UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



i

LIVIA CAMILLA TREVISAN SCORZA

CARACTERIZAÇÃO DO MOVIMENTO DO ANDROGINÓFORO DE FLORES DO GÊNERO Passiflora, SEÇÃO Xerogona (PASSIFLORACEAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) LIVIA CAMILLA TREVISAN SOORZA e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Sco79c	Scorza, Livia Camilla Trevisan Caracterização do movimento do androginóforo de flores do gênero Passiflora, seção Xerogona (Passifloraceae) / Livia Camilla Trevisan Scorza. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.
	Orientador: Marcelo Carnier Dornelas. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Passiflora. 2. Xerogona. 3. Androginóforo. 4. Movimento. I. Dornelas, Marcelo Carnier. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
	(
	(rcdVib)

Título em inglês: Anatomical characterization of the androgynophore movement in Passiflora, section Xerogona (Passifloraceae). Palavras-chave em inglês: Passiflora; Xerogona; Androgynophore; Movement. Área de concentração: Biologia Vegetal. Titulação: Mestre em Biologia Vegetal. Banca examinadora: Marcelo Carnier Dornelas, Sandra Maria Carmello-Guerreiro, Sílvia Rodrigues Machado. Data da defesa: 07/02/2011. Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal. Campinas, 07 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (orientador) Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro 0 00000 - J Profa. Dra. Stivia Rodrigues Machado

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e aos seus alunos, que tornam possível a expansão da formação acadêmica para a formação pessoal.

Ao Instituto de Biologia da Unicamp pelos cursos de Licenciatura em Ciências Biológicas e Mestrado em Biologia Vegetal, que me trouxeram até esta dissertação.

À FAPESP e ao CNPq por terem financiado este projeto de pesquisa.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA) da ESALQ – Universidade de São Paulo, ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima por ceder o uso dos microscópios eletrônicos e à Monica Lanzoni Rossi pelo auxílio no preparo do material de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao orientador Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas pela dedicação em orientar este projeto mostrando-se sempre disposto a sanar dúvidas, fazer sugestões e tudo que o cabia para que o trabalho se finalizasse com sucesso.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Sandra Maria Carmello-Guerreiro e Silvia Rodrigues Machado, convidadas para a banca examinadora, por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Sandra por ter me orientado na iniciação científica e desde então se mostrar disposta em me auxiliar.

Ao meu pai Augusto pelo incentivo em permanecer na ciência, sempre contribuindo para a minha formação pessoal e intelectual e à minha mãe Maroisa pela amizade incondicional e por todo apoio.

iv

Às amigas da graduação Tamy, Juliana, Camila e Carol pela companhia nas lições da biologia e da vida.

Aos amigos do Dpto. de Biologia Vegetal que comigo compartilharam o conhecimento e a amizade, tornando o trabalho mais inteligível e prazeroso.

Ao Lucas pela companhia diária e por toda ajuda e paciência neste último ano de trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	.vii
SUMMARY	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Respostas das plantas a estímulos mecânicos	1
1.2. Desenvolvimento reprodutivo em Passiflora	. 10
2. OBJETIVOS	. 13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material Vegetal	14
3.2. Obtenção e análise de imagens dos testes de movimento	. 14
3.3. Microscopia óptica	. 15
3.4. Microscopia eletrônica de transmissão	. 16
3.5. Microscopia eletrônica de varredura	. 16
3.6. Tratamentos com auxina e inibidor do transporte polar de auxina	. 17
4. RESULTADOS	. 17
4.1. Análise de imagens e vídeos	. 17
4.2. Desenvolvimento do androginóforo	. 24
4.3. Anatomia do androginóforo	35
4.4. Ultraestrutura das células do parênquima do androginóforo	46
4.5. Micromorfologia da superfície do androginóforo	51
5. DISCUSSÃO	55
7. BIBLIOGRAFIA CITADA	66

RESUMO

Em plantas, os movimentos rápidos são geralmente induzidos por estímulos mecânicos e possuem origem na adaptação evolutiva à resposta de estímulos ambientais que exigem repostas rápidas da planta. Algumas espécies do gênero Passiflora subgen. Decaloba, seção Xerogona como P. sanguinolenta, P. citrina, P. capsularis e P. rubra apresentam movimento de inclinação do androginóforo guando estimulado pelo toque. O objetivo geral do presente projeto foi o de estudar o movimento do androginóforo de guatro espécies de Passiflora seção Xerogona. Observou-se que após a aplicação do estímulo e conseqüente movimento, a aplicação imediata de um novo estímulo no mesmo sentido do estímulo anterior não produziu efeito. No entanto, após 2 a 3 minutos o androginóforo respondeu novamente, com movimento, a um estímulo de mesma direção. O movimento tem duração de 1,5 a 2 segundos e velocidade angular de 0,03 a 0,14 rad/s, sendo as maiores médias de P. capsularis e P. sanguinolenta e a menor de P. citrina. A formação da coluna do androginóforo ocorre tardiamente durante o desenvolvimento da flor. Análises anatômicas e ultraestruturais do androginóforo mostraram que o movimento se dá por perda de água por plasmólise parcial e temporária de parte do parênguima. A reorganização dos vacúolos parece ser fundamental para que a plasmólise e recuperação do turgor ocorram. A aplicação de auxina, bem como de um inibidor de seu transporte polar, às flores de P. sanguinolenta levaram a um aumento na velocidade do movimento. De maneira geral, os mecanismos que fazem com que o androginóforo se incline são semelhantes aos observados nos pulvinos de Leguminosae.

vii

SUMMARY

Rapid movements in plants are induced by mechanical stimuli and have originated in response to evolutionary adaptation to environmental stimuli that require fast responses by the plant. The androgynophore of some species of genus Passiflora, subgenus Decaloba, section Xerogona as P. sanguinolenta, P. citrina, P. capsularis e P. rubra exhibit a bending movement when touched. The aim of this work was to characterize this thigmotropic response. The movement takes place only when the androgynophore column or the ovary is stimulated and it always occurs in the same direction of the stimulus. If a new stimulus is applied right after the bending in the same direction that provoked this previous movement, the androgynophore is incapable to respond. Only after 2 to 3 minutes the androgynophore is able to react to a new stimulus in the same direction. The duration of the bending movement ranged from 1,5 to 2 seconds and the speed from 0,03 to 0,14 rad/s, being P. sanguinlenta and P. capsularis the fastest ones and P. citrina the slower one. Anatomical and ultrastructural analysis revealed that the movement is caused by loss of turgor from part of the parenchyma cells of the androgynophore. This partial and temporary plasmolysis is probably due to vacuolar reorganization, which seems to be reasonable, since there is a recovery of cell turgor, making possible a new stimulus in the same direction after a few minutes to produce new movement. When auxin or and inhibitor of its synthesis were applied to P. sanguinolenta flowers, we observed a fastest androgynophore bending movement. The mechanisms that lead to the movement in these Xerogona species seems to be similar to those observed in the pulvinus of some Leguminosae species.

viii

1. INTRODUÇÃO

1.1. Respostas das plantas a estímulos mecânicos

A reação das plantas a estímulos mecânicos pode ser tanto de forma lenta como de forma rápida. Estes movimentos são classificados como tropismos (geralmente lentos) e nastismos (geralmente rápidos). Os diferentes tropismos e nastismos se diferenciam de acordo com o prefixo correspondente ao estímulo aplicado. As respostas trópicas ocorrem em uma direção determinada pela localização ou direção do estímulo, como o comportamento de escalada exibido por algumas videiras mecano-sensitivas (tigmotropismo). Em contraste, respostas násticas são movimentos, como o fechamento dos folíolos de *Mimosa pudica* que ocorrem em uma direção independente da direção do estímulo (nictinastismo, quando o estímulo é a luz ou tigmonastismo quando o estímulo é mecânico) (Fleurat-Lessard, 1988; Braam, 2005).

Em plantas, os movimentos rápidos são geralmente induzidos por estímulos mecânicos e possuem origem na adaptação evolutiva à resposta de estímulos ambientais que exigem repostas rápidas da planta.

Algumas plantas abrem suas folhas e/ou folíolos durante o dia para interceptar a luz e se fecham à noite. Estes movimentos, conhecidos como nictinastismo, são exibidos por muitas leguminosas como as dos gêneros *Mimosa, Albizia, Pterodon* e *Robinia*, e membros da família Oxalidaceae, e são regulados por um relógio circadiano com ciclo de cerca de 24h (Moysset & Simón, 1991; Machado & Rodrigues, 2004; Taiz & Zieger, 2006). Em *M. pudica*, por exemplo, além do estímulo da luz, um estímulo tátil pode resultar no rápido fechamento dos folíolos

(seismonastismo ou tigmonastismo) e este estímulo pode se propagar a todos os folíolos da folha ao tocar-se em apenas um folíolo.

No caso de um estímulo mais forte, como uma injúria, o comportamento de fechamento dos folíolos pode chegar a pecíolos de folhas mais distantes. Este comportamento da planta pode evitar a predação (Malone, 1994). O pulvino, uma estrutura especializada localizada na base das folhas e folíolos, é responsável por este movimento.

O pulvino possui dois grupos de células especializadas, chamadas células motoras, que estão nas zonas opostas do pulvino ditas flexora e extensora. A maioria das informações a respeito do movimento do pulvino é baseada em indução por um potencial de ação que se propaga no pecíolo e no órgão motor e que gera mudanças na forma e no tamanho das células motoras, causadas pelo fluxo de íons K⁺ através da membrana plasmática destas células, que é seguido de fluxo de água massivo, resultando em sua turgidez ou murcha (Satter & Galston, 1981; Sibaoka, 1991).

Também foi demonstrado que há uma diminuição na resistência elétrica e aumento da concentração de íons Cl⁻ no córtex do pulvino, principalmente durante a resposta ao estímulo, provavelmente resultante da saída de água contendo eletrólitos das células motoras (Samejima & Sibaoka, 1980). Os fluxos de íons ocorrem entre simplasto e apoplasto e o espaço apoplástico associado às paredes das células motoras funcionam como um reservatório temporário de íons e como um sítio de trocas com o simplasto (Freudling et al., 1988). Ainda há a participação de íons de cálcio no movimento. Os níveis de cálcio nas células motoras aumentam durante o dobramento do pulvino. Experimentos indicaram que canais de cálcio na

membrana de vacúolos de tanino são responsáveis pela liberação de cálcio, que vai para o vacúolo coloidal cujas fibrilas se agregam produzindo contração. Durante a fase de recuperação do pecíolo para a posição original, o cálcio retorna para o vacúolo de tanino (Toriyama & Jaffe, 1972, Turnquist et al.,1993).

Fluxos de íons em plantas são processos que requerem energia e dependem do gradiente eletroquímico gerado por bombas de prótons no tonoplasto (Fleurat-Lessard et al., 1997). Tornou-se claro também que as aquaporinas desempenham papel fundamental em células que mudam seu volume rapidamente levando ao movimento (Uehlein & Kaldenhoff, 2008). Foi ainda isolado um par de substâncias bioativas que regulam os movimentos nictinásticos de diversas plantas que exibem este comportamento, sendo estas substâncias o "fator de abertura de folha" e o "fator de fechamento de folha". Estes fatores são ditos gênero-específicos, pois não são efetivos em plantas pertencentes a gêneros diferentes, e se associam especificamente à proteínas de ligação localizadas nas células motoras extensoras. Os níveis destes fatores são regulados por ciclos circadianos (Ueda & Nakamura, 2007).

O rearranjo do citoesqueleto de actina está envolvido também no movimento de dobramento dos pecíolos de *M. pudica*. Os filamentos de actina são altamente fosforilados em resíduos de tirosina e há uma proporção direta entre o grau de fosforilação e a intensidade do dobramento do pecíolo (Kameyama et al., 2000). Ainda, foi demonstrado que a despolimerização do citoesqueleto de actina nas células motoras do pulvino em resposta a estímulos elétricos resulta em aumento dos níveis de cálcio (Yao et al., 2008).

Estudos anatômicos e ultraestruturais do pulvino em leguminosas mostraram que existem algumas características comuns nas células corticais motoras de todas as espécies e que devem permitir a rapidez das mudanças celulares resultando nos rápidos movimentos. Podemos citar a presença de grandes vacúolos coloidais ou vacúolos sem tanino, vacúolos contendo tanino, numerosas mitocôndrias e dictiossomos, membrana plasmática sinuosa com grandes espaços periplasmáticos, plasmodesmos agrupados em campos de pontoação, paredes irregulares e muitos espaços intercelulares (Fleurat-Lessard & Millet, 1984; Fleurat-Lessard, 1988; Moysset & Simón, 1991; Machado & Rodrigues, 2004, Rodrigues & Machado, 2006).

Em *M. pudica, Albizzia julibrissin, Pterodon pubescens* e *Robinia pseudoacacia* notou-se que quando o folíolo está aberto, o vacúolo não tânico da maioria das células motoras extensoras apresenta-se grande, em posição central, ocupando quase toda a célula. Após o fechamento dos folíolos, estas células tornamse multivacuoladas. Além do vacúolo, o citoplasma também sofre alterações, tornando-se mais denso no estado de multivacuolação. Já nas células motoras flexoras um único grande vacúolo não tânico ocupa quase toda a extensão da célula quando os folíolos se fecham. Com os folíolos abertos, estas células apresentam-se multivacuoladas, desta forma mantendo a área de superfície do tonoplasto. No entanto, as mudanças nas células flexoras são menos óbvias (Campbell & Garber, 1981; Fleurat-Lessard, 1988; Moysset & Simon, 1991; Machado & Rodrigues, 2004). Células guarda dos estômatos também mudam sua forma e tamanho através de mecanismos de reorganização vacuolar para abrir e fechar a abertura estomática (Gao, 2005). Em espécies das subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e

Mimosoideae estudos acerca da anatomia do sistema vascular do pulvino demonstraram características que asseguram passagem de íons e estímulos entre os tecidos do pulvino. Entre estas encontram-se a presença de células da bainha, constituídas de fibras septadas vivas, que conectam o córtex aos tecidos vasculares via numerosos plasmodesmos, a ausência de esclerificação ao redor do floema, células do parênquima vascular com citoplasma abundante e lignificação reduzida. Desta forma, o sistema vascular, além das células motoras, também participa da transferência de íons e transmissão dos estímulos (Rodrigues & Machado, 2007).

Foi demonstrado que os movimentos do tipo tigmonásticos e nictinásticos em leguminosas são passíveis de serem controlados por auxina (Watanabe & Sibaoka, 1983, Bonmort & Roblin, 1996; Moyen et al., 2007). Sabe-se que a auxina, além de afetar processos fisiológicos nas plantas envolvendo regulação gênica, também afeta, em curto prazo, eventos celulares. Uma destas alterações refere-se ao aumento da atividade de H⁺ATPases preexistentes na membrana plasmática, estimulando a extrusão de prótons na parede celular (Taiz & Zieger, 2006).

Demonstrou-se que os fluxos de K⁺ em plantas estão acoplados a fluxos inversos de H⁺, que são dirigidos pela atividade de bombas de prótons na membrana plasmática (Bonmort & Roblin, 1996; Moyen et al., 2007). Efeitos da auxina em movimentos dos pulvinos com turgor reversível foram descritos por alguns autores. A aplicação de ácido indol acético (AIA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido naftaleno acético (NAA) na região terminal da ráquis de pinas excisadas de *M. pudica* fez com que os folíolos abrissem mesmo quando colocados no escuro, sendo que as concentrações mínimas necessárias de 2,4-D e NAA para abertura dos

folíolos no escuro foram menores do que para AIA. Isto provavelmente se deve ao fato de que 2,4-D e NAA são moléculas sintéticas e, portanto, não metabolizadas pelos tecidos das plantas (Watanabe & Sibaoka, 1983).

Após a aplicação de AIA, estímulos mecânicos nos folíolos geraram rápidos movimentos de fechamento e abertura, e esta rapidez foi a mesma quando as pinas excisadas com aplicação de auxina foram colocadas na luz. O mesmo ocorreu com a aplicação de NAA e 2,4-D (Watanabe & Sibaoka, 1983). Com uso de AIA radioativo, observou-se que uma quantidade suficiente de auxina é transferida através de uma pina em 4 minutos (Watanabe & Sibaoka, 1983).

Outros estudos demonstraram os efeitos da auxina sintética 2,4-D na alteração do movimento pulvinar induzido por luz e escuro em *Cassia fasciculata* e *M. pudica*, mostrando que esta auxina afeta o funcionamento da célula por interromper processos que envolvem rápidas mudanças na permeabilidade da membrana à água e íons (Bonmort & Roblin, 1996; Moyen et al., 2007). O 2,4-D inibiu de maneira dose-dependente o fechamento dos folíolos induzido por escuro em *C. fasciculata..* Este efeito pode ser atribuído a uma inibição do decréscimo do turgor celular induzido pelo escuro. Reciprocamente, 2,4-D promoveu a amplitude da abertura do folíolo de maneira significativa quando exposto à luz, sugerindo que o turgor celular dirigido pelo sinal de luz é aumentado. Estes experimentos sugerem que a permeabilidade das células motoras ao K⁺ foi principalmente direcionada ao influxo deste cátion para as células e, consequentemente, ao influxo de água. Ainda, a reação de fechamento dos folíolos induzida por estímulo elétrico no pulvino foi

inibida com a aplicação de 2,4D a 100 μM (Bonmort & Roblin, 1996; Moyen et al., 2007).

Outro exemplo típico de movimento tigmonástico é o exibido por plantas carnívoras, como a *Dionaea muscipula*, que reage rapidamente a estímulos mecânicos. Suas folhas especializadas são divididas em duas partes, a superior e a inferior. A parte superior possui um par de lobos em forma de trapézio. O centro de cada lobo contém três tricomas sensitivos e um pigmento vermelho que atrai os insetos. Tocando estes tricomas, que funcionam como um gatilho, canais de íons mecanossensíveis são ativados gerando sinais elétricos intercelulares. O potencial de ação gerado leva ao fechamento parcial dos lobos em menos de um segundo. O fechamento total leva alguns minutos. As margens de cada lobo são rodeadas de projeções semelhantes a espinhos ou cílios que se sobrepõem durante o fechamento parcial permitindo a manutenção da presa dentro da armadilha (Fagerberg & Allain, 1991; Volkov et al. 2007).

Observando-se a ultra-estrutura dos tricomas, distinguiram-se três regiões de células metabolicamente ativas (células anticlinais, indentadas e podium) que contêm muitos plasmodesmos sendo possível fazer uma correlação com a sensibilidade dos tricomas e suas particularidades estruturais (Williams & Mozingo, 1971). Ainda, assumiu-se que a folha inclui camadas de células onde diferentes pressões hidrostáticas são mantidas e estas diferentes pressões geram uma energia de curvatura elástica que é armazenada quando os lobos estão abertos. O estímulo abre os poros de água entre essas camadas e o fluido se transfere da camada superior para a camada inferior. Desta forma, a folha muda sua configuração e relaxa

ao estado de equilíbrio que corresponde à folha fechada. Desacopladores podem inibir o transporte de H⁺ e bloqueadores de aquaporinas podem impedir o fluxo de água. A recepção do estímulo elétrico tem caráter cumulativo, indicando a existência de memória elétrica nesta planta (Volkov et al. 2008).

Outras plantas carnívoras como *Drosera rotundifolia* e espécies do gênero *Utricularia* exibem movimentos tigmonásticos para a captura de presas, mas poucos são os estudos a respeito dos mecanismos do movimento destas espécies (Braam, 2005).

A maior parte dos estudos até hoje realizados dizem respeito aos movimentos de partes vegetativas, como o fechamento das folhas de plantas carnívoras e principalmente das folhas e folíolos de espécies de Leguminosae. No entanto, apesar de não existirem muitos estudos específicos a respeito, sabe-se que muitas espécies desenvolveram órgãos florais sensíveis ao toque, com exemplos de filetes do estame, pétalas e pistilos tigmotrópicos ou tigmonásticos. Estes comportamentos geralmente surgiram e se mantiveram por pressão de seleção no sentido de prevenir a autopolinização ou para o sucesso no depósito de pólen nos polinizadores, como pássaros e insetos.

A autopolinização é evitada por uma série de mecanismos responsivos ao toque. Alguns estigmas, por exemplo, curvam-se em direção às pétalas em resposta a um inseto rastejando em suas anteras, evitando, contato com o pólen carregado por ele quando ele parte. Mais comumente, estames sensíveis ao toque inclinam-se levemente para depositar o pólen sobre os insetos visitantes (Braam, 2005). Alguns exemplos referem-se a movimentos realizados através do armazenamento de

energia elástica, como ocorre no gênero de orquídea *Catasetum*, que possui flores dimórficas. As flores masculinas estão preparadas para responder a visitantes que encostam suas antenas no centro da flor, liberando os estames seguros sob tensão pelas pétalas. A força com a qual os sacos polínicos batem no polinizador pode ser forte o suficiente para jogá-lo da flor. Esta experiência do polinizador pode desenvolver o potencial de cuidado para futuras visitas, escolhendo flores femininas às explosivas flores masculinas (Romero & Nelson 1986).

Outro exemplo é o de algumas plantas anemófilas que liberam explosivamente o pólen para o ar. Estudos mostraram que a espécie *Morus alba* apresenta o mais rápido movimento floral já gravado, 20 vezes mais rápido do que o da espécie *Cornus canadensis* (Taylor et al. 2006), que armazena energia elástica suficiente para a antese floral ocorrer em 0.5 ms e os grãos de pólen são lançados a uma altura de 2,5cm o que é mais de dez vezes a altura da flor (Edwards et al. 2005). A antese de *Morus alba* se aproximou dos limites físicos teóricos para movimentos hidráulicos em plantas . Movimentos rápidos impulsionados por uma restrição mecânica seguida de liberação de energia elástica foram desenvolvidos por uma série de outras espécies, e são comuns na tribo Moreae (ordem Urticales), e dentro de Urticaceae todas as espécies parecem utilizar este mecanismo para liberação de pólen (Taylor et al. 2006).

Em *Berberis canadensis* (família Berberidaceae) observou-se que os filetes dos estames respondem a vários tipos de estímulos, como mecânicos e elétricos. Um estudo de ultraestrutura destes filamentos mostrou que, assim como em *M*.

pudica, células do parênquima dos filetes possuem paredes sinuosas, numerosos plasmodesmos, taninos próximos ao núcleo e microfibrilas nos vacúolos de tanino.

1.2. Desenvolvimento reprodutivo em Passiflora

As flores do gênero *Passiflora* geralmente são pentâmeras e em todas as espécies, estames e carpelos são elevados por uma coluna denominada androginóforo (Cervi, 1997; Ulmer & MacDougal, 2004). Os estames são sempre em número de cinco, e estão unidos por suas bases, formando uma membrana aderente ao androginóforo junto à inserção do ovário, que está acima dos estames (Cervi, 1997; Ulmer & MacDougal, 2004). Os estiletes no gênero *Passiflora* iniciam-se no centro da região superior do ovário, que é sempre unilocular, tricarpelar e com placentação parietal (Cervi, 1997; Ulmer & MacDougal, 2004). Entre o perianto e o androginóforo encontra-se a corona, que neste gênero aparece como uma série de estruturas filamentosas. Em geral, a corona tem um papel importante na biologia reprodutiva pela atração de polinizadores, que podem ser insetos no caso de flores em forma de disco, a corona também funciona como plataforma de pouso para os insetos.

O opérculo e o límen são outras características das flores de *Passiflora*, e são igualmente importantes na biologia floral do gênero. Estas estruturas estão associadas direta ou indiretamente ao androginóforo. O opérculo está situado no interior do tubo formado pelo perianto, um pouco abaixo da corona, e forma um sistema de compartimentos em associação com o límen, que é uma estrutura em forma de anel ou uma membrana que circunda a base do androginóforo (Cervi, 1997;

Ulmer & MacDougal, 2004). O compartimento formado pelo sistema opérculo-límen contém um disco nectarífero. Além disso, o opérculo é de grande importância para a identificação de subgêneros. Não há na literatura informações quanto à origem de tais estruturas, assim como acerca da origem do androginóforo.

O gênero *Passiflora* é dividido em subgêneros, superseções e seções. A seção *Xerogona*, incluída no subgênero *Decaloba*, inclui 13 espécies, sendo as mais conhecidas: *Passiflora sanguinolenta* Mast., *Passiflora citrina* MacDougal, *Passiflora capsularis* L., e *Passiflora rubra* L. Todas as espécies da seção *Xerogona* têm frutos tipo cápsula, com abertura loculicida, o que é uma exceção para o gênero, cujos frutos são geralmente do tipo baga (Ulmer & MacDougal, 2004).

As espécies *P. sanguinolenta* e *P. citrina* possuem flores com formato e tamanho bastante semelhantes, somente diferindo claramente na pigmentação do perianto, que é rosado em *P. sanguinolenta* e amarelo em *P. citrina*. As flores são tubulares e provavelmente polinizadas por beija-flores (Mac Dougal, 1989; Ulmer & MacDougal, 2004). *P. sanguinolenta* origina-se nas regiões montanhosas do Equador em altitudes de 800-2800m e *P. citrina* se estende do leste da Guatemala a Honduras central, crescendo em elevações de 600-1500m (Ulmer & MacDougal, 2004). O longo androginóforo e o tubo floral conspícuo não são usuais em espécies do subgênero *Decaloba*.

As espécies *P. capsularis* e *P. rubra* têm flores em forma de disco e provavelmente são polinizadas por insetos (Ulmer & MacDougal, 2004). *P. capsularis* é notável pelas flores brancas, e, segundo informações da literatura, pode ser polinizada por mariposas (Koschnitzke & Sazima, 1997). *P. rubra* possui flores muito

semelhantes às de *P. capsularis*, mas a superfície abaxial de suas sépalas possui veios avermelhados e a corona apresenta leve pigmentação avermelhada na base, enquanto que em *P. capsularis*, as sépalas têm a superfície abaxial toda esverdeada e a corona inteira branca (Ulmer & McDougal, 2004; observações pessoais). Os frutos também podem diferenciar claramente as duas espécies, sendo verdes ou arroxeados em *P. capsularis*, dependendo da variedade, e vermelhos em *P. rubra*. (Ulmer & McDougal, 2004, observações pessoais). A espécie *P. capsularis* está distribuída em muitas partes da América do Sul e Central e *P. rubra* é encontrada no Caribe, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolivia e Brasil, ocorrendo tanto próximo ao nível do mar quanto em altitudes maiores que 2200m (Ulmer & Mac Dougal, 2004).

A grande variabilidade das estruturas florais presentes em *Passiflora* desafia as explicações até agora apresentadas para as suas origens evolutivas. A compreensão dos mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na geração desta variedade de formas e estruturas florais é de grande importância para esclarecer os processos de co-evolução de morfologias florais com os respectivos polinizadores. Algumas espécies do gênero *Passiflora* subgen. *Decaloba*, seção *Xerogona* como *P. sanguinolenta*, *P. citrina*, *P. capsularis* e *P. rubra* apresentam movimento de inclinação do androginóforo quando estimuladas pelo toque. Este movimento, provavelmente relacionado com a polinização destas espécies, ainda não foi descrito na literatura científica e permanece uma observação anedótica de colecionadores de espécies ornamentais de *Passiflora*. Assim, espera-se que os resultados obtidos possam contribuir com a melhor compreensão da evolução dos

sistemas de polinização em *Passiflora* e das interações dinâmicas entre as morfologias florais destas espécies e seus polinizadores.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto foi o de estudar o movimento do androginóforo de quatro espécies do gênero *Passiflora* seção *Xerogona* (Raf.) Killip. Com este intuito, objetivos específicos foram estabelecidos:

A. Documentar em imagens e em vídeo o movimento do androginóforo das flores de *P. sanguinolenta*, *P. capsularis*, *P. rubra e P. citrina* quando submetidas a estímulos mecânicos.

B. Caracterizar a morfologia do desenvolvimento floral de *P. sanguinolenta*, *P. citrina*, *P. capsularis e P. rubra*.

C. Analisar o desenvolvimento do androginóforo das espécies *P.* sanguinolenta, *P. citrina, P. capsularis e P. rubra* em diferentes fases de desenvolvimento.

D. Caracterizar as células ou tecidos potencialmente responsáveis pelo movimento do androginóforo de *P. sanguinolenta*, *P. citrina*, *P. capsularis e P. rubra*.

E. Caracterizar a micromorfologia da superfície do androginóforo de *P.* sanguinolenta, *P. citrina, P. capsularis e P. rubra*.

F. Analisar o efeito da aplicação de auxina e um inibidor do transporte polar de auxina no movimento do androginóforo de pelo menos uma das espécies estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado é proveniente de cultivo de *P. sanguinolenta, P.citrina, P. capsularis* e *P. rubra* em vasos na casa de vegetação do Depto. de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp (Campinas, SP). Para a documentação em imagens de vídeo e/ou fotos, foram coletadas flores das espécies estudadas logo após a antese e estas foram montadas em espuma floral úmida. Além disso, meristemas florais e botões de diferentes tamanhos das quatro espécies foram coletados tanto para a análise macroscópica do desenvolvimento do androginóforo e realização de medições, quanto para a análise em microscopia eletrônica de varredura. Para a caracterização das células potencialmente responsáveis pelo movimento por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão, e para a análise da superfície do androginóforo por microscopia eletrônica de varredura, androginóforos de flores na antese das quatro espécies estudadas foram coletados após aplicação de estímulo mecânico. As amostras foram preparadas para as análises como descrito abaixo.

3.2. Obtenção e análise de imagens dos testes de movimento

Para analisar o movimento do androginóforo, as flores foram excisadas da planta mãe, fixadas em espuma floral e parte do perianto foi retirada para observação detalhada do androginóforo e documentação dos testes de indução do movimento por estímulo mecânico. O estímulo foi realizado manualmente com um

bastão de metal, utilizado para tocar partes das flores em antese das guatro espécies com o intuito de verificar quais as partes da flor eram sensíveis ao estímulo e capazes de gerar movimento do androginóforo. A coluna do androginóforo foi tocada na região proximal (base), no centro e em sua região apical, nas guatro espécies. A fim de monitorar e documentar o movimento do androginóforo, foram utilizadas as câmeras digitais Sony Cyber-shot DSC-W210, DSC-W12 e Canon Power Shot SD500. Dentre as centenas de vídeos obtidos para a documentação do movimento nas guatro espécies estudadas, foram selecionados dez vídeos representativos de cada espécie para as coletas de dados referentes aos cálculos de tempo de movimento(s), angulação (rad) e velocidade angular (rad/s). Os vídeos foram software "Windows analisados quadro quadro pelo а MovieMaker"(https://www.microsoft.com/windowsxp/downloads/updates/moviemaker 2.mspx). As medições de angulações foram feitas utilizando o software "Screen 4.0" Protractor (http://wareseeker.com/Graphic-Apps/screen-protractor-4.0.zip/338720) e para análise estatística dos dados obtidos (análise de variância de médias e teste Tukey) utilizou-se o software "Varpc".

3.3. Microscopia óptica

As amostras coletadas foram colocadas em fixador paraformaldeído a 4% (p/v) em tampão fosfato e colocadas em vácuo por 15 minutos. Após o vácuo, o material permaneceu no fixador por 24h a 4°C, para depois ser desidratado em série etílica e emblocado em resina plástica (Historesin, Leica). Secções de 3-5 µm foram obtidas com o uso de micrótomo rotativo e montadas em lâminas de vidro. Após

coloração com azul de toluidina a 0,05% (p/v) em tampão de tetraborato de sódio, secagem e montagem de lâminas permanentes com lamínulas e Entellan, as lâminas foram observadas em microscópio ZEISS modelo AXIOVERT 35 e fotografadas.

3.4. Microscopia eletrônica de transmissão

O material coletado foi fixado em solução de Karnovsky, por 24h a 4°C, pós fixado em tetróxido de ósmio (1%), desidratado em série etílica e emblocado em resina plástica Eppon 812, Fluka seguindo-se as instruções do fabricante. Secções semifinas foram obtidas por um ultramicrótomo e, após a análise prévia dos cortes em microscópio óptico, cortes ultrafinos do androginóforo a uma altura que variou de 5 a 8 mm, foram obtidos e montados em telas metálicas de cobre. O material foi contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e observado no NAP/MEPA, ESALQ/USP em microscópio Zeiss EM 900 acoplado ao sistema Kontron KS 300 para o processamento de imagens.

3.5. Microscopia eletrônica de varredura

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura, o material após ser fixado a vácuo em paraformaldeído a 4%(p/v) em tampão fosfato por 24h a 4°C e desidratado em série etílica, foi seco ao ponto-crítico, montado em "stubs" e metalizado com ouro coloidal. As observações foram feitas no NAP/MEPA, ESALQ/USP em microscópio LEO 435 VP equipado com o sistema LEOUIF para aquisição de imagens digitais.

3.6. Tratamentos com auxina e inibidor do transporte polar de auxina

Uma vez caracterizado o movimento do androginóforo das espécies estudadas, foi analisado o efeito da aplicação de auxina (ácido indol acético, AIA) e de um inibidor de transporte polar de auxina (ácido 1-N-naftil-ftalâmico, NPA) sobre este tipo de movimento. Para tal, as flores foram excisadas da planta mãe e o pedúnculo floral foi imerso em solução de AIA a 1 mM ou em solução de NPA 0,1 mM. Após cerca de três horas, as flores foram fixadas em espuma floral úmida para documentação em vídeo do movimento do androginóforo. Foram realizadas 10 repetições para ambos os testes.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de imagens e vídeos

4.1.1. Testes de indução do movimento por estímulo mecânico

Algumas observações gerais quanto à indução do movimento do androginóforo foram comuns às quatro espécies estudadas: Após estímulo mecânico, o androginóforo se inclinou na mesma direção do estímulo, caracterizando este movimento como tigmotrópico, ou seja, o movimento é causado por aplicação de estímulo mecânico e se dá em uma direção dependente da direção do estímulo. Em geral, o movimento ocorreu na base do androginóforo, que se manteve em uma coluna reta (Figuras 1 e 2). No entanto, em alguns casos, a coluna do androginóforo formou uma curva a alguns milímetros da base (Figuras 3 e 13B).

Estímulos mecânicos nas pétalas, corona, límen, opérculo, estames, estiletes e estigmas não induziram movimento do androginóforo. O movimento foi observado apenas ao se tocar na coluna do androginóforo (em qualquer posição da mesma) e no ovário. No entanto, observou-se que apenas encostar levemente (ou roçar levemente) no ovário e/ou na coluna do androginóforo não foi suficiente para induzir o movimento. Logo após a indução do estímulo de um lado do androginóforo, este não foi capaz de responder a um novo estímulo de mesma direção. Ao tocar no lado oposto, observou-se movimento para o lado estimulado. Para todas as espécies estudadas, o androginóforo respondeu novamente, com movimento, a um estímulo de mesma direção entre 2 e 3 minutos após a aplicação do último estímulo.

4.1.2. Duração do movimento

Os testes de indução do movimento do androginóforo mostraram que, em geral, a duração do movimento é de 1,5 a 2 segundos (Figuras 1 e 2). A maior média de duração do movimento observada foi a da espécie *P. sanguinolenta* e a menor, de *P. capsularis* (Figura 4A). Não houve diferença significativa entre as médias de duração do movimento entre *P. citrina*, *P. rubra* e as demais espécies. No entanto, as médias de *P. sanguinolenta* e *P. capsularis*, diferiram significativamente entre si (Figura 4A).

4.1.3. Angulação do androginóforo após o movimento

As espécies *P. sanguinolenta* e *P. capsularis* foram as que apresentaram os maiores valores de angulação do androginóforo e *P. citrina* a que apresentou os menores

valores. Não houve diferença significativa entre as médias de angulação do androginóforo de *P. capsularis*, *P. rubra* e *P. sanguinolenta*, mas a média de *P. citrina* diferiu das demais (Figura 4B).

4.1.4. Velocidade angular do movimento

Os cálculos de velocidade angular mostraram que as maiores médias são as de *P. capsularis* e *P. sanguinolenta*, que não diferiram entre si significativamente (Figura 4C). A média de velocidade angular de *P. citrina* diferiu bastante das demais, sendo o movimento mais lento observado. Um valor intermediário foi observado para *P. rubra* (Figura 4C).



Figura 1. Imagens obtidas de vídeos mostrando o movimento do androginóforo em *P. sanguinolenta* (A, B e C) e em *P. citrina* (D, E e F). Em repouso (A e D) e após o estímulo mecânico (B-C e E-F). As setas em A e D indicam o lado estimulado. O tempo decorrido do momento do toque no ovário é mostrado no canto superior direito.



Figura 2. Imagens obtidas de vídeos mostrando o movimento do androginóforo em *P. capsularis* (A, B e C) e em *P. rubra* (D, E e F). Em repouso (A e D) e após o estímulo mecânico (B-C e E-F). As setas em A e D indicam a direção do estímulo. O tempo decorrido do momento do toque no ovário é mostrado no canto superior direito.



Figura 3. Sobreposição de duas imagens de uma mesma flor de *P. sanguinolenta*. A letra i indica a posição inicial do androginóforo, antes do estímulo. A letra f indica a posição final do androginóforo após o estímulo mecânico. Notar que a angulação no androginóforo se deu apenas a aproximadamente 5mm acima da base, formando uma curva na coluna do androginóforo. Barra=1cm.

4.1.5. Efeito da aplicação de auxina e inibidor do transporte polar de auxina no movimento do androginóforo

A análise dos movimentos mostrou que tanto a velocidade angular do androginóforo em flores tratadas com AIA quanto a velocidade das tratadas com NPA foi significativamente maior do que a velocidade obtida nos experimentos de teste de movimento (controle) nos quais as flores excisadas receberam apenas água (Figura 4F). O aumento significativo da velocidade angular foi devido a um aumento significativo da angulação, que foi maior para os androginóforos de flores tratadas com AIA e NPA (Figura 4D). O tempo de movimento não diferiu significativamente entre os experimentos (Figura 4E).



Figura 4. Gráficos de médias de angulação (A), tempo de movimento (B) e velocidade angular (C) de *P. capsularis, P. rubra, P. citrina* e *P. sanguinolenta* nos testes de movimento. Os gráficos D, E e F mostram as médias de angulação (D), tempo de movimento (E) e velocidade angular (F) de *P. sanguinolenta* nos testes de movimento (Controle) e com aplicação de AIA a 1mM e NPA a 0,1mM. As letras representam a comparação das médias. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si, letras diferentes indicam que as médias diferem entre si e as duas letras juntas significa que a média não difere de nenhuma das outras duas médias segundo o teste Tukey a 5%. A ausência de letras acima das barras significa que a variância das médias não é significativa.

4.2. Desenvolvimento do androginóforo

4.2.1. Desenvolvimento inicial dos órgãos florais

Nas espécies de Xerogona estudadas, observou-se a produção de apenas um meristema floral pelo meristema axilar. Diferentemente do observado para outras espécies de Passiflora (Ulmer & MacDougal, 2004), não se observou, nas espécies analisadas, a formação de um primórdio de bráctea em posição oposta ao primórdio de gavinha. Os primeiros primórdios formados pelo meristema floral foram os primórdios das sépalas, iniciados seguencialmente, de forma espiralada, até o número de 5 (Figura 5D, 6D, 7D e 8D). O primeiro primórdio de sépala iniciou-se em posição oposta ao primórdio de gavinha. No segundo verticilo, cinco primórdios de pétalas foram iniciados nas posições entre os primórdios de sépalas (Figuras 5 E-F, 6E-F, 7E-F e 8 E-F). Foram iniciados os cinco primórdios dos estames, no terceiro verticilo (Figura 4E). Os primórdios dos estames continuaram o seu desenvolvimento e se alongaram, enquanto os primórdios de pétalas pareceram paralisar o alongamento, até que os primórdios de carpelos também se iniciassem (Figuras 5F-G, 6F-G, 7F-G e 8F-G). Os últimos primórdios florais formados foram 3 primórdios de carpelos, no guarto verticilo (Figuras 5F-G, 6F-G, 7F-G e 8F-G).

Apesar de em *Passiflora* o gineceu e o androceu serem soldados na coluna do androginóforo, os primórdios dos verticilos das estruturas reprodutivas masculinas e femininas são formados separadamente (Figuras 5, 6, 7 e 8) e a fusão ocorre apenas tardiamente durante o desenvolvimento (Figura 5H, 6H, 7H e 8H).



Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura. Elaboração do meristema reprodutivo em *P. sanguinolenta*. A. meristema apical do ramo em vista lateral superior. Barra= 50 µm. B-D. Estágios sucessivos do desenvolvimento do meristema duplo de flor e gavinha. Os números em D indicam a seguência de formação dos 3 primeiros primórdios de sépala. Barras= 40µm. E. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de estames. As setas indicam os primórdios de pétalas. Barra= 70 µm. F. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. As setas indicam os primórdios de pétalas que ainda não se alongaram. Barra= 70 µm. G. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. Este meristema está num estágio de desenvolvimento posterior ao mostrado em F. Note que os primórdios de pétala iniciaram o alongamento. Barra= 70 µm. H. Botão floral com todos os órgãos diferenciados. Note que o alongamento da coluna do androginóforo não foi iniciado. Barra= 300 µm. (ca: carpelos; co: primórdio dos filamentos da corona; es: primórdio de estípula; et: estame: ma: meristema axilar: mc: meristema apical caulinar: mf: meristema floral: ov: ovário; pe: primórdio de estame; pp: primórdio de pétala; pf: primórdio da lâmina foliar; pg: primórdio de gavinha; pt: pétala; se: sépala; st: estilete; si: estigma).



Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura. Elaboração do meristema reprodutivo em *P. citrina.* **A.** meristema apical do ramo em vista lateral superior. Barra= 50 μm. **B-D.** Estágios sucessivos do desenvolvimento do meristema duplo de flor e gavinha. Os números em D indicam a sequência de formação dos 3 primeiros primórdios de sépala. Barras= 40μm. **E.** Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de estames. As setas indicam os primórdios de pétalas. Barra= 70 μm. **F.** Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. As setas indicam os primórdios de pétalas que ainda não se alongaram. Barra= 70 μm. **G.** Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. Este meristema está num estágio de desenvolvimento posterior ao mostrado em F. Barra= 70 μm. **H.** Botão floral com todos os órgãos diferenciados. Note que o alongamento da coluna do androginóforo não foi iniciado. Barra= 300 μm.

(ca: carpelos; co: primórdio dos filamentos da corona; es: primórdio de estípula; et: estame; ma: meristema axilar; mc: meristema apical caulinar; mf: meristema floral; ov: ovário; pe: primórdio de estame; pp: primórdio de pétala; pf: primórdio da lâmina foliar; pg: primórdio de gavinha; pt: pétala; se: sépala; st: estilete; si: estigma).


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura. Elaboração do meristema reprodutivo em P. capsularis. A. meristema apical do ramo em vista lateral superior. Barra= 50 µm. **B-D.** Estágios sucessivos do desenvolvimento do meristema duplo de flor e gavinha. Os números em D indicam a seguência de formação dos primórdios de sépala. Barras= 40µm. E. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de estames. As setas indicam os primórdios de pétalas. Barra= 70 µm. F. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. As setas indicam os primórdios de pétalas que ainda não se alongaram. Barra= 70 µm. G. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. Este meristema está num estágio de desenvolvimento posterior ao mostrado em F. Note que os primórdios de pétala iniciaram o alongamento. Barra= 70 µm. H. Botão floral com todos os órgãos diferenciados. Note que o alongamento da coluna do androginóforo não foi iniciado. Barra= 300 µm. (ca: carpelos; co: primórdio dos filamentos da corona; es: primórdio de estípula; et: estame: ma: meristema axilar: mc: meristema apical caulinar: mf: meristema floral: ov: ovário; pe: primórdio de estame; pp: primórdio de pétala; pf: primórdio da lâmina foliar; pg: primórdio de gavinha; pt: pétala; se: sépala; st: estilete; si: estigma).



Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura. Elaboração do meristema reprodutivo em *P. rubra*. A. meristema apical do ramo em vista lateral superior. Barra= 50 µm. B-D. Estágios sucessivos do desenvolvimento do meristema duplo de flor e gavinha. Os números em D indicam a sequência de formação dos 3 primeiros primórdios de sépala. Barras= 40µm. E. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de estames. As setas indicam os primórdios de pétalas. Barra= 70 µm. F. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de estames floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de estames. As setas indicam os primórdios de pétalas. Barra= 70 µm. F. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. As setas indicam os primórdios de pétalas que ainda não se alongaram. Barra= 70 µm. G. Meristema floral no estágio de desenvolvimento dos primórdios de carpelo. Este meristema está num estágio de desenvolvimento posterior ao mostrado em F. Barra= 70 µm. H. Botão floral com todos os órgãos diferenciados. Note que o alongamento da coluna do androginóforo não foi iniciado. Barra= 300 µm.

(ca: carpelos; co: primórdio dos filamentos da corona; es: primórdio de estípula; et: estame; ma: meristema axilar; mc: meristema apical caulinar; mf: meristema floral; ov: ovário; pe: primórdio de estame; pp: primórdio de pétala; pf: primórdio da lâmina foliar; pg: primórdio de gavinha; pt: pétala; se: sépala; st: estilete; si: estigma).

4.2.2. Desenvolvimento do androginóforo

Após a formação do botão floral, observou-se que a coluna do androginóforo de *P. rubra* cresceu, proporcionalmente ao tamanho do botão floral inteiro, mais lentamente, e o ovário ocupou sempre a região mediana do botão (Figura 9D). Desta forma, a relação entre tamanho do botão/ tamanho do androginóforo (TB/TA) praticamente não diferiu no decorrer do desenvolvimento do botão (Figura 10). Já nas outras espécies estudadas observou-se que, quando o botão ainda estava no início do desenvolvimento, a relação TB/TA foi grande, mas diminuiu ao longo do desenvolvimento, o que denota um crescimento diferencial da coluna do androginóforo mais tardio em relação ao desenvolvimento do botão floral (Figura 10). Em *P. capsularis, P. citrina* e *P. sanguinolenta* observou-se que o ovário no botão em pré-antese ocupa sempre o terço superior do botão (Figuras 9 – A, B e C). O comprimento do androginóforo é de cerca de 2 a 2,5 cm em *P. sanguinolenta* e em *P. citrina*, e de cerca de 0,5 a 0,8 cm em *P. capsularis e P. rubra*.



Figura 9. Imagens de botões florais em diversas fases do desenvolvimento com perianto parcialmente removido para visualização do androginóforo de *P. sanguinolenta* (**A**), *P. citrina* (**B**), *P. capsularis* (**C**) e *P. rubra* (**D**). As retas azuis são referentes ao tamanho do botão floral e as retas vermelhas são referentes ao tamanho do androginóforo. Os números em algarismos romanos referem-se ao estágio de desenvolvimento do botão floral, sendo o I mais inicial e o VI (*P. sanguinolenta* e *P. citrina*) ou V (*P. capsularis* e *P. rubra*) mais maduro.



Figura 10. Gráfico da relação entre o tamanho do botão e o tamanho do androginóforo (T.B./ T.A.) nas espécies *P. sanguinolenta*, *P. citrina*, *P. capsularis* e *P. rubra*. As barras referem-se aos estágios do desenvolvimento dos botões florais mostrados na Figura 9. O eixo X refere-se aos estágios de desenvolvimento do botão floral. Em cada grupo de barras, os números em algarismos romanos referem-se aos mesmos estágios de desenvolvimento do botão floral mostrados na Figura 9.

4.3. Anatomia do androginóforo

Nas quatro espécies (*P. sanguinolenta, P. citrina, P. capsularis* e *P. rubra*) o androginóforo apresenta estruturas anatômicas básicas semelhantes. O diâmetro do androginóforo é de aproximadamente 1,5 mm em *P. sanguinolenta*, 1,3 mm em *P; citrina,* 1 mm em *P. capsularis* e 1,3mm em P. rubra. Em cortes transversais do androginóforo de todas as espécies observaram-se a epiderme, camadas de células parenquimáticas e feixes vasculares responsáveis pela vascularização de estames e carpelos (Figuras 11G, 12E, 12F, 13E, 13F, 13G e 14G). A epiderme é uniestratificada, formada por células tabulares de paredes espessas (Figuras 11A, 11D, 11K, 12C, 13A, 13F e 14C). Não foram encontrados estômatos.

Logo abaixo da epiderme observam-se cerca de 28 camadas de células parenquimáticas (Figuras 11G, 12E, 12F, 13E, 13G, 14A e 14G) com núcleo e nucléolo evidentes (Figuras 11E, 12H e 13A). As primeiras camadas (cerca de 20) são constituídas de células prismáticas nas quais a espessura da parede, o formato e aspecto intracelular variam de acordo com a altura e grau de turgescência. Este parênquima que sofre tais variações, será denominado aqui de "Parênquima 1" (P1). No P1, células mais próximas da base do androginóforo apresentam paredes celulares primárias irregularmente espessadas, rica em polissacarídeos, que coram em magenta com Azul de Toluidina, conferindo a este grupo de células aspecto colenquimatoso (Figuras 11A, 11B, 12G, 12H, 12I, 13E, 13F, 14A e 14F).

À medida que se distancia verticalmente da base do androginóforo, as paredes das células do P1 ficam menos espessas, passando por espessuras intermediárias (Figuras 11E, 11K e 12C) até se tornarem delgadas na região apical, não sendo mais possível observar diferenças entre este grupo de células e o restante do parênquima(11F, 12E e 12G). Os espaços intercelulares ocorrem em toda a extensão do P1 do androginóforo, inclusive em regiões de paredes espessadas (Figuras 11D, 11H, 11J, 12C e 14H). Na parede celular do P1 visualizam-se numerosos campos de pontoação (Figuras 11B e 14F). Imersos no P1, estão cinco feixes vasculares concêntricos anficrivais responsáveis pela vascularização dos cinco estames (Figuras 11G, 12B, 12E, 13D, 13E, 13H e 14G) . As camadas de células parenquimáticas (cerca de oito camadas) internas ao P1, que estão mais próximas do centro do androginóforo, apresentam-se sem variações anatômicas ao longo do comprimento do mesmo e, aparentemente, não sofrem nenhum tipo de

modificação no grau de turgescência no androginóforo tocado, e serão aqui denominadas "Parênquima 2"(P2).

O P2 é composto por células prismáticas de paredes delgadas, de diâmetros de diversos tamanhos, frequentemente alongadas longitudinalmente (Figuras 11J. 12A, 12B, 13D, 13F, 14E e 14H). Logo abaixo do P2 estão seis feixes vasculares colaterais formando um arco na região central do androginóforo, responsáveis pela vascularização dos três carpelos (Figuras 11G, 12B, 12E, 13D, 13E, 14A, 14G e 14H). No P2 de P. rubra e P. capsularis, observam-se, adjacentes ao floema dos feixes vasculares de carpelo, aproximadamente cinco camadas de células parenquimáticas com diâmetros variáveis e com conteúdo citoplasmático mais denso, corado de azul claro (13F e 14H). Os feixes vasculares de carpelos são separados por duas a guatro camadas de células em uma a guatro linhas radiais (Figuras 12B e 8H) que vão até o centro do androginóforo, onde formam uma região medular de células parenquimáticas semelhantes as do P2, sendo aqui denominado de "Parênquima central" (Pc) (Figuras 11G, 12E, 13E, 14A, 14G, 14E e 14H). Os idioblastos fenólicos foram observados nas quatro espécies e em maior quantidade em P. rubra, aparecendo principalmente em regiões do P2 e Pc (Figuras 14A, 14B, 14E e 14H). Em menor quantidade e geralmente na primeira camada de células do P1, encontram-se idioblastos fenólicos em P. capsularis e P. citrina (Figuras 12D e 12E) e são raros em *P. sanguinolenta*.

Em cortes transversais do androginóforo de *P. sanguinolenta* observou-se plasmólise parcial de um grupo de células do P1 e epiderme a aproximadamente 5mm de altura da base do androginóforo (Figuras 11H e 11K).

Estas células apresentam pequenas sinuosidades na membrana plasmática e conteúdo citoplasmático mais denso (Figuras 11H e 11K). Em células do P1 e da epiderme da região oposta do mesmo corte visualizam-se células túrgidas com contorno mais arredondado, e nas quais provavelmente há um único grande vacúolo ocupando toda a extensão da célula, restringindo o núcleo e o citoplasma para a periferia (Figuras 11D e 11E). A presença de células de aspecto plasmolisado com a membrana plasmática retraída e conteúdo citoplasmático mais denso e vesiculoso foi observada em cortes longitudinais do androginóforo de *P. sanguinolenta* em uma região a partir do primeiro milímetro acima da base até a altura aproximada de 1cm (Figuras 11I e 11L). Em cortes longitudinais opostos a esta região observou-se que as células da epiderme e P1 apresentavam-se túrgidas (Figuras 11C e 11F).

Em cortes transversais de *P. citrina* a uma altura de aproximadamente 5 mm da base, observa-se a presença tanto de paredes espessas quando de paredes mais delgadas, mostrando que a transição da espessura das paredes celulares se dá aproximadamente nesta altura (Figura 12F). Nestes cortes, também é possível visualizar em uma região do P1 células com paredes irregularmente espessadas e contornos irregulares aparentando estar plasmolisadas (Figura 12I).



Figura 11. Anatomia do androginóforo de *P. sanguinolenta*. A. Corte longitudinal da base do androginóforo mostrando a epiderme e o P1com paredes espessas. Barra= 100 um. **B.** Corte longitudinal mostrando um detalhe de células do P1 com paredes espessas e numerosos campos de pontoação primários. Barra= 20 µm. C. Corte longitudinal a 1 cm da base mostrando epiderme, P1, parênguima 2, feixe vascular de carpelos e parênguima central da região oposta à região onde se encontram células do P1 plasmolisadas (imagem I). Barra= 100 µm D. Quadrante tracejado mostrado da imagem G (região inferior). Corte transversal a 5mm mostrando a epiderme e o P1 com células de contornos regulares e aspecto túrgido. Barra= 20 µm. E. Detalhe da imagem em D mostrando células da epiderme e do P1. Notar que as células apresentam um grande vacúolo deixando o núcleo restrito a periferia. Barra= 10 µm. F. Detalhe da imagem C mostrando o P1 com paredes delgadas e células com aspecto túrgido. Barra= 20 µm. G. Corte transversal mostrando a visão geral do androginóforo a 5 mm da base. Seta= feixe vascular de estames. Seta pontilhada=feixe vascular de carpelos. Barra= 100 µm. H. Quadrante pontilhado da imagem G (região superior). Notar as células do P1 com contornos irregulares e muitas células da epiderme e do P1 com citoplasma mais denso. Barra= 20 µm. I. Corte longitudinal a 1cm da base mostrando células da epiderme e do parênguima com aspecto plasmolisado. Barra = 20 µm. J. Corte transversal da base mostrando P1, parênguima 2 e um feixe vascular de estame. Barra= 50µm. K. Detalhe da imagem H mostrando células com aspecto plasmolisado. Notar o citoplasma da epiderme e do P1 mais denso. Barra = 10 µm. L. Detalhe da imagem I mostrando células do P1 com aspecto plasmolisado, com citoplasma mais retraído e denso. Barra = $10 \mu m$.

(e= epiderme; P1= parênquima 1; P2= parênquima 2; Pc= parênquima central; Fvc= feixe vascular de carpelo; Fve= feixe vascular de estame).



Figura 12. Anatomia do androginóforo de *P. citrina*. A. Corte longitudinal a 1cm da base mostrando P1 com paredes menos espessas em relação ao P1 próximo a base (imagem G), parênquima 2 e um feixe vascular de carpelo. Barra= 200 μ m. B. Detalhe do corte transversal (imagem E) mostrando P1 de paredes delgadas, feixe vascular de estame, parênquima 2 e um feixe vascular de carpelo. Asterisco=células separando os feixes vasculares de carpelos. Barra= 20 μ m. C. Quadrante tracejado da imagem F (corte transversal) mostrando epiderme e P1. Notar que as células do P1 apresentam-se túrgidas. Barra= 20 μ m. D. Detalhe do corte longitudinal a 1 cm da base mostrando epiderme e P1 com paredes menos espessas e idioblastos fenólicos na primeira camada de células (asterisco). Barra= 20 μ m E. Corte transversal a 8 mm da base mostrando a estrutura anatômica geral do androginóforo. Seta=feixe vascular de carpelo. Cabeça de seta=feixe vascular de estame. Barra= 100 μ m. F.

Corte transversal a 5 mm da base mostrando a estrutura geral do androginóforo. Notar as paredes espessas do P1 em relação a espessura do mesmo tecido na imagem E. Barra= 100 μ m **G.** Corte longitudinal a 1mm da base mostrando a epiderme, o P1 e um feixe vascular de estame. Barra= 200 μ m. **H.** Detalhe da imagem G motrando o P1 com paredes irregularmente espessadas. Barra= 20 μ m **I.** Quadrante pontilhado da imagem F mostrando a epiderme e o P1. Notar as paredes espessas e contornos irregulares das células do parênquima que aparentam estar plasmolisadas. Barra= 20 μ m.

(e= epiderme; P1= parênquima 1; P2= parênquima 2; Pc= parênquima central; Fvc= feixe vascular de carpelo; Fve= feixe vascular de estame).

Do lado oposto do mesmo corte, observa-se que a maioria das células do P1 está túrgida, maior, com contorno arredondado (Figura 6C).

Em cortes longitudinais do androginóforo de *P. capsularis*, observou-se, a uma altura de aproximadamente 3 mm, células de um lado células da epiderme e do P1 plasmolisadas e do lado oposto do mesmo corte células epidérmicas e do P1 não plasmolisadas (Figura 13D). As células com aspecto plasmolisado apresentam citoplasma retraído e mais denso em relação às células do lado oposto (Figura13C). O núcleo de algumas destas células está em posição central, e não restrito a periferia (Figura 13C). Na região oposta, as células do P1 encontram-se túrgidas, com menor retração do citoplasma e um vacúolo maior ocupando praticamente toda a extensão da célula (Figura 13A).

Em cortes longitudinais de *P. rubra* observou-se, próximo da base, o mesmo que em *P. capsularis*. De um lado, as células da epiderme e do P1 apresentam aspecto plasmolisado, com citoplasma retraído e mais corado (Figura 14D). Na região oposta a esta, as células epidérmicas do P1 são mais túrgidas, com menor retração do citoplasma e um vacúolo aparentemente maior (Figura 14C).



Figura 13. Anatomia do androginóforo de *P. capsularis.* **A.** Detalhe da região a esquerda do retângulo tracejado em B. Corte longitudinal mostrando células da epiderme e do P1 com um grande vacúolo ocupando quase todo o volume da célula conferindo aspecto túrgido. Barra= 20 μ m. **B.** Corte longitudinal do androginóforo inteiro. O retângulo tracejado está a 3 mm da base. Barra= 200 μ m **C.** Detalhe da região a direita do retângulo tracejado em B. Barra= 200 μ m. Corte longitudinal mostrando células com citoplasma denso e retraído conferindo aspecto plasmolisado. Barra= 20 μ m. **D.** Área referente ao retângulo tracejado em B. Corte longitudinal mostrando o P1, feixe vascular de estame, parênquima 2, e feixe vascular de carpelo. Notar que as células do P1 a direita do corte apresentam maior turgidez em relação as células do P1 a direita do corte. Barra= 40 μ m **E.** Corte transversal da base do androginóforo. Notar que as células do P1 apresentam paredes espessas, enquanto que as células de P2 apresentam paredes mais delgadas, formando uma região mais clara. Seta= feixe vascular de carpelo. Cabeça

de seta= feixe vascular de estame. Barra= 100 μ m. **F.** Detalhe da imagem E mostrando epiderme, P1 com paredes espessas, parênquima 2 com paredes delgadas contendo algumas células com conteúdo citoplasmático corado de azul claro (seta) e parênquima central. Barra= 20 μ m **G.** Corte transversal do androginóforo a 5mm da base. Notar as células do P1 com paredes delgadas. Não se observa diferença significativa entre as paredes do P1 e o parênquima 2. Seta= feixe vascular de carpelo. Cabeça de seta= feixe vascular de estame. Barra= 100 μ m **H.** Detalhe da imagem G mostrando epiderme, células do P1 mais justapostas com paredes mais delgadas, e um feixe vascular de estame. Barra= 20 μ m.

(e= epiderme; P1= parênquima 1; P2= parênquima 2; Pc= parênquima central; Fvc= feixe vascular de carpelo; Fve= feixe vascular de estame).



Figura 14. Anatomia do androginóforo de *P. rubra.* **A.** Corte longitudinal da região base-2mm mostrando epiderme, P1, parênquima 2, dois feixes vasculares de carpelo e parênquima central. O retângulo tracejado (esquerda) refere-se a imagem C e o retângulo pontilhado (direita) refere-se a imagem D. Barra= 200 μ m. **B.** Corte longitudinal a aproximadamente 1cm da base mostrando os mesmos tecidos apresentados em A. Notar que as paredes da epiderme e do P1 não são mais tão espessas quanto o mostrado em A (região basal). Barra= 200 μ m **C.** Quadrante tracejado (esquerda) da imagem A mostrando um detalhe da epiderme e do P1 cujas células possuem um grande vacúolo ocupando quase todo o volume celular conferindo aspecto túrgido. Barra= 20 μ m. **D.** Quadrante pontilhado (direita) da imagem A mostrando um detalhe da epiderme e do Citoplasma (corado de azul) conferindo aspecto plasmolisado. Notar a superfície irregular em relação a imagem C. Barra= 20 μ m. **E.** Detalhe do parênquima central com muitos

idioblastos fenólicos (asterisco). Barra= 20 μ m. **F.** Detalhe do P1 da região basal mostrando as paredes espessas e campos de pontoação primários. Barra= 20 μ m. **G.** Corte transversal a 2 mm da base mostrando a estrutura geral do androginóforo. Seta=feixe vascular de carpelo. Cabeça de seta= feixe vascular de estame. Notar que o parênquima 2 forma uma região mais clara em torno dos feixes vasculares de carpelo devido a diferença na espessura da parede em relação ao P1. Barra= 100 μ m **H.** Detalhe da imagem G, mostrando o P1 com paredes espessas; parênquima 2 com paredes delgadas, células achatadas tangencialmente e células com conteúdo citoplasmático corado de azul claro (seta); feixes vasculares de carpelo separados por linhas de células radiais (seta pontilhada) e parênquima central. Barra= 50 μ m. (e= epiderme; P1= parênquima 1; P2= parênquima 2; Pc= parênquima central; Fvc= feixe vascular de carpelo; Fve= feixe vascular de estame).

4.4. Ultraestrutura das células do parênquima do androginóforo

As imagens de microscopia de transmissão são referentes a células do P1 do androginóforo a alturas que variaram de 5 a 8 mm. O aspecto das células do P1 variou nas quatro espécies de acordo com o grau de turgescência em certas regiões deste tecido. Em geral, o P1 apresenta numerosos espaços intercelulares (Figuras 15G, 15H e 16F) e variações na espessura da parede. No citoplasma, que varia de densidade conforme a turgidez da célula, nota-se a presença de muitas mitocôndrias, numerosos aparato de golgi e vesículas, plastídios, dentre eles cloroplastos e alguns amiloplastos, e plasmodesmos agrupados em campos de pontoação primários (15D-F, 15H, 16A-F).

Na região do citoplasma próxima a membrana plasmática encontram-se numerosas vesículas (Figuras 15C, 15D, 15F, 15H, 16E e 16F). A membrana plasmática é frequentemente sinuosa, fazendo com que o espaço periplasmático seja grande (Figuras 15D. 15F, 16A, 16C, 16D e 16F). É freqüente também a formação de dobras circulares na membrana plasmática e a presença de membranas circulares no espaço periplasmático (Figura 16F). A maior parte das células do P1

apresenta-se com um único grande vacúolo de conteúdo eletronlúcido que ocupa a maior parte do volume celular (Figuras 15A e 15B). No lúmen destes grandes vacúolos é frequente a presença de estruturas que se assemelham a remanescentes do tonoplasto ou a vesículas (Figuras 15E, 15F, 16A e 16B). Nas células com um único grande vacúolo, o citoplasma encontra-se restrito a uma fina camada na periferia celular (Figuras 15C-H). Em algumas regiões do P1 foi possível notar células com vacúolos menores ou multivacuoladas e com conteúdo citoplasmático denso (Figuras 16A-D e 16F).



Figura 15. Ultraestrutura do androginóforo. A-H. Secções transversais do Parênquima 1. A. *P. citrina* - **B.** *P. sanguinolenta.* Visão geral de uma região do P1. Notar que algumas células apresentam-se menores, com conteúdo citoplasmático mais denso e com vacúolos menores ou multivacuoladas enquanto outras estão maiores e com um único grande vacúolo. Barras= 5 μm. **C.** *P. capsularis.* Células túrgidas com grande vacúolo restringindo o citoplasma a periferia. Seta=vesículas. Barra= 2 um. **D.** *P. rubra.* Detalhe de uma célula túrgida com amiloplastos. Quadrado=espaço periplasmático. Setas= vesículas. Barra= 2 μm. **E.** *P. citrina.* Células túrgidas e paredes espessas. Barra= 2 μm. **F.** *P.rubra.* Células túrgidas com corpos multivesiculares (setas) e campo de pontoação (região circulada). Quadrado = espaço periplasmático. Barra= 2 μm **G.** *P. sanguinolenta.* Detalhe de uma célula túrgida, com citoplasma restrito a periferia celular e grande espaço intercelular. Barra= 5 μm. **H.** *P. rubra.* Células túrgidas e grande espaço intercelular. Seta =vesícula. Barra= 2μm.

(Am= amiloplasto; Ei= espaço intercelular; Mi= mitocôndria; Pa= parede; Pl= plastídio Va= vacúolo).



Figura 16. Ultraestrutura do androginóforo. A-F. Secções transversais do Parênguima 1. A. P. sanguinolenta. Célula com citoplasma mais denso, vacúolo pequeno com numerosas membranas, Quadrado = espaco periplasmático. Barra= 2 um. **B.** *P. citrina*. Célula com citoplasma denso e multivacuolada. Notar a parede espessa. Barra= 2 μm. C. P. sanguinolenta. Célula multivacuolada. Quadrado = espaço periplasmático. Barra= 2 µm. D. P. capsularis. Célula multivacuolada. Quadrado = espaco periplasmático. Cabecas de seta= dobras circulares dos espacos periplasmáticos contendo constituintes de membrana. Barra= 2 µm. E. *P.* primário. sanguinolenta. Detalhe de um campo de pontoacão Seta tracejada=plasmodesmos. Setas= vesículas. Barra= 1 µm. F. P. capsularis. Detalhe dos amiloplastos e grandes espaços periplasmáticos (guadrados) com dobras contendo cisternas (cabeças de seta). Barra= 2 µm.

(Ag= aparato de Golgi; Am= amiloplasto; Ei= espaço intercelular; Mi= mitocôndria; Nu= núcleo; Pa= parede; PI = plastídio; Re= retículo endoplasmático; Va= vacúolo).

4.5. Micromorfologia da superfície do androginóforo

Analisando a superfície da epiderme do androginóforo, percebe-se que existem diferenças entre a região mais próxima a região basal e a mais próxima ao ápice. Em alguns casos, percebe-se ainda diferença na região mediana (Figuras 17 e 18). Em *P. citrina*, as células epidérmicas da região proximal apresentam estrias transversais na parede, formando em alguns pontos pequenas dobras (Figura 17A), enquanto que em células da região apical as estrias são longitudinais e superfície não forma dobras (Figuras 17B, 17D). Na região mediana do androginóforo observase uma zona de transição, onde se encontram células epidérmicas com estrias transversais e longitudinais (Figura 17C). Em *P. sanguinolenta* observou-se, na região proximal, dobras na superfície da parede das células epidérmicas (Figura 17E) , não se observam as estrias conspícuas como as presentes em *P. citrina*. As células epidérmicas da região apical também não possuem estrias tão evidentes, que são arranjadas transversalmente (Figura 17E).

Em *P. capsularis*, as células epidérmicas da região basal apresentam estrias em várias direções (Figura 18A), enquanto que, à medida que se aproxima da região apical, a superfície das células torna-se mais lisa (Figura 18B). Em *P. rubra* notam-se diversas estrias e ornamentações na superfície em aproximadamente dois terços do androginóforo, na região mais próxima à base (Figuras 18C-E). Observam-se regiões com células expandidas, estrias em diversas direções e dobras na epiderme (Figuras 18C-E).



Figura 17. Micromorfologia da superfície do androginóforo tocado (vista longitudinal). A-D. *P. citrina*. A.Região basal. Notar células da epiderme com dobras e estrias transversais. Barra= 20 μ m. **B.** Células próximas do topo sem dobras. Barra= 20 μ m. **C.** Região mediana, com estrias transversais e longitudinais. **D.** Detalhe da região apical, mostrando células com estrias longitudinais. Barra= 30 μ m. **E-F.** *P. sanguinolenta*. **E.** Região basal com dobras na epiderme. Barra= 100 μ m. **F.** Região apical mostrando leves estriações transversais. Barra= 30 μ m.



Figura 18. Micromorfologia da superfície do androginóforo tocado (vista longitudinal). A-B. *P. capsularis.* A. Região basal. Células epidérmicas com estrias em várias direções. Barra= 10 μ m. B. Região apical. Células com poucas estriações. Barra= 30 μ m. C-F. *P. rubra.* C, D e E. Região do primeiro terço do androginóforo (mais próximo da base). Notar a presença de células expandidas na superfície (C e D) de estrias em diversas direções (D), e de dobras na epiderme.Barras= 50, 20 e 30 μ m. F. Região distal. Notar menor quantidade de estrias e dobras. Barra=20 μ m.

Estas células expandidas também foram observadas em *P. capsularis.* Na região apical do androginóforo de *P. rubra* as células epidérmicas possuem superfície mais lisa (Figura 18F).

5. DISCUSSÃO

Nas espécies de *Passiflora* aqui analisadas, observou-se que o movimento do androginóforo só é induzido quando a coluna do androginóforo ou o ovário são tocados, e não outras partes da flor, e apenas roçar na coluna ou no ovário não é suficiente para indução do movimento. Já em *M. pudica*, as folhas e folíolos são bastante sensíveis à ação de fatores ambientais como vento, vibrações, estímulos por temperatura e luz. A provável explicação para menor sensibilidade do androginóforo baseia-se no fato de que fatores ambientais amenos como o vento não desencadeariam um movimento que seria dispendioso e inútil para a planta de *Passiflora* em tal situação, visto que este movimento do androginóforo só seria induzido pelo estímulo mais brusco do contato com uma parte do corpo do polinizador.

Experimentos conduzidos com métodos de injeção de carga foram realizados com *Dionaea* e *M. pudica* possibilitando quantificar um estímulo mínimo para gerar movimento nestas plantas em partes diferentes das folhas (Volkov, 2007; Volkov 2010). Pode-se sugerir este tipo de experimento para estas espécies de *Passiflora* como forma de verificar a reação ao estímulo elétrico, quantificar estes estímulos e relacioná-los às respostas das plantas. Da mesma forma, ainda se faz necessária a realização de outros experimentos com intuito de normalizar a quantidade de estímulo necessário e suficiente para causar o movimento do androginóforo. As

espécies que apresentaram maiores valores médios de velocidade do movimento foram *P. capsularis* e *P. sanguinolenta* e o menor valor foi o de *P. citrina.* É provável que a eficácia do movimento na otimização da polinização cruzada seja apenas para *P. sanguinolenta*, que é polinizada principalmente por beija-flores (Mac Dougal, 1989), porque a visita deste agente polinizador seria teoricamente mais duradoura e o estímulo mecânico suficiente para suscitar indução de movimento. Em *P. citrina*, que provavelmente também é polinizada por beija-flores (Mac Dougal, 1989), a angulação do androginóforo é muito menor e provavelmente o movimento não é significativo. Já em *P. rubra* e *P. capsularis*, talvez o movimento do androginóforo não seja um mecanismo eficaz para o depósito de pólen no agente polinizador, que seriam insetos (Koschnitzke & Sazima, 1993). No entanto, não existem estudos específicos a respeito da observação dos eventos de polinização destas espécies, com descrições detalhadas da visitação, sendo que estas inferências devem ser utilizadas com cautela.

Ainda não há um estudo filogenético preciso do subgênero *Decaloba* e, portanto, não é claro se as flores tubulares como as *de P. citrina* e *P. sanguinolenta* são derivadas ou basais em relação às flores em forma de disco (como por exemplo, as de *P. capsularis* e *P. rubra*). A hipótese mais aceita é a de que flores em forma de disco são basais (Koschnitzke & Sazima, 1993), e o movimento do androginóforo nestas espécies seria ineficaz para evitar a autopolinização. As flores tubulares seriam derivadas e teriam surgido como um escape à polinização por insetos, por pressão de seleção de outros agentes polinizadores, como os beija-flores (MacDougal, 1989). Esta hipótese está baseada ainda no fato de que *P. capsularis* e

P. rubra são autocompatíveis e facilmente autopolinizadas (Koschnitzke & Sazima, 1993; Ulmer & MacDougal, 2004), sendo que frutos destas espécies são frequentemente observados nas plantas mantidas dentro da casa de vegetação, onde não há presença de agentes polinizadores (observações pessoais).

O tipo de movimento realizado pelos pulvinos é o que mais se assemelha ao observado no androginóforo das espécies de *Xerogona* estudadas. A maioria das informações a respeito do movimento de pulvinos é baseada em mudanças na forma e tamanho das células motoras, causadas pelo fluxo de íons k⁺ através da membrana plasmática destas células, que é seguido de fluxo de água massivo, resultando em sua turgidez ou murcha (Satter & Galston, 1981). Nossos resultados de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão indicaram que existe uma provável reorganização do citoplasma e dos vacúolos de um grupo de células parenquimáticas (P1) do androginóforo e que esta reorganização é responsável pelo movimento.

Nas quatro espécies de *Xerogona* estudadas foi possível visualizar um grupo das células do P1, de um lado do androginóforo, com aspecto túrgido (contorno circular regular, grandes vacúolos) e do outro, células de contornos irregulares e com plasmólise parcial. A posição das células plasmolisadas coincide com o lado do androginóforo estimulado ao movimento. A confirmação de que há reorganização vacuolar nas células parenquimáticas do androginóforo se deu pela análise em microscopia eletrônica de transmissão. Observaram-se células com vacúolos grandes e com citoplasma restrito à periferia da célula no P1 de um lado do

androginóforo e, do lado estimulado ao movimento, células com vacúolos menores, e com citoplasma denso.

De forma semelhante, a reorganização dos vacúolos foi observada em células motoras do córtex do pulvino de algumas espécies de leguminosas que exibem movimentos nictinásticos e tigmonásticos (Campbell & Garber, 1980; Fleurat-Lessard & Millet, 1984; Fleurat-Lessard, 1988; Moysset & Simon, 1991; Machado & Rodrigues, 2004) e em células guarda de estômatos (Gao et al., 2005). Além da reorganização vacuolar, observaram-se, dentro de vacúolos grandes, muitas estruturas semelhantes à vesículas ou remanescentes de tonoplasto. Tais observações são semelhantes às de Gao et al. (2005) que analisaram a reorganização dos vacúolos nas células guarda dos estômatos em Vicia faba. Nas células guarda há fusão de pequenos vacúolos para formar um ou mais vacúolos grandes a fim de que o estômato se abra. No grande vacúolo fundido, que irá se dividir para formar novamente pequenos vacúolos durante o fechamento estomático, existem remanescentes de tonoplasto no lúmen e muitas estruturas semelhantes à vesículas ligadas à membrana, que devem ser provenientes da união dos dobras do tonoplasto (Gao et al., 2005). Ainda, sugeriu-se que estas estruturas de membrana no lúmen do vacúolo sirvam como reservatórios de tonoplasto para amparar as rápidas mudanças no volume vacuolar durante o movimento de abertura e fechamento estomático (Gao et al., 2005).

Foi documentada a dificuldade em se obter células motoras no estado estimulado porque o processo de recuperação se inicia segundos após o estímulo (Fleurat-Lessard, 1988). De forma similar, o estado de repouso também é

relativamente difícil de ser obtido, já que o próprio manuseio para fixar o material já pode induzi-lo ao movimento (Fleurat-Lessard, 1988). Além disso, o citoplasma das células motoras pode ser difícil de fixar devido à sua instabilidade (Fleurat-Lessard, 1988).Nas espécies de *Passiflora* aqui estudadas, quando observamos células em microscopia eletrônica de transmissão com vacúolos contendo em seu lúmen conteúdos de membrana, estas estão possivelmente no estágio de recuperação do turgor, após fusão de pequenos vacúolos que se formaram durante o movimento.

A reorganização vacuolar nos pulvinos e nas células guarda é reversível e provavelmente também o é nas células do P1 do androginóforo em *Passiflora* já que, para as quatro espécies estudadas, observou-se que após cerca de 2-3 minutos do estímulo (com movimento em uma determinada direção), o androginóforo é capaz de responder novamente a um segundo estímulo na mesma direção que a do estímulo anterior e gerar movimento. No entanto, não se observou movimento suplementar por um segundo estímulo realizado imediatamente e na mesma direção. Estas observações concordam com um mecanismo de movimento baseado na plasmólise celular parcial e concorda com observações para outras espécies, em relação ao tempo necessário para células vegetais retomarem o seu turgor original (Sibaoka, 1980).

A mudança no tamanho das células do P1 do androginóforo não é tão marcante quando se observa uma célula individualmente. Porém, vale lembrar que a amplitude do movimento não é tão grande quanto a do fechamento de folíolos do pulvino, e que as células capazes de movimento não se restringem à algumas camadas de células subepidérmicas (Campbell & Garber, 1980), mas à maioria das

células do P1 em uma extensão do androginóforo que pode ir até 9 mm, como foi observado em *P. sanguinolenta*.

A microscopia óptica e a microscopia eletrônica de transmissão mostraram que, além da reorganização do vacúolo, o androginóforo das espécies de Passiflora agui estudadas possui outras características anatômicas e ultraestruturais semelhantes às observadas em células motoras do pulvino e células motoras dos filetes dos estames de B. canadensis. Numerosos espacos intercelulares, paredes sinuosas irregularmente espessadas, ausência de lignificação nas paredes, plasmodesmos agrupados em campos de pontoacão, numerosas mitocôndrias e dictiossomos são algumas das características compartilhadas por estas espécies (Fleurat-Lessard 1988, Fleurat-Lessard & Millet, 1997, Machado & Rodrigues, 2004) e que devem estar relacionadas ao movimento. Fleurat-Lessard (1988) e Fleurat-Lessard & Millet (1997) descreveram para M. pudica pudica e para B. canadensis grandes espaços periplasmáticos, contendo fibrilas, ou constituintes de membrana cisternas. Espaços periplasmáticos também foram encontrados em P. ou sanguinolenta, P. capsularis e P. rubra, e, nestas espécies, algumas vezes encontram-se cisternas dentro destes espaços, que possivelmente funcionam como sítio de estocagem temporária de íons, favorecendo trocas entre simplasto e apoplasto (Fleurat-Lessard, 1988). As estruturas similares à membranas que formam cisternas provavelmente são exfoliações da membrana plasmática (Fleurat-Lessard. 1988).

As espessas paredes do P1 na base do androginóforo provavelmente servem como suporte, já que se trata de um órgão alongado e que está sujeito a movimentos

constantes. A diferença na espessura das paredes parece não ter relação com a capacidade de mudanças na forma e volume celular nem com as mudanças intercelulares rápidas que levam à plasmólise ou turgescência da célula, já que se observaram estes fenômenos tanto em regiões de paredes espessas quanto em regiões de paredes menos espessas. No pulvino de leguminosas, a diferença da espessura da parede entre células flexoras e extensoras é comum, mas em *R. pseudoacacia* (Moysset & Simón), por exemplo, não existem diferenças entre as paredes destas células. No entanto, a elasticidade da parede parece ter papel fundamental para o movimento (Fleurat-Lessard, 1988), bem como a ausência de lignificações na parede e a presença de plasmodesmos agrupados em campos de pontoação, que asseguram a comunicação entre as células favorecendo a distribuição de íons (Rodrigues & Machado, 2004; Rodrigues & Machado, 2006).

As células parenquimáticas do androginóforo de *Passiflora* não possuem o sistema duplo de vacúolos (vacúolos de tanino e vacúolos sem tanino ou coloidais) como observado em células motoras do pulvino, e em células motoras de *B. canadensis* (Campbell & Garber, 1980; Fleurat-Lessard 1988; Moysset & Simón, 1991; Fleurat-Lessard & Millet, 1997; Machado & Rodrigues, 2004), mas apenas um tipo de vacúolo que não contém tanino. Acredita-se que os vacúolos de tanino sirvam como reserva de íons cálcio cuja concentração é aumentada durante o fechamento dos folíolos do pulvino, e que pode estar relacionada ao movimento de contração do vacúolo e ao efluxo de íons potássio (Toriyama & Jaffe, 1972; Turnquist et al., 1993) . Provavelmente esta reserva de íons cálcio dos vacúolos de tanino não é necessária para a contração do vacúolo de células do P1 do androginóforo, bem como não é

para as células guarda dos estômatos, que também não têm vacúolos contendo tanino, e nas quais o influxo do cálcio extracelular é aumentado pela hiperpolarização da membrana plasmática. As oscilações no cálcio citosólico são fundamentais para o fechamento dos estômatos (Allen et al., 2001) . Sabe-se que em células vegetais íons cálcio são encontrados em grandes quantidades no apoplasto e nos vacúolos, e ainda no retículo endoplasmático e cloroplastos, mas eventos de transdução de sinal fazem com que a taxa de íons cálcio no citosol aumente (Hirschi, 2004).

A análise da superfície do androginóforo por microscopia eletrônica de varredura foi realizada no intuito de buscar peculiaridades que poderiam estar relacionadas à capacidade de movimentação, como as rugosidades e cutícula sulcada observadas na superfície do pulvino de *R. pseudoacacia* (Moysset & Simón, 1991) ou as ondulações contendo protuberâncias lignificadas em pulvinos do gênero *Mimosa* e outros gêneros de Leguminosae (Rodrigues & Machado, 2006). Na superfície do androginóforo tocado de *P. sanguinolenta*, *P. citrina* e *P. rubra* observaram-se, em regiões próximas à base, dobras na superfície que podem estar relacionados com o movimento de inclinação desta estrutura.

As flores de *P. sanguinolenta* com pedicelo imerso em solução de auxina (AIA) a 1mM e em solução de um inibidor de transporte polar de auxina (NPA) a 0,1 mM mostraram aumento da amplitude do movimento uma vez que valores maiores de angulação e velocidade angular foram observados em relação aos dos movimentos observados nos testes de movimento. Preliminarmente, foram realizados experimentos com flores da mesma espécie que foram somente borrifadas com a mesma solução de NPA, mas não houve diferença significativa quando comparado

ao movimento das flores não borrifadas (testes de movimento), provavelmente porque as flores não absorveram quantidade suficiente da solução de NPA pelas células da epiderme. É sabido que os movimentos pulvinares são derivados de variações de turgor reversíveis dirigidas por fluxos de K⁺ para dentro ou para fora das células do parênquima do pulvino. A auxina aumenta a atividade das bombas H+ATPase, estimulando a extrusão de prótons para fora da célula (Taiz & Zeiger, 2006), que estão acoplados a fluxos inversos de íons K⁺ (Bonmort & Roblin, 1996; Moyen et al. 2007). Concomitante com a entrada de íons K⁺ há entrada de água, fazendo então com que a célula fique ou se mantenha túrgida.

Experimentos com aplicação de 2,4-D em *C. fasciculata* mostraram que os folíolos se mantêm abertos mesmo quando colocados no escuro, portanto o estímulo de fechamento dos folíolos induzido por escuro é inibido. Ao mesmo tempo, quando colocados na luz, os folíolos continuam abertos e a amplitude da abertura aumenta. Houve também inibição do fechamento dos folíolos mediante estímulo elétrico em plantas tratadas com 2,4-D (Bonmort & Roblin, 1996; Moyen et al., 2007). Por outro lado, em *M. pudica,* observou-se que após a aplicação de auxina (AIA,NAA e 2,4-D) estímulos mecânicos geram rápidos movimentos de fechamento e abertura dos folíolos, tanto no escuro quanto na luz (Watanabe & Sibaoka, 1983). Nossos resultados concordam com os obtidos por Watanabe & Sibaoka (1983), já que a

Sabe-se que o NPA tem ação de acumulação de auxina no tecido, e não de diminuição da concentração de auxina, pois a inibição refere-se ao transporte polar de auxina e não ao efeito do hormônio (Petrásek, 2003). Observou-se massiva

proliferação radial do xilema nos feixes vasculares adjacentes à folhas jovens em mutantes *AtPIN1* de *Arabidopsis*, que têm o transporte polar de auxina defeituoso. No entanto, o aumento de tecido vascular é característico de plantas que superproduzem auxina. O observado no mutante é explicado pelo fato de que o tecido vascular está em uma posição logo abaixo de folhas jovens que sintetizam auxina que é então acumulada, já que o transporte basípeto está prejudicado no mutante, reduzindo a drenagem deste hormônio. A inibição química do transporte polar de auxina com uso de NPA em plantas selvagens causou alterações similares às do mutante (Gälweiler et al. 1998). Foi demonstrado que a extremidade apical dos órgãos florais, que são folhas modificadas, é um sítio primário de produção de auxina livre que controla o desenvolvimento floral e induz a formação dos tecidos vasculares (Aloni, 2006). O resultado obtido com as flores tratadas com NPA está dentro do esperado, já que o movimento do androginóforo nestas flores teve médias de angulação e velocidade angular similares ao das flores tratadas com AIA.

A concentração de AIA escolhida para os experimentos realizados foi maior do que as concentrações que geraram resposta em experimentos com pulvinos de *M. pudica* e *C. fasciculata* (Watanabe & Sibaoka, 1983; Bonmort & Roblin, 1996; Moyen et al., 2007) a fim de verificar se este hormônio produziria algum efeito no movimento. Após verificar a existência do efeito, futuramente pretende-se testar outras concentrações de auxinas para verificar o efeito desta variação na velocidade do movimento do androginóforo de espécies de *Xerogona*. A concentração de NPA utilizada foi escolhida com este mesmo propósito.
De maneira geral, os mecanismos que fazem com que o androginóforo se incline são semelhantes aos observados nos pulvinos, nos estames de *B. canadensis* e em células guarda dos estômatos de *V. faba*, ao menos até onde se pode observar com o uso de técnicas tradicionais de análise anatômica e ultraestrutural. No entanto, experimentos relacionados aos aspectos bioquímicos do movimento, tais como transporte de íons, água e prótons, são necessários para desvendar as causas das modificações observadas nas análises de microscopia. De mesma importância seriam os estudos sobre a biologia da polinização destas espécies, a fim de verificar se este movimento de inclinação do androginóforo está sob pressão de seleção no sentido de aprimorar o sucesso da polinização cruzada.

7. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Allen, G. J.; Chu, S. P.; Harrington, C. L.; Schumacher, K.; Hoffman, T.; Tang, Y. Y.; Grill, E.; Schroeder, J. (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. Nature 411: 1053-1057.
- Aloni, R.; Aloni, E.; Langhans, M. (2006) Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development 223: 315-328.
- Bonmort, J. & Roblin, G. (1996) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the dark and light-induced pulvinar movements in *Cassia fasciculate* Michx. Plant Growth Regulation 19: 61-65.
- Braam, J. (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. New Phytologist 165: 373–389.
- Campbell, N. A. & Garber, R. C. (1981) Vacuolar reorganization in the motor cells of *Albizzia* during leaf movement. Planta 148: 251-255.
- Cervi, A. C. (1997) Passifloraceae no Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. Fontqueria 45: 1-92.
- Edwards, J.; Whitaker, D.; Klionsky, S.; Laskowski, M.J. (2005) A record-breaking catapult. Nature 435:164.
- Fagerberg W.R. & Allain, D. (1991) A quantitative study of tissue dynamics during closure in the traps of Venus's flytrap *Dionaea muscipula* Ellis. American Jounal of Botany 78: 647–657.
- Fleurat-Lessard, P. & Millet, B. (1984) Ultrastructural features of cortical parenchyma cells ('motor cells') in stamen filaments of *Berberis canadensis* Mill. and tertiary pulvini of *Mimosa pudica* L. Journal of Experimental Botany 35: 1332-1341.

- Fleurat-Lessard, P. (1988) Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 63: 1-22.
- Fleurat-Lessard, P.; Frangne, N.; Maeshima, M.; Katajkzac, R.; Bonnemain, J.; Martinoia, E. (1997) Increased Expression of Vacuolar Aquaporin and H+-ATPase Related to Motor Cell Function in *Mimosa pudica* L. Plant Physiology 114: 827-834.
- Freudling C.; Starrach N.; Flach D.; Gradmann D.; Mayer W.E. (1988) Cell walls as reservoirs of potassium ions for reversible volume changes of pulvinar motor cells during rhythmic leaf movements. Planta 175: 193-203.
- Gälweiler, L.; Guan. C. Müller, A.; Wisman, E.; Mendgen, K.; Yephremov, A.; Palme,K. (1998) Regulation of polar auxine transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. Science 282: 2226-2230.
- Gao, X.; Li, C.;Wei, P.;Zhang, X.;Chen, J; Wang, C. (2005) The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*.
 Plant Physiology 139: 1207-1216.
- Hirschi, K. D. (2004) The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. Plant Physiology 136: 2438 2442.
- Kameyama, K.; Kishi, Y.; Yoshimura, M.; Kanzawa, M.; Sameshima, M.; Tshuchiya, T. (2000) Tyrosine phosphorylation in plant bending. Nature 407: 37.
- Koschnitzke, C. ; Sazima, M. (1993) Morfologia e biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.

- Malone, M. (1994) Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. New Phytologist 128:49-56.
- MacDougal, J. M. (1989) *Passiflora citrina*, A new Species in section *Xerogona* (Passifloraceae), from mesoamerica. Annals of the Missouri Botanical Garden 76: 354-356.
- Machado, S. R. & Rodrigues, T. M. (2004) Anatomia e ultraestrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae Faboideae). Revista Brasileira de Botânica 27: 135-147.
- Moyen, C.; Bonmort, J.; Roblin, G. (2007) Membrane effects of 2,4dichlorophenoxyacetic acid in motor cells of *Mimosa pudica* L. Plant Physiology and Biochemistry 45: 420-426.
- Moysset, L. & Simón, E. (1991) Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. American Journal of Botany 78: 1467-1486.
- Petrásek J.; Cerná, A.; Schwarzerová, K.; Elckner, M.; Morris, D. A. Zazimalova, E.
 (2003) Do phytotropins inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? Plant
 Physiology 131: 254-263.
- Rodrigues, T. M. & Machado, S. R. (2006) Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. Revista Brasileira de Botânica 19: 709-720.
- Rodrigues, T. M. & Machado, S. R. (2007) Pulvinus functional traits in relation to leaf movements: A light and transmission electron microscopy study of the vascular system. Micron 39: 7-16.

- Romero, G. A. & Nelson, C. E. (1986) Sexual dimorphism in *Catasetum* orchids: Forcible pollen emplacement and male flower competition. Science 232: 1538-1540.
- Satter, R. L.; & Galston, A. W. (1981) Mechanisms of control of leaf movements. Annual Review of Plant Physiology 32: 83-110.
- Sibaoka, T. (1980) Action potentials and rapid plant movements. *In* F. Skoog, ed., Plant Growth Substances 462-469.
- Sibaoka, T. (1991) Rapid Plant Movements triggered by action potentials. The Botanical Magazine, Tokyo 104: 73-95.
- Samejima, M.; & Sibaoka, T. (1980) Changes in the extracellular ion concentration in the main pulvinus of *Mimosa pudica* during rapid movement and recovery. Plant & Cell Physiology 21: 467-479.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2006) Fisiologia Vegetal. 4^a edição. Editora Artmed.

- Taylor, P. E.; Card, G.; House, J.; Dickinson, M. H.; Flagan, R. C. (2006) High-speed pollen release in the white mulberry tree, *Morus alba* L. Sex Plant Reproduction 19: 19–24.
- Toriyama, H. & Jaffe, M.J. (1972) Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cells of *Mimosa pudica* L. Plant Physiology 49:72-81.
- Turnquist, H.; Allen, N.; Jaffe, M.J. (1993) A pharmacological study of calcium flux mechanisms in the tannin vacuoles of *Mimosa pudica* L. motor cells. *Protoplasma* 176: 91-99.
- Ueda, M. & Nakamura, Y. (2007) Chemical Basis of Plant Leaf Movement. Plant & Cell Physiology 48: 900–907.

- Uehlein, N. & Kaldenhoff, L. (2008) Aquaporins and plant leaf movements. Annals of Botany 101: 1-4.
- Ulmer, T. & MacDougal, J.M. (2004) Passiflora: Passionflowers of the world. Timber Press Inc. Cambridge.
- Volkov, A.G.; Adesina, T.; Jovanov, E. (2007) Closing of venus flytrap by electrical stimulation of motor cells. Plant Signaling and Behavior 2: 139–144.
- Volkov, A. G. Foster, J. C.; Ashby, T. A.; Walker, R. K.; Johnson, J. A.; Markin, V. S.
 (2010) *Mimosa pudica*: Electrical and mechanical stimulation of plant movements. Plant, Cell and Environment 33: 163–173.
- Watanabe, S.; Sibaoka, T. (1983) Light- and auxin-induced leaflet opening in detached pinnae of *Mimosa pudica*. Plant & Cell Physiology 24: 641-647.
- Yao H., Xu Q. & Yuan M. (2008) Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. Plant Signaling and Behavior 3: 954–960.