

Artigo de Revisão

EXPRESSÃO GÊNICA NOS ESTIGMAS E ESTILETES DE PLANTAS DA FAMÍLIA SOLANACEAE: SEQÜÊNCIAS RELACIONADAS COM A PATOGÊNESE ⁽¹⁾PAULA CRISTINA DA SILVA ANGELO ⁽²⁾**RESUMO**

O florescimento é uma mudança fundamental no desenvolvimento das plantas. A evocação do florescimento é a transição entre a fase vegetativa e a reprodutiva, durante a qual ocorre a especialização dos meristemas apicais. Nas plantas com flores completas, como aquelas da família Solanaceae, células meristemáticas na camada mais externa, dão origem às sépalas e aquelas na segunda camada originam as pétalas; na terceira camada, as células tornam-se estames e aquelas na quarta e mais interna camada dão origem aos carpelos (ovários, estiletos e estigmas). O surgimento desses órgãos florais é relativamente recente na história evolutiva das plantas e demandou o desenvolvimento de padrões de expressão tecido-específicos. Um desses padrões específicos, em flores de Solanaceae, inclui a expressão de genes relacionados com os processos de defesa, cuja atividade é induzida por infecção com patógenos ou por ferimentos nos órgãos vegetativos da planta, mas que são constitutivamente expressos nas flores saudáveis, onde os transcritos se acumulam seguindo padrões vinculados ao desenvolvimento. Neste trabalho, são revistas e compiladas as informações publicadas sobre os genes relacionados com as reações de defesa, denominados Sp41, PR10a, SK2 e sobre uma adenosina-metiltransferase, que também pode estar relacionada com a reação aos patógenos, e que seguem esse modelo de expressão. Algumas das hipóteses existentes para explicar este modelo também são apresentadas.

Palavras-chave: florescimento, Sp41, PR10a, SK2, metiltransferase.

ABSTRACT**GENE EXPRESSION IN SOLANACEAE STIGMAS AND STYLES: PATHOGENESIS RELATED SEQUENCES**

Flowering is a fundamental process in plant development. Flower evocation is the transition from the vegetative to the reproductive phase, when the specialization of apical meristems takes place. In plants, such as the Solanaceae, which present complete flowers, the meristematic cells in the most external first series bring out the sepals and those cells in the second series turn to be the petals; in the third series the cells become stamens and the cells in the innermost series give origin to carpels (ovaries, styles and stigmas). Floral organs have shown up recently in evolution and this event demanded the development of tissue-specific patterns for gene expression. Indeed, some of the pathogenesis related genes from Solanaceae, induced by infection or wounding in vegetative organs, show flower-specific patterns of transcription, with constitutive expression and the occurrence of temporal profiles of expression controlled by development being detected in healthy floral tissues. PR10a, SK2, Sp41 pathogenesis related genes and an adenosine:methyltransferase, possibly related to pathogenesis as well, are genes that follow the described tissue-specific patterns and are reviewed here. Hypothesis proposed to demonstrate the meanings of these mechanisms of gene expression are also presented.

Key-words: flowering, Sp41, PR10a, SK2, methyltransferase.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Doutorado da autora apresentada à USP/Ribeirão Preto, em 2001. Recebido para publicação em 19 de janeiro de 2004 e aceito em 14 de março de 2005.

⁽²⁾ Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 010 - km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319, 69011-970 Manaus (AM). E-mail: paula@cpaa.embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

O florescimento é uma mudança fundamental no desenvolvimento das plantas. A evocação do florescimento é a transição entre a fase vegetativa e a reprodutiva, durante a qual ocorre a especialização dos meristemas apicais. Esses tecidos meristemáticos promovem a emergência de quatro camadas concêntricas de primórdios de órgãos florais, antes que sua atividade cesse. Mutações em genes homeóticos permitiram o reconhecimento de sua atuação na determinação da identidade dos meristemas florais. Esses genes codificam fatores de transcrição, os quais se expressam em regiões específicas dos meristemas. Na evocação floral, os fatores de transcrição homeóticos interagem entre si e com outros genes também relacionados com o processo de florescimento, em uma “cascata” de reações que resulta no surgimento de flores. Nas plantas de flores completas, células primordiais na camada mais externa dão origem às sépalas, aquelas na segunda camada originam as pétalas, na terceira camada as células tornam-se estames e aquelas na quarta e mais interna camada dão origem aos carpelos (BERNIER, 1988).

Dois ou mais carpelos podem ser fundidos em uma estrutura única, denominada pistilo. Observa-se nos pistilos uma superfície especializada para receber o pólen, denominada estigma. Estigma e ovário são conectados por meio da estrutura denominada estilete (ESAU, 1981). A porção central do estilete denomina-se tecido transmissor, e é envolvida pelo parênquima cortical e pela epiderme (KANDASAMY e KRISTEN, 1987). Na família Solanaceae, o estigma é classificado como úmido. Estigmas úmidos são aqueles nos quais pode ser observada uma secreção superficial característica. Tal secreção, ou exsudato, é produzida pelas células da zona secretória do estigma e/ou pelas células do tecido transmissor do estilete, imediatamente subjacente (CRESTI et al., 1986; KANDASAMY e KRISTEN, 1987; LI et al., 1994). A secreção preenche os espaços intercelulares do tecido transmissor, da mesma maneira que o faz no estigma, e é altamente enriquecida em carboidratos, especialmente sob a forma de glicoproteínas, formando uma matriz extracelular (CRESTI et al., 1986; BACIC et al., 1988).

Em plantas com arquitetura floral primitiva, os carpelos são compostos por estruturas semelhantes a folhas, dobradas longitudinalmente e margens fundidas. Essas margens são cobertas por tricomas e alguns deles protudem para formar uma “crista estigmática”, à qual os grãos de pólen aderem para germinar (BAILEY e SWAMY, 1951). O pistilo teria evoluído, provavelmente, dessas estruturas semelhantes a folhas e, portanto, os tecidos

especializados dos estigmas/estiletos (papilas estigmáticas, zona secretória, tecido transmissor do estilete) parecem ter tido origem em estruturas muito mais simples. Essa especialização e a diferenciação bioquímica, relativamente recentes, de células e tecidos são conseqüências da modulação órgão-específica da expressão gênica, entre outros fatores. Assim, a aquisição da forma atual observada nos estigmas/estiletos demandou o desenvolvimento de padrões de expressão órgão-específicos. A análise estrutural e do padrão de expressão é importante para o entendimento da função dos genes (GOLDMAN et al., 1994). O estudo da relação entre a diferenciação das flores e os padrões tecido-específicos de expressão gênica pode, por sua vez, contribuir para a compreensão das funções exercidas por células, tecidos e órgãos relativamente “recém-diferenciados”.

A expressão, nas flores, em níveis altos, de “genes de defesa” (aqueles que codificam proteínas que fazem parte das famílias denominadas PR - “pathogenesis related”), de maneira independente de indução por infecção com patógenos ou por ferimentos infligidos à planta, ocorre em Solanaceae e teria sido assegurada através do desenvolvimento de mecanismos reguladores, porque a função reprodutiva exercida pelos órgãos florais e, mais especificamente, pelos estigmas/estiletos, ter-se-ia tornado, ao longo do processo evolutivo, essencial para as plantas (MILLIGAN e GASSER, 1995). Foi observado um conjunto de sete clones de cDNA correspondentes a genes expressos nas flores de tomate, de alto grau de similaridade com seqüências PR previamente descritas, cuja transcrição ocorria em outros órgãos da planta. Os transcritos (sinais da expressão dos genes até a etapa do RNA mensageiro) verificados em tecidos vegetativos seriam induzidos pela presença de fatores de patogenicidade ou por ferimentos, enquanto seus homólogos nos estigmas/estiletos e outros órgãos florais seriam expressos em níveis constitutivos altos ou de acordo com padrões controlados ao longo do desenvolvimento (MILLIGAN e GASSER, 1995). Apesar de alta similaridade da região estrutural, o que é natural em membros de uma mesma família de genes, aqueles verificados nas folhas seriam expressos a partir da indução por infecção (patogênese) ou ferimentos, enquanto os elementos reguladores da transcrição (promotor e *cis*-elementos adjacentes, que são seqüências curtas de nucleotídeos, conservadas evolutivamente e encontradas, com redundância, em contextos similares, nas regiões de promoção de transcrição) dos genes que codificam as proteínas da mesma família detectadas nas flores, garantiriam sua expressão tecido-específica, e em níveis altos, nos tecidos florais sadios.

A hipótese construída para explicar a evolução desse sistema admitiu que o desenvolvimento independente de seqüências regulatórias que permitissem o funcionamento independente dos dois conjuntos de genes - genes expressos nos tecidos vegetativos e genes expressos nas flores - tão relacionados estruturalmente seria improvável. A explicação mais plausível seria a ocorrência de duplicação gênica e posterior divergência entre as seqüências expressas em folhas e flores (MILLIGAN e GASSER, 1995). A regulação fina da expressão gênica - ajuste ao contexto ontogênico ou à ocorrência de estresses bióticos - nesses sistemas estaria, então, vinculada à presença de fatores de transcrição tecido-específicos. Alguns dos sistemas de expressão descritos seguem esse mesmo modelo de expressão gênica (Figura 1).

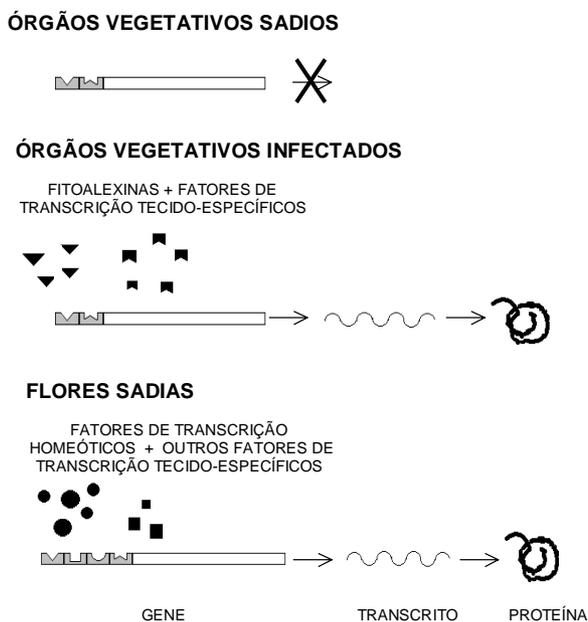


Figura 1. Representação do sistema de expressão dos genes relacionados com a patogênese em órgãos vegetativos e nas flores. Elementos reguladores do gene estão representados em cor cinza e a região estrutural em branco. Os fatores de transcrição estão representados em preto (ANGELO, P.C.S.).

2. PR-10a, UMA PROTEÍNA PR EXPRESSA NO ESTIGMA DAS FLORES DE BATATA

Fusões entre a região reguladora de um gene denominado PR-10a da batata e a região estrutural do gene "repórter" que codifica para a β -glucuronidase (GUS) foram reintroduzidas em plantas dessa mesma espécie.

A atividade GUS, detectada por coloração azul proveniente da ação daquela enzima sobre um substrato específico, revelou que o acúmulo dos transcritos correspondentes a PR-10a seria induzido em órgãos vegetativos por ferimentos e pela infecção com patógenos, especialmente, o fungo *Phytophthora infestans* (CONSTABEL e BRISSON, 1995).

A proteína PR-10a foi detectada por imunoreação, seguindo o mesmo padrão de transcrição pós-indução. Nas flores da batata, no entanto, independentemente de indução por infecção, ocorreu um padrão temporal de acúmulo da proteína, modulado pelo desenvolvimento.

As concentrações de proteína PR-10a nas flores saudáveis aumentaram gradativamente durante o desenvolvimento, atingindo um pico em flores completamente abertas, quando foi detectada em quantidade equivalente àquela encontrada nos tubérculos de batata, após a indução por um ativador (ácido araquidônico) de reações de defesa (CONSTABEL e BRISSON, 1995).

Os resultados dos experimentos, citados anteriormente, realizados com o gene repórter GUS sob controle da região reguladora de PR-10a, foram utilizados, também, para analisar em detalhes, por meio de preparações histológicas das flores saudáveis, o padrão espacial de transcrição do gene. A atividade da β -glucuronidase foi detectada somente nos estigmas, concentrada na região das papilas estigmáticas e mais difusa na zona secretória do estigma, subjacente. Nenhuma atividade foi detectada nos tecidos vasculares ou nas células dos estiletos (CONSTABEL e BRISSON, 1995).

Nos tubérculos de batata, durante as reações de defesa, a indução da transcrição de PR-10a é mediada pela ligação, aos *cis*-elementos adjacentes ao promotor do gene, de um complexo protéico que inclui um componente denominado p24 (DESVAUX et al., 2000). Portanto, p24 é parte de um conjunto de fatores de transcrição. É possível que existam conjuntos de fatores tecido-específicos que garantam a ocorrência de transcrição de PR-10a em nível alto nos estigmas de flores saudáveis. Talvez alguns desses fatores sejam expressos constitutivamente em flores, a partir da evocação floral.

O padrão temporal da expressão, independente da infecção por patógenos, seria produzido pelo acúmulo gradual de células com a identidade floral definida em consequência da atividade de genes homeóticos durante a morfogênese e no posterior crescimento dos órgãos florais, neste caso de PR-10a, mais especificamente, durante a morfogênese e o crescimento dos estigmas.

Uma seqüência parcial de cDNA, estruturalmente similar à proteína p24, foi isolada de uma biblioteca de cDNAs de carpelos de tomate (resultado não publicado, seqüência registrada sob o n.º AI488224, no banco de seqüências do NCBI, no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A p24 poderia ser um fator de transcrição específico de flores. A atividade catalisada por algumas das proteínas PR ainda não foi efetivamente demonstrada. Uma atividade provável para proteínas da família PR-10 é de ribonuclease (ZHOU et al., 2002).

3. SK2: ENDOQUITINASE DOS PISTILOS DE BATATA

Uma proteína com atividade de endoquitinase, também classificada como PR, foi purificada de pistilos de flores maduras de batata e denominada SK2. Essa proteína constituiria 5% da fração protéica solúvel dos pistilos daquela espécie, sendo similar a outras quitinases da batata e do fumo, de *Arabidopsis* e da aveia. A atividade catalítica da enzima purificada de batata foi testada e demonstrada. Por imunoensaio, proteínas com os mesmos epitopos foram identificadas em quantidades muito menores nas raízes primárias e nas folhas, provavelmente devido à reação cruzada dos anticorpos com outros membros da família das quitinases expressos nesses órgãos. Em flores, a reação *in situ* com os mesmos anticorpos indicou a presença de espécies reativas apenas na matriz extracelular do tecido transmissor e, em menor intensidade, na epiderme do ovário. O acúmulo da proteína em flores não foi induzido por estresse (WEMMER et al., 1994).

Sondas constituídas de oligonucleotídeos sintéticos correpondentes a todas as combinações possíveis, ou pelo menos às mais prováveis, de códons para uma parte da proteína SK2 foram utilizadas para o “screening” de uma biblioteca de cDNAs de pistilos de batata. Transcritos com 1.050 nucleotídeos, similares aos cDNAs SK2, foram encontrados, em hibridações do tipo “northern blot”, apenas nos pistilos, indicando ser a transcrição desse gene também restrita aos órgãos reprodutivos femininos (WEMMER et al., 1994). Uma vez que quitinas (homopolímeros de (1,4)- β -acetilglicosaminas) não são observadas em plantas, sendo, porém, constituintes comuns das paredes celulares de fungos e do exoesqueleto dos insetos, seria mais provável que essa enzima do estilete estivesse envolvida nas reações de defesa contra patógenos. No entanto, o transcrito e a proteína enzimaticamente ativa são detectados em grande quantidade nas flores sadias. A existência de associação entre a quitinase e os tubos polínicos,

durante sua germinação através do tecido transmissor do estilete, não pôde ser demonstrada, embora tenha sido inicialmente proposta (WEMMER et al., 1994). Por outro lado, unidades isoladas de acetilglicosamina são encontradas nos pontos de inserção dos glicosídeos em algumas glicoproteínas. O reconhecimento e a mobilização dessas porções apoprotéicas, nos estigmas/estiletos, poderiam estar relacionados com os mecanismos de inibição ou de estímulo à germinação.

4. Sp41: ENDOGLICOSIDASE DO TECIDO TRANSMISSOR DO ESTILETE, NO FUMO

A seqüência de Sp41, que seria a proteína presente em maior quantidade no estilete do fumo, tem similaridade com (1,3)- β -glicosidases, proteínas PR que catalisam a hidrólise das ligações β -(1,3) entre monômeros de glicose. Sp41 foi, por imuno-reação, quase exclusivamente localizada na matriz extracelular do tecido transmissor e, em quantidade 500 vezes menor, em folhas de plantas não infectadas. Sp41 seria uma proteína altamente glicosilada nos estiletos e glicosilada em grau menor nas folhas, e a atividade hidrolítica da forma protéica encontrada na matriz extracelular do tecido transmissor foi demonstrada *in vitro*. Mais especificamente, neste caso, por se tratar de endoglicosidase, a capacidade de hidrolisar ligações internas entre monômeros de glicose em um polímero (a laminarina) mantido por ligações β -(1,3) foi comprovada (LOTAN et al., 1989; ORI et al., 1990).

A proteína purificada dos estiletos do fumo foi seqüenciada. Sondas de DNA, sintetizadas para conter combinações de códons capazes de gerar a mesma seqüência de aminoácidos de uma parte da proteína, foram utilizadas para o “screening” de uma biblioteca de cDNAs. Dois grupos de clones, com 1.390 e 1.427 nucleotídeos, com similaridade de 94% entre si, foram isolados.

Os transcritos correspondentes possuíam padrão de expressão temporal vinculado ao desenvolvimento do estilete. Não se verificou sinal de ocorrência de transcrição em botões florais recém-diferenciados.

Os transcritos começaram a ser detectados em botões diferenciados imaturos; o acúmulo de transcritos atingiu um pico com a aproximação da antese (abertura das flores) e em flores polinizadas a expressão continuou alta, até a instalação do processo de senescência dos tecidos da flor, que ocorre após a fertilização.

Resultados coerentes com o modelo proposto por MILLIGAN e GASSER (1995) podem ser observados também no sistema Sp41: os transcritos induzidos em folhas por infecção com o vírus do mosaico do tabaco não foram notados no estilete, e quando o ativador das reações de defesa, tunicamicina, foi aplicado ao pistilo, somente a forma pistilar de Sp41 foi expressa e nenhuma forma de glicosidase específica de folhas ocorreu (ORI et al., 1990).

Um clone de DNA genômico correspondente a uma das seqüências de cDNA para Sp41 foi isolado e analisado. A fusão das regiões regulatórias com o gene repórter GUS confirmou o padrão de expressão tecido-específico verificado por imunodeteção da proteína. Um “motivo” para interação com o fator de transcrição homeótico *Agamous* foi identificado na posição -300 da região regulatória do gene para Sp41. Uma série de experimentos de expressão da região estrutural de Sp41, em orientação “antisense”, sob o controle do promotor 35S (promotor do vírus do mosaico da couve-flor, que promove transcrição constitutiva de genes em plantas), com o objetivo de eliminar a expressão do gene, não teria provocado alteração morfológica ou fisiológica nas plantas transformadas (SESSA e FLUHR, 1995).

5. OUTRO GENE. O MESMO MODELO?

Recentemente, identificou-se um clone de cDNA para uma adenosina-metiltransferase, expressa exclusivamente no pistilo do tabaco, com um padrão temporal de transcrição modulado pelo desenvolvimento (ANGELO et al., 1999 e 2001). Um dos possíveis substratos para a metilação seria o ácido salicílico. Estando envolvida com mecanismos de defesa, o modelo de regulação sugerido para os genes descritos acima estaria sendo reproduzido para a metil-transferase.

O produto da reação, o metil-salicilato, estaria implicado, como um mensageiro volátil, na ativação inicial das reações de defesa (SHULAEV et al., 1997; SESKAR et al., 1998; ROSS et al., 1999; ARIMURA et al., 2000; OZAWA et al., 2000). O metil-jasmonato também poderia ser o produto da reação de metilação, neste caso, provavelmente, evocando, também, os mecanismos de morfogênese das flores, em inflorescências de uma mesma planta ou em plantas vizinhas, contribuindo para a sincronização do processo de evocação floral (ZENG et al., 1999; OZAWA et al., 2000; SEO et al., 2001). Uma metiltransferase que atua comprovadamente sobre o ácido jasmônico, registrada sob o código 2.1.1.141, junto à

“International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), foi purificada de *Arabidopsis thaliana* (SEO et al., 2001).

6. QUESTÕES INTERESSANTES

Estaria, então, a proteína Sp41 comprometida somente com as vias metabólicas vinculadas à patogênese (SESSA e FLUHR, 1995), embora a ocorrência de um padrão de expressão vinculado ao desenvolvimento tenha sido demonstrada em flores sadias (ORI et al., 1990)?

As glicosidases encontradas na matriz extracelular do tecido transmissor do estilete do fumo, espécie que não apresenta sistema ativo de auto-incompatibilidade, não devem interferir na germinação de tubos polínicos da própria espécie, cuja parede é constituída, principalmente, de calose, um (1,3)- β -glicosídeo. Eventualmente, notam-se anéis de arabinana, recobertos por celulose e pectina (BRETT e WALDRON, 1990; LI et al., 1994). Essa estrutura permite o trânsito passivo de proteínas pequenas (JACKSON e KAMBOJ, 1986; WU et al., 1995). Seria necessária, então, a ação catalisada pela Sp41 ser para dificultar o crescimento dos tubos polínicos de gametófitos incongruentes (como, por exemplo, os grãos de pólen de outras espécies que podem ser considerados “passivamente incompatíveis” - ASCHER, 1986)? A ausência de Sp41, um polipeptídeo que representa mais de 20% do total de proteínas solúveis encontradas nos estiletos do fumo e que tem atividade endoglicosidase específica sobre polímeros de (1,3)- β -glicosídeo (ORI et al., 1990; SESSA e FLUHR, 1995), poderia resultar em quebra de barreira à germinação de pólen incongruente? Essa hipótese ainda não foi testada.

Existem, no tecido transmissor do estilete e no ovário, mecanismos de direcionamento e suporte ao crescimento do tubo polínico (CHEUNG et al., 1993, 1995a,b; JENSEN et al., 1983). Se esses mecanismos de suporte forem desencadeados apenas na interação compatível (MULCAHY e MULCAHY, 1986), a lentidão das etapas de alongamento (ASCHER, 1986) ou de reforço da parede dos tubos polínicos incongruentes (LI et al., 1994) poderia gerar oportunidade para a ação da endoglicosidase Sp41 e de outras enzimas liticas? Esse fato poderia impedir que a interação do pistilo com grãos de pólen “passivamente incompatíveis” ativasse, “inutilmente”, o mecanismo de degeneração de sinérgides (MULCAHY e MULCAHY, 1986) ou provocasse danos aos sacos embrionários, reduzindo a eficiência reprodutiva das plantas?

7 - ÚLTIMAS CONSIDERAÇÕES

Existe outro ponto de vista sobre a expressão em níveis constitutivos altos de genes relacionados com processos de reação aos ferimentos e ao ataque de patógenos em flores sadias: as alterações morfogênicas que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento das plantas poderiam requerer a ruptura de aglomerados de células ou tecidos vegetais previamente estabelecidos (NEALE et al., 1990). A lise inicial dos tecidos poderia ativar mais genes que codificam proteínas com atividade lítica, reconhecidas como PR, desde que os fragmentos de tecidos atuassem como fitoalexinas (EULGEM et al., 1999; Klarzynski et al., 2000). Esse tipo de atividade lítica ocorreria durante o surgimento dos órgãos da flor, na evocação floral; durante a germinação de tubos polínicos através dos estiletos (NEALE et al., 1990) e da mesma forma, durante a germinação de sementes ou lançamento de ramos laterais (HIRSINGER et al., 1999).

Seqüências relacionadas com a auto-incompatibilidade (CLARKE e NEWBIGIN, 1993; McCubbin e Kao, 1999; Charlesworth, 2000), com a megagametogênese ou com a senescência da flor depois da fertilização não estão diretamente vinculadas ao funcionamento do pistilo durante o processo de fertilização compatível, que é o foco principal deste trabalho, e não foram aqui incluídas. Mais especificamente, sobre interações entre pólen e pistilo podem ser consultadas as seguintes referências: CORNISH et al. (1988); GIRANTON et al. (1999); PALANIVELU e PREUSS (2000) e ROULSTON et al. (2000).

AGRADECIMENTOS

Aos Pesquisadores da Embrapa Amazônia Ocidental, Vicente Haroldo de Figueiredo Moraes e Larissa Alexandra Cardoso Moraes pelas sugestões. À Maria Perpetua B. Pereira pela revisão da escrita. À Prof.^a Dr.^a Maria Helena de Souza Goldman (FFCL - USP Ribeirão Preto) pela oportunidade de trabalhar com um assunto tão interessante quanto o florescimento. Ao Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade (UFPE) pelo incentivo. À FAPESP pelo apoio financeiro durante o primeiro ano do Curso de Doutorado.

REFERÊNCIAS

ANGELO, P.C.S.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S. A novel methionine:salicylic acid methyltransferase exclusively expressed in tobacco pistils. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., Goiânia, 2001. *REDBIO 2001 - Programa e Resumos...* Goiânia: CEGRAF-FUNAPE-HAGAPRINT GRÁFICA, 2001. p.166.

ANGELO, P.C.S.; TERENCE, M.F.; MEGLHORIATTI, F.A.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S. A novel gene preferentially expressed in pistils of *Nicotiana tabacum* is identified. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p.294, 1999. Suplemento.

ARIMURA, G-I.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; TAKABAYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, London, v.406, p.512-514, 2000.

ASCHER, P.D. Incompatibility and incongruity: two mechanisms preventing gene transfer between taxa. In: MULCAHY, D.L.; MULCAHY, G.B.; OTTAVIANO, E. (Eds.) *Biotechnology and Ecology of Pollen*. New York: Springer-Verlag, 1986. p.251-256.

BACIC, A.; GELL, A.C.; CLARKE, A.E. Arabinogalactan proteins from stigmas of *Nicotiana glauca*. *Phytochemistry*, Oxford, v.27, p.679-684, 1988.

BAILEY, I.W.; SWAMY, B.G.L. The conduplicate carpel of dicotyledons and its initial trends of specialization. *American Journal of Botany*, New York, v.38, p.373-379, 1951.

BERNIER, G. The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.39, p.175-219, 1988.

BRETT, C.; WALDRON, K. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. London: Black & Chapman, Unwin Hyman Ltd, 1990. 194p.

CHARLESWORTH, D. How can two-gene models of self-incompatibility generate new specificities? *The Plant Cell*, Baltimore, v.2, p.309-310, 2000.

CHEUNG, A.Y. Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, Washington, v.92, p.3077-3080, 1995a.

CHEUNG, A.Y.; MAY, B.; KAWATA; E.E.; GU, Q.; WU, H-M. Characterization of cDNAs for stylar transmitting tissue-specific proline-rich proteins in tobacco. *The Plant Journal*, Oxford, v.3, p.151-160, 1993.

CHEUNG, A.Y.; WANG, H.; WU, H-M. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, Cambridge, v.82, p.383-393, 1995b.

CLARKE, A.E.; NEWBIGIN, E. Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, v.27, p.257-279, 1993.

CONSTABEL, C.P.; BRISSON, N. Stigma- and vascular-specific expression of the PR-10a gene of potato: a novel pattern of expression of a pathogenesis-related gene. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, St. Paul, v.8, p.104-113, 1995.

CORNISH, E.C.; PETTITT, J.M.; BONING, I.; CLARKE, A.E. Molecular aspects of fertilization in flowering plants. *Annual Review of Cell Biology*, Palo Alto, v.4, p.209-228, 1988.

DESVAUX, D.; DESPRÉS, C.A.; SUBRAMANIAM, R.; BRISSON, N. PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10a gene activation in potato. *The Plant Cell*, Baltimore, v.12, p.1477-1489, 2000.

- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1981. 293 p.
- EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; SCHMELZER, E.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I.E. Early events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **The EMBO Journal**, Köln, v.18, p.4689-4699, 1999.
- GIRANTON, J.L.; PASSELEGUE, E.; DUMAS, C.; COCK, J.M.; GAUDE, T. Membrane proteins involved in pollen-pistil interactions. **Biochimie**, Paris, v.81, p.675-680, 1999.
- GOLDMAN, M.H.S.; GOLDBERG, R.B.; MARIANI, C. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. **The EMBO Journal**, Köln, v.13, p.2976-2984, 1994.
- HIRSINGER, C.; SALVA, I.; MARBACH, J.; DURR, A.; FLECK, J.; JAMET, E. The tobacco extensin gene Ext 1.4 is expressed in cells submitted to mechanical constrains and in cells proliferating under hormone control. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.50, n.332, p.343-355, 1999.
- JACKSON, J.F.; KAMBOJ, R.K. Control of protein release from germinating pollen. In: MULCAHY, D.L.; MULCAHY, G.B.; OTTAVIANO, E. (Eds.) **Biotechnology and Ecology of Pollen**. New York: Springer-Verlag, 1986. p.369-372.
- JENSEN, W.A.; ASHTON, M.E.; BEASLEY, C.A. Pollen tube-embryo sac interaction in cotton. In: MULCAHY, D.L.; OTTAVIANO, E. (Eds.) **Pollen: biology and implications for plant breeding**. New York: Elsevier Biomedical, 1982, p.67-72.
- KANDASAMY, M.K.; KRISTEN, U. Developmental aspects of ultrastructure, histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana sylvestris*. **Annals of Botany**, London, v.60, p.427-437, 1987.
- KLARZYNSKI, O.; PLESSE, B.; JOUBERT, J.M.; YVIN, J.C.; KOPP, M.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, n.3, p.1027-1038, 2000.
- LI, Y.Q.; CHEN, F.; LINSKENS, H.F.; CRESTI, M. Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.7, p.145-152, 1994.
- LOTAN, T.; ORI, N.; FLUHR, R. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. **The Plant Cell**, Baltimore, v.1, p.881-887, 1989.
- McCUBBIN, A.G.; KAO, T.H. The emerging complexity of self-incompatibility (S-) loci. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.12, p.1-5, 1999.
- MILLIGAN, S.B.; GASSER, C.S. Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.28, p.691-711, 1995.
- MULCAHY, B.M.; MULCAHY, D.L. Pollen-pistil interaction. In: MULCAHY, D.L.; MULCAHY, G.B.; OTTAVIANO, E. (Eds.) **Biotechnology and Ecology of Pollen**. New York: Springer-Verlag, 1986. p.173-178.
- NEALE, A.D.; WAHLEITHNER, J.A.; LUND, M.; BONNETT, H.T.; KELLY, A.; MEEKS-WAGNES, D.R.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Chitinase, B-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **The Plant Cell**, Baltimore, v.2, p.673-684, 1990.
- ORI, N.; SESSA, G.; LOTAN, T.; HIMMELHOCH, S.; FLUHR, R. A major stylar matrix polypeptide (Sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. **The EMBO Journal**, Köln, v.9, p.3429-3436, 1990.
- OZAWA, R.; ARIMURA, G-I.; TAKABAYASHI, J.; SHIMODA, T.; TAKAOKI, N. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.41, n.4, p.391-398, 2000.
- PALANIVELU, R.; PREUSS, D. Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanism. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v.10, p.517-524, 2000.
- ROSS, J.R.; NAM, K.H.; D'AURIA, J.C.; PICHESKY, E. S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.367, n.1, p.9-16, 1999.
- ROULSTON, T.H.; CANE-JAMES, H.; BUCHMANN, S.L.T.I. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? **Ecological Monographs**, Durham, v.70, p.617-643, 2000.
- SEO, H.S.; SONG, J.T.; CHEONG, J.J.; LEE, Y-H.; LEE, Y-W.; HWANG, I.; LEE, J.S.; CHOI, Y.D. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.98, n.8, p.4788-4793, 2001.
- SESKAR, M.; SHULAEV, V.; RASKIN, I. Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.387-392, 1998.
- SESSA, G.; FLUHR, R. The expression of an abundant transmitting tract-specific endoglucanase (Sp41) is promoter-dependent and not essential for the reproductive physiology of tobacco. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.29, p.969-982, 1995.
- SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, London, v.385, p.718-720, 1997.
- WEMMER, T.; KAUFMANN, H.; KIRCH, H-H.; SCHNEIDER, K.; LOTTSPREICH, F. The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.) is an endochitinase. **Planta**, Berlin, v.194, p.264-273, 1994.

WU, H-M.; WANG, H.; CHEUNG, A.Y. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. **Cell**, Cambridge, v.82, p.395-403, 1995.

ZENG, X.; ZHOU, X.; ZHANG, W.; MUROFUSHI, N.; KITAHARA, T.; KAMURO, Y. Opening of rice floret in rapid response to methyl jasmonate. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.18, p.153-158, 1999.

ZHOU, X-J.; LU, S.; XU, Y-H.; WANG, J-W.; CHEN, X-Y. A cotton cDNA (GaPR-10) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity. **Plant Science**, Amsterdam, v.162, p.629-636, 2002.