistilo.

5. CONCLUSÕES

O crescimento e direccionamento do tubo polínico desde o estigma até ao óvulo envolve uma série de complexos fenómenos de comunicação entre as células. Os grãos de pólen e os tubos polínicos interactuam com vários tecidos diplóides e com várias células haplóides do pistilo para que ocorra com sucesso o processo de reprodução sexuada nas angiospérmicas. Em *A. hypochondriacus* a abundância das PAGs nos tecidos do pistilo e a sua distribuição selectiva, já verificada para um vasto conjunto de angiospérmicas, são a razão principal para considerar que esta classe de proteoglicanos desempenha funções importantes na reprodução sexuada.

A expressão selectiva dos epítomos das PAGs nos tecidos do pistilo indica que cada conjunto de PAGs deve desempenhar funções diferentes e relacionadas com o tecido onde estão presentes. Assim ao nível do estigma sugere-se que as PAGs desempenham uma função de suporte adesivo; no estilete as PAGs desempenharão funções relacionadas com a nutrição e orientação do tubo polínico; as PAGs presentes nos elementos traqueais de xilema estarão relacionadas com o processo de diferenciação destas células. Já ao nível do óvulo os dados obtidos sugerem que as PAGs façam parte de um mecanismo quimiotrópico de atracção do tubo polínico desde o micrópilo do óvulo até ao saco embrionário. A localização na membrana plasmática e na parede celular relaciona-as sem dúvida, com processos de interacção célula-célula, essenciais durante o desenvolvimento.

Parece-nos claro que o conhecimento das relações exactas entre as diferentes PAGs dos tecidos do pistilo e as suas funções, incluindo acontecimentos como os da interacção pólen-pistilo, nutrição do tubo polínico e diferenciação celular, depende do conhecimento detalhado da estrutura de cada uma das PAGs. No entanto até ao momento apenas um pequeno número destas glicoproteínas foi caracterizado. No futuro será necessário purificar e caracterizar as PAGs dos tecidos reprodutores de algumas plantas para melhor determinar as suas funções. Para investigar a regulação das PAGs durante o desenvolvimento será importante utilizar por exemplo anticorpos produzidos contra as regiões proteicas não glicosiladas das PAGs ou então técnicas baseadas na clonagem molecular de modo a examinar a expressão dos núcleos proteicos das PAGs. Seria importante ainda verificar a possibilidade de algumas PAGs interactuarem entre si ou com outras moléculas, para realizarem determinada função sendo provável que múltiplas

proteínas desempenhem funções que se sobrepõem de modo a suportar o crescimento do tubo polínico e a diferenciação celular.

Concluindo, tudo indica que as PAGs estão envolvidas em múltiplos processos relacionados com o desenvolvimento das plantas, mas a descrição pormenorizada de como tal acontece é ainda uma tarefa para a investigação dos próximos anos.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bacic A, Gell AC, Clarke AE (1988) Arabinogalactan-proteins from stigmas of *Nicotiana glauca*. *Phytochemistry* 27: 679-684.
- Baker SC, Robinson-Beers K, Villanueva JM, Gasser CS (1997) Interactions among genes regulating ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 145: 1109-1124.
- Baldwin TC, McCann MC, Roberts K (1993) A novel hydroxiprolin-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. *Plant Physiol* 103: 115-123.
- Bedinger P (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.
- Casero PJ, Casimiro I, Knox JP (1998) Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in the root apex of four species. *Planta* 204: 252-259.
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 281-309.
- Chasan R (1994) Arabinogalactan-proteins: getting to the core. *Plant Cell* 6: 1519-1521.
- Chen C-G, Pu Z-Y, Moritz RL, Simpson RJ, Bacic A, Clarke AE, Mau S-L (1994) Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*) cell suspension culture. *Proc Natl Acad Sci* 91: 10305-10309.
- Cheung AY (1995) Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc Natl Acad Sci* 92: 3077-3080.
- Cheung AY (1996) Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. *Trends Plant Sci* 1: 45-51.
- Cheung AY, Wu H-M (1999) Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction. *Protoplasma* 208: 87-98.
- Cheung AY, Wang H, Wu H (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383-393.
- Clarke AE, Gleeson P, Harrison S, Knox RB (1979) Pollen-stigma interactions: identification and characterization of surface components with recognition potential. *Proc Natl Acad Sci* 76: 3358-3362.
- Coimbra S (1998) Biologia da reprodução sexuada em *Amaranthus hypochondriacus* L., Tese de Doutoramento. Universidade do Porto, Porto.

- Coimbra S, Salema R (1997) Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus hypochondriacus* L. ovules. *Protoplasma* 199: 75-82.
- Cresti M, Blackmore S, van Went JL (1992) Atlas of sexual reproduction in flowering plants. Springer-Verlag, Berlin.
- Dolan L, Linstead P, Roberts K (1995) An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from vascular initials in the *Arabidopsis* root. *Protoplasma* 189: 149-155.
- Du H, Simpson RJ, Moritz RL, Clarke AE, Bacic A (1994) Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the styles of *Nicotiana alata* and characterization of a corresponding cDNA. *Plant Cell* 6: 1643-1653.
- Du H, Simpson RJ, Clarke AE, Bacic A (1996) Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana alata*. *Plant J* 9: 313-323.
- Esau K (1977) Anatomy of seed plants. 2 ed. John Wiley and Sons, New York.
- Faure J-E, Aldon D, Rougier M, Dumas C (1996) Emerging data on pollen tube growth and fertilization in flowering plants, 1990-1995. *Protoplasma* 196: 132-143.
- Ferguson C, Bacic A, Anderson MA, Read SM (1999) Subcellular distribution of arabinogalactan proteins in pollen grains and tubes as revealed with a monoclonal antibody raised against stylar arabinogalactan proteins. *Protoplasma* 206: 105-117.
- Fincher GB, Stone BA, Clarke AE (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Ann Rev Plant Physiol* 34: 47-70.
- Franklin-Tong VE (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* 11: 727-738.
- Fukuda H (1997) Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9: 1147-1156.
- Gane AM, Clarke AE, Bacic A (1995) Localization and expression of arabinogalactan-proteins in the ovaries of *Nicotiana alata* Link and Otto. *Sex Plant Reprod* 8: 278-282.
- Gao M, Showalter M (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant J* 19: 321-331.
- Gao M, Showalter AM (2000) Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* 210: 865-874.

- Gao M, Kieliszewski MJ, Lamport D, Showalter M (1999) Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *The Plant J* 18: 43-55.
- Gasser CS, Robinson-Beers K (1993) Pistil development. *Plant Cell* 5: 1231-1239.
- Gell AC, Bacic A, Clarke AE (1986) Arabinogalactan-proteins of the female sexual tissue of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol* 82: 885-889.
- Gens JS, Fujiki M, Pickard BG (2000) Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Protoplasma* 212: 115-134.
- Gerster J, Allard S, Robert LS (1996) Molecular characterization of two *Brassica napus* pollen-expressed genes encoding putative arabinogalactan proteins. *Plant Physiol* 110: 1231-1237.
- Gleeson PA, Clarke AE (1980) Arabinogalactans of sexual and somatic tissues of *Gladiolus* and *Lilium*. *Phytochemistry* 19: 1777-1782.
- Goldman MHS, Goldberg RB, Mariani C (1994) Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J* 13: 2976-2984.
- Greenberg JT (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci* 93: 12094-12097.
- Groover A, Jones AM (1999) Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol* 119: 375-384.
- Herman EM, Lamb CJ (1992) Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiol* 98: 264-272.
- Herrero M, Hormaza JI (1996) Pistil strategies controlling tube growth. *Sex Plant Reprod* 9: 343-347.
- Huang B-Q, Russell SD (1992) Female germ unit: organization, isolation, and function. *Int Rev Cytol* 140: 233-293.
- Hülkamp M, Kopczak S, Horejsi TF, Kihl BK, Pruitt RE (1995a) Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8: 703-714.
- Hülkamp M, Schneitz K, Pruitt RE (1995b) Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7: 57-64.
- Jauh GY, Lord EM (1995) Movement of the tube cell in lily style in the absence of the pollen grain and the spent pollen tube. *Sex Plant Reprod* 8: 168-172.

- Jauh GY, Lord EM (1996) Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* 199: 251-261.
- Jauh GY, Eckard KJ, Nothnagel EA, Lord EM (1997) Adhesion of lily pollen tubes on an artificial matrix. *Sex Plant Reprod* 10: 173-180.
- Knox JP (1995) Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *FASEB* 9: 1004-1012.
- Knox JP (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int Rev Cytol* 171: 79-120.
- Knox JP, Linstead P, Peart JM, Cooper C, Roberts K (1991) Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *The Plant J* 1: 317-326.
- Knox P (1999) Intriguing, complex and everywhere: getting to grips with arabinogalactan-proteins. *Trends Plant Sci* 4: 123-125.
- Kohorn BD (2000) Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiol* 124: 31-38.
- Kreuger M, van Holst G-J (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189: 243-248.
- Kreuger M, van Holst G-J (1996) Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol Biol* 30: 1077-1086.
- Langan K, Nothnagel EA (1997) Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. *Protoplasma* 196: 87-98.
- Li SX, Showalter AM (1996) Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein. *Plant Mol Biol* 32: 641-652.
- Li Y-Q, Bruun L, Pierson ES, Cresti M (1992) Periodic deposition of arabinogalactan epitopes in the cell wall of pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 188: 532-538.
- Lind JL, Bacic A, Clarke AE, Anderson MA (1994) A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *The Plant J* 6: 491-502.
- Lind JL, Bönig I, Clarke AE, Anderson MA (1996) A style-specific 120-kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana alata* in vivo. *Sex Plant Reprod* 9: 75-86.
- Loopstra CA, Puryear D, No E-G (2000) Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine. *Planta* 210: 686-689.

- Lord EM, Sanders LC (1992) Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: a special case of cell movement in plants. *Dev Biol* 153: 16-28.
- Lush WM (1999) Whither chemotropism and pollen tube guidance? *Trends Plant Sci* 4: 413-418.
- Lush WM, Grieser F, Wolters-Arts M (1998) Directional guidance of *Nicotiana glauca* pollen tubes in vitro and on the stigma. *Plant Physiol* 118: 733-741.
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol* 122: 3-9.
- Malhó R (1998) Pollen tube guidance - the long and winding road. *Sex Plant Reprod* 11: 242-244.
- Malhó R, Trewavas AJ (1996) Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 8: 1935-1949.
- Mascarenhas JP (1993) Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 5: 1303-1314.
- Mascarenhas JP, Machlis L (1962) Chemotropic response of *Antirrhinum majus* pollen to calcium. *Nature* 196: 292-293.
- McCabe PF, Valentine TA, Forsberg LS, Pennell RI (1997) Soluble signals from cells identified at cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell* 9: 2225-2241.
- Mo Y, Nagel C, Taylor LP (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc Natl Acad Sci* 89: 7213-7217.
- Motose H, Sugiyama M, Fukuda H (2001) An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 42: 129-137.
- Nasrallah JB, Nasrallah ME (1993) Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5: 1325-1335.
- Oxley D, Bacic A (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc Natl Acad Sci* 96: 14246-14251.
- Park S-Y, Jauh GY, Mollet J-C, Eckard KJ, Nothnagel EA, Walling LL, Lord EM (2000) A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12: 151-163.

- Pennell RI, Roberts K (1990) Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature* 344: 547-549.
- Pennell RI, Lamb C (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9: 1157-1168.
- Pennell RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR, Roberts K (1989) A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *J Cell Biol* 108: 1967-1977.
- Pennell RI, Janniche L, Kjellbom P, Scofield GN, Peart JM, Roberts K (1991) Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oil seed rape flowers. *Plant Cell* 3: 1317-1326.
- Pierson ES, Miller DD, Callaham DA, Shipley AM, Rivers BA, Cresti M, Hepler PK (1994) Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* 6: 1815-1828.
- Pierson ES, Miller DD, Callaham DA, van Aken J, Hackett G, Hepler PK (1996) Tip-localized entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol* 174: 160-173.
- Pogson BJ, Davies C (1995) Characterization of a cDNA encoding the protein moiety of a putative arabinogalactan protein from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol Biol* 28: 347-352.
- Preuss D, Lemieux B, Yen G, Davis RW (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev* 7: 974-985.
- Pruitt RE (1997) Molecular mechanics of smart stigmas. *Trends Plant Sci* 2: 328-329.
- Ray S, Park S-S, Ray A (1997) Pollen tube guidance by the female gametophyte. *Development* 124: 2489-2498.
- Reger BJ, Pressey R, Chaubal R (1992) *In vitro* chemotropism of pearl millet pollen tubes to stigma tissue: a response to glucose produced in the medium by tissue-bound invertase. *Sex Plant Reprod* 5: 201-205.
- Reiser L, Fischer RL (1993) The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5: 1291-1301.
- Roy S, Jauh GY, Hepler PK, Lord EM (1998) Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta* 204: 450-458.
- Russell SD (1993) The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1349-1359.
- Russell SD (1996) Attraction and transport of male gametes for fertilization. *Sex Plant Reprod* 9: 337-342.

- Samaj J, Samajová O, Peters M, Baluska F, Lichtscheidl I, Knox JP, Volkmann D (2000) Immunolocalization of LM2 arabinogalactan protein epitope associated with endomembranes of plant cells. *Protoplasma* 212: 186-196.
- Sanders LC, Lord EM (1989) Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants. *Science* 243: 1606-1608.
- Sanders LC, Lord EM (1992) A dynamic role for the stylar matrix in pollen tube extension. In: Sexual reproduction in flowering plants. Russell SD, Dumas C (ed). Academic Press, San Diego, pp: 297-318.
- Schindler T, Bergfeld R, Schopfer P (1995) Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *The Plant J* 7: 25-36.
- Schultz CJ, Hauser K, Lind JL, Atkinson AH, Pu Z-y, Anderson MA, Clarke AE (1997) Molecular characterisation of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120 KDa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Mol Biol* 35: 833-845.
- Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci* 3: 426-431.
- Schultz C, Johnson KL, Currie G, Bacic A (2000) The classical arabinogalactan protein gene family of Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1751-1767.
- Serpe MD, Nothnagel EA (1994) Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193: 542-550.
- Serpe MD, Nothnagel EA (1995) Fractionation and structural characterization of arabinogalactan-proteins from the cell wall of rose cells. *Plant Physiol* 109: 1007-1016.
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23.
- Smyth DR (1997) Plant development: attractive ovules. *Current Biology* 7: 64-66.
- Sommer-Knudsen J, Clarke AE, Bacic A (1997) Proline- and hydroxiproline-rich gene products in the sexual tissues of flowers. *Sex Plant Reprod* 10: 253-260.
- Sommer-Knudsen J, Lush WM, Bacic A, Clarke AE (1998) Re-evaluation of the role of a transmitting tract-specific glycoprotein on pollen tube growth. *The Plant J* 13: 529-535.

- Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 461-491.
- Wang H, Wu H, Cheung AY (1993) Development and pollination regulated accumulation and glycosylation of a stylar transmitting tissue-specific proline-rich protein. *Plant Cell* 5: 1639-1650.
- Wang H, Wu H, Cheung AY (1996) Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. *The Plant J* 9: 715-727.
- Wilhelmi LK, Preuss D (1996) Self-sterility in *Arabidopsis* due to defective pollen tube guidance. *Science* 274: 1535-1537.
- Wilhelmi LK, Preuss D (1997) Blazing new trails. Pollen tube guidance in flowering plants. *Plant Physiol* 113: 307-312.
- Willats WGT, Knox JP (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of b-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J* 9: 919-925.
- Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C (1998) Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392: 818821.
- Wu H, Wang H, Cheung AY (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* 82: 395-403.
- Wu H, Wong E, Ogdahl J, Cheung AY (2000) A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *The Plant J* 22: 165-176.
- Yariv J, His H, Katchalski E (1967) Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem J* 105: 10-20.
- Yates EA, Valdor J-F, Haslam SM, Morris HR, Mackie W, Knox JP (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6: 131-139.
- Youl J, Bacic A, Oxley D (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7921-7926.
- Zhu J-K, Bressan RA, Hasegawa PM (1993) Loss of arabinogalactan-proteins from the plasma membrane of NaCl-adapted tobacco cells. *Planta* 190: 221-226.