

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CANTÍDIO FERNANDO GOUVÊA

**Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da
família Meliaceae**

Piracicaba

2005

CANTÍDIO FERNANDO GOUVÊA

**Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da
família Meliaceae**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli
Rodriguez

Piracicaba

2005

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Gouvêa, Cantídio Fernando

Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas
da família Meliaceae / Cantídio Fernando Gouvêa; orientadora
Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez. - - Piracicaba, 2005.
101 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências.
Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - -
Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo.

1. Agamous 2. Apetala 3. Expressão gênica 5. Hibridização *in situ* 6. Modelo ABC 7. Morfogênese vegetal I. Título

DEDICATÓRIA

A DEUS

**Pela sua onipotência e oportunidade de
crescimento aos seus filhos.**

DEDICO

À HUMANIDADE

Na contribuição para sua evolução

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela criação maior, força inspiradora e oportunidade de crescimento para com seus filhos.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez, pela orientação, amizade e principalmente compreensão e apoio nas horas difíceis.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas pela amizade, colaboração, orientação e paciência na execução das diferentes fases do estudo.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade para a realização do doutoramento e por toda a infraestrutura física e humana disponível ao aluno e principalmente pelo ótimo relacionamento entre o corpo docente e discente da unidade.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal/CENA/USP pela oportunidade e disponibilidade para a realização dos ensaios e experimentos da tese e pela agradável convivência com a equipe de trabalho.

À Profa. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela colaboração na disponibilidade de equipamentos e infra-estrutura do laboratório de Biotecnologia Vegetal/CENA/USP.

À técnica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal/CENA/USP, Renata Beatriz Cruz pela colaboração técnica, convivência e principalmente amizade.

Ao Laboratório de Histopatologia Vegetal e Biologia Estrutural de Plantas através de suas representantes Profa. Dra. Neusa de Lima Nogueira e a técnica do laboratório Mônica Lanzoni Rossi pelo apoio, colaboração e disponibilização da estrutura do laboratório.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA, ESALQ/USP e ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela disponibilidade de uso dos equipamentos e em especial do microscópio eletrônico de varredura, além da calorosa amizade.

À secretária Suzineide de Fátima Manesco, pela amizade e colaboração na resolução de assuntos burocráticos.

Aos professores das disciplinas realizadas durante o cumprimento dos créditos no doutoramento: Adriana, Marcelo, Tsai, Zagatto, Virgílio, Francisco Krug, Kitajima entre outros que de maneira total ou parcial contribuíram na formação acadêmica adquirida.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Janaynna, Maria Graziela (Zizi), Liliane (Lili), Márcio, Nailton, Joanne, Hérika Zaia, Gustavo, Alice, Girlene, Flávio, Carolina (Carol), Bonassa, Mayra, Fernanda, Raquel, Sandra, Fernando, entre outros que conviveram por curtos ou longos períodos.

Aos amigos Wagner, Alexandre, Fábio, Salete, Luciana, Alan, Flávia e muitos outros pela amizade e força em todas as horas.

Aos meus familiares e em especial à minha mãe pelo enorme incentivo, carinho e compreensão nas horas difíceis.

A todos os funcionários do CENA que direta e indiretamente colaboraram no trabalho e em especial ao João Geraldo Brancalion (Gera) e equipe (informática), Neuda Fernandes de Oliveira e equipe (pós-graduação), Marília Garcia Henyei e equipe (biblioteca), Cleusa Pereira Cabral e Adilson Corrêa da Silva, entre outros amigos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na execução de alguma fase deste estudo, o meu muito obrigado!!!!

RESUMO

GOUVÊA, C. F. **Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da família Meliaceae**. 2005. 101 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

A família Meliaceae compreende cerca de 51 gêneros e 550 espécies distribuídas principalmente na região Neotropical. Incluídas nesta família, estão espécies de elevado interesse comercial para a produção de madeiras nobres. Há carência de informações quanto à biologia floral dessas espécies, que aliada a problemas silviculturas dificulta a elaboração de programas efetivos de melhoramento genético das espécies de interesse econômico da família. O presente trabalho visa contribuir para o entendimento do desenvolvimento floral na família Meliaceae, com destaque para sete espécies de interesse econômico e/ou ecológico: *Cedrela fissilis* L., *Cedrela odorata* L., *Swietenia macrophylla* R. A. King, *Trichilia clausenii* C. DC., *Guarea guidonea* (L.) Sleumer, *Toona ciliata* M. J. Roem e *Melia azedarach* L. Para os estudos morfo-anatômicos utilizaram-se técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Analisou-se igualmente o padrão de expressão de genes do modelo ABC, relacionados ao desenvolvimento floral, via hibridização *in situ*. Os

estudos morfo-anatômicos permitiram caracterizar o desenvolvimento dos primórdios dos órgãos florais e o estabelecimento de estágios arbitrários de desenvolvimento, auxiliando na caracterização da expressão gênica. Estes resultados permitiram ainda a identificação de flores funcionalmente femininas ou masculinas em *S. macrophylla* C. *fissilis*, *C. odorata* e *T. ciliata*, as quais apresentam dimorfismo sexual. O padrão de expressão dos homólogos dos genes: *APETALA1* (*AP1*), *APETALA3* (*AP3*) e *AGAMOUS* (*AG*) foram diferentes daqueles previstos pelo modelo ABC. A expressão dos homólogos de *AP1* foi verificada em todo o meristema floral nos estágios iniciais de desenvolvimento, em todas as espécies estudadas. O sinal de expressão concentrou-se nos primórdios das sépalas e pétalas em estágios mais avançados do desenvolvimento, porém um fraco sinal de hibridização de *AP1* foi verificado em todos os verticilos. A expressão dos homólogos de *AP3* foi verificada nas regiões previstas pelo modelo ABC, correspondentes ao segundo e terceiro verticilos. Porém um fraco sinal de *AP3* foi também observado no quarto verticilo, o que não é previsto pelo modelo teórico. A expressão dos homólogos de *AG* foi restrita à região central do meristema floral, correspondente ao terceiro e quarto verticilos, em todos os estágios do desenvolvimento floral de todas as espécies estudadas. Entretanto, sinais adicionais de hibridização dos homólogos de *AG* foram visualizados na região abaxial dos primórdios de sépalas e pétalas em *C. fissilis*, *C. odorata* e *T. ciliata*. Os estudos da expressão dos genes do modelo ABC em Meliaceae revelaram padrões de expressão que não concordam com o modelo teórico vigente do controle molecular da determinação da identidade dos órgãos florais.

Palavras chave: Meliaceae, desenvolvimento floral, modelo ABC, *Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata*, *Toona ciliata*, *Swietenia macrophylla*, *Trichilia claussenii*, *Melia azedarach*, *Guarea guidonea*.

ABSTRACT

GOUVÊA, C. F. **Floral development in woody species of the Meliaceae family.** 2005. 101 p. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

The Meliaceae family comprises approximately 51 genus and 550 species mainly distributed in the Neotropical region. In this family there are many species of commercial interest for the production of noble wood. The lack of information on the floral biology associated with silvicultural problems limits the elaboration of effective breeding programs with species of economic interest. The present work aims to contribute with the understanding of floral development in Meliaceae, focusing in seven species of economical or ecological interest: *Cedrela fissilis* L., *Cedrela odorata* L., *Swietenia macrophylla* R. A. King, *Trichilia clausenii* C. DC., *Guarea guidonea* (L.) Sleumer, *Toona ciliata* M. J. Roem e *Melia azedarach* L. Morpho-anatomical analyses were done by light and scanning electron microscopy. The expression pattern of the ABC model genes, which are related to floral development, was analyzed by *in situ* hybridization. The characterization of the development of floral organ primordia and the establishment of arbitrary stages of floral development was done and was important for

the characterization of gene expression. These results allowed for the identification of functionally female and male flowers in *Swietenia macrophylla*, *Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata* and *Toona ciliata*, characterizing sexual dimorphism. The patterns of gene expression of the homologous of *APETALA 1*, *APETALA 3* and *AGAMOUS* were different from those predicted by the ABC model. *AP1* expression was observed in the entire floral meristem in the initial stages of development, in all seven species. The expression signal was more concentrated in sepal and petal primordia in further stages of development, although a weak hybridization signal of *AP1* was verified in all four whorls. The expression of *AP3* homologs was observed in the second and third whorls, as predicted by the ABC model. However, a weak signal of *AP3* was also observed in the forth whorl, which was not predicted by the ABC model. *AG* homolog expression was restricted to the central region of the floral meristem, corresponding to the third and forth whorls, in all stages of development of all seven species. However, additional hybridization signal of *AG* homologs were seen in the abaxial region of sepal and petal primordia in *Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata* and *Toona ciliata*. The analyses of the ABC model genes in Meliaceae revealed that the expression patterns do not agree with the theoretical currently accepted model that determines the molecular control of the identity of the floral organs.

Keywords: Meliaceae, floral development, ABC model, *Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata*, *Toona ciliata*, *Swietenia macrophylla*, *Trichilia claussoni*, *Melia azedarach*, *Guarea guidonea*.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Características silviculturas das espécies estudadas.....	6
2.2. Caracterização floral da família Meliaceae.....	8
2.3. Controle molecular do desenvolvimento floral.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. MATERIAL.....	15
3.2. MÉTODOS.....	16
3.2.1. Preparo e armazenamento do material coletado.....	16
3.2.2. Estudo morfo-anatômico do desenvolvimento floral utilizando-se MEV e MO.....	17
3.2.3. Medições do gineceu das flores de <i>S. macrophylla</i>	19
3.2.4. Infiltração e emblocagem em parafina visando hibridização <i>in</i> <i>situ</i>	19
3.2.5. Análise dos padrões de expressão dos genes do modelo ABC.....	21
3.2.5.1. Manutenção e extração dos plasmídeos contendo as sondas utilizadas.....	21
3.2.5.2. Linearização do plasmídeo.....	22

3.2.5.3. Marcação das sondas antisense.....	22
3.2.6. Hibridização <i>in situ</i> em corte histológico.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Características gerais do florescimento em espécies de Meliaceae..	26
4.2. Caracterização da arquitetura das inflorescências.....	27
4.3. Caracterização do desenvolvimento dos verticilos florais por MEV e MO.....	37
4.3.1. Desenvolvimento das sépalas.....	37
4.3.2. Desenvolvimento das pétalas.....	41
4.3.3. Desenvolvimento dos estames.....	44
4.3.4. Desenvolvimento dos carpelos.....	47
4.3.5. Flores em antese.....	47
4.4. Expressão de genes do modelo ABC em Meliaceae via Hibridização <i>in situ</i>	56
4.4.1. Padrões de expressão dos homólogos do Grupo-A (<i>APETALA 1</i>) em Meliaceae.....	66
4.4.2. Padrões de expressão dos homólogos do Grupo-B (<i>APETALA 3</i>) em Meliaceae.....	69
4.4.3. Padrões de expressão dos homólogos do Grupo-C (<i>AGAMOUS</i>) em Meliaceae.....	74
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

A família Meliaceae apresenta-se como uma das mais importantes famílias com espécies de grande interesse econômico e de alto potencial madeireiro no mundo, e por este motivo são exploradas intensivamente em florestas tropicais mundiais. A família é composta por cerca de 51 gêneros e 550 espécies distribuídas principalmente na região Neotropical, sendo que mais da metade das espécies pertencem a apenas 5 gêneros: *Aglaia* (100 espécies), *Trichilia* (66), *Turraea* (65), *Dysoxylum* (61) e *Guarea* (35). Os gêneros *Melia*, *Swietenia* e *Cedrela* apresentam menor número de espécies (Judd *et al.*, 1999). A madeira de muitas espécies desta família está entre as mais procuradas madeiras comerciais do mundo (Muellner *et al.*, 2003), principalmente para a indústria moveleira, além da possível utilização na arborização urbana, e de possuírem compostos ativos como os metabólitos secundários conhecidos como liminóides e meliacinas (Mabberley *et al.*, 1995). Essas substâncias são utilizadas como repelentes de insetos (Valladares *et al.*, 1999; Abdelgaleil *et al.*, 2001; Simmonds *et al.*, 2001), como ação inseticida (Schneider *et al.*, 2000; Greger *et al.*, 2001), fungicida (Govindachari *et al.*, 1999; Engelmeier *et al.*, 2000), bactericida (Kumar & Gopal, 1999, Aboutatb *et al.*, 2000) e antiviral em plantas (Singh *et al.*, 1988).

e ainda observa-se a ocorrência de numerosas substâncias com efeitos medicinais em humanos e animais (Bamba *et al.*, 1999, Benencia *et al.*, 2000; Benosman *et al.*, 2000).

A excessiva exploração mundial de espécies de Meliaceae tem causado uma redução considerável na população dessas espécies. No Brasil, esta exploração desordenada de espécies de Meliaceae ocorre principalmente na região amazônica, provocando grande impacto sobre a estrutura genética e populacional nas áreas de ocorrência natural. Este processo de contínua exploração, aliado às altas taxas de desmatamento, provoca a fragmentação das áreas contínuas da floresta tropical e o isolamento de populações inteiras, prejudicando, ou mesmo inviabilizando, o fluxo gênico entre os indivíduos (White *et al.*, 2002). Desta forma, o estudo da biologia floral pode elucidar aspectos importantes em relação à organização das estruturas florais, além de contribuir para o entendimento das relações evolutivas entre os diferentes taxa de Meliaceae. Estes estudos poderão oferecer subsídios para auxiliar na compreensão da estrutura e diversidade genética e nas relações ecológicas entre os indivíduos das espécies estudadas e seus polinizadores, contribuindo ainda para a elaboração efetiva de programas de conservação e melhoramento genético dessas espécies. Até o presente momento, existe uma carência de estudos sobre a biologia floral de Meliaceae, encontrando-se apenas a descrição morfo-anatômica quanto às características florais da família e sua taxonomia até o nível de gênero (Pennington & Styles, 1975). Este trabalho descritivo é considerado como a mais importante revisão morfo-anatômica da família Meliaceae (Muellner *et al.*, 2003) e depois dele poucos estudos foram realizados detalhando as características florais de espécies representativas de cada gênero. Uma característica marcante desta família é a presença de espécies monóicas com dimorfismo sexual das flores (revisado por Styles,

1972). Esta característica permite identificar flores hermafroditas e funcionalmente masculinas ou femininas na maioria das espécies de Meliaceae, inclusive aquelas enfocadas neste estudo. O dimorfismo sexual nem sempre é identificado diretamente com a observação a olho nu das flores nas inflorescências. Assim, o sucesso de programas de melhoramento genético através da utilização de cruzamentos controlados pode ser equivocado quando não considerada esta característica.

Buscando melhor compreender o processo de diferenciação floral na família Meliaceae, realizou-se o estudo da ontogênese floral com a descrição morfo-anatômica, seguida pela análise da expressão de genes relacionados à identidade dos órgãos florais. Estes genes foram inicialmente clonados em *Arabidopsis thaliana* (Coen & Meyerowitz, 1991), sendo estudadas as suas respectivas funções em mutantes do desenvolvimento floral desta espécie. A análise dos resultados da expressão ectópica de genes permitiu a elaboração de modelos que contemplam o funcionamento desses genes relacionados exclusivamente com a determinação da identidade dos órgãos em cada verticilo floral (Weigel & Meyerowitz, 1994). Este modelo foi denominado de modelo ABC e vem sendo estudado em vários grupos de plantas, demonstrando a conservação das respectivas funções, principalmente dentro do grupo das angiospermas. Estes estudos estão contribuindo para a elucidação de questões evolutivas importantes nos diferentes grupos vegetais encontrados na natureza. Desta forma, procuramos estudar um grupo de sete espécies de Meliaceae representantes de 5 gêneros, procurando considerar tribos e subfamílias distintas. A decisão em trabalhar com essas espécies decorreu da grande variação morfológica encontrada entre elas (e.g. presença ou ausência de tubo estaminal) e dentro de cada espécie (e.g. dimorfismo sexual), aliada à importância silvicultural e disponibilidade para a obtenção

periódica do material no decorrer do estudo. Uma das questões fundamentais deste estudo é entender o processo de diferenciação sexual das flores em decorrência da presença de órgãos masculinos ou femininos bem desenvolvidos em cada tipo de flor e a identidade genética dos órgãos florais. Como resultados, apresentamos a caracterização morfo-anatômica separando os diferentes tipos de flor nas espécies estudadas e dados que suportam a conservação da função dos genes relacionados com a identidade dos órgãos florais para a maioria das espécies.

Desta forma, este estudo teve como objetivos:

- I. Analisar o processo do desenvolvimento ontogenético floral de espécies de Meliaceae, através do estudo morfo-anatômico, visando a caracterização de estágios de desenvolvimento floral.
- II. Determinar os padrões de expressão dos genes do modelo ABC, através da técnica de hibridização *in situ*, comparando-os com os descritos para a planta modelo *Arabidopsis thaliana*.
- III. Entender as relações filogenéticas entre os gêneros estudados e suas espécies representativas, associando os dados morfo-anatômicos e a expressão diferencial de genes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A família Meliaceae possui cerca de 51 gêneros e 550 espécies (Judd *et al.*, 1999), sendo uma das famílias mais importantes de plantas para produção de madeiras nobres, com grande potencial para a silvicultura (Pennington & Styles, 1975), especialmente no Brasil. A maioria das espécies arbóreas da família Meliaceae encontra-se na região tropical, em florestas úmidas (Pennington & Styles, 1975; Rizzini, 1971).

Pennington & Styles (1975) realizaram ampla revisão bibliográfica sobre a família Meliaceae e seus respectivos gêneros, sendo apontado por Muellner *et al.* (2003), como um dos estudos mais importantes e completos da família. Pennington & Styles, (1975) reconheceram a existência de 4 subfamílias: Melioideae, com sete tribos contendo 35 gêneros, entre as quais *Melia*, *Trichilia* e *Guarea*, e Swietenioideae, com treze gêneros, incluindo-se *Cedrela*, *Swietenia* e *Toona* organizados em três tribos. As subfamílias Quivisianthoideae e Capuronianthoideae possuem apenas um gênero cada, *Quivisianthe* e *Capuronianthus*, respectivamente.

Muellner *et al.* (2003) também estudaram a família Meliaceae, visando reconstrução filogenética através de marcadores moleculares de seqüência de DNA de

três regiões diferentes: genes de plastídeos *rbcL*, *mat K* (parcial) e o gene de rDNA 26S nuclear (parcial). Os resultados confirmaram a filogenia apresentada por Pennington & Styles (1975), que foi estabelecida apenas com caracteres morfo-anatômicos das espécies. As distâncias filogenéticas entre os gêneros *Cedrela*, *Swietenia* e *Toona*, da subfamília Swietenioideae, foram menores entre si do que em relação aos gêneros *Melia*, *Trichilia* e *Guarea*, da subfamília Melioideae (Muellner *et al.*, 2003). Nesta subfamília, as menores distâncias filogenéticas foram encontradas entre os gêneros *Guarea* e *Trichilia* (Muellner *et al.*, 2003). Verificou-se que o gênero *Guarea*, representado pela espécie *Guarea guidonea*, possuía caracteres morfológicos mais ancestrais.

2.1. Características silviculturas das espécies estudadas.

A árvore do mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla*) atinge grande porte, com 40 a 45 metros de altura e podendo atingir de 1 a 2 metros de diâmetro à altura do peito (DAP), produzindo uma madeira moderadamente pesada, sendo que sua densidade básica varia de 0,55 a 0,70 g.cm⁻³ (Couto, 2002). Possui cerne de coloração variada entre castanho avermelhado e castanho escuro, uniforme e muito utilizado para produção moveleira, naval, de instrumentos musicais, entre outros (Gasparetto, 1998).

No Brasil, o mogno é intensamente explorado na região amazônica, principalmente no estado do Pará em matas de terra-firme. Devido ao desmatamento intenso, inúmeros projetos que visam a proteção e conservação da espécie foram propostos, porém sem sucesso, estando atualmente proibida a exploração predatória desta espécie.

Os cedros, representados neste trabalho por *Cedrela fissilis* e *Cedrela odorata*, possuem grande interesse para a indústria moveleira em geral. *Cedrela odorata* é de ocorrência natural na floresta Amazônica e *Cedrela fissilis* é natural da mata Atlântica (Rizzini, 1971). A árvore de *C. odorata* pode atingir proporções semelhantes às do mogno, e maiores em relação a *C. fissilis*. A madeira de ambas as espécies possui uma coloração avermelhada, e geralmente com uma grã direita e uniforme que confere grande estabilidade e utilização variada em movelaria (Rizzini, 1971).

Espécies como *Guarea guidonea* e *Trichilia clausenii* são encontradas em florestas da Mata Atlântica e possuem baixo potencial madeireiro. *Trichilia clausenii* é uma espécie de sub-bosque (Lorenzi, 1999), apresentando valores de DAP (diâmetro à altura do peito) insuficientes para o aproveitamento em serraria.

Outras espécies exóticas e que fazem parte desse estudo são *Toona ciliata* (mogno australiano) e *Melia azedarach* (cinamomo). *Toona ciliata* possui distribuição natural no sul da Austrália, entre Queensland e New South Wales, e também na Índia e sudeste asiático. A árvore pode atingir até 55 metros de altura (Wagner *et al.*, 1999). *Melia azedarach* é muito utilizada como espécie ornamental podendo atingir grande porte, sendo atualmente estudada para obtenção de produtos com princípio ativo inseticida (Schneider *et al.*, 2000; Greger *et al.*, 2001).

Um dos grandes problemas silviculturais para o uso de Meliaceae em reflorestamentos homogêneos é o ataque de uma lagarta conhecida como *Hypsipylla grandella* (Lepdoptera: Pyralidae; Mayhew & Newton, 1998), que inviabilizou inúmeras tentativas de plantio em larga escala. Esta praga tem atacado plantios experimentais de *S. macrophylla*, *C. fissilis* e *C. odorata*, não tendo sido verificados problemas em outras

espécies até o presente momento, sendo, portanto, promissor em termos silviculturais, o uso de *T. ciliata*.

2.2. Caracterização floral da família Meliaceae

Na família Meliaceae, as flores geralmente são organizadas em inflorescências determinadas e axilares, ou menos freqüentemente, podem ser terminais do tipo cimo ou racemo (Pennington & Styles, 1975; Judd *et al.*, 1999; Watson & Dallwitz, 2000). As flores são usualmente unissexuais, em plantas monóicas ou dióicas (Judd *et al.*, 1999). O perianto é formado por 4 ou 5 sépalas e pétalas isômeras, geralmente livres, podendo ser soldadas, como por exemplo nas espécies do gênero *Cedrela*, levemente conadas basalmente, imbricadas, convolvuladas, ou ainda valvadas (Judd *et al.*, 1999). Os estames são livres (e. g. *Cedrela* e *Toona*), ou unidos, formando um tubo estaminal (e.g. *Swietenia*, *Melia*, *Guarea*, *Trichilia*). As flores possuem ainda um disco nectarífero anular, intraestaminal, podendo formar um androginóforo (e.g. *Cedrela*). O gineceu é formado por 2 a 5 carpelos unidos, geralmente plurilocular e com placentação axilar (Pennington & Styles, 1975; Watson & Dallwitz, 2000). Há a presença de 4 a 10 estames ou, ocasionalmente em maior número de estames com filetes usualmente conados e unidos, formando um tubo, com ou sem apêndices apicais, glabros ou pubescentes. O estigma da flor pode ter uma forma variada, mas usualmente é capitado. Geralmente apresenta 2 ou mais óvulos anátropos ou ortótropos por loja. Os grãos de pólen são colpados e tetraporados com ornamentação variada da exina (Revisado por Pennington & Styles, 1975; Judd *et al.*, 1999; Watson & Dallwitz, 2000).

Styles (1972) apresentou um estudo do dimorfismo sexual das flores de algumas espécies de Meliaceae, mostrando diferenças morfológicas importantes para a distinção entre flores em uma mesma inflorescência. A subfamília Swietenioideae é descrita como contendo espécies monóicas, enquanto a subfamília Melioideae possuiria espécies dióicas, como as do gênero *Guarea* e *Trichilia*, bem como espécies poligâmicas, como as do gênero *Melia*. Styles (1972) menciona que os diferentes tipos florais não são distribuídos de maneira aleatória pelos ramos da inflorescência. Geralmente as inflorescências formam um dicásio e as flores terminais de cada ramo (ou tirso) são femininas ou hermafroditas, e as flores laterais são masculinas, portanto sempre em maior número. Porém, este modelo não é conservado e podem existir inflorescências apenas com flores masculinas, ou femininas. Este autor relata ainda que todos os gêneros de Meliaceae, exceto *Toona* e *Cedrela*, possuem flores com filetes formando um tubo estaminal, onde as anteras possuem posição introrsa.

Há a necessidade de aprofundamento dos estudos morfo-anatômicos do dimorfismo sexual em espécies de Meliaceae. Informações a esse respeito podem complementar outros estudos de ecologia (sistemas de reprodução, identificação de polinizadores, etc.) e melhoramento genético (planejamento de pomares de sementes, de estratégias de polinização controlada, etc.).

2.3. Controle molecular do desenvolvimento floral

Em plantas superiores, a transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva envolve fatores exógenos (tais como fotoperíodo e temperatura) e endógenos (fitormônios e controle genético) (Poethig, 1990; Bernier *et al.*, 1993;

Hopkins, 1995; Irish, 1999). A elucidação de aspectos genéticos e moleculares relacionados ao florescimento (Koorneef *et al.* 1991; Weigel *et al.* 1992; Coupland, 1995; Kramer & Irish, 1999; Honma & Goto, 2001; Hong *et al.* 2003, Ferrario *et al.*, 2004, Zahn *et al.*, 2005), tem avançado grandemente através de estudos de clonagem e caracterização de genes envolvidos no desenvolvimento floral (Weigel, 1995; Lawton-Rauch *et al.* 2000), inicialmente em plantas-modelo como *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus*. Atualmente, esses estudos têm sido estendidos a outros grupos de plantas como em gimnospermas: *Picea abies* (Tandre *et al.* 1995, 1998; Carlsbecker *et al.*, 2003; Sundstrom *et al.* 1999), *P. mariana* (Rutledge *et al.* 1998), *Ginkgo biloba* (Jager *et al.*, 2003); e em angiospermas monocotiledôneas, tais como: *Zea mays* (Mena *et al.* 1998; Schmidt & Ambrose, 1998) e *Oryza sativa* (Kang *et al.* 1998, Prasad *et al.*, 2001), e em angiospermas dicotiledônias como o girassol (Dezar *et al.*, 2003), *Petunia hybrida* (Ferrario *et al.*, 2003) e tomate (Hart & Hannapel, 2002).

Segundo Theissen *et al.* (2000), a flor é o modelo ideal para os estudos de genética evolutiva do desenvolvimento em plantas, e genes como os do complexo MADS têm um importante papel na origem e evolução do desenvolvimento floral. A morfologia floral é um dos recursos para a taxonomia e reconstrução filogenética de angiospermas (Lawton-Rauth *et al.*, 2000). Além disso, o desenvolvimento floral em eudicotiledôneas é determinado por uma rede regulatória de genes organizados hierarquicamente (Coen & Meyerowitz, 1991).

As interações genéticas implicadas na indução floral são bem compreendidas em *Arabidopsis* (Bowman *et al.* 1989; Schultz & Haughn, 1993; Weigel & Meyerowitz, 1994; Weigel, 1995; Mandel & Yanofsky, 1995; Parcy *et al.* 1998; Irish, 1999; Messenguy & Dubois, 2003; Folter *et al.*, 2005).

Genes de identidade do meristema controlam tanto a transição do meristema vegetativo para o meristema da inflorescência, como da inflorescência para o floral (Weigel, 1995; Ng & Yanofsky, 2000). Os genes de identidade dos órgãos florais (genes homeóticos do modelo ABC, Coen & Meyerowitz, 1991) especificam a identidade do órgão em cada verticilo da flor (Weigel & Meyerowitz, 1994). Um modelo clássico proposto primeiramente por Coen e Meyerowitz (1991) sugere três classes de genes homeóticos: A, B e C. O modelo ABC, o qual descreve o papel destas funções no desenvolvimento floral, propõe que a identidade das sépalas é controlada somente pela função A atuando no primeiro verticilo. A combinação entre as funções A e B especifica o desenvolvimento de pétalas no segundo verticilo, e a combinação das funções B e C especifica a formação de estames no terceiro verticilo. A expressão única do fator C, na região central do meristema floral, especifica o desenvolvimento de carpelos no quarto verticilo e também a determinação do meristema floral. O modelo também propõe que as funções A e C regulam negativamente uma à outra e que a função B é restrita ao segundo e terceiro verticilos, independentemente das funções A e C. Foram isolados genes de *Arabidopsis* que correspondem às três atividades homeóticas A, B e C; os genes *APETALA1* (*AP1*) e *APETALA2* (*AP2*) estão relacionados à função A; *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*) à função B e *AGAMOUS* (*AG*) à função C (Coen e Meyerowitz, 1991; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Theissen *et al.*, 2000, Messenguy & Dubois, 2003)

A maior parte dos genes do modelo ABC codifica fatores de transcrição, pertencentes à família multigênica denominada MADS, possuindo um domínio de ligação a DNA altamente conservado (Ma *et al.* 1991; Honma & Goto, 2001). A comparação de seqüências de aminoácidos das proteínas codificadas pela família

multigênica MADS levou à classificação dos genes nos grupos A, B e C (Purugganan *et al.* 1995). Experimentos de expressão ectópica destes genes de identidade dos órgãos florais, usando-se estratégias de antisense/co-supressão têm confirmado a função dos mesmos (Weigel & Meyerowitz, 1994; Golovkin, 2003).

Um dos primeiros genes MADS isolados foi o gene *AGAMOUS*, *AG* (Yanofsky *et al.* 1990), que codifica a função C em *A. thaliana*. Mutantes *ag* possuem sépalas e pétalas normais, entretanto os estames são homeoticamente convertidos em pétalas e os carpelos são substituídos por outra flor mutante. A superexpressão de *AG*, sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), apresenta o mesmo fenótipo do mutante para o grupo A (*AP1* e *AP2*) apresentando carpelos no primeiro verticilo, no lugar das sépalas, e estames substituindo as pétalas no segundo verticilo (Mizukami & Ma, 1992). Os fenótipos dos mutantes demonstram que o gene *AG* possui um papel importante na determinação da identidade dos carpelos e estames, tendo assim um papel fundamental na definição do sexo na flor. Plantas que possuem flores com sexos separados, como milho e pepino, possuem homólogos múltiplos de *AGAMOUS* (Kater *et al.*, 1998).

Em adição ao modelo ABC, outra função foi proposta, denominada E, realizada pelos genes homeóticos *SEPALLATA* (*SEP*). Os genes *SEPALLATA1* (*SEP1*), *SEPALLATA2* (*SEP2*) e *SEPALLATA3* (*SEP3*), juntamente com os genes das classes A, B e C são necessários para a especificação da identidade dos órgãos florais. Assim, as pétalas seriam o resultado da atuação dos genes das funções A, B e E; os estames, dos genes das funções B, C e E, e os carpelos dos genes das funções C e E (Pelaz *et al.*, 2000; Theissen, 2001; Theissen & Saedler, 2001). Os genes *AP1*, *AP3*, *PI* e *AG* são todos capazes de interagir entre si, mas somente homodímeros de *AP1*,

homodímeros de *AG* e heterodímeros de *AP3-PI* são capazes de se ligarem em seqüências CArG do DNA (Riechmann *et al.*, 1996). Um exemplo disso foi a demonstração de que complexos de proteínas dos genes *AP3-AP1* e *PI-AP3-SEP3* são suficientes para ativar a região promotora de *AP3*, que possui 3 regiões CArG (Honma & Goto, 2001). Outros estudos mostraram que a expressão ectópica dos heterodímeros de *PI-AP3-SEP3* e *PI-AP3-AP1* são suficientes para transformar folhas em órgãos petalóides, e que heterodímeros de *PI-AP3-SEP-AG* são suficientes para converter folhas em órgãos estaminóides. Com base nestas observações, Theissen e Saedler (2001) propuseram uma atualização do modelo ABC, que prevê a atuação de quatro diferentes complexos de fatores de transcrição compostos por diferentes proteínas MADS. Em *Antirrhinum*, os homólogos conhecidos dos genes de identidade dos órgãos florais são: *SQUAMOSA (SQUA)* que é um gene da identidade do meristema floral (Huijser *et al.* 1992) e responsável pela função A, sendo ortólogo do gene *AP1* de *Arabidopsis* (Mandel *et al.*, 1992); *DEFICIENS (DEF)* (Sommer *et al.* 1990), e *GLOBOSA (GLO)* (Tröbner *et al.*, 1992) requeridos para a identidade das pétalas e estames e relacionados com a função B, formando heterodímeros entre si, e o gene *PLENA (PLE)*, que é necessário para a formação de estames e carpelos e pertence à função C (Bradley *et al.*, 1993). Todos esses genes sintetizam proteínas MADS (Saedler *et al.*, 2001; Messenguy & Dubois, 2003). Quando as proteínas desses genes são co-expressas, o heterodímero *DEF-GLO* possui grande afinidade para formar um complexo multicomponente com o homodímero *SQUA*. Este complexo multicomponente é formado a partir de regiões consenso (região C- terminal) de cada proteína (Messenguy & Dubois, 2003). Esses dados mostram conformidade com o modelo proposto para *Arabidopsis*.

Devido à surpreendente constância da organização floral em angiospermas, sugere-se que o modelo ABC seja altamente conservado durante a evolução (Baum, 1998; Irish, 1999; Ferrario *et al.*, 2004). Desta forma, os estudos relacionados à identificação de variações no número de genes, no padrão de expressão gênica e na interação entre os produtos gênicos, podem contribuir para o entendimento da evolução das flores (Theissen, 2000). Lawton-Rauh *et al.* (2000) sugerem ainda que a interação entre a genética evolutiva e a genética do desenvolvimento responderá questões gerais sobre a evolução floral e o desenvolvimento em plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Ramos contendo inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fotografados, sendo posteriormente prensados para secagem e herborização. O material seco foi depositado na forma de exsiccatas no Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESA, como documento taxonômico deste estudo. Após um trabalho de re-identificação, os materiais foram identificados como: *Cedrela fissilis* Vell (cedro - ESA nº78412), *Cedrela odorata* L. (cedro cheiroso, cedro-do-brejo – ESA nº 78413), *Swietenia macrophylla* R. A. King (mogno brasileiro – ESA nº 78419), *Trichilia clausenii* C. DC. (ESA nº78421), *Guarea guidonea* (L.) Sleumer (camboatã, marinheiro – ESA nº 78415), *Toona ciliata* M. J. Roem (ESA nº78420) e *Melia azedarach* L (Santa Bárbara – ESA nº78417).

Posteriormente à identificação, o material vegetal das 7 espécies arbóreas foi coletado no parque da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, no período correspondente a agosto e novembro de 2001 a 2004, com pico de florescimento em

setembro para as condições de fotoperíodo de Piracicaba/SP. Todas as espécies floresceram neste período com pequena variação entre as mesmas.

O material coletado consistiu de inflorescências nos primeiros estágios de desenvolvimento, logo após a rebrota primaveril e no início de formação dos primórdios florais.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo e armazenamento do material coletado

A fixação dos materiais coletados para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO) foi realizada em solução de paraformaldeído (4% p/v em água deionizada), com a utilização de baixo vácuo (60mmHg) por 30 segundos. Posteriormente, foram mantidos em geladeira durante 4 dias.

O material a ser utilizado na hibridização *in situ* seguiu o mesmo processo de fixação, porém sendo mantido em geladeira por cerca de 24 horas. Em seguida, as amostras fixadas foram desidratadas em série etílica (30 a 70%, com incrementos de 10% a cada 4 horas), sob refrigeração. As amostras para hibridização *in situ* foram desidratadas em série etílica (30 a 100%, com incrementos de 10% a cada 4 horas) e armazenadas em etanol 100% a -20°C (Dornelas *et al.*, 1999).

3.2.2. Estudo morfo-anatômico do desenvolvimento floral utilizando-se MEV e MO.

Para a análise em MEV, flores em diferentes estágios foram separadas visualmente a partir das amostras mantidas em etanol 70%. Posteriormente, foram desidratadas até etanol 100%, conforme o mesmo procedimento descrito no item 3.2.1. Amostras correspondentes a esses estágios de desenvolvimento foram secas ao ponto crítico (equipamento marca Balzer – CPD 030), dissecadas para expor as estruturas florais, montadas em porta-espécimes apropriados utilizando-se fita adesiva dupla face comercial e metalizadas com ouro coloidal (camada de 40 a 60nm) em metalizador (equipamento marca Balzer – MED 010).

A observação dos espécimes foi feita em microscópios de varredura (marca ZEISS - modelos DSM 940 A e LEO 435 PV) operando entre 10 e 15KV. As imagens foram digitalizadas pelos programas DIT e LEO/UIF, respectivamente, no Núcleo de Apoio à Pesquisa de Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária NAP -MEPA,ESALQ/USP.

Para a análise em microscopia óptica, amostras das flores separadas visualmente foram desidratadas em série etílica até 100%, conforme descrito no item 3.2.1, e emblocadas em Histoiresina (Leica, Heidelberg), seguindo-se as instruções do fabricante.

Para algumas espécies como; *Guarea guidonea*, *Cedrela odorata* e *Melia azedarach*, foi utilizado o protocolo de infiltração modificado de Rodriguez & Wetzstein (1998) visando melhorar as condições de infiltração da resina, com a utilização de baixo vácuo a cada troca de solução.

Tabela 01-Protocolo para infiltração em historesina (modificado de Rodriguez & Wetzstein, 1998)

PRODUTO/PROCEDIMENTO	TEMPO MÍNIMO *
- 2 períodos em etanol PA 100%	4 horas por período
- 2 períodos em propanol PA 100%	4 horas por período
- 2 períodos em butanol PA 100%	4 horas por período
- 1 período em solução contendo 1/3 de historesina e 2/3 de butanol PA 100%	4 horas por período
- 1 período em solução contendo 1/2 de historesina e 1/2 de butanol PA 100%	4 horas por período
- 1 período em solução contendo 2/3 de historesina e 1/3 de butanol PA 100%	4 horas por período
- 1 período em solução contendo historesina pura	Deixar uma semana no mínimo **

* Deixar os recipientes resfriados a cerca de 4°C em geladeira e substituir a solução a cada período.

** Verificar constantemente a fluidez da resina evitando a polimerização da mesma, e em casos de má infiltração, aumentar o tempo proposto.

Após a fase de infiltração, as amostras em diferentes estágios foram submetidas à polimerização em resina à temperatura ambiente, por 48 horas. Cortes seriados longitudinais, em secções de 5 µm, foram obtidos com o uso de micrótomo rotativo (Leica, RM2155), e colocados em lâminas histológicas sobre placa aquecedora a 50°C para secagem. Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,05% p/v em H₂O destilada, pH 9,0 (1% p/v) (Feder & O'Brien, 1968). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio ZEISS (modelo AXIOVERT 35) e fotografados.

3.2.3. Medições do gineceu das flores de *S. macrophylla*

Medições do gineceu das flores foram realizadas em lupa graduada com equipamento de medição acoplado da marca HEERBRUGG SWITZERLAND modelo WILD MM S235 e ocular modelo WILD TYP 325400.

3.2.4. Infiltração e emblocagem em parafina visando hibridização *in situ*

Inflorescências contendo meristemas em estágios iniciais de desenvolvimento foram separadas do material fixado, desidratado e armazenado em etanol 100%, realizando-se em seguida a substituição progressiva do etanol por xilol (Cuco & Bandel, 1998). Esta substituição foi realizada conforme a mistura apresentada na Tabela 02:

Tabela 02 - Proporções utilizadas para substituição de etanol por xilol, visando a emblocagem em parafina de inflorescências com meristemas florais em estágios iniciais de desenvolvimento.

Solventes		Tempo	Armazenamento
Etanol	Xilol	horas	
3	1	2	Freezer
1	1	2	Freezer
1	3	2	Freezer
0	1	2	Freezer

Em seguida iniciou-se a inclusão da parafina ralada conforme protocolo de Jackson (1991), com modificações.

As amostras em xilol foram colocadas em estufa, a 60°C, em frascos de vidro autoclavados e em seguida foi acrescentada parafina ralada, com a utilização de uma medida dosadora de 5mL, seguindo-se o seguinte procedimento:

1. Inserção de uma medida de parafina ralada em intervalos de 6 horas num recipiente de vidro contendo 30mL de xilol. No período noturno não foi adicionada parafina às amostras.

2. Retirada de 10% da solução e repetição do procedimento do item 1.

Esta seqüência foi repetida durante 5 dias, aumentando-se gradativamente a concentração de parafina na mistura.

Para emblocagem do material foram preparadas caixas-molde de papel tipo sulfite, sendo preenchidas com parafina derretida e quando solidificada foram realizados orifícios na parafina com o uso de uma pinça aquecida, onde foram inseridas as amostras. Após o resfriamento total, os blocos foram cortados com o uso de uma lâmina de bisturi aquecida, para individualização das amostras. Posteriormente, cada amostra foi fixada em porta espécimes de madeira, utilizando-se parafina derretida, e acondicionadas em geladeira. Cortes histológicos com secções de 10µm de espessura foram obtidos e colocados em lâminas previamente tratadas com organosilana (banho em solução de 2% de organosilana em acetona P. A.), mantendo-se as lâminas por um período de 8 horas sobre placa aquecedora a 50°C. O banho em solução de organosilana foi realizado em lâminas previamente limpas em etanol 100%, colocando-

as em porta lâminas de vidro e mergulhando-as na solução por cinco minutos. Em seguida, duas lavagens rápidas foram realizadas em acetona para retirada do excesso de organosilana, deixando as lâminas secarem ao ar sobre um papel filtro e guardando-as em suas embalagens originais.

3.2.5. Análise dos padrões de expressão dos genes do modelo ABC

O padrão de expressão dos genes de Meliaceae homólogos aos genes de identidade dos órgãos florais de *Arabidopsis thaliana* foi analisado por hibridização *in situ* em cortes histológicos. Para isto, clones parciais de DNA complementar dos genes *APETALA 1* (*AP1* - Fator A) e *AGAMOUS* (*AG* - Fator C) de *Arabidopsis* foram fornecidos pelo Dr. Martin Yanofsky (Universidade da Califórnia, La Jolla, USA), e o clone do gene *APETALA 3* (*AP3* - Fator B) foi fornecido pelo Dr. Thomas Jack (Gilman Laboratory, Dartmouth College, Hanover, USA) tendo sido utilizados como sondas heterólogas.

3.2.5.1. Manutenção e extração dos plasmídeos contendo as sondas utilizadas

Escherichia coli (linhagem DH5 alpha) contendo os plasmídeos KY89 (com a sonda do gene *AP1*); pD1136 (com a sonda do gene *AP3*) e pCIT565 (com a sonda do gene *AG*), foram cultivadas em meio de cultura LB sólido (10g.L⁻¹ tripton; 5g.L⁻¹ extrato de levedura; 10g.L⁻¹ NaCl e 15g.L⁻¹ ágar), juntamente com 50mg.L⁻¹ de ampicilina e mantidas por no máximo 28 dias a 4°C (Sambrook *et al.* 1989).

Para a obtenção do DNA plasmidial contendo a sonda a ser marcada, as bactérias foram cultivadas em meio LB líquido com ampicilina, a 37°C, sob agitação, durante a noite. A extração dos plasmídeos foi feita pelo método tradicional de lise alcalina (Sambrook *et al.* 1989).

3.2.5.2. Linearização do plasmídeo

A linearização dos plasmídeos foi realizada por meio de digestão pelas enzimas de restrição: *XhoI* (pKY89 - AP1); *BglII* (pD1136 - AP3); *HindIII* (pCIT565 - AG). Foram digeridos 2µg de DNA plasmidial em 10U.µL⁻¹ (4000 U) da enzima de restrição para cada tipo de construção plasmidial, acrescida de 2µL do tampão da enzima, em volume total de 20µL, a 37°C por 1 hora (Sambrook *et al.* 1989). Posteriormente, o DNA digerido foi precipitado em etanol absoluto e ressuspendido em 100µL de água DEPC e analisado quanto à qualidade e concentração em gel de agarose 0,7% em TBE (0,5X).

3.2.5.3. Marcação das sondas antisense

A marcação da sonda foi realizada por transcrição *in vitro*, utilizando-se o kit de marcação de sonda com digoxigenina (DIG), (Boehringer-Mannheim/Roche, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante do kit. Uma reação de marcação de sonda tradicionalmente consiste em 2µg do DNA plasmidial, 2µL das enzimas RNA polimerase e SP6 para AP1 (pKY89) e AP3 (pD1136); e T7 para AG (pCIT565), 4µL do tampão da enzima (5X concentrado), 1µL de inibidor de RNase e 2µL do mix de

nucleotídeos (dNTPs contendo dUTP-DIG). A reação ocorreu a 37°C por 2 horas. Posteriormente, precipitou-se o RNA marcado com etanol absoluto a -20°C. A sonda foi re-suspendida em água DEPC a 0,1 µg.µL⁻¹ e armazenada a -20°C até o momento de sua utilização.

3.2.6. Hibridização *in situ* em cortes histológicos

Para a hibridização seguiu-se o protocolo descrito por Dornelas *et al.* (1999) em condições de baixa estringência. O protocolo de hibridização seguiu o seguinte cronograma:

Pré - hibridização: Lâminas contendo os cortes histológicos foram colocadas em cubas de vidro e tratadas inicialmente com xilol para a retirada da parafina dos cortes conforme apresentado na Tabela 03. Posteriormente, foi realizada a substituição do xilol para etanol antes da secagem das lâminas à temperatura ambiente.

Tabela 03 - Misturas utilizadas para substituição de xilol para etanol em cortes histológicos.

Solventes		Tempo
Etanol	Xilol	Minutos
1	3	5
1	1	5
3	1	5
1	0	5

Após a secagem ao ar, os tratamentos seguintes foram realizados em câmara úmida. O material foi tratado com proteinase K ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$ em Tris-HCl 0,05M, pH 7,5) por 20 minutos, a 37°C , utilizando-se $200\mu\text{L}$ por lâmina. As lâminas foram cobertas com tiras de parafilme. Foram realizadas 2 lavagens com 0,05M Tris-HCl, pH7,5, à temperatura ambiente em cubas de vidro.

Hibridização: Adicionou-se às lâminas o mix de hibridização (1M Tris-HCl, pH7,5; 1M NaCl; formamida a 50%; 0,5M EDTA, pH 8,0; Denharts 1X e dextransulfato a 50%), num volume de $200\mu\text{L}$ por lâmina, contendo 600ng.mL^{-1} de sonda marcada. As lâminas foram novamente cobertas com parafilme. A hibridização foi conduzida em estufa, por 16h, a 37°C , no escuro, em câmara úmida.

Lavagem: Foram realizadas quatro lavagens de 20 minutos cada, a 37°C , no escuro. As duas primeiras com solução 4X SSC ($0,6\text{M NaCl}$; $0,06\text{M C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e duas outras com solução 2X SSC ($0,3\text{M NaCl}$; $0,03\text{M C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Posteriormente, o material foi lavado 2 vezes por 10 minutos em DB1 ($0,1\text{M Tris-HCl}$; $0,5\text{M NaCl}$), pH7,5, a 37°C , no escuro.

Bloqueamento: Após a lavagem em DB1, os cortes hibridizados foram tratados com uma solução bloqueadora (2% do reagente bloqueador Boheringer-Mannheim/Roche em solução DB1) por 1 hora, a 37°C , no escuro.

Detecção: Após este período, as lâminas foram lavadas com DB1. Adicionou-se 200 μ L da solução de detecção da sonda com anticorpo anti-DIG, conjugado à fosfatase alcalina, na concentração de 1:1000 em solução bloqueadora por 2 horas, a 37°C, no escuro e cobrindo as lâminas com parafilme.

Reação da Fosfatase Alcalina: As amostras hibridizadas e tratadas com o anticorpo foram lavadas com solução DB3 (0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,05M MgCl₂.6H₂O), pH9,5. Para a visualização do sinal de hibridização, utilizou-se solução comercial de NBT/BCIP (PIERCE, USA) como substrato para a fosfatase alcalina, por 2 horas, a 37°C, no escuro. Fez-se a visualização periódica dos cortes em microscópio estereoscópico e, quando necessário, utilizou-se uma lavagem rápida em solução DB4 (0,01M Tris-HCl; 1mM EDTA, pH8,0) para inibir a continuidade da reação. Para todas as espécies de Meliaceae estudadas, o período de reação ideal foi de cerca de 16 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características gerais do florescimento em espécies de Meliaceae

Todas as espécies deste estudo floresceram no período entre o início de agosto e final de novembro, logo após a rebrota primaveril, inclusive as espécies exóticas *Toona ciliata* e *Melia azedarach*. Espécies como a *Trichilia clausenii* já apresentavam botões bem formados em agosto, sendo uma das primeiras a florescer. O período de florescimento ocorreu regularmente nesses meses entre os anos de 2001 a 2004, nos quais foram realizadas as coletas.

Apresentaremos inicialmente os resultados descrevendo as características da arquitetura das inflorescências das espécies estudadas. Posteriormente, apresentaremos a caracterização das estruturas formadas em cada verticilo floral, baseando-se nos resultados obtidos com a utilização das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica de luz visando a caracterização morfo-anatômica, e na última parte a apresentação dos resultados da expressão gênica, através de hibridização *in situ*.

As espécies estudadas nesta tese diferem quanto à forma e dimensões da copa, sendo que *C. fissilis* (Figura 1), *C. odorata* (Figura 2), *T. ciliata* (Figura 3) e *S. macrophylla* (Figura 4) são árvores de grande porte, ocupando o dossel da floresta. As espécies *G. guidonea* (Figura 5) e *M. azedarach* (Figura 6) apresentam porte intermediário, com copa mais aberta, e *T. clausenii* (Figura 7) o menor porte de todas, sendo que os indivíduos desta espécie pertencem ao sub-bosque da floresta e permanecem sombreados pelos indivíduos maiores do dossel da floresta.

4.2. Caracterização da arquitetura das inflorescências.

As inflorescências de todas as espécies estudadas são formadas pela conversão dos meristemas vegetativos apicais dos ramos, ou axilares na porção terminal dos ramos, em meristema da inflorescência. O meristema da inflorescência principal produz meristemas secundários, dando origem a ramificações no eixo principal da inflorescência. Esses meristemas secundários diferenciam-se em meristemas florais, assim como o meristema terminal, que também se diferencia numa flor terminal.

As espécies estudadas podem ser separadas em dois grupos distintos: aquelas que apresentam inflorescências terminais com a formação de uma única inflorescência no final de cada ramo vegetativo, representadas pelas espécies *Cedrela fissilis* (Figura 1), *Cedrela odorata* (Figura 2) e *Toona ciliata* (Figura 3); e aquelas que apresentam inflorescências axilares na parte final dos ramos vegetativos, representadas pelas espécies *Swietenia macrophylla* (Figura 4), *Guarea guidonea* (Figura 5), *Melia azedarach* (Figura 6) e *Trichilia clausenii* (Figura 7). Os meristemas das

inflorescências, em todas estas espécies, são originados a partir de meristemas vegetativos nos ramos jovens formados após a rebrota primaveril.

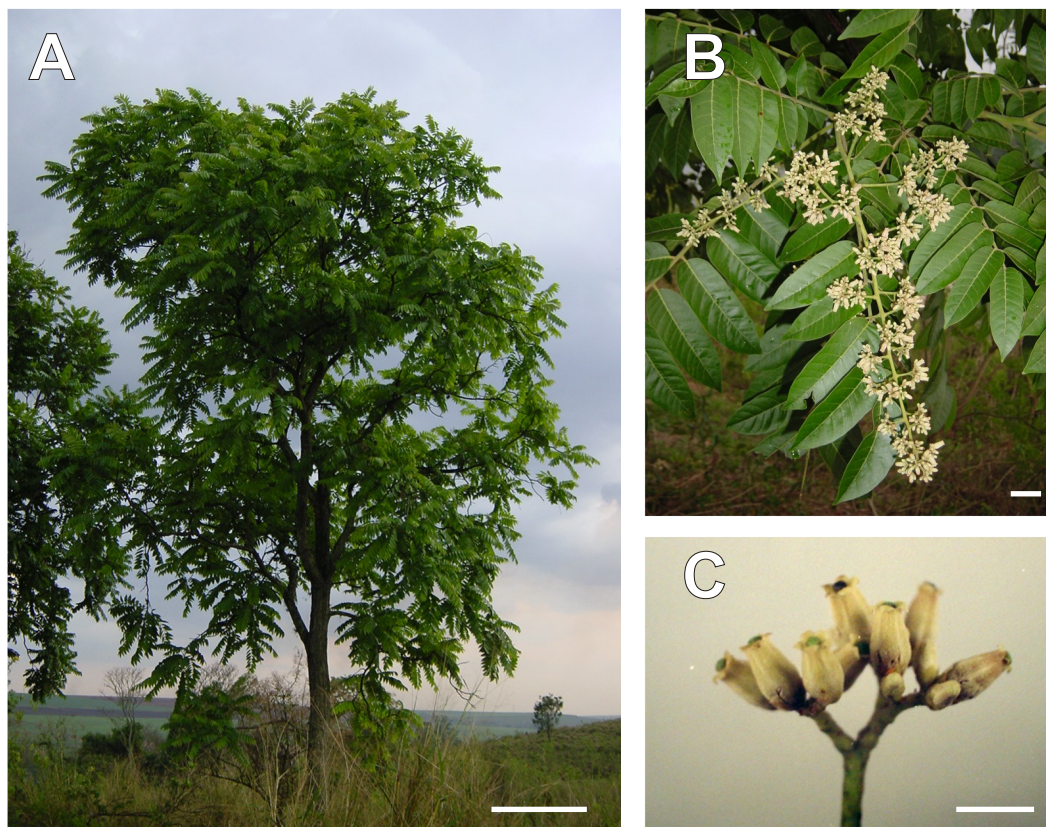


Figura 1: *Cedrela fissilis*. **A:** Indivíduo adulto no parque da ESALQ/USP. **B:** Vista geral da inflorescência. **C:** Flores em diferentes estágios de desenvolvimento. Barras: **A:** 1m; **B:** 5cm; **C:** 1cm.

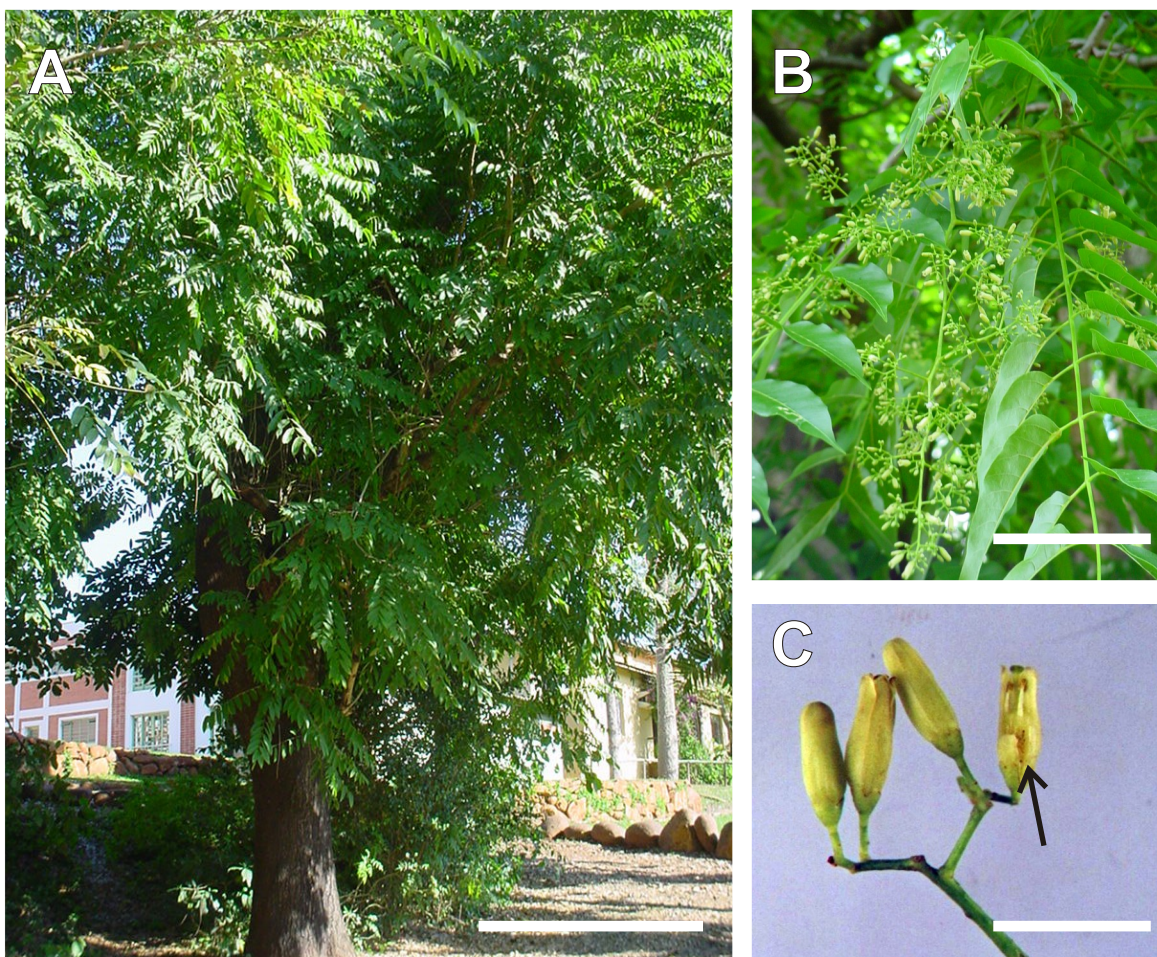


Figura 2: *Cedrela odorata*. **A:** Vista parcial do indivíduo adulto no parque da ESALQ/USP. **B:** Vista de uma inflorescência na planta. **C:** Flores em diferentes estágios de desenvolvimento no material coletado. Uma das flores na antese foi parcialmente dissecada para revelar os órgãos florais internos (seta). Barras: **A:** 0,5m; **B:** 10cm; **C:** 1cm.



Figura 3: *Toona ciliata*. **A:** Vista parcial do indivíduo adulto. **B:** Detalhe de um ramo, mostrando a típica inflorescência terminal. **C:** Parte terminal de uma inflorescência com flores em diferentes estágios de desenvolvimento. O inserto contém parte de um eixo secundário da inflorescência onde uma flor na antese foi parcialmente dissecada para mostrar o nectário (seta). Barras: **A:** 0,5m; **B:** 10cm; **C:** 1cm.

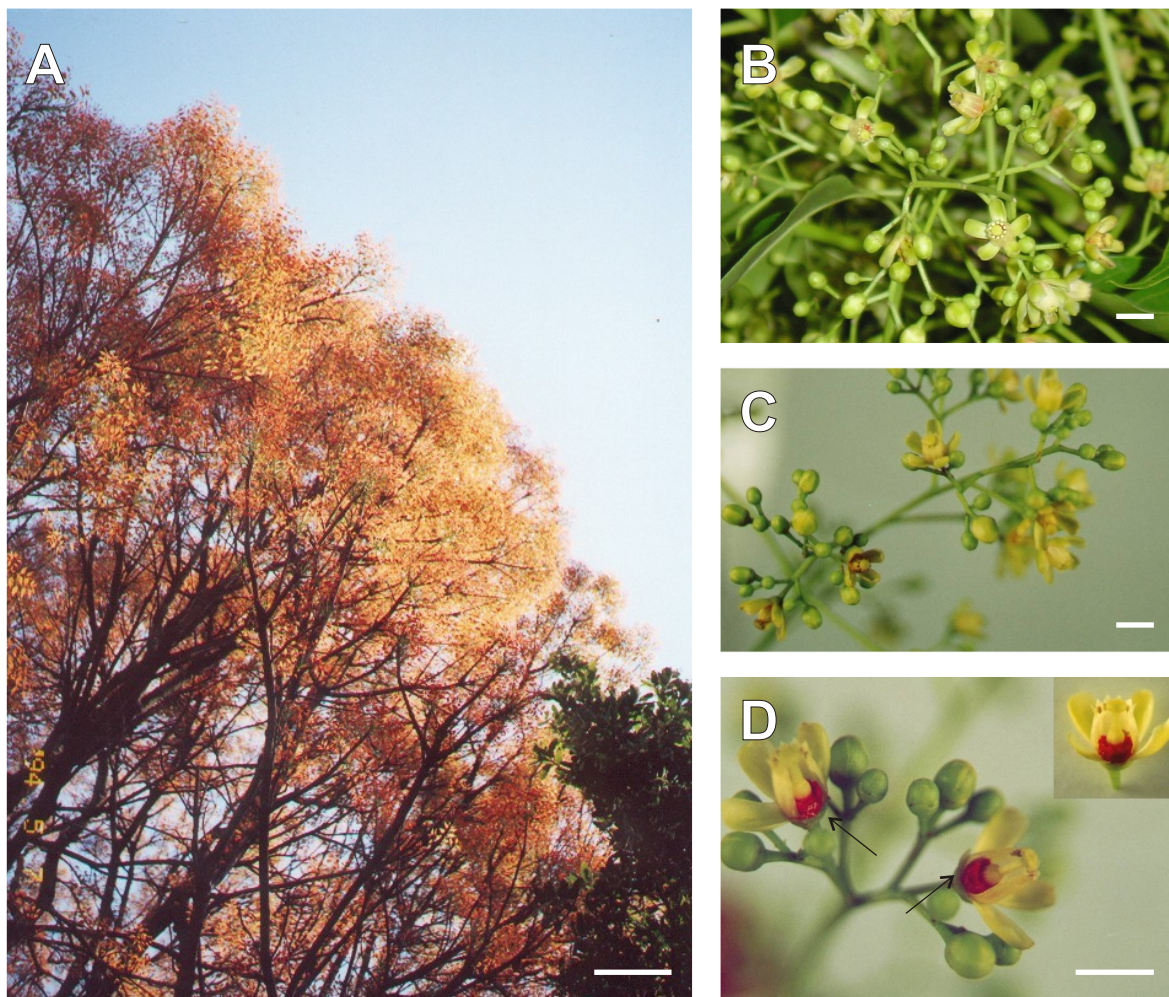


Figura 4: *Swietenia macrophylla*. **A:** Vista parcial do indivíduo adulto durante a rebrota primaveril, no parque da ESALQ/USP. **B:** Vista parcial da inflorescência na planta. **C:** Flores e botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento no material coletado. **D:** Flores e botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento. As flores na antese tiveram parte das suas pétalas e das anteras dissecadas para revelar o nectário (setas). No inserto uma flor parcialmente dissecada em vista lateral. Barras: **A:** 50cm; **B-D:** 1cm.



Figura 5: *Guarea guidonea*. **A:** Indivíduo adulto no parque da ESALQ/USP. **B:** Vista lateral de um ramo mostrando o início do desenvolvimento de inflorescências a partir de gemas axilares. **C:** Inflorescência com flores em diferentes estágios de desenvolvimento. A flor em vista lateral apresentada no inserto está na antese, e teve parte das suas pétalas e das anteras dissecadas para revelar o nectário (seta). Barras: **A:** 1m; **B:** 5cm; **C:** 2cm; inserto: 0,5cm.

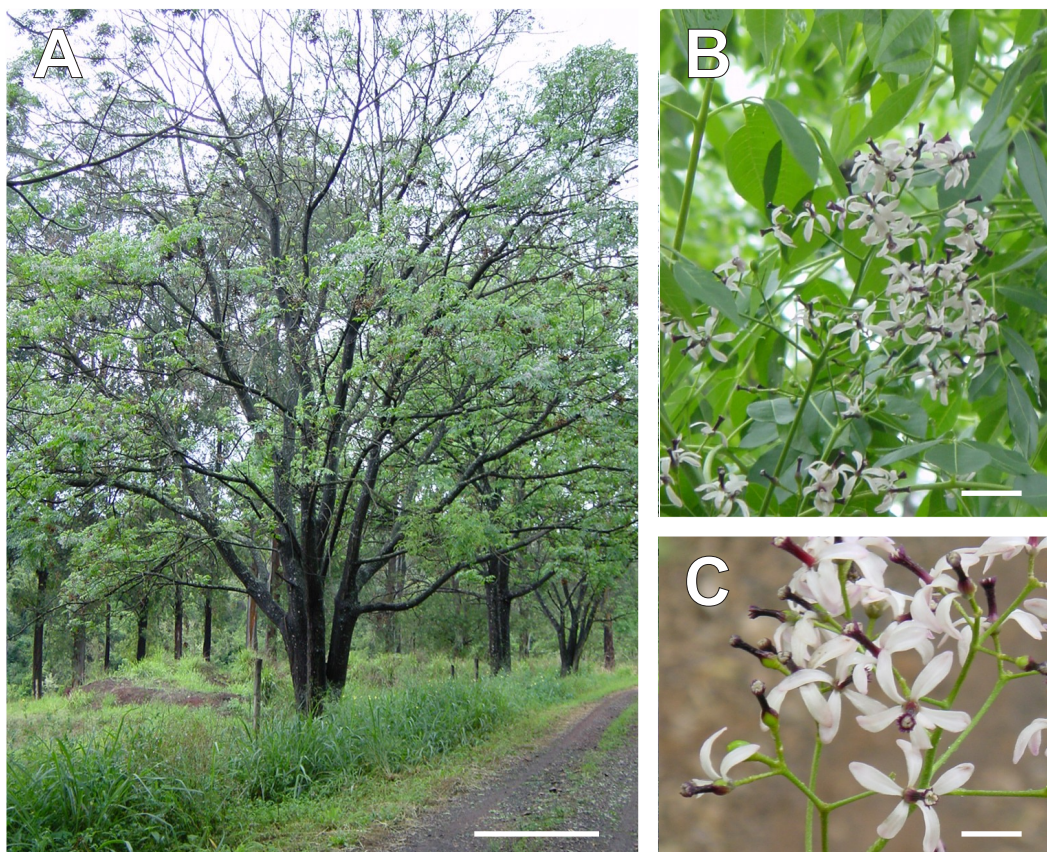


Figura 6: *Melia azedarach*. **A:** Indivíduo adulto no parque da ESALQ/USP. **B:** Vista parcial da inflorescência na planta. **C:** Flores em diferentes estágios de desenvolvimento. Barras: **A:** 1m; **B:** 5cm; **C:** 2cm.

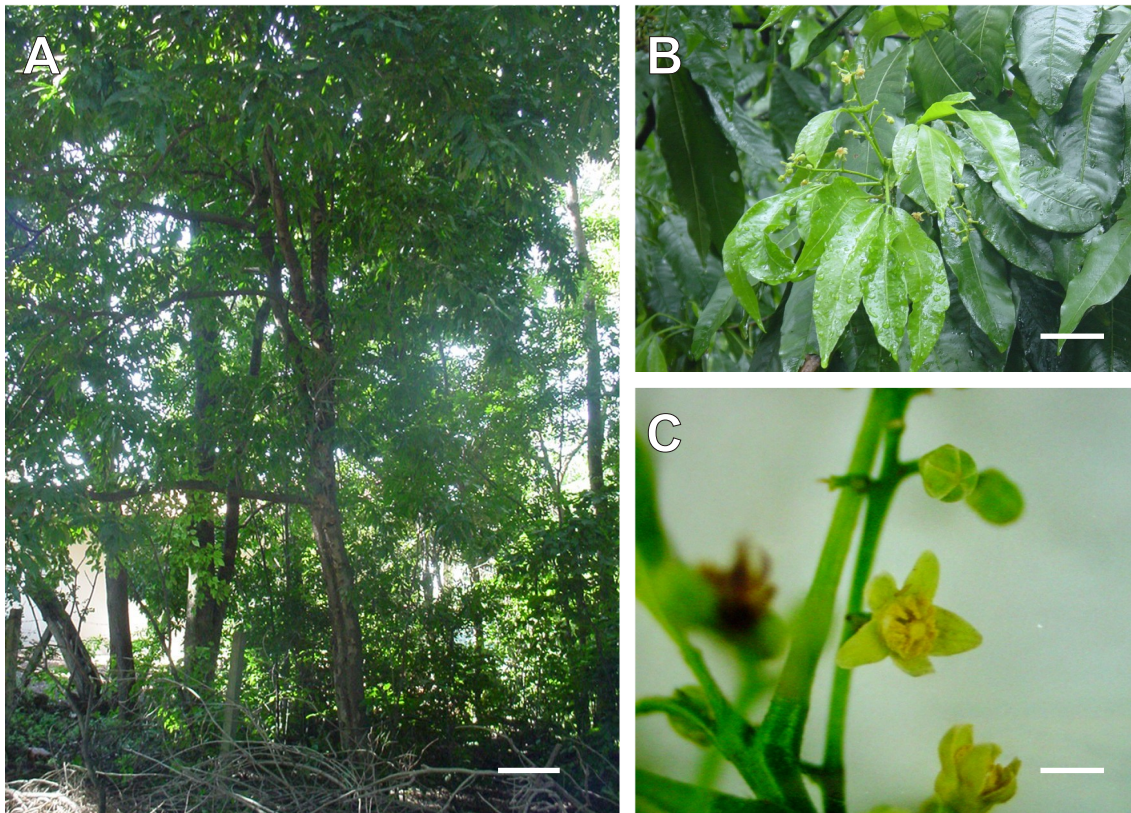


Figura 7: *Trichilia clausenii*. **A:** Vista parcial do indivíduo adulto no parque da ESALQ/USP. **B:** Detalhe de um ramo, mostrando três inflorescências axilares. **C:** Parte de uma inflorescência contendo flores em diferentes estágios de desenvolvimento. Uma flor na antese é mostrada em vista frontal. Barras: **A:** 25cm; **B:** 5cm; **C:** 0,5cm.

O tamanho e a forma das inflorescências variam entre as espécies estudadas, principalmente naquelas que formam muitas inflorescências axilares por ramo, como *S. macrophylla* e *M. azedarach*. Todas as inflorescências estudadas são cimosas, do tipo cima bípara ou dicásio, estando de acordo com as possíveis arquiteturas de inflorescências encontradas na família Meliaceae (Pennington & Styles, 1975, Judd *et. al.* 1999). Este tipo de inflorescência, cima bípara ou dicásio, é caracterizada por possuir inflorescências formadas por um eixo principal que se ramifica sucessivamente formando eixos secundários de várias ordens, conhecidos como tirsos, e estes apresentam crescimento determinado, com a formação de uma flor terminal, contendo duas outras laterais em sentidos opostos (Figuras 1 a 7).

As primeiras flores a entrarem em antese foram as flores terminais no final de cada tirso, seguido pelas flores adjacentes a estas (Figuras 1C a 7C). Pôde-se observar a existência de cicatrizes de flores abortadas nos ramos das inflorescências, antes de atingirem a antese. Esta característica foi observada tanto em espécies com inflorescências terminais como *C. odorata* (Figura 2), como em espécies de inflorescências axilares, como *M. azedarach* (Figura 6) e *T. clausenii* (Figura 7). Entre as espécies estudadas, as inflorescências de menor tamanho e número de flores foram verificadas em *T. clausenii*. Em todas as espécies estudadas o número de flores por inflorescência apresentou grande variação, juntamente com o tamanho das inflorescências em um mesmo indivíduo. Os tirsos formados em cada inflorescência apresentam várias ordens em todas as espécies estudadas, exceto para *Guarea guidonea* (Figura 5C) que apresenta tirsos curtos de primeira ordem, sendo extremamente curtos no terço final da inflorescência, com flores inseridas diretamente

no eixo principal e na região do ápice da inflorescência, mas mantendo as características de dicásio (Figura 5C).

4.3. Caracterização do desenvolvimento dos verticilos florais por MEV e MO.

O estudo morfo-anatômico por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica foi realizado visando caracterizar o início da formação dos primórdios dos órgãos florais em cada verticilo da flor, comparando-os com o padrão de desenvolvimento anteriormente caracterizado em *Arabidopsis thaliana* por Smyth *et al.* (1990). Esta caracterização foi necessária para compreender o processo de formação dos primórdios dos órgãos florais de forma espacial e temporal, e desta forma, relacionar esses estágios do desenvolvimento floral com os padrões de expressão dos genes do modelo ABC, responsáveis pelo controle da formação dos órgãos em cada verticilo da flor. Não existem estudos quanto à determinação de estágios do desenvolvimento floral em Meliaceae, desta forma, os critérios utilizados para *Arabidopsis thaliana*, foram adaptados para as espécies em estudo.

4.3.1. Desenvolvimento das sépalas

Em todas as espécies estudadas, os meristemas florais são protegidos por uma bráctea e as estruturas florais desenvolvem-se, a partir dos meristemas, de forma centrípeta, ocorrendo diferenciação dos primórdios das sépalas no primeiro verticilo da flor (Figuras 8A – H e 9A e F). Este estágio foi denominado como estágio 1, equivalente ao estágio 3 de *A. thaliana*, descrito por Smyth *et al.* (1990). Para todas as espécies,

verificou-se o desenvolvimento de 5 primórdios de sépalas. O perianto é heteroclamídeo, ou seja, apesar de apresentar o mesmo número de órgãos (isômeros) em cada verticilo, são diferentes entre si.

Figura 8: Desenvolvimento de sépalas em *Cedrela fissilis* Vell. (**A** e **B**), *Swietenia macrophylla* R. A. King (**C** e **D**), *Guarea guidonea* (L.) Sleumer (**E** e **F**), *Melia azedarach* L. (**G** e **H**). **A, C, E** e **G**: Microscopia eletrônica de varredura. **B, D, F** e **H**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento de sépalas. Pode-se ver o início da formação de pétalas (setas). **B**: Corte longitudinal de um botão floral em desenvolvimento. Pode-se ver o início da formação de sépalas e pétalas (setas). **C**: Meristema floral mostrando a formação das sépalas e pétalas. **D**: Meristema floral mostrando o início dos primórdios de pétalas (setas) e duas brácteas que protegem meristemas florais laterais. **E**: Meristema floral mostrando o início de formação das sépalas. As brácteas foram retiradas para expor o meristema. **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando a formação de sépalas. **G**: Meristema floral mostrando o início de formação das sépalas. **H**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação de sépalas. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **mf**: meristema floral, **se**: sépala. **Barras:** **A, B, C, D**: 50µm; **F**: 60µm; **E**: 40µm; **G, H**: 30µm.

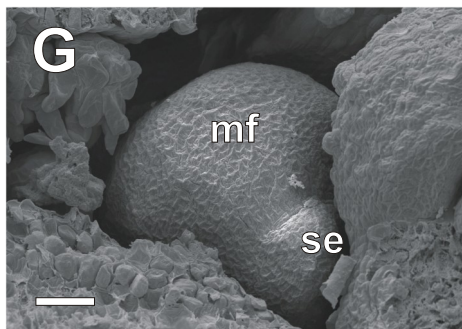
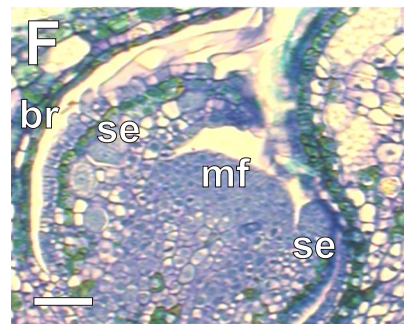
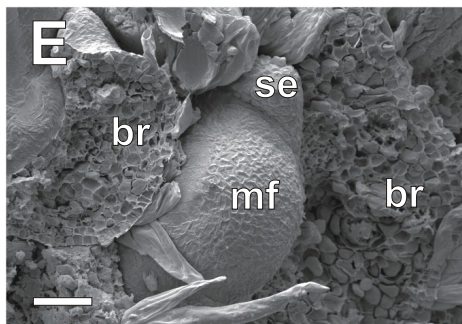
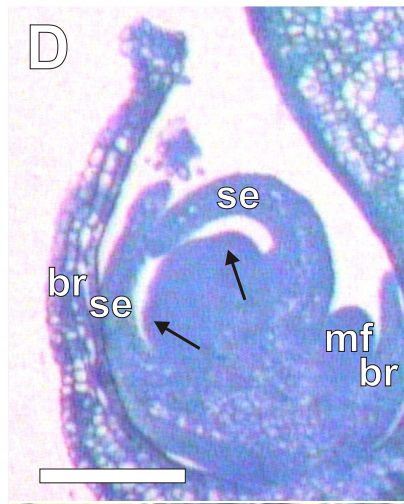
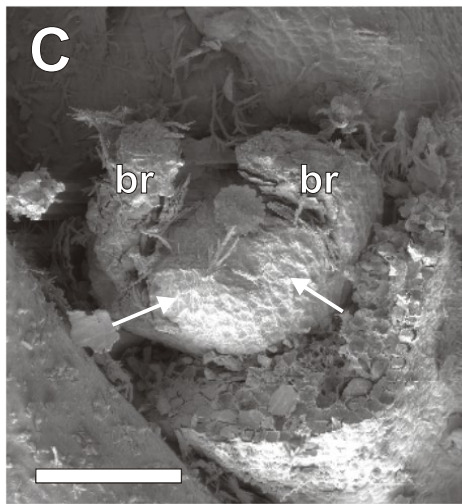
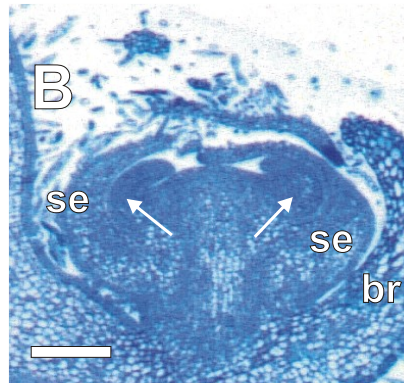
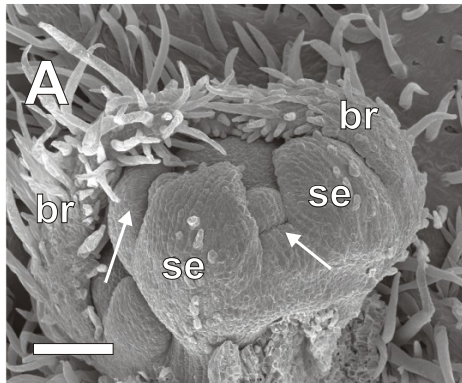
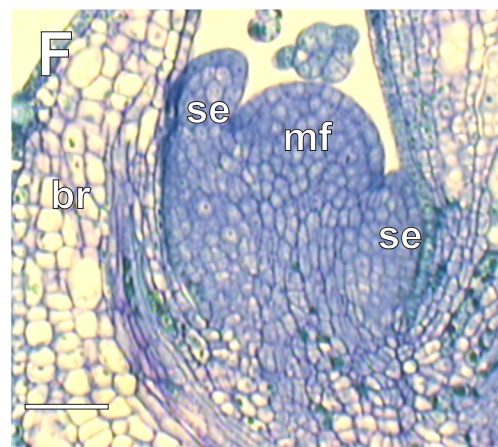
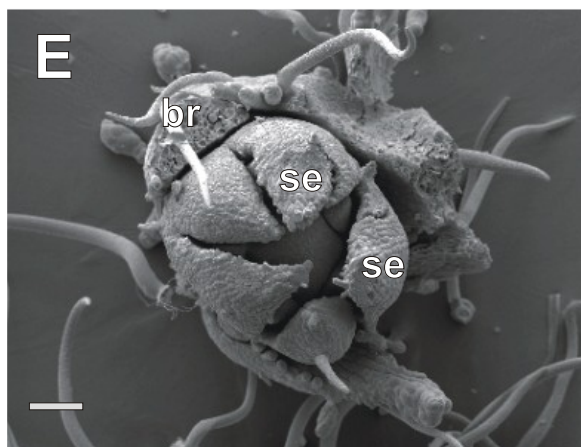
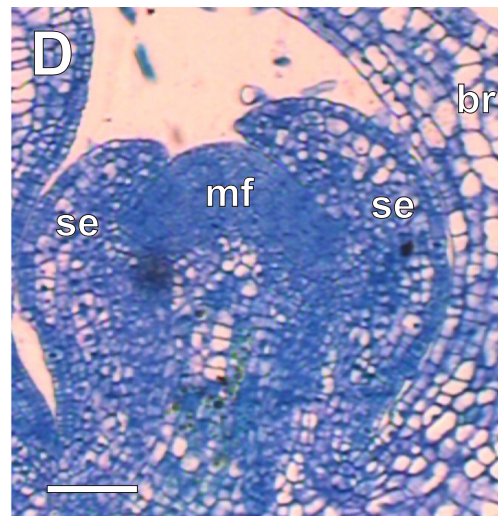
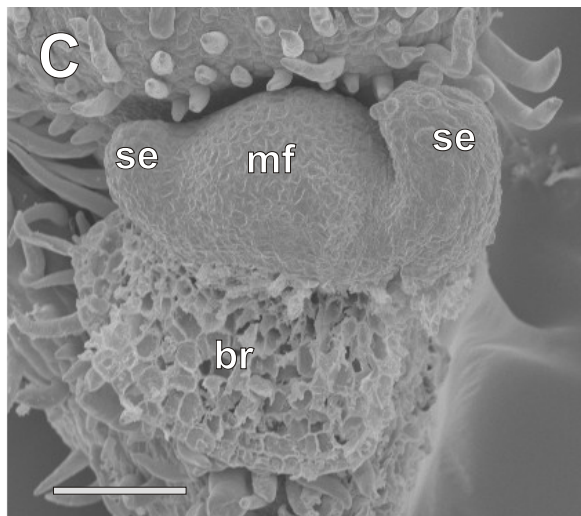
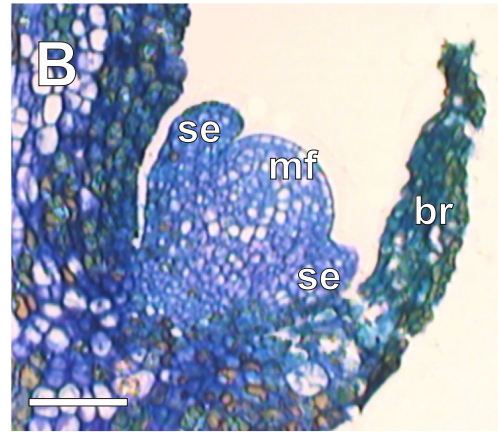
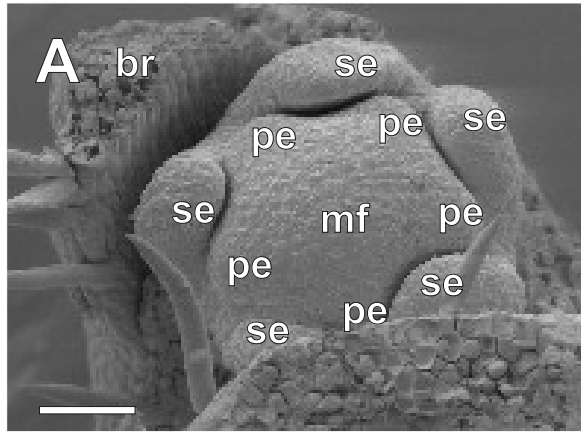


Figura 9: Desenvolvimento de sépalas em *Toona ciliata* M. J. Roem (**A** e **B**), *Cedrela odorata* L. (**C** e **D**) e *Trichilia clausenii* C. DC. (**E** e **F**). **A**, **C** e **E**: Microscopia eletrônica de varredura. **B**, **D** e **F**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando a formação das sépalas e pétalas. **B**: Corte longitudinal de um botão floral em desenvolvimento, apresentando a formação das sépalas. **C**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento das sépalas no meristema floral, tendo-se retirado a bráctea. **D**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início do desenvolvimento das sépalas. **E**: Meristema floral mostrando o desenvolvimento das sépalas. **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação das sépalas abaxial (direita) e adaxial (esquerda) do meristema floral. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **mf**: meristema floral, **se**: sépala. **Barras:** **A**, **B** e **E**: 50µm; **C**: 40µm; **D** e **F**: 30µm.



4.3.2. Desenvolvimento das pétalas

As pétalas se formam constituindo o segundo verticilo do meristema floral. O início do desenvolvimento dos primórdios das pétalas foi denominado de estágio 2, equivalente ao estágio 5 de *A. thaliana*, descrito por Smyth *et al.* (1990). Em todas as espécies estudadas, houve a diferenciação de cinco primórdios de pétalas (Figuras 10 e 11), exceto em *G. guidonea*. Em *G. guidonea*, foi verificada a formação de 4 primórdios de pétalas na grande maioria dos meristemas analisados (Figura 10E). Esta diferença também foi verificada quanto ao número de anteras e carpelos formados nos verticilos subseqüentes, apresentando assim uma variação merística, que não havia sido descrita anteriormente na família Meliaceae (Judd *et al.* 1999). Os primórdios das pétalas desenvolvem-se em posição alternada ao das sépalas.

As pétalas são livres e abrem-se totalmente nas flores em antese, nas espécies: *S. macrophylla* (Figura 10C), *G. guidonea* (Figura 10E), *M. azedarach* (Figura 10G) e *Trichilia clausenii* (Figura 11E), enquanto em *T. ciliata* (Figura 11A) as pétalas são livres, mas não se abrem totalmente. Em *C. fissilis* (Figura 10A) e *C. odorata* (Figura 11C), as pétalas mantêm-se parcialmente soldadas, separando-se apenas no terço final com a exposição do estigma, na antese, concordando com a descrição de Pennington & Styles (1975), Watson & Dallwitz (2000).

Figura 10: Desenvolvimento de pétalas em *Cedrela fissilis* Vell (**A** e **B**), *Swietenia macrophylla* R. A. King (**C** e **D**), *Guarea guidonea* (L.) Sleumer (**E** e **F**), *Melia azedarach* L. (**G** e **H**). **A**, **C**, **E**, e **G**: Microscopia eletrônica de varredura. **B**, **D**, **F** e **H**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento de pétalas (setas), em posição intercalar às sépalas. **B**: Corte longitudinal de um meristema floral em desenvolvimento mostrando o início da formação das pétalas. **C**: Meristema floral mostrando os primórdios de pétalas. **D**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação das pétalas. **E**: Meristema floral mostrando o início da formação das pétalas. Verificam-se apenas quatro primórdios de pétalas. **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando a formação das pétalas. **G**: Meristema floral mostrando o início da formação dos primórdios das pétalas (setas). **H**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação das pétalas. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **mf**: meristema floral, **pe**: pétala, **se**: sépala. **Barras:** **A**, **B**, **C** e **G**: 50µm; **E**: 100µm; **D**: 40µm; **F**: 80µm; **H**: 30µm.

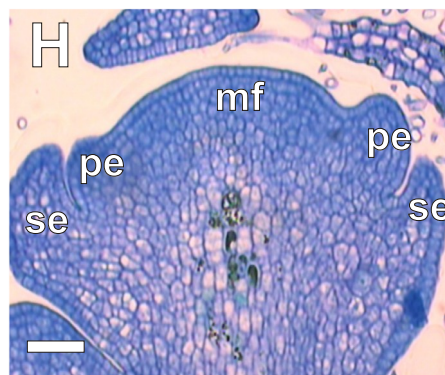
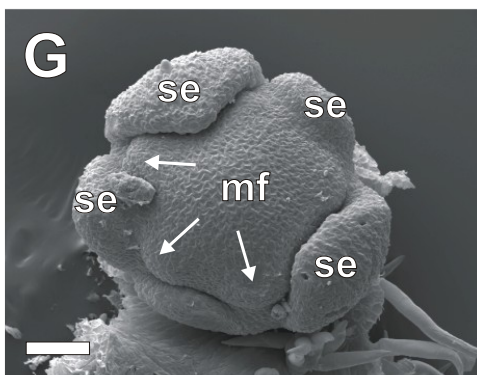
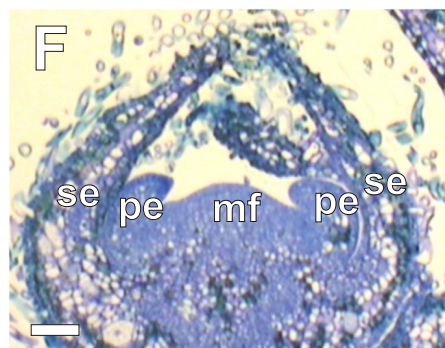
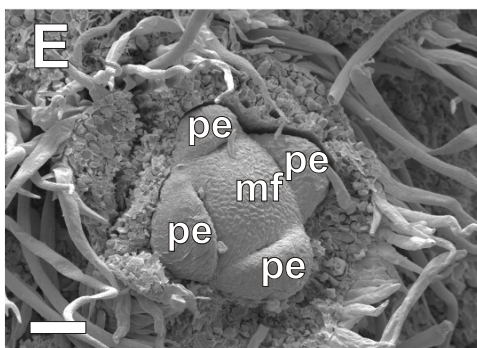
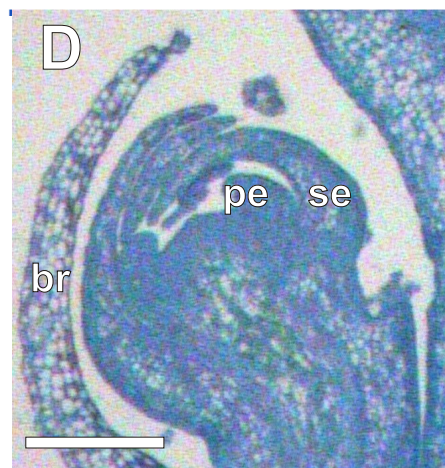
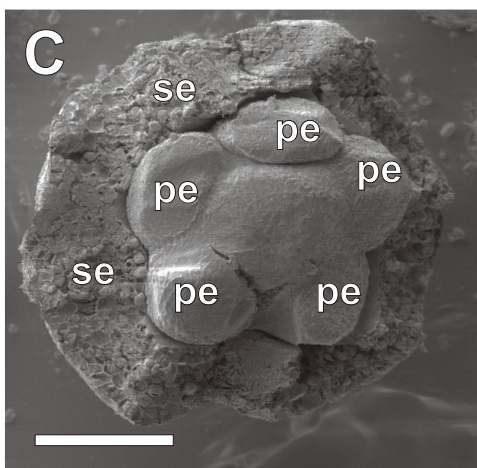
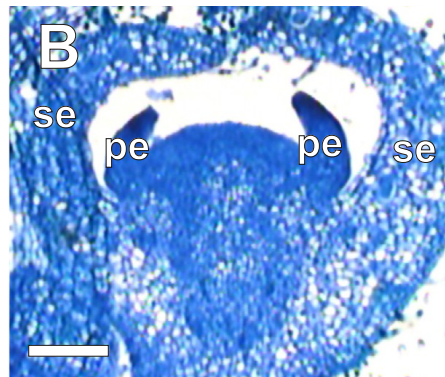
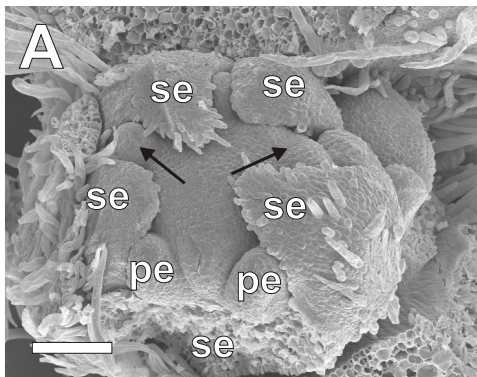
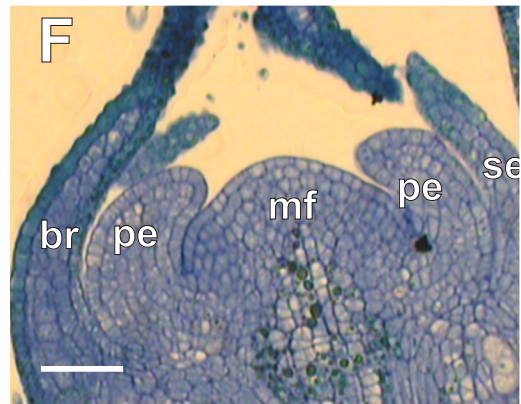
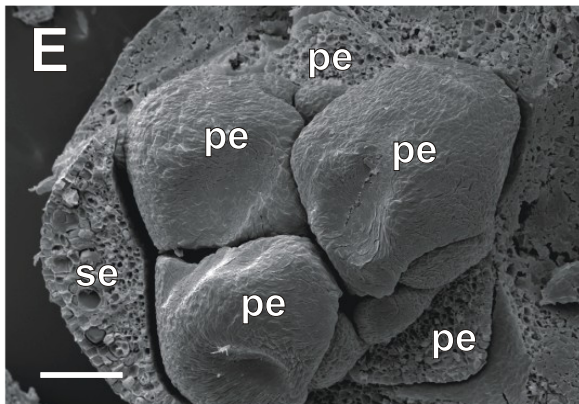
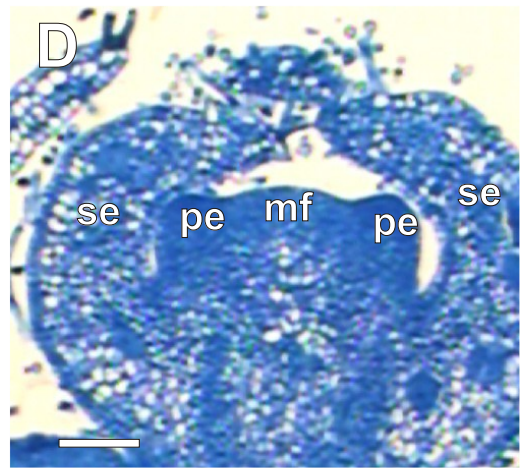
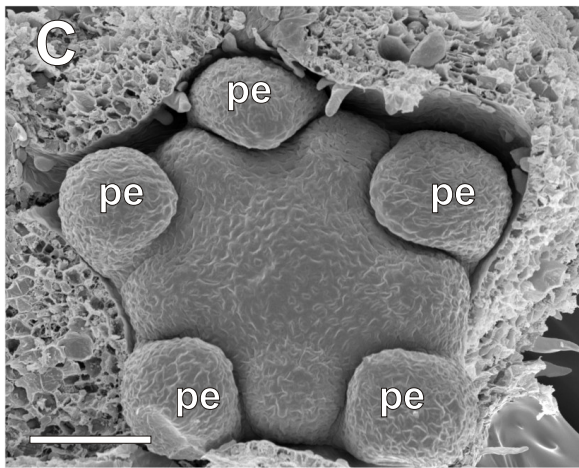
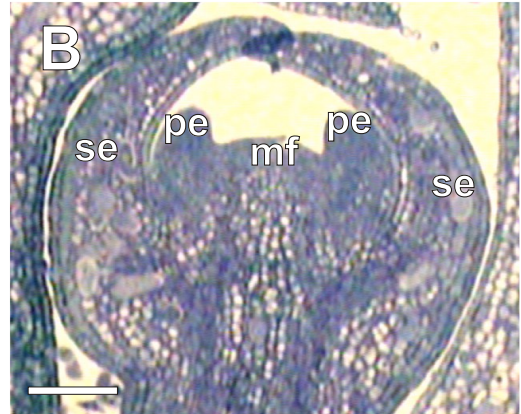
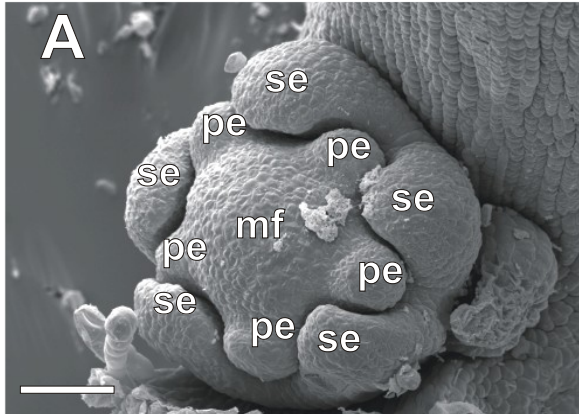


Figura 11: Desenvolvimento de pétalas em *Toona ciliata* M. J. Roem (**A** e **B**), *Cedrela odorata* L. (**C** e **D**), e *Trichilia clausenii* C. DC. (**E** e **F**). **A**, **C** e **E**: Microscopia eletrônica de varredura. **B**, **D** e **F**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando a formação de sépalas e pétalas. **B**: Corte longitudinal de um botão floral em desenvolvimento mostrando a formação de pétalas (setas). **C**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento das pétalas após a retirada das sépalas, podendo-se observar o início dos primórdios de estames (setas). **D**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início do desenvolvimento das pétalas. **E**: Meristema floral mostrando as pétalas. Duas das cinco pétalas foram arrancadas, restando três delas recobrando o meristema floral. **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início das pétalas. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **mf**: meristema floral, **pe**: pétala, **se**: sépala. **Barras:** **A**: 60µm; **B**: 80µm; **C**: 30µm; **D**: 40µm; **E** e **F**: 50µm.



4.3.3. Desenvolvimento dos estames

Para todas as espécies estudadas, observou-se que os primórdios dos estames são formados, constituindo o terceiro verticilo (Figuras 12 e 13). O número final de anteras variou entre 5 a 12 nas espécies estudadas. Em *G. guidonea*, houve variação no número de primórdios de estames e das anteras formadas nos meristemas analisados, apresentando como anteriormente referido, variação merística. Nas demais espécies, este número foi constante. O início da formação dos primórdios de anteras foi denominado de estágio 3, similar ao estágio 7 de *A. thaliana*, descrito por Smyth *et al.* (1990).

Nas espécies *S. macrophylla* (Figura 12C–D e 4D), *G. guidonea* (Figura 12E–F e 5C), *M. azedarach* (Figura 12G–H e 6C) e *Trichilia clausenii* (13E–F e 7C) os filetes são soldados, dando origem a um tubo que circunda o gineceu. Esta estrutura foi denominada de tubo estaminal por Pennington & Styles (1975) e Judd *et al.* (1999). As anteras são introrsas, formadas na porção apical distal do tubo estaminal. Na antese, as anteras liberam o pólen diretamente sobre o estigma, devido ao posicionamento das anteras no mesmo plano do estigma, situando-se frontalmente à lateral do estigma, onde são encontradas as células papilares (Figura 16A). Nas espécies *C. fissilis* (Figura 12A), *T. ciliata* (Figura 13A) e *C. odorata* (Figura 13C) os filetes são livres, concordando com o descrito para estes gêneros (Pennington & Styles, 1975; Judd *et al.* 1999).

Figura 12: Desenvolvimento dos estames em *Cedrela fissilis* Vell. (**A** e **B**), *Swietenia macrophylla* R. A. King (**C** e **D**), *Guarea guidonea* (L.) Sleumer (**E** e **F**), *Melia azedarach* L. (**G** e **H**). **A**, **C**, **E** e **G**: Microscopia eletrônica de varredura. **B**, **D**, **F** e **H**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento dos estames. **B**: Corte longitudinal de um botão floral em desenvolvimento, mostrando o início da formação dos estames (seta branca) e dos carpelos (seta preta). **C**: Meristema floral mostrando o início da formação das anteras e dos carpelos. **D**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação dos estames (seta). **E**: Meristema floral mostrando o início da formação dos primórdios de estames e de primórdios dos carpelos. **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando a formação dos estames. **G**: Meristema floral mostrando o início da formação dos primórdios dos estames. **H**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação das anteras. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **ca**: carpelo, **es**: estame, **mf**: meristema floral, **pe**: pétala, **se**: sépala. **Barras:** **A**: 100µm; **B** e **E**: 120µm; **C**: 130µm; **D**: 80µm; **F**: 150µm; **G**: 40µm e **H**: 30µm.

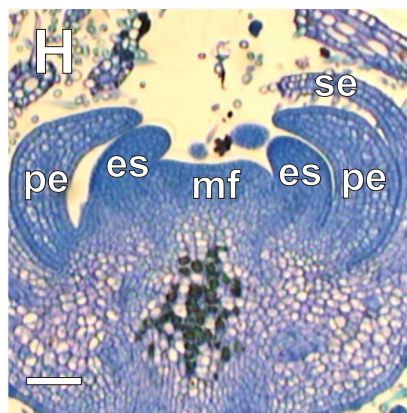
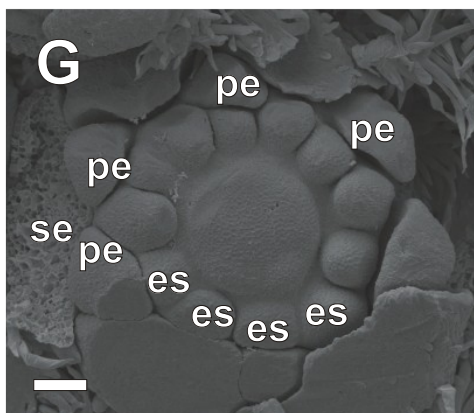
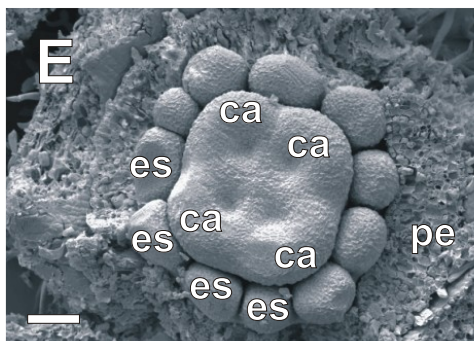
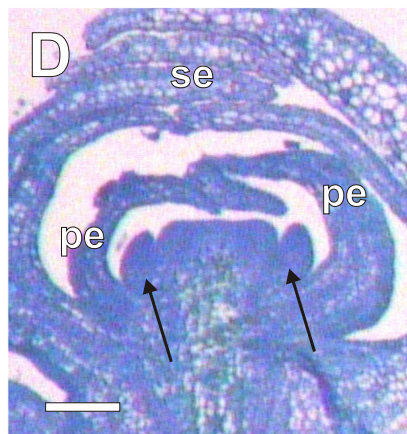
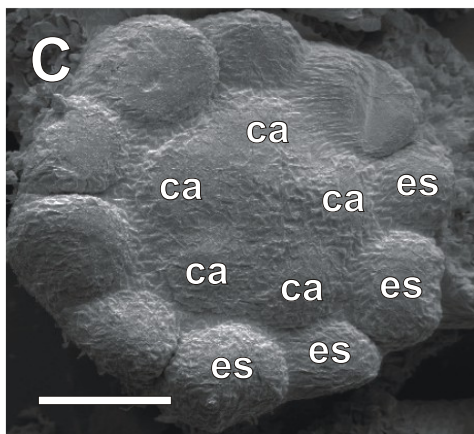
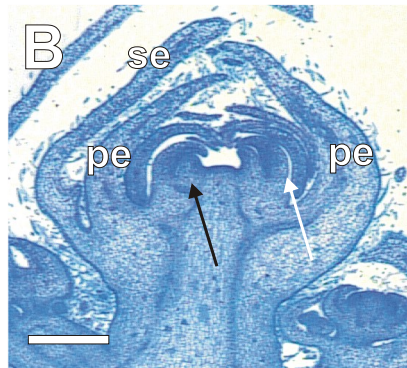
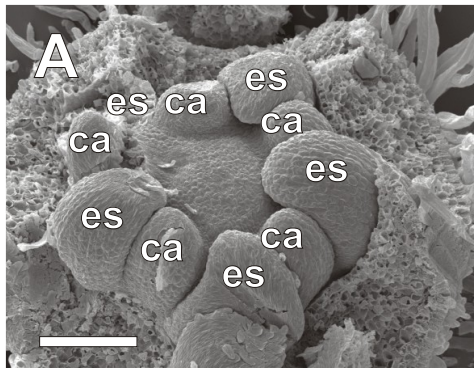
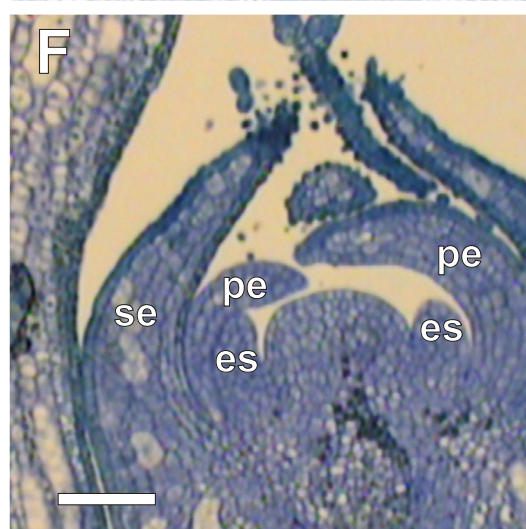
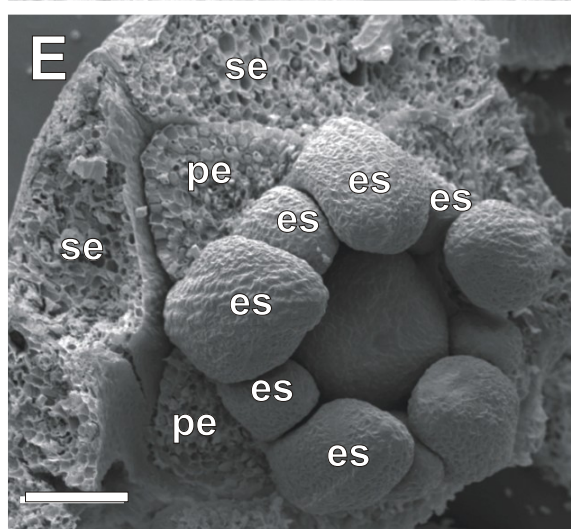
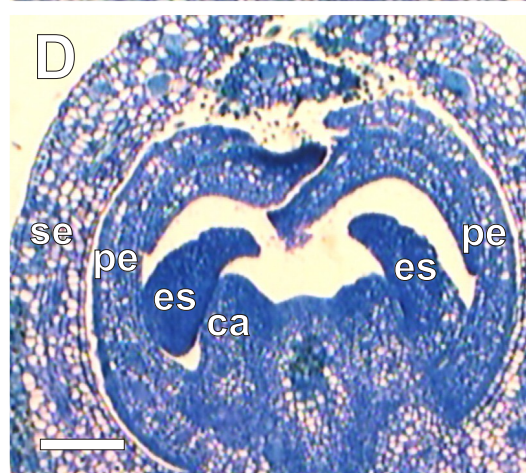
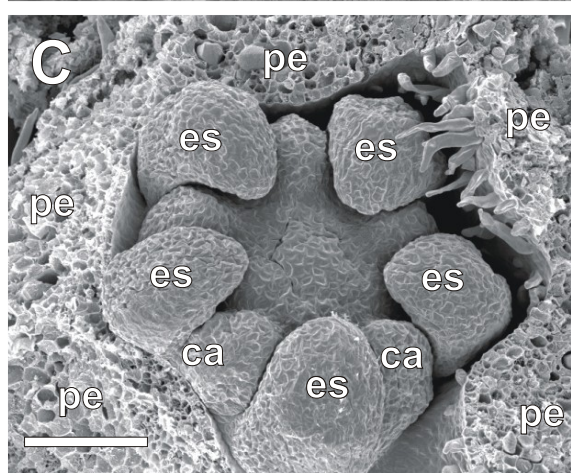
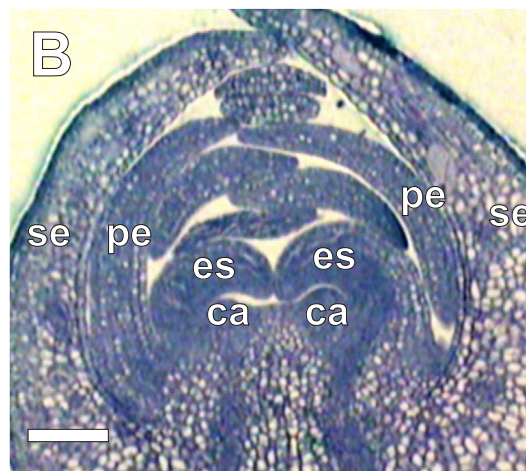
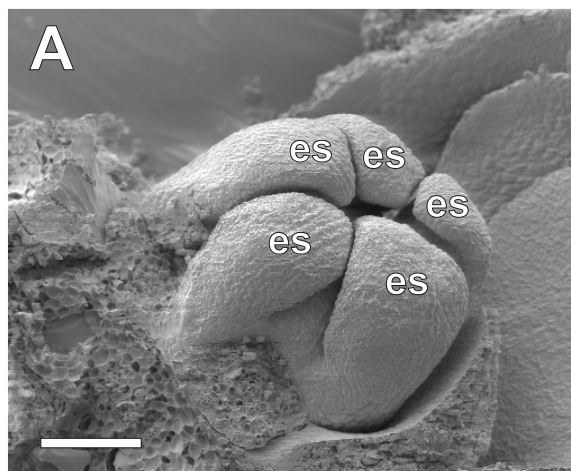


Figura 13: Desenvolvimento dos estames em *Toona ciliata* M. J. Roem (**A** e **B**), *Cedrela odorata* L. (**C** e **D**) e *Trichilia clausenii* C. DC. (**E** e **F**); **A**, **C** e **E**: Microscopia eletrônica de varredura. **B**, **D** e **F**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando a formação dos estames, recobrindo a região dos carpelos. **B**: Corte longitudinal de um botão floral em desenvolvimento mostrando a formação dos estames. **C**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento dos estames e o início da formação dos primórdios dos carpelos. **D**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início das anteras e dos primórdios dos carpelos. **E**: Meristema floral mostrando o desenvolvimento dos estames. As sépalas e pétalas foram retiradas para melhor visualização das estruturas internas. **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação dos estames. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **ca**: carpelo, **es**: estame; **pe**: pétala, **se**: sépala. **Barras:** **A** e **B**: 80µm; **C**: 100µm; **D**, **E** e **F**: 50µm.



4.3.4. Desenvolvimento dos carpelos

O desenvolvimento dos primórdios dos carpelos ocorre, finalmente, constituindo o quarto e último verticilo para todas as espécies estudadas (Figuras 14 e 15). Os primórdios de carpelos são cinco, inicialmente livres, e posteriormente fundem-se, em processo denominado de fusão pós-genital ou fusão ontogenética, formando um único pistilo. Durante o processo de desenvolvimento, os carpelos sofrem invaginações dando origem à região da placenta, onde serão formados os óvulos (Figuras 15C e 15E – seta). São observados cinco carpelos em todas as espécies estudadas, exceto em *T. clausenii*, que apresentou a formação de 3 carpelos. Esta fase do desenvolvimento do meristema floral foi denominada de estágio 4, similar aos estágios 10 e 11 de *A. thaliana*, descrito por Smyth *et al.* (1990).

4.3.5. Flores em antese

As flores em antese mostram diferenças distintas em relação à forma das estruturas florais, principalmente abertura da corola, formação ou não do tubo estaminal e dimorfismo sexual das flores. Algumas dessas características podem ser visualizadas nas Figuras 16A – I, 17A – F e 18A – E. Nas espécies *S. macrophylla*, *G. guidonea*, *M. azedarach* e *T. clausenii* a abertura das pétalas é total, expondo completamente as estruturas reprodutivas, enquanto que em *C. fissilis* (Figura 16A) e *C. odorata* (Figura 17E) a corola forma um tubo com as pétalas soldadas no terço inferior basal, abrindo-se apenas no terço final e distal, expondo o estigma da flor. Em *T. ciliata* a corola também forma um tubo, porém as pétalas não estão soldadas, mantendo-se livres em toda a sua extensão.

Figura 14: Desenvolvimento dos carpelos em *Cedrela fissilis* Vell. (**A** e **B**), *Swietenia macrophylla* R. A. King (**C** e **D**), *Guarea guidonea* (L.) Sleumer (**E** e **F**), *Melia azedarach* L. (**G** e **H**); **A**, **C**, **E** e **G**: Microscopia eletrônica de varredura. **B**, **D**, **F** e **H**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento dos carpelos (estames retirados). **B**: Corte longitudinal de um botão floral em desenvolvimento mostrando o início da formação dos carpelos. **C**: Meristema floral mostrando o início da formação dos carpelos e dos estames. **D**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação dos estames (seta branca) e dos carpelos (seta preta). **E**: Meristema floral mostrando o início da formação dos primórdios dos carpelos e dos estames. **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando a formação dos carpelos. **G**: Meristema floral mostrando o início da formação dos primórdios dos carpelos (seta). **H**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o alongamento dos carpelos. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **ca**: carpelo, **es**: estame, **pe**: pétala, **se**: sépala. **Barras:** **A**, **C** e **F**: 150µm; **B** e **E**: 120µm; **D**: 80µm; **G**: 60µm; **H**: 100µm.

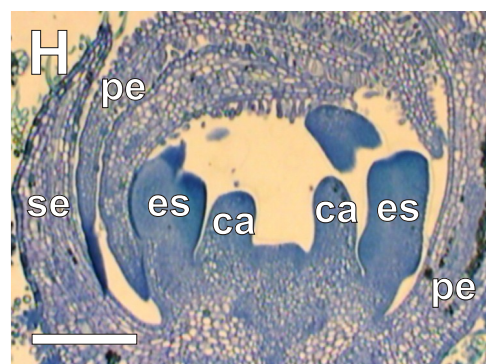
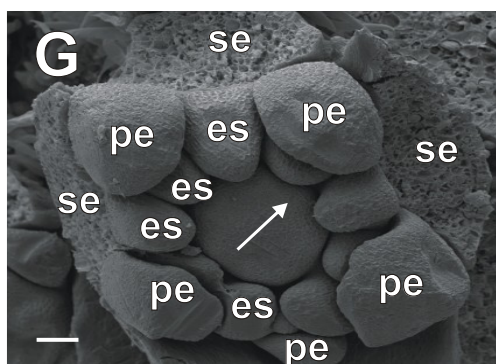
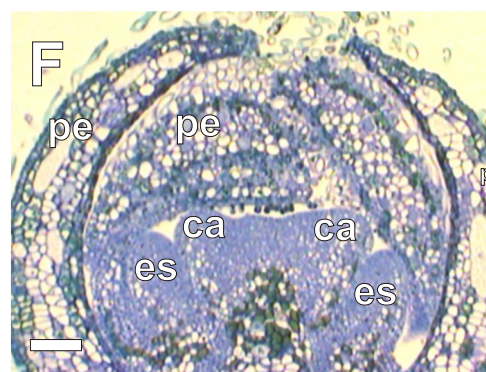
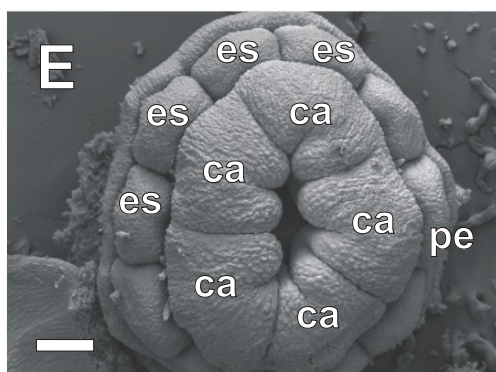
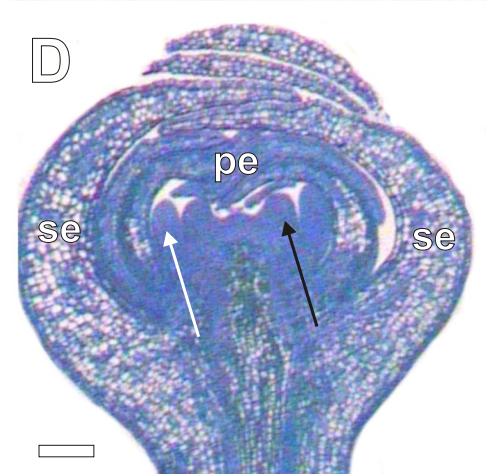
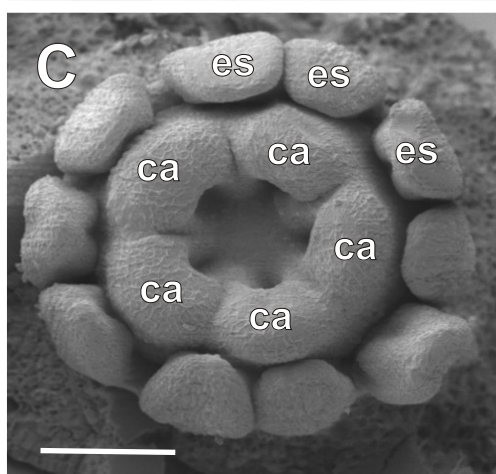
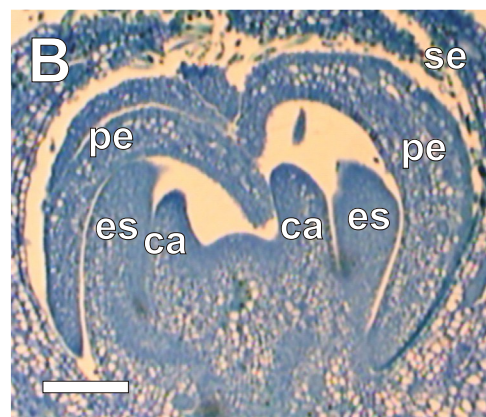
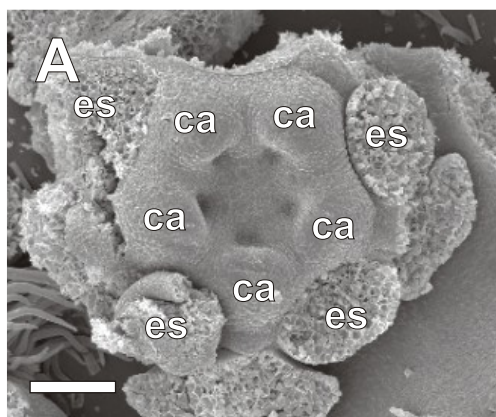


Figura 15: Desenvolvimento dos carpelos em *Toona ciliata* M. J. Roem (**A** e **B**), *Cedrela odorata* L. (**C** e **D**) e *Trichilia clausenii* C. DC. (**E** e **F**); **A**, **C** e **E**: Microscopia eletrônica de varredura. **B**, **D** e **F**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Meristema floral mostrando a formação dos carpelos. **B**: Corte longitudinal de um botão floral em desenvolvimento mostrando a formação dos carpelos. **C**: Meristema floral mostrando o início do desenvolvimento dos estames e o início da formação dos carpelos. Pode-se observar a região de formação da placenta com a invaginação dos carpelos (seta) **D**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início do desenvolvimento dos estames e dos carpelos. **E**: Meristema floral mostrando os carpelos se alongando e sofrendo invaginações para dar origem à região da placenta (seta). **F**: Corte longitudinal de um botão floral mostrando o início da formação dos carpelos. **Abreviaturas:** **br**: bráctea, **ca**: carpelo, **es**: estame, **pe**: pétala, **se**: sépala. **Barras:** **A**: 40µm; **B**: 80µm; **C**, **E** e **F**: 50µm; **D**: 150µm.

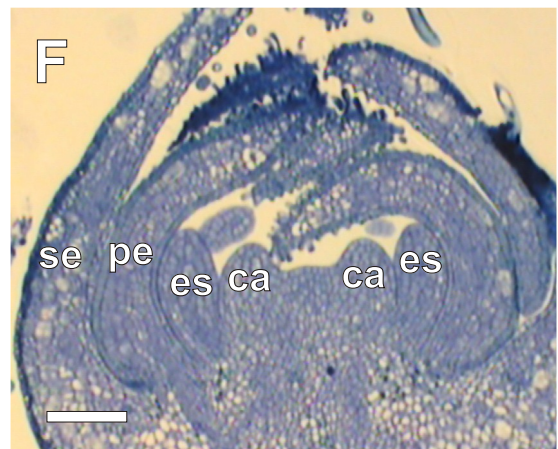
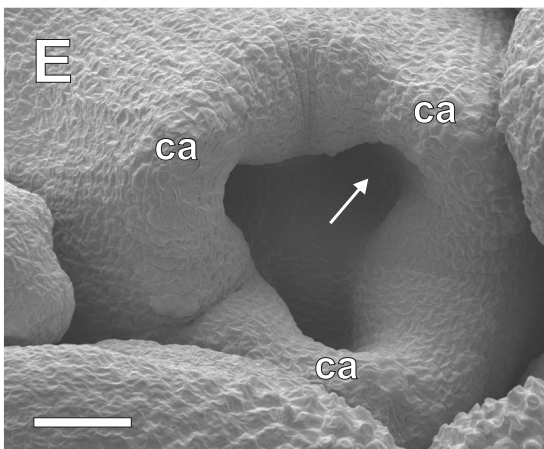
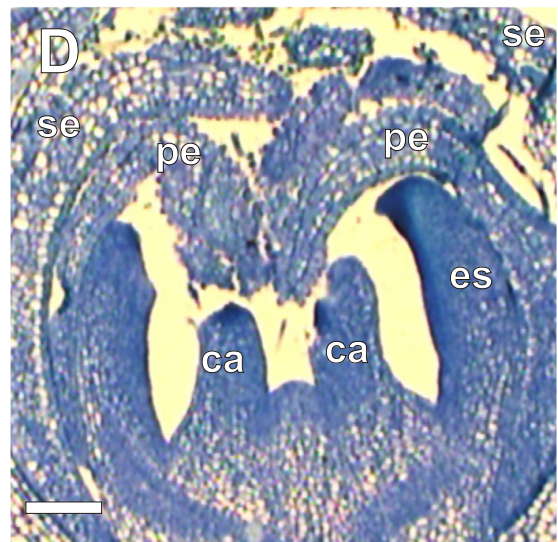
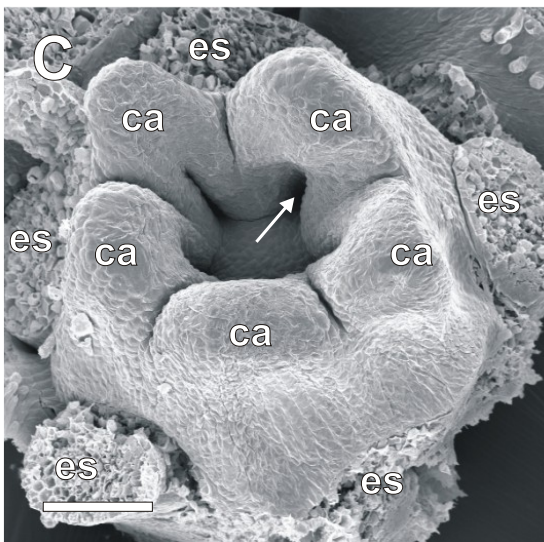
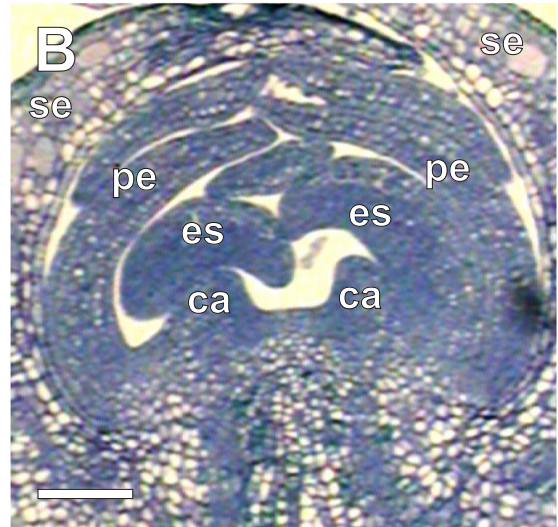
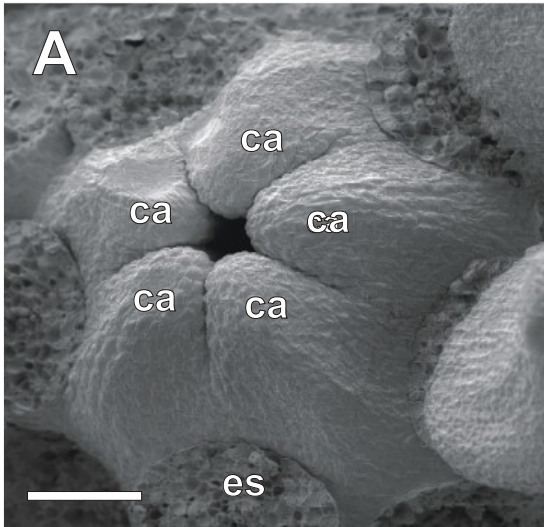


Figura 16: Flores na antese em *Cedrela fissilis* Vell. (**A – D**), *Swietenia macrophylla* R.

A. King (**E – I**). **A, B, D e E:** Microscopia eletrônica de varredura. **C, F, G, H e I:** Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A:** Vista frontal mostrando a posição relativa das estruturas florais. **B:** ovário dissecado mostrando óvulos (setas) com desenvolvimento normal na flor funcionalmente feminina. **C:** Corte longitudinal de *Cedrela fissilis* Vell de uma flor funcionalmente masculina mostrando a degeneração dos óvulos no ovário (seta). **D:** ovário dissecado mostrando óvulos degenerados (setas) de uma flor funcionalmente masculina. **E:** Gineceu mostrando as dimensões das partes da flor funcionalmente feminina e masculina. Notam-se as diferenças entre a largura (x) e altura (y) na região do estilete-ovário do gineceu. **F e G:** Cortes longitudinais do ovário mostrando a degeneração dos óvulos (setas) de uma flor funcionalmente masculina. **H e I:** Cortes longitudinais de ovários mostrando óvulos (setas) normais de uma flor funcionalmente feminina na antese. **Abreviaturas:** **an:** antera, **est:** estilete, **ne:** nectário, **pe:** pétala, **pl:** placenta, **st:** estigma, **te:** tubo estaminal. **Barras:** **A:** 400µm; **B, G, I:** 80µm; **C:** 200µm; **D e F:** 100µm; **E:** 350µm; **H:** 150µm.

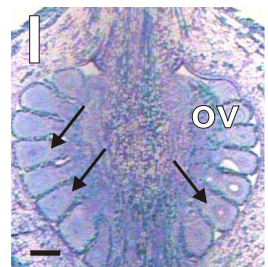
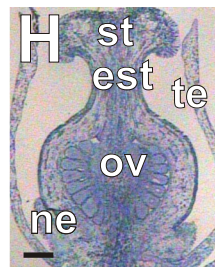
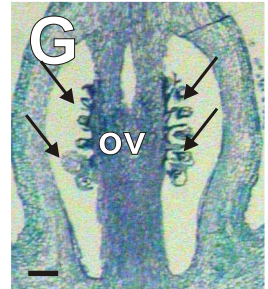
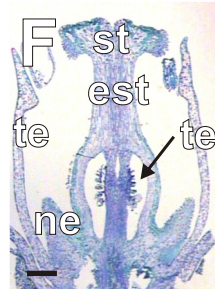
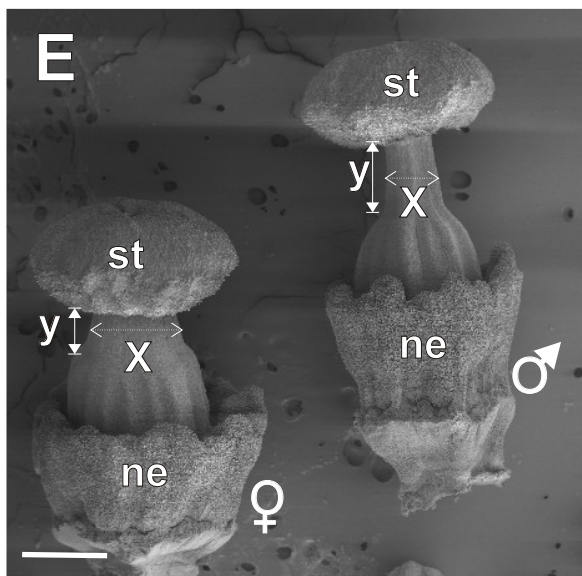
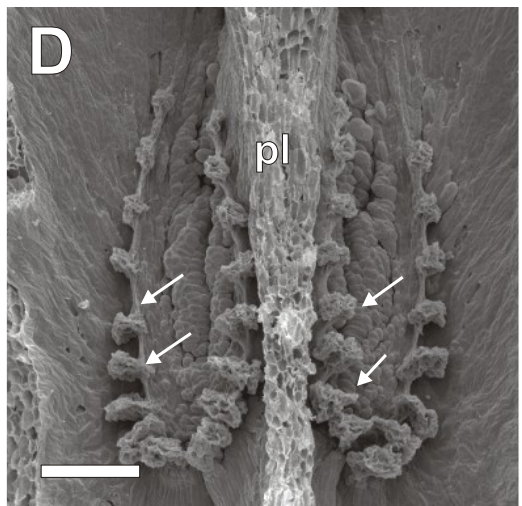
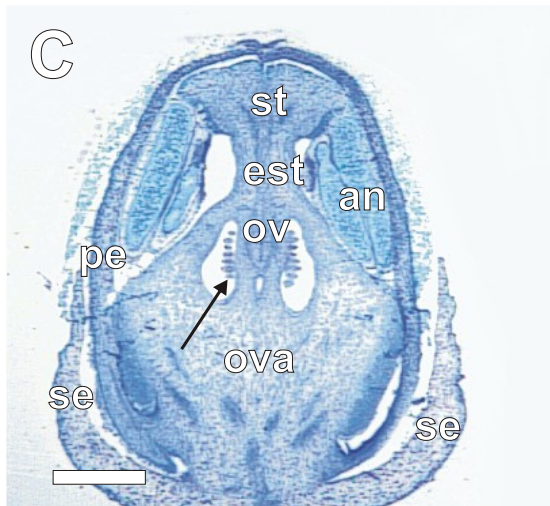
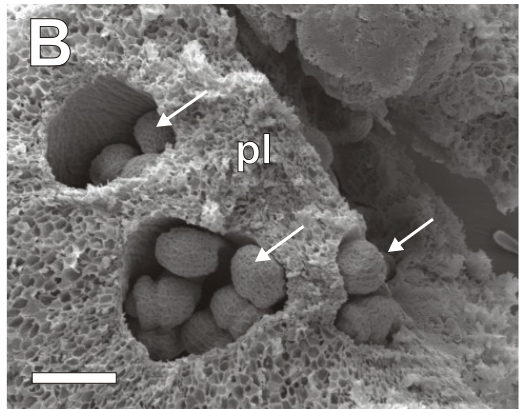
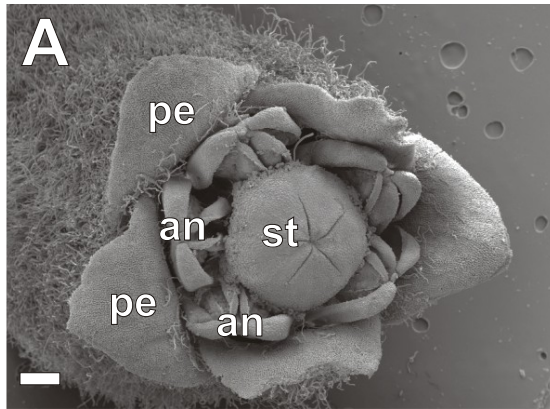


Figura 17: Flores na antese em *Guarea guidonea* (L) Sleumer (**A** e **B**), *Melia azedarach* L. (**C** e **D**), *Cedrela odorata* L. (**E** e **F**). **A**, **C** e **E**: Microscopia eletrônica de varredura; **B**, **D** e **F**: Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A**: Flor mostrando aspectos do gineceu (tricomos na região do ovário e estilete) e do tubo estaminal, este foi aberto para a exposição do gineceu. **B**: Corte longitudinal da flor mostrando a posição relativa dos órgãos florais. **C**: Aspectos da flor evidenciando o gineceu e o nectário anular circundando o ovário. Parte do tubo estaminal pode ser visualizada com tricomos na face interna. **D**: Corte longitudinal do gineceu de uma flor de *Melia azedarach* L. **E**: Flor parcialmente dissecada mostrando óvulos mal formados e outras estruturas florais de uma flor funcionalmente masculina. **F**: Corte longitudinal do ovário de uma flor funcionalmente masculina equivalente à imagem **E** e óvulos atrofiados no ovário (seta). **Abreviaturas:** **an**: antera, **est**: estilete, **ne**: nectário, **pe**: pétala, **se**: sépala, **st**: estigma, **te**: tubo estaminal, **ova**: ovário, **ov**: óvulo. **Barras:** **A**, **B**: 600µm; **C**, **D** e **E**: 300µm; **F**: 350µm.

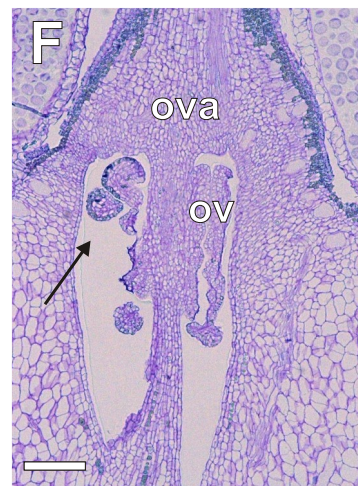
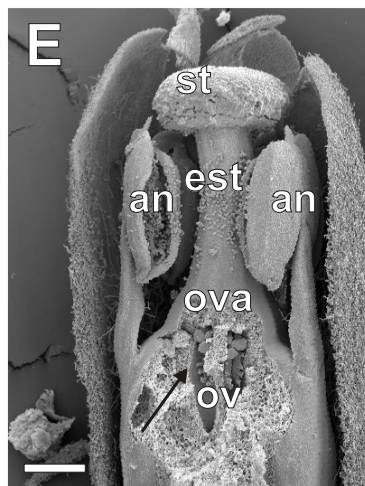
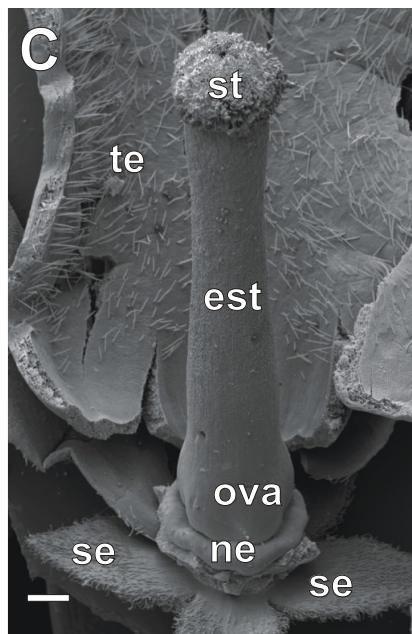
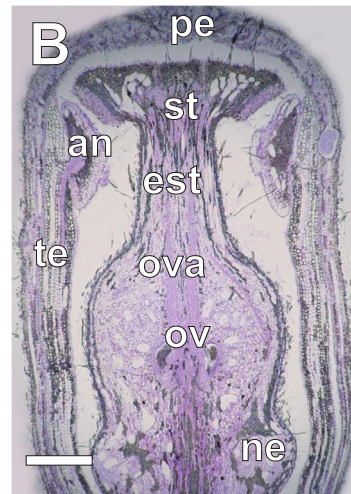
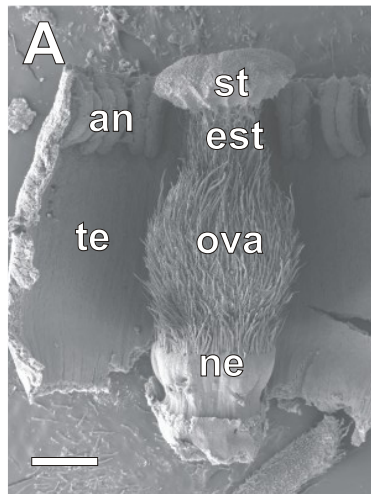
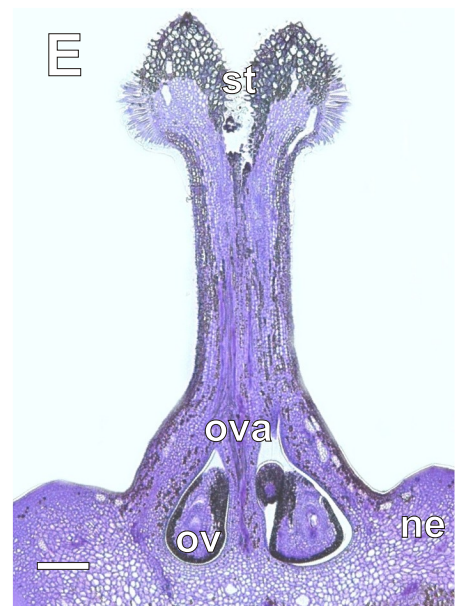
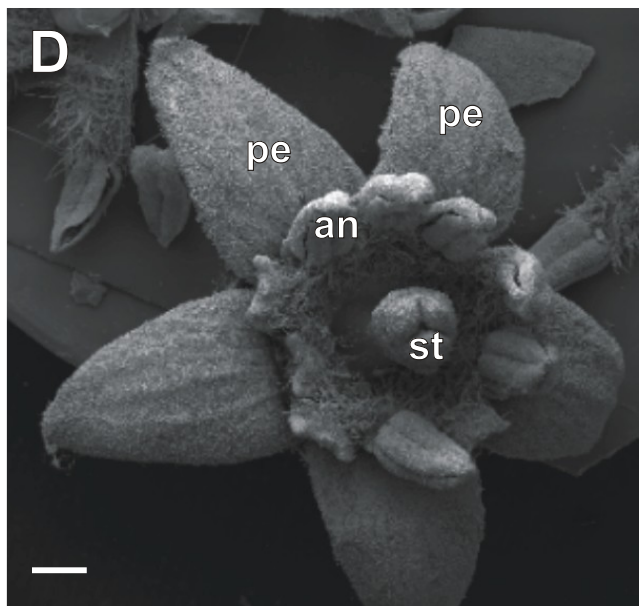
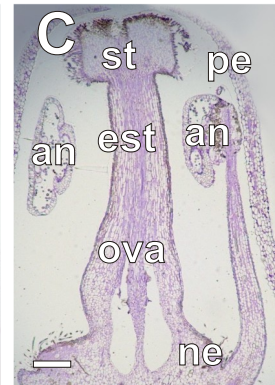
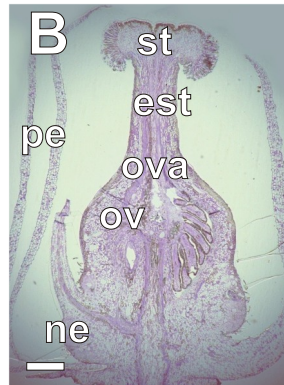
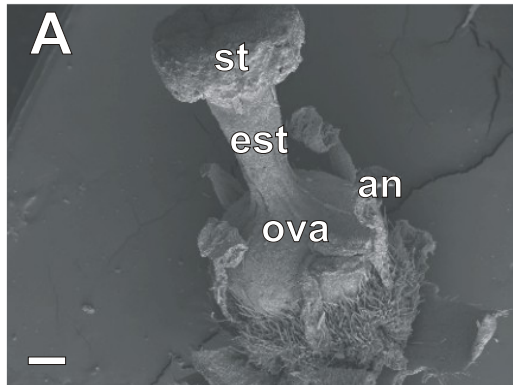


Figura 18: Flores na antese em *Toona ciliata* M. J. Roem (**A – C**) e *Trichilia clausenii* C. DC. (**D e E**). **A e D:** Microscopia eletrônica de varredura. **B, C e E:** Cortes histológicos observados em microscopia óptica. **A:** Gineceu com anteras atrofiadas e senescentes. **B e C:** Cortes longitudinais de flores funcionalmente feminina e masculina, respectivamente. Nota-se o ovário com óvulos normais em **B** e atrofiados em **C**. **D:** Vista frontal de uma flor mostrando a posição relativa das estruturas florais. **E:** Corte longitudinal de um gineceu com óvulos bem formados no ovário. **Abreviaturas:** **an:** antera, **est:** estilete, **ne:** nectário, **pe:** pétala, **st:** estigma. **Barras:** **A:** 200µm; **B:** 250µm; **C:** 300µm; **D:** 600µm; **E:** 650µm.



Em muitas espécies de Meliaceae é comum a existência de um tubo estaminal, formado pela fusão dos filetes das anteras. Esta característica comum é descrita por Styles (1972) e Pennington & Styles (1975), e pode ser claramente visualizada em *S. macrophylla* (inserto da figura 4C), *G. guidonea* (inserto da figura 5C), *M. azedarach* (Figura 6C) e *T. clausenii* (Figura 7C e 18D), onde as anteras são introrsas e dispostas na face interna e distal do tubo estaminal. Nas outras espécies, *C. fissilis* (Figura 16A), *C. odorata* (Figura 17E) e *T. ciliata* (Figura 18A) o tubo estaminal não se forma, os filetes mantêm-se livres e as anteras situam-se na mesma posição em relação às espécies que formam o tubo estaminal, mantendo o mesmo plano em relação ao estigma, conforme também descrito por Pennington & Styles (1975).

Nas espécies que formam o tubo estaminal, o número de anteras formadas é maior do que nas espécies onde os filetes são livres. Desta forma, verificamos a existência do dobro de anteras no tubo estaminal, e apenas 5 anteras nas espécies com filetes livres.

Variação de tamanho foi verificada no início da formação dos primórdios dos estames em *T. clausenii* (Figura 13E), podendo-se constatar a existência de um grupo de estames maiores que estão distribuídos alternadamente com outros primórdios de anteras menores, porém não verificamos nenhuma alteração morfológica entre as anteras dessa espécie na fase de liberação dos grãos de pólen, mesmo apresentando esta diferença de tamanho na fase inicial do desenvolvimento dos estames, como podemos ver na flor em antese de *T. clausenii* (Figura 18D). Nas demais espécies esta diferença de tamanho não foi verificada em nenhuma fase do desenvolvimento.

Em todas as espécies, a posição das células papilares no estigma das flores, em relação às anteras, parece facilitar a autopolinização em todas as espécies

estudadas, com a liberação dos grãos de pólen ocorrendo diretamente sobre essas células. Entretanto, Gandara (1996) analisou a taxa de cruzamento de *C. fissilis* por marcadores isoenzimáticos, concluindo que esta espécie é preferencialmente alógama.

Neste estudo, verificamos uma diferença macroscópica entre a morfologia das flores ditas “funcionalmente masculinas” e “funcionalmente femininas” em *S. macrophylla* (Figura 16E). Esta diferença pôde ser facilmente visualizada a olho nu e confirmada pela análise em microscopia óptica e eletrônica de varredura, observando-se a degeneração, ou má formação, dos óvulos no ovário de flores “funcionalmente masculinas” (Figuras 16F–G), e o desenvolvimento aparentemente normal dos óvulos nas flores “funcionalmente femininas” (Figuras 16H–I). Nas demais espécies, o dimorfismo sexual não foi observado a olho nú, como em *S. macrophylla*. Em *C. fissilis* (Figuras 16B–D), *T. ciliata* (Figuras 18B–C) e *C. odorata* (Figuras 17E–F), esta diferença entre morfologias florais foi confirmada somente através de microscopia eletrônica de varredura ou microscopia óptica. Nas outras espécies, *G. guidonea* (Figura 17B), *M. azedarach* (Figura 17D) e *T. clausenii* (Figura 18H) o dimorfismo sexual não foi possível de ser determinado, pois em todas as flores analisadas constatou-se a presença de pelo menos um óvulo considerado morfológicamente normal. Esta condição não assegura que o mesmo seja viável, gerando dúvidas quanto à precisa função sexual dessas flores.

Desta forma, medições do gineceu foram realizadas visando caracterizar o gineceu das flores quanto ao dimorfismo sexual (Tabela 04).

Tabela 04 - Dimensões em milímetros das partes constituintes do gineceu das flores em antese

ESPÉCIE	COMPRIMENTO				LARGURA		
	Total	Ovário	Estilete	Estigma	Ovário	Estilete	Estigma
<i>S. macrophylla</i>	3.574	1.885	0.945	0.825	2.226	0.666	1.745
Flor feminina	±0.735	±0.315	±0.145	±0.193	±0.502	±0.151	±0.253
<i>S. macrophylla</i>	3.293	1.280	1.378	0.752	1.346	0.625	1.557
Flor masculina	±0.215	±0.115	±0.185	±0.036	±0.039	±0.042	±0.019

** valores correspondentes à média de 30 flores femininas e 30 flores masculinas e seus respectivos desvios padrão. Nas demais espécies não foram realizadas medições do gineceu devido à impossibilidade de se diferenciar visualmente as flores masculinas das flores femininas.

As medições realizadas das regiões constituintes do gineceu em *S. macrophylla* comprovam as diferenças de tamanho dessas estruturas, permitindo a separação macroscópica prévia entre as flores com sexos funcionais diferentes. O tamanho dos ovários das flores femininas, tanto em comprimento (1,885mm), como em largura (2,226mm), apresentaram valores superiores aos dos ovários das flores masculinas (comprimento 1,280mm e largura 1,346mm), comprovando-se a diferença constatada a olho nu. O comprimento total do gineceu entre os dois tipos de flores de *S. macrophylla*, porém, foi semelhante em flores masculinas e femininas. As medidas obtidas em *S. macrophylla* no dimensionamento do estilete também proporcionaram a separação das flores, que apresentaram comprimento de 0,945mm para a flor feminina e de 1,378mm para a flor masculina. A largura do estilete apresentou-se semelhante comparando-se flores femininas e masculinas, sendo apenas 0,041mm maior para a flor feminina, porém esta diferença pode ser desconsiderada quando analisamos o valor do desvio padrão obtido para a flor feminina. As dimensões do estigma para os dois tipos florais foram semelhantes, não representando uma ferramenta eficaz para a separação entre os tipos florais.

Em *G. guidonea* observaram-se tricomas no gineceu, nas regiões do ovário e do estilete (Figura 17A). Nas demais espécies, não foram observados tricomas no gineceu, mas na face interna do tubo estaminal das espécies *M. azedarach* (Figura 17C) e *T. clausenii* (Figura 18D) os tricomas estavam presentes.

Em todas as espécies estudadas verificou-se a presença de um disco nectarífico intraestaminal disposto ao redor da base do ovário súpero (setas nos insertos das Figuras 3C, 4D, 5C, 16E, 17A, 17C, 18B–C e 18E), como também descrito por Judd *et al.* (1999) em espécies de Meliaceae. A coloração do nectário é marcante em *S. macrophylla* e em *T. ciliata* comparando-se às outras espécies estudadas. Em *S. macrophylla* e em *T. ciliata*, a cor dos nectários é vermelha-intensa, destacando-se das outras estruturas florais, enquanto que nas demais espécies estudadas, a coloração dos nectários era semelhante à das demais estruturas florais. Verificou-se a presença de uma substância viscosa e açucarada exsudada na superfície dos nectários no período de antese das flores, atraindo alguns insetos como abelhas e que usualmente se alimentam de néctar.

Os grãos de pólen de todas as espécies estudadas são tetracolpados e tetraporados, com superfície lisa e sem ornamentação da exina.

4.4. Expressão de genes do modelo ABC em Meliaceae via hibridização *in situ*.

O modelo ABC (Coen e Meyerowitz, 1991) postula que a combinação das funções de genes dos grupos A, B, e C presumivelmente ocorre em diferentes verticilos do meristema floral, especificando identidades diferentes dos órgãos (Figura 19A).

Desta forma, os padrões de expressão esperados de qualquer homólogo de genes da identidade dos órgãos florais dos grupos A, B ou C em uma determinada espécie devem seguir a previsão do modelo ABC (Figura 19B).

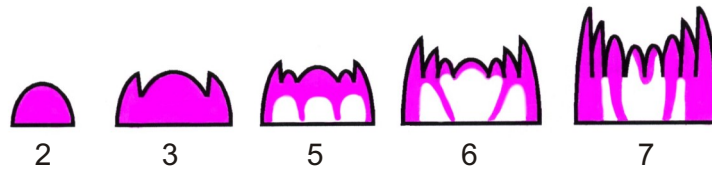
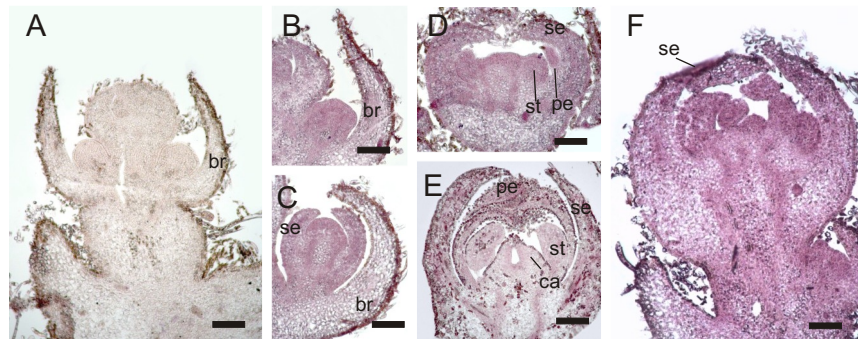
Consistentemente, observaram-se sinais de hibridização durante o início do desenvolvimento floral de todas as espécies de Meliaceae estudadas, e para todas as sondas antisense heterólogas testadas de genes MADS. Não foram observados sinais de hibridização acima da coloração de fundo (“background”) quando foram utilizadas sondas sense (Figuras 20 a 26).

Para facilitar a interpretação dos padrões de expressão de genes MADS de Meliaceae e para compará-los com aqueles observados para *Arabidopsis thaliana*, caracterizaram-se os estágios do desenvolvimento floral de Meliaceae, de acordo com Smyth *et al.* (1990) (item 4.3). Os principais resultados de hibridização *in situ* são apresentados juntamente com os esquemas dos meristemas florais em diferentes estágios do desenvolvimento (Figuras 20 a 26).

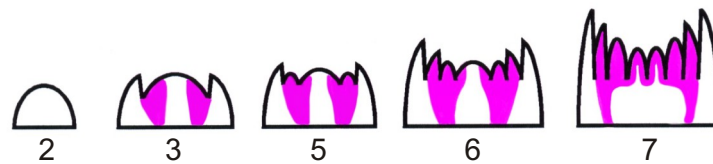
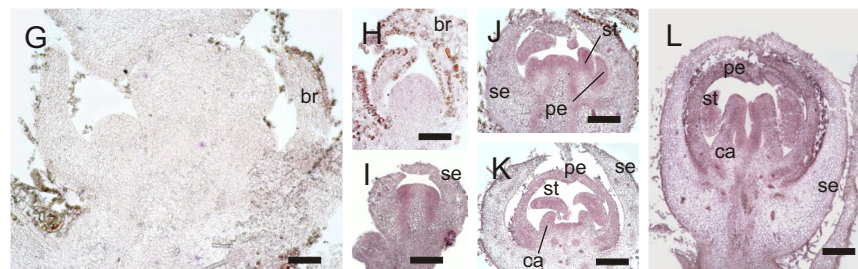
Figura 19: O modelo ABC e a expressão localizada dos genes da identidade do órgão floral durante o desenvolvimento floral em *Arabidopsis thaliana*. **A:** O modelo ABC propõe que a combinação das funções dos genes A, B, e C em diferentes verticilos, durante o desenvolvimento do meristema floral, especifica diferentes identidades dos órgãos. A atuação única da função A somente especifica a identidade da sépala (se), a função A combinada com a B especifica a identidade da pétala (pe), a função B combinada com a C especifica a identidade do estame (st), e a atuação única da função C especifica a identidade do carpelo (ca). Este esquema é baseado em Coen & Meyerowitz (1991). **B:** Os padrões de expressão dos homólogos putativos de genes de identidade dos órgãos *AP1*, *AP3*, e *AG* são previstos pelo modelo ABC. Os padrões de expressão são diagramados em estágios sucessivos do desenvolvimento floral. Usamos para os meristemas florais de Meliaceae, os mesmos critérios dos estágios aplicados para *Arabidopsis* por Smyth *et al.* (1990): estágio 2, antes da emergência das sépalas; estágio 3, quando os primórdios de sépalas surgem; estágio 5 quando os primórdios de pétalas surgem; estágio 6, quando todos os primórdios dos órgãos são visíveis; e estágio 7, quando todos os primórdios começam a alongar-se. Algumas das interações regulatórias responsáveis pelo estabelecimento destes padrões de expressão espacialmente limitados são apresentados com o alongamento dos órgãos florais (estágio 7), durante o estágio em que parecem atuar. **Abreviaturas:** **se:** primórdio de sépala, **pe:** primórdio de pétala, **st:** primórdio de estame; **ca:** primórdio de carpelo.

Figura 20: Padrões de expressão dos homólogos dos genes ABC em *C. fissilis*, avaliados através de hibridização *in situ*. Todas as secções são longitudinais. O sinal de hibridização é observado pelo precipitado de coloração roxa ou cor-de-rosa. **A, G e M** são sondas sense. **B-F**: Sonda antisense de *AP1*. **H-L**: sonda antisense de *AP3*. **N-R**: sonda antisense de *AG*. Os esquemas apresentados abaixo de cada grupo de figuras representam a interpretação do padrão da expressão dos genes e são representados em diferentes estágios dos meristemas florais de acordo com Smyth *et al.* (1990). Os estágios dos meristemas florais apresentados nas figuras correspondem a: **B, H e N**: estágio 2; **C, I e O**: final do estágio 3; **D, J e P**: final do estágio 6; **F, K e R**: estágio 7; **E**: final do estágio 9; **L**: final do estágio 11. Em **Q**, uma secção longitudinal de um primórdio de óvulo (flor no estágio 12) mostrando o sinal de hibridização na região da chalaza (**ch**) e no nucelo (**nu**). **Abreviaturas:** **br**: bráctea; **ca**: primórdio de carpelo; **mmc**: célula mãe do megásporo; **pe**: primórdio de pétala; **se**: primórdio de sépala; **st**: primórdio de estame. **Barras:** **A, G e M**: 20µm; **B, H, I, N e O**: 18µm; **D, E, J, K, P e Q**: 30µm; **F, L e R**: 30µm;

AP1



AP3



AG

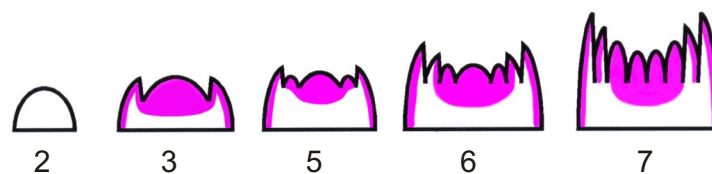
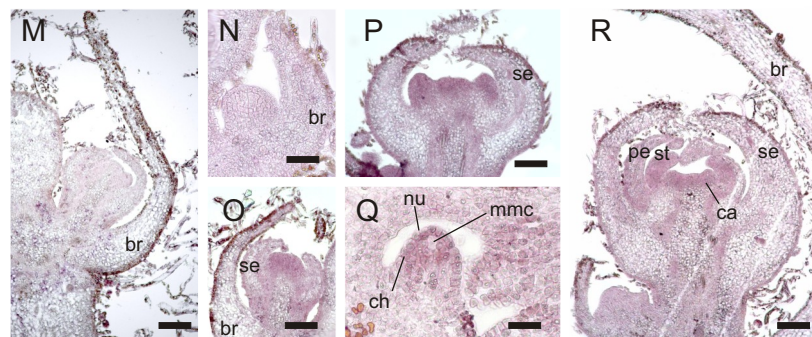
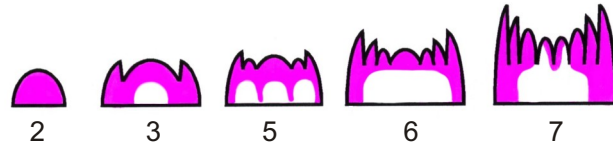
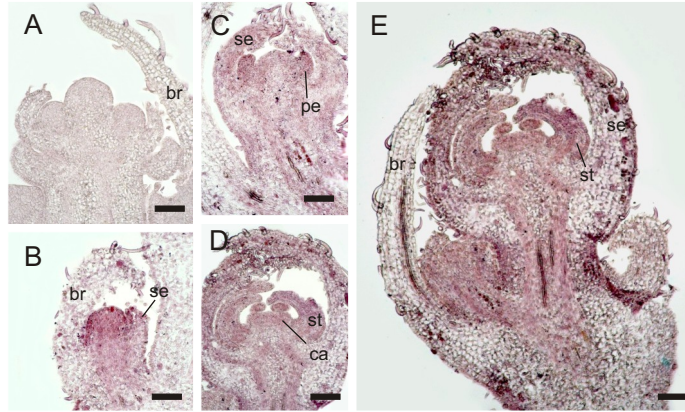
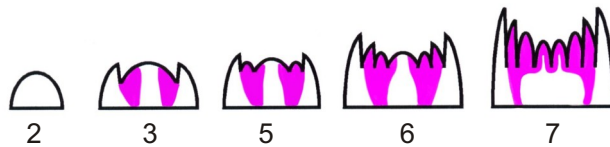
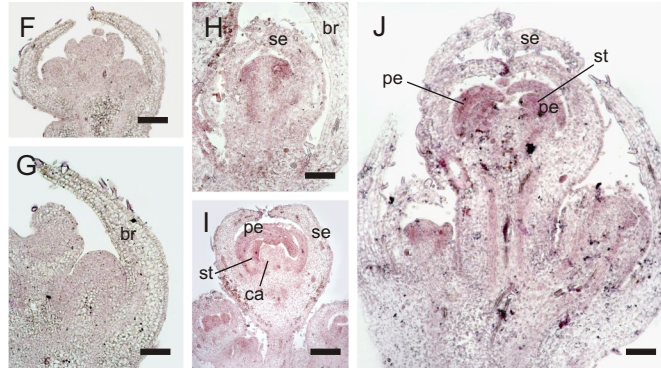


Figura 21: Padrões de expressão dos homólogos dos genes ABC em *C. odorata*, avaliados através de hibridização *in situ*. Todas as secções são longitudinais. O sinal de hibridização é observado pelo precipitado de coloração roxa ou cor-de-rosa. **A, F e K** são sondas sense. **B-E:** sonda antisense de *AP1*. **G-J:** sonda antisense de *AP3*. **L-O:** sonda antisense de *AG*. Os esquemas apresentados abaixo de cada grupo de figuras representam a interpretação do padrão de expressão e são representados em diferentes estágios dos meristemas florais de acordo com Smyth *et al.* (1990). Os estágios florais dos meristemas apresentados nas figuras correspondem a: **B e G:** início do estágio 3; **L:** estágio 2; **C, H e M:** final do estágio 3; **D, I e N:** estágio 6-7; **E, J e O:** parte de uma inflorescência contendo meristemas no estágio 3 (pequeno) a 7 (grande). **Abreviaturas:** **br:** bráctea; **ca:** primórdio de carpelo; **pe:** primórdio de pétala; **se:** primórdio de sépala; **st:** primórdio de estame. **Barras:** **A, G, K, e L:** 20µm; **C, D, H, I, M e N:** 15µm; **E, J e O:** 25µm.

AP1



AP3



AG

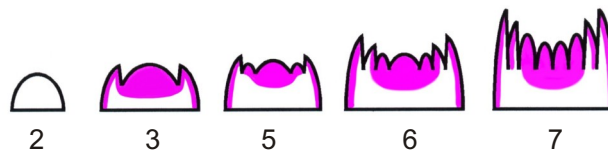
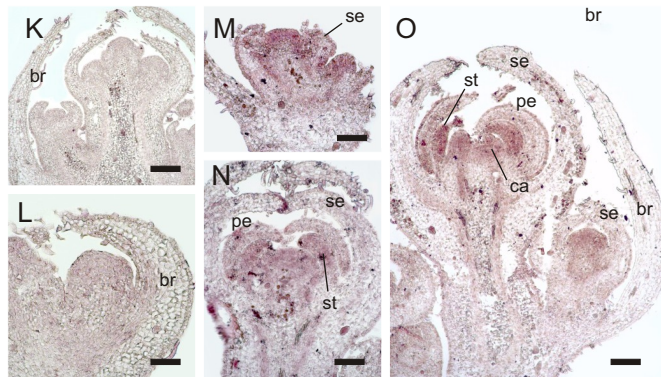
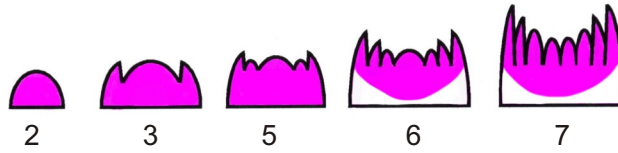
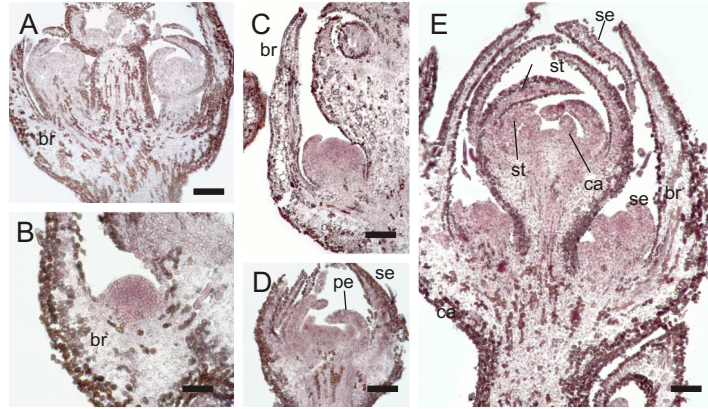


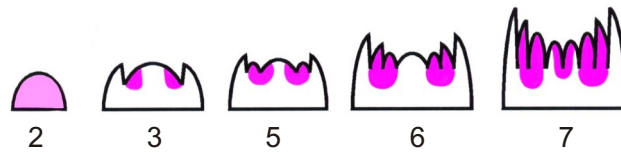
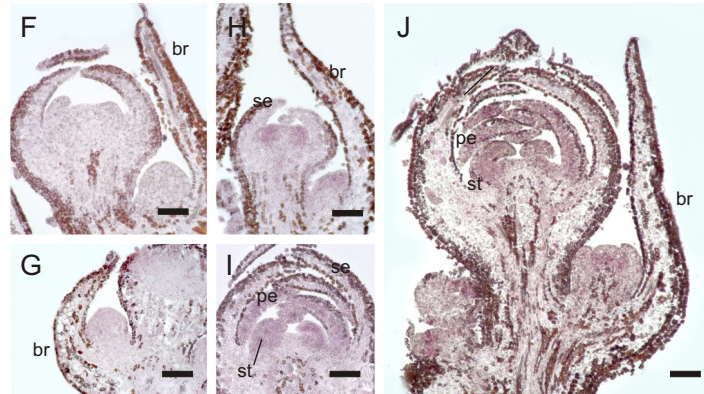
Figura 22: Padrões de expressão dos homólogos dos genes ABC de *T. ciliata*, avaliados através de hibridização *in situ*. Todas as secções são longitudinais. O sinal de hibridização é observado pelo precipitado de coloração roxa ou cor-de-rosa. **A, F e K** são sondas sense. **B-E**: sonda antisense de *AP1*. **G-J**: sonda antisense de *AP3*. **L-O**: sonda antisense de *AG*. Os esquemas apresentados abaixo de cada grupo de figuras representam a interpretação do padrão de expressão e são representados em meristemas florais de acordo com Smyth *et al.* (1990). Os estágios dos meristemas florais apresentados nas figuras correspondem a: **B, G e L**: estágio 2; **C, H e M**: estágio anterior ao 3; **D, I e N**: estágio 6-7; **E, J e O**: parte de uma inflorescência contendo meristemas nos estágios 2 - 3 (pequeno) a 7 (grande). **br**: bráctea; **ca**: primórdio de carpelo; **pe**: primórdio de pétala; **se**: primórdio de sépala; **st**: primórdio de estame.

Barras: **A**: 15µm; **B, C, D, F, H, G, I, K, M, L e N**: 12µm; **E, J e O**: 20µm.

AP1



AP3



AG

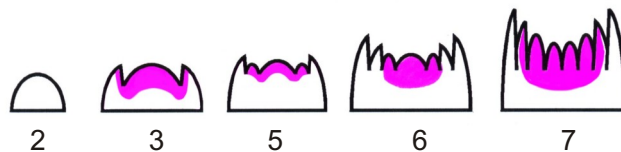
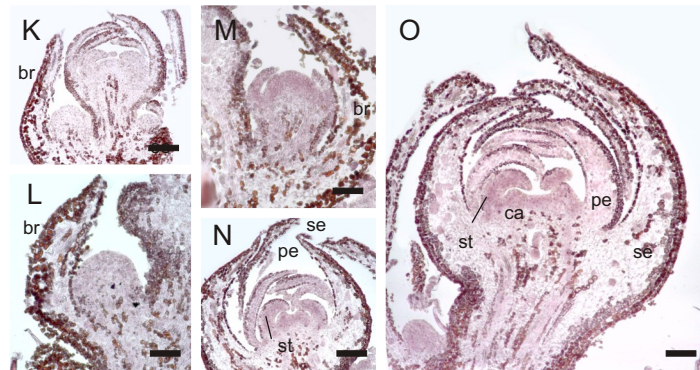
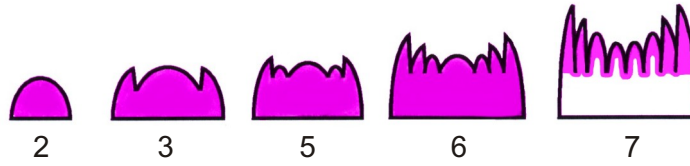
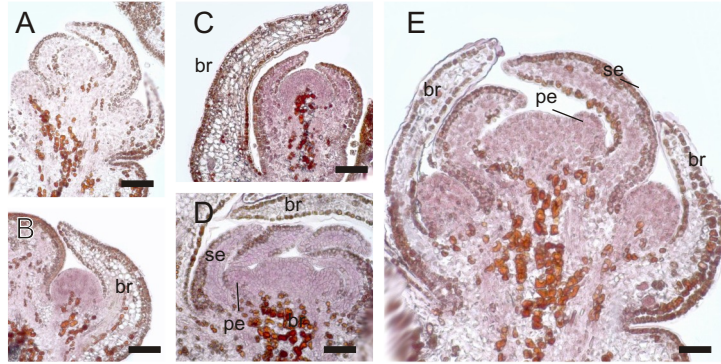
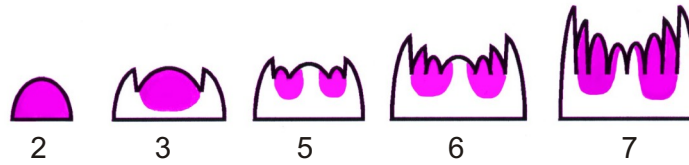
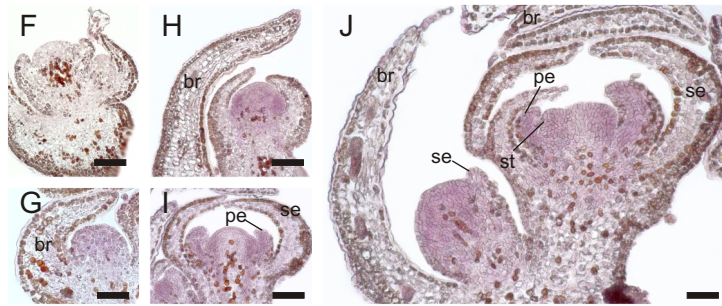


Figura 23: Padrões de expressão dos homólogos dos genes ABC de *S. macrophylla*, avaliados através de hibridização *in situ*. Todas as secções são longitudinais. O sinal de hibridização é observado pelo precipitado de coloração roxa ou cor-de-rosa. **A, F e K** são sondas sense. **B-E:** sonda antisense de *AP1*. **G-J:** sonda antisense de *AP3*. **L-O:** sonda antisense de *AG*. Os esquemas apresentados abaixo de cada grupo de figuras representam a interpretação do padrão de expressão e são representados em meristemas florais de acordo com Smyth *et al.* (1990). Os estágios dos meristemas florais apresentados nas figuras correspondem a: **B, G e L:** estágio 2; **C, H e M:** estágio anterior ao 3; **D, I e N:** estágio 6-7; **E, J e O:** parte de uma inflorescência contendo meristemas no estágio 2 (pequeno) a 5 (grande). **Abreviaturas:** **br:** bráctea; **ca:** primórdio de carpelo; **pe:** primórdio de pétala; **se:** primórdio de sépala; **st:** primórdio de estame. **Barras:** **A, K, e F:** 18µm; **C, B, H, G, e I:** 15µm; **D, L, M e N:** 12µm; **E, J e O:** 20µm.

AP1



AP3



AG

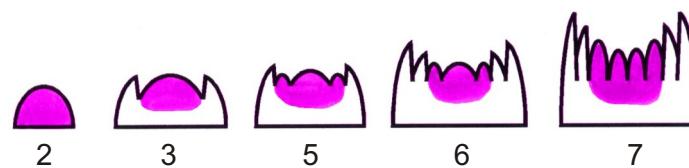
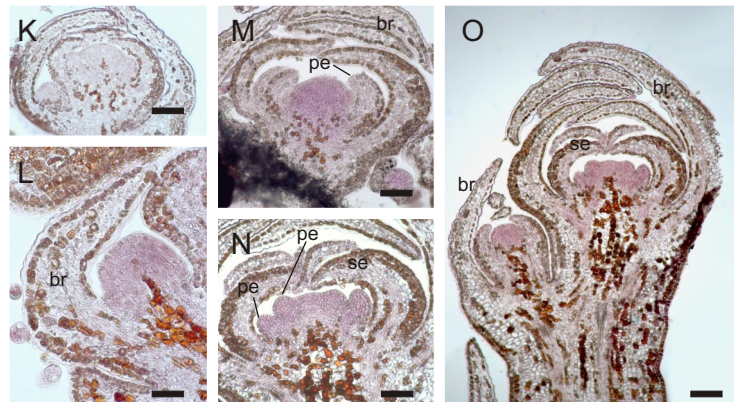
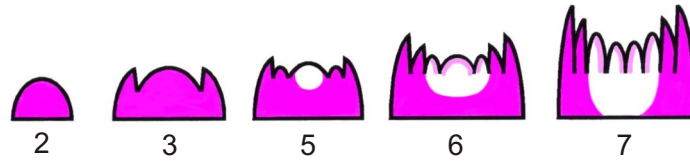
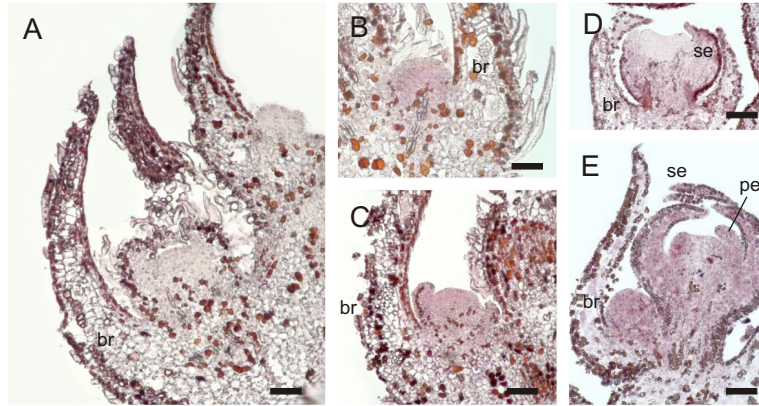
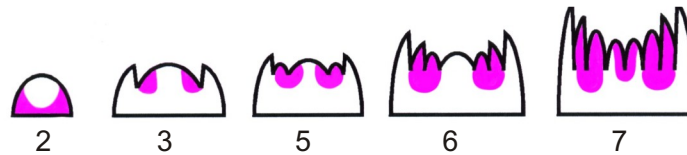
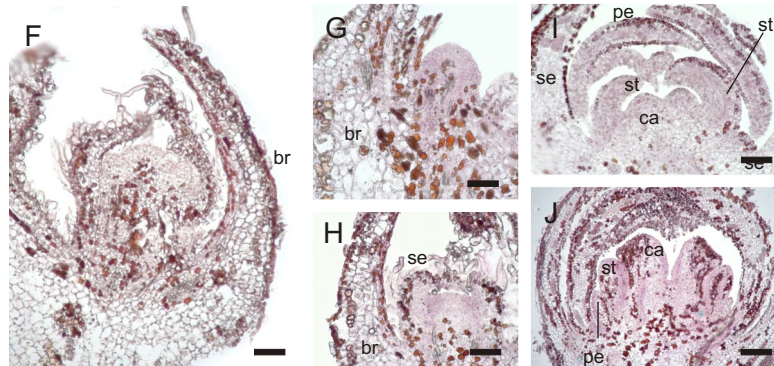


Figura 24: Padrões de expressão dos homólogos dos genes ABC em *G. guidonea*, avaliados através de hibridização *in situ*. Todas as secções são longitudinais. O sinal de hibridização é observado pelo precipitado de coloração roxa ou cor-de-rosa. **A, F e K** são sondas sense. **B-E**: sonda antisense de *AP1*. **G-J**: sonda antisense de *AP3*. **L-O**: sonda antisense de *AG*. Os esquemas apresentados abaixo de cada grupo de figuras representam a interpretação do padrão de expressão e são representados em meristemas florais de acordo com Smyth *et al.* (1990). Os estágios dos meristemas florais apresentados nas figuras correspondem a: **B, G e L**: estágio 2; **C, H e M**: estágio 3; **D e N**: estágio 5; **I**: início do estágio 7; **E**: parte de uma inflorescência contendo meristemas no estágio 2 (pequeno) a 5 (grande); **J**: estágio 11; **O**: final do estágio 8. **Abreviaturas:** **br**: bráctea; **ca**: primórdio de carpelo; **pe**: primórdio de pétala; **se**: primórdio de sépala; **st**: primórdio de estame. **Barras:** **A, F e K**: 20µm; **B, C, D, E, G, H, L e M**: 10µm; **I, J, N e O**: 15µm.

AP1



AP3



AG

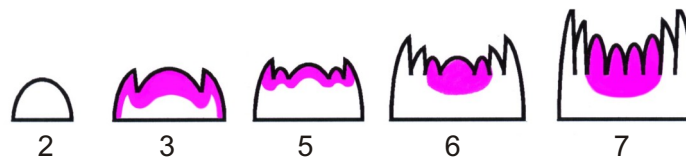
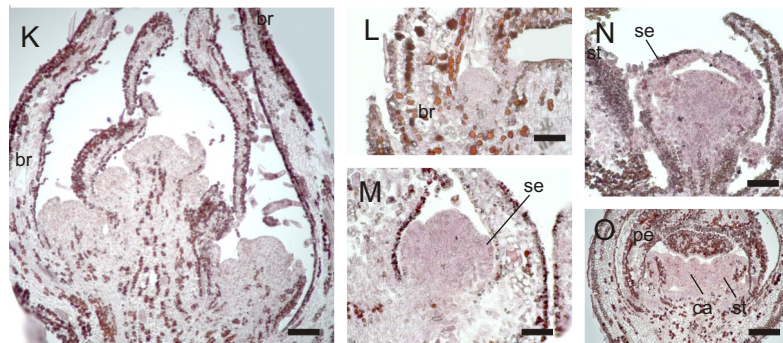
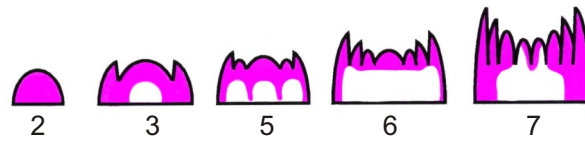
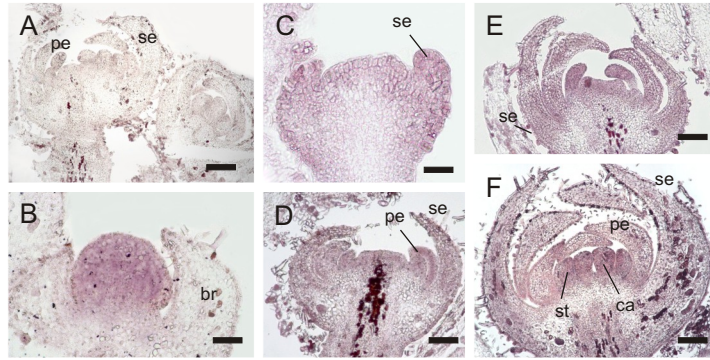


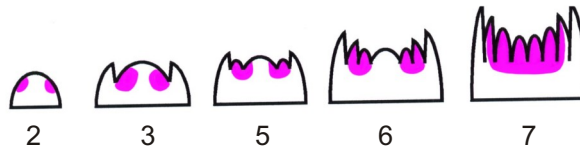
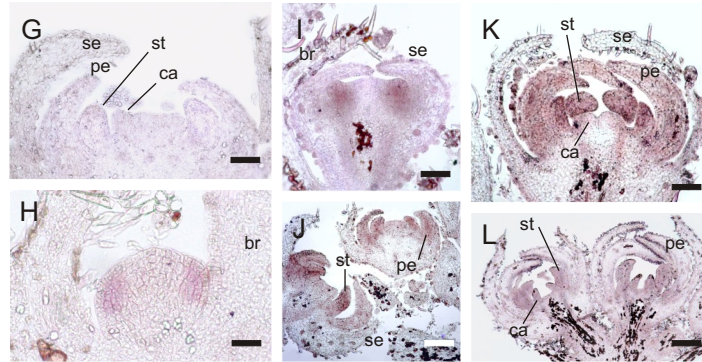
Figura 25: Padrões de expressão dos homólogos dos genes ABC de *M. azedarach*, avaliados através de hibridização *in situ*. Todas as secções são longitudinais, exceto em **R** que é transversal. O sinal de hibridização é observado pelo precipitado de coloração roxa ou cor-de-rosa. **A, G e K** são sondas sense. **C-F**: sonda antisense de *AP1*. **H-L**: sonda antisense de *AP3*. **N-R**: sonda antisense de *AG*. Os esquemas apresentados abaixo de cada grupo de figuras representam a interpretação do padrão de expressão e são representados em meristemas florais de acordo com Smyth *et al.* (1990). Os estágios dos meristemas florais apresentados nas figuras correspondem a: **B, H e N**: estágio 2; **C, I e O**: estágio 3; **D, J e P**: estágio 6-7; **E, K e Q**: início do estágio 8. **F e L**: final do estágio 10. **R**: início do estágio 11.

Abreviaturas: **br**: bráctea; **ca**: primórdio de carpelo; **pe**: primórdio de pétala; **se**: primórdio de sépala; **st**: primórdio de estame. **Barras:** **A e M**: 20µm; **B, C, D, H, I, N e O**: 10µm; **E, F, P, Q e R**: 15µm; **J e L**: 30µm.

AP1



AP3



AG

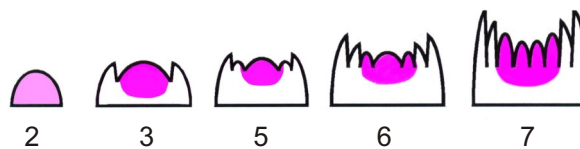
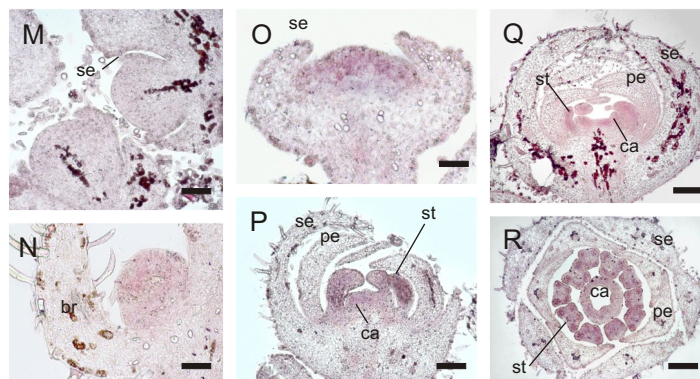
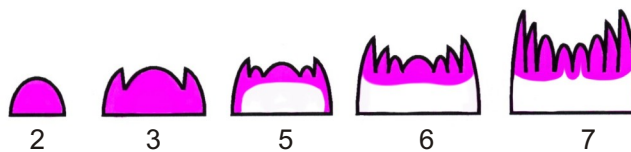
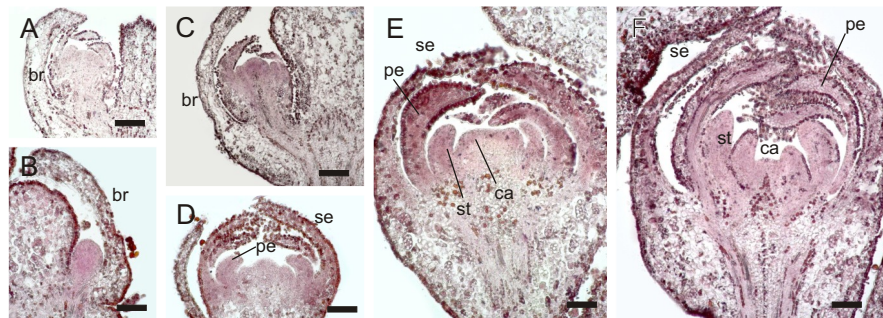
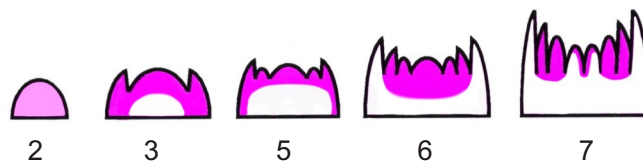


Figura 26: Padrões de expressão dos homólogos dos genes ABC em *T. clausenii*, avaliados através de hibridização *in situ*. Todas as secções são longitudinais. O sinal de hibridização é observado pelo precipitado de coloração roxa ou cor-de-rosa. **A, G e M** são sondas sense. **C-F:** sonda antisense de *AP1*. **H-L:** sonda antisense de *AP3*. **N-R:** sonda antisense de *AG*. Os esquemas apresentados abaixo de cada grupo de figuras representam a interpretação do padrão de expressão e são representados em meristemas florais de acordo com Smyth *et al.* (1990). Os estágios dos meristemas florais apresentados nas figuras correspondem a: **B, H e N:** estágio 2; **C, I e O:** estágio 3; **D e J:** estágio 6-7; **P:** estágio 5. **E e Q:** início do estágio 8. **K:** estágio 10, **F, L e R:** início do estágio 11. **Abreviaturas:** **br:** bráctea; **ca:** primórdio de carpelo; **pe:** primórdio de pétala; **se:** primórdio de sépala; **st:** primórdio de estame. **Barras:** **A, C, B, G, H, I, M e N:** 10µm; **D, J, O e P:** 15µm; **E, F, K, L, Q e R:** 20µm.

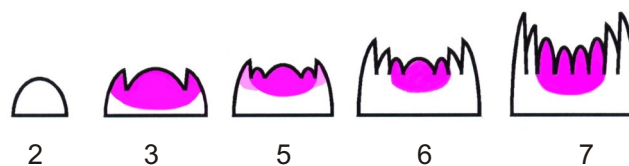
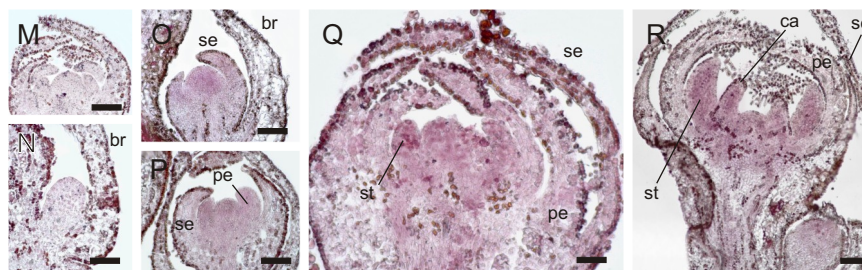
AP1



AP3



AG



4.4.1. Padrões de expressão dos homólogos do Grupo-A (*APETALA1*) em *Meliaceae*

O gene *AP1* é consistente com um duplo papel na especificidade da identidade do meristema floral e na identidade do órgão, e homólogos de *AP1* de *Meliaceae* inicialmente se expressaram em todo o meristema floral jovem (Figuras 20-26). Posteriormente, tornaram-se restritos às regiões onde, presumivelmente, os primórdios de sépalas e de pétalas se desenvolveriam em todos os taxa de *Meliaceae* estudados. As brácteas, que envolvem os meristemas florais juvenis, não mostraram nenhum sinal de hibridização acima da coloração de fundo ("background") (Figuras 20-26). Surpreendentemente, também detectamos sinais do homólogo de *AP1* no terceiro e quarto verticilo em desenvolvimento (Figuras 20 -26). O sinal de hibridização foi detectado até mais tarde no desenvolvimento da flor, quando o primórdio do óvulo já havia se formado e as células papilares já haviam se diferenciado no estigma da flor.

Muitos genes "*SQUA-like*", como o *AP1*, são tipicamente expressos em inflorescências ou meristemas florais, sendo que a maioria deles pode agir como genes de identidade floral (Theissen *et al.*, 1996). O gene *AP1*, homólogo ao *SQUA* em *Arabidopsis*, está envolvido na especificação de sépalas e pétalas, atuando como um gene típico da identidade do órgão floral da classe A (Mandel *et al.*, 1992). Existem três genes "*SQUA-like*" no genoma de *Arabidopsis*: *AP1*, *CAULIFLOWER (CAL)* e *AGL8* (Guo *et al.*, 1998; Kempin *et al.*, 1995; Mandel *et al.*, 1992). Plantas homozigotas de *Arabidopsis* para o mutante *CAL* são fenotipicamente iguais ao tipo selvagem, mas junto com mutações no *AP1*, produzem um duplo mutante, cujo fenótipo é caracterizado por

uma proliferação extensiva de meristemas em cada posição onde no tipo selvagem uma única flor seria formada (Kempin *et al.*, 1995). Estes dados indicam que *CAL* e *AP1* codificam funções parcialmente redundantes. A alta similaridade de seqüências entre *CAL* e *AP1*, e o fato de ortólogos (genes com mesma função e mesmo ancestral comum, mas separados por processos de especiação) de *CAL* terem sido encontrados somente em Brassicaceae, sugerem que ambos os genes são parálogos (genes homólogos, produto de uma duplicação gênica recente) relativamente novos.

Genes ligados ao grupo *SQUA* foram isolados em diversas monocotiledôneas e em outras angiospermas basais (Theissen, 2001; Becker & Theissen, 2003; Münster *et al.*, 2002a). Assim, a clade de genes “*SQUA*-like” provavelmente estabeleceu-se no último ancestral comum entre monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Os padrões de expressão de alguns desses genes em milho sugerem que eles não estão envolvidos no estabelecimento da identidade do meristema floral, mas funcionam em estágios posteriores do desenvolvimento do florete (Theissen *et al.*, 2000). Assume-se que a função ancestral de genes “*SQUA*-like” seria a especificação da identidade do meristema floral. Esta função é mantida em ortólogos de diferentes taxa (Theissen, 2000; Theissen *et al.*, 2000).

Consistente com um duplo papel, tanto na especificação da identidade do meristema, como na do órgão, o gene *AP1* é inicialmente expresso no meristema floral jovem e, posteriormente, torna-se restrito às regiões onde presumivelmente os primórdios de sépalas e de pétalas serão formados (Mandel *et al.*, 1992). Igualmente, sinais de hibridização de homólogos da classe A em Meliaceae, foram detectados no meristema floral antes do início da formação dos primórdios florais. Entretanto, a expressão dos homólogos de MADS-box da classe A de Meliaceae em estames e

carpelos em estágios iniciais de seu desenvolvimento, divergiram do proposto pelo modelo ABC. De acordo com o modelo, a identidade do estame é definida pela transcrição simultânea de genes da classe B e C e a identidade do carpelo é expressa somente por genes da classe C (Coen & Meyerowitz, 1991). Recentemente, Becker & Theissen (2003) relataram que a maioria dos homólogos da classe A nas angiospermas mostraram padrões de transcrição que são divergentes daqueles descritos pelo modelo ABC tradicional.

Arabidopsis permanece a única espécie identificada na qual um mutante para um gene do grupo *AP1* resulta no erro de especificação da identidade de órgãos (Becker & Theissen 2003). Assim, a perda da identidade apropriada do órgão pode ser uma consequência da natureza incompleta da transição de meristema da inflorescência para o floral, particularmente nos dois verticilos exteriores. De acordo com esta interpretação do papel do gene *AP1*, não há uma função especificada para A. Ao contrário, o aparente erro de especificação na identidade do órgão floral no mutante *ap1* de *Arabidopsis* é consequência de uma especificação incompleta da identidade do meristema floral. Se a produção de sépalas representa o primeiro estágio de um meristema floral, a identidade do órgão floral pode ser adequadamente especificada pelos resultados apenas das funções B e C (Theissen *et al.* 2000; Becker & Theissen 2003). Desta forma, a falta dos exemplos de mutantes da função A em outras taxa além de Brassicaceae e a restrição de genes *euAP1* em eudicotiledôneas verdadeiras (“core eudicots”) (Johansen *et al.*, 2002; Becker & Theissen, 2003), juntamente com os resultados do padrão da expressão mostrados aqui para Meliaceae, sugerem que a universalidade, ou talvez o conceito, da função A na especificação da identidade de órgãos florais como sépalas e pétalas, deva ser reavaliado.

4.4.2. Padrões de expressão dos homólogos do Grupo-B (*APETALA3*) em *Meliaceae*.

Na subfamília Swietenioideae, os homólogos de *AP3* foram primeiramente detectados em meristemas florais de *S. macrophylla* no estágio 2 (Figura 23) e fracamente em meristemas florais de *T. ciliata* no mesmo estágio (Figura 22), mas podendo ser detectado somente após o estágio 3 em *C. fissilis* e em *C. odorata* (Figuras 20 e 21). Para a subfamília Melioideae, o sinal de genes da classe-B foi detectado primeiramente na periferia dos meristemas no estágio 2 em *G. guidonea* (Figura 24) e *M. azedarach* (Figura 25) e fracamente em meristemas de *T. clausenii* no mesmo estágio (Figura 26). Durante os estágios 3 a 5, RNAs homólogos de *AP3* foram detectados consistentemente no segundo, terceiro e quarto verticilos, exceto para *T. ciliata* (Figura 22), onde o sinal de hibridização mais acentuado do que a coloração de fundo (“background”) foi também observado em primórdios de sépala. Em estágio mais avançado do desenvolvimento floral, a expressão concentrou-se em primórdios de pétalas e de estames, mas também foi detectada em primórdios de carpelos, especialmente na face adaxial, onde presumivelmente a placenta se diferenciaria (Figuras 20 - 26).

Existe apenas um gene “*DEF-like*” e um “*GLO-like*” no genoma de *Arabidopsis*, ou seja, *AP3* e *PI*, respectivamente (Goto & Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1992), mas diversos parálogos de *AP3* ou de *PI* podem ser encontrados em muitos outros genomas de angiospermas (Kramer & Irish, 1999; Kramer *et al.*, 1998; Münster *et al.*, 2001). Ambos os genes “*AP3-like*” e “*PI-like*” foram encontrados em todas as

angiospermas onde foram investigados. Genes ancestrais “*AP3-like*” e “*PI-like*” foram também encontrados em gimnospermas, sugerindo a existência desses genes há aproximadamente 300 milhões de anos (Mouradov *et al.*, 1999; Sundström *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 1999, Fukui *et al.*, 2001). Os dados existentes até o presente momento concordam com a hipótese de que a duplicação dos genes da função B, e que levou à formação de clades irmãs distintas de genes “*AP3-like*” e “*PI-like*”, ocorreu próxima à base das angiospermas verdadeiras (“core angiosperms”) (Winter *et al.*, 2002a). A evolução de genes da função B envolveu mudanças consideráveis nos padrões de expressão do RNA mensageiro e nas interações entre proteínas (Kramer *et al.*, 1998; Kramer & Irish, 1999; Ambrose *et al.*, 2000; Theissen *et al.*, 2000; Münster *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 1999, 2002a). Genes do grupo B podem ter uma função ancestral, mantida nas gimnospermas, na distinção entre órgãos reprodutivos masculinos, onde se verifica somente a expressão de genes da função B, e órgãos reprodutivos femininos com a ausência da expressão de genes da função B (ver Albert *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999, 2002a). Após o estabelecimento de genes distintos “*AP3-like*” e “*PI-like*” durante a evolução das angiospermas, esses genes foram recrutados também para especificar a identidade da pétala, e seus produtos gênicos evoluíram da homodimerização para heterodimerização obrigatória (Winter *et al.*, 2002a).

A conservação da expressão de genes “*AP3-like*” no desenvolvimento dos primórdios de pétala e estame em Meliaceae está de acordo com uma função homeótica floral da função B desses genes (Becker & Teissen, 2003). Entretanto, a expressão observada nos carpelos não é explicada pelo modelo ABC tradicional, que não prevê uma função de genes de B em órgãos reprodutivos femininos. Para alguns genes “*AP3-like*” das eudicotiledôneas, tais como o *AP3* de *Arabidopsis*, a expressão em primórdios

de órgãos femininos (quarto verticilo) foi também relatada, sugerindo a conservação deste fenômeno no decorrer do tempo. No caso de espécies relativamente próximas como *Antirrhinum majus* e *Nicotiana tabacum*, entretanto, é o gene *DEF* que se expressa precocemente nos órgãos do quarto verticilo (Davies *et al.*, 1996; Samach *et al.*, 1997). A expressão conservada de genes da função B em primórdios de órgãos femininos, descritos aqui para homólogos de genes “*AP3-like*” em Meliaceae, levanta uma questão quanto à sua importância funcional.

Existem evidências em eudicotiledôneas de que a expressão de genes “*PI-like*” e “*AP3-like*” se sobrepõem somente nos primórdios de pétalas e estames. Somente nesta região sobreposta, essas duas classes diferentes de proteínas da função B (proteínas dos genes “*PI-like*” e “*AP3-like*”), heterodimerizam. A formação do heterodímero estabiliza as proteínas, permitindo sua entrada no núcleo da célula e ligação com seqüências-alvo no domínio MADS, chamadas de CArG-boxes, (revisado por Samach *et al.*, 1997). Entre os alvos de heterodímeros dessas proteínas da classe B estão, muito provavelmente, os próprios genes B, pois a manutenção da expressão de genes da função B depende de proteínas funcionais de B de ambos os tipos. Os genes do grupo B estão, portanto, sujeitos a um controle auto-regulatório (“feedback activation”). Conseqüentemente, nesses sistemas, as proteínas funcionais de B são detectadas somente nos primórdios de pétalas e dos estames. Se a regulação de genes do grupo B em Meliaceae atua na mesma via, a expressão do RNA mensageiro no quarto verticilo pode ser funcionalmente irrelevante. Do mesmo modo, a expressão de genes “*PI-like*” em primórdios de carpelo foi relatada em gramíneas (Münster *et al.*, 2001), mas os genes “*AP3-like*” em milho (*SILKY1*) e arroz (*OSMADS16*) não são expressos nos primórdios de carpelos (Moon *et al.*, 1999; Ambrose *et al.*, 2000).

Recentemente, genes similares aos genes da função B foram identificados em gimnospermas (*GGM13*) e em angiospermas (*ZMM17*) e denominados “B-sister” (Bs) (Becker *et al.*, 2000; Becker & Theissen, 2003). Reconstruções filogenéticas sugerem que as linhagens de genes B e Bs foram geradas por um evento de duplicação gênica na linhagem que levou à formação de plantas com semente, aproximadamente 300 a 400 milhões de anos atrás. Ainda mais importante, em contraste aos genes da função B que são expressos predominantemente nos órgãos reprodutivos masculinos, os genes Bs são expressos principalmente em órgãos reprodutivos femininos, ou seja, nos óvulos das plantas com semente e nos carpelos das angiospermas (Becker & Theissen 2003).

A expressão do último ancestral comum de genes B e Bs pode ter ocorrido em ambos os tipos de órgãos florais, ou mesmo no precursor homospórico dos microsporófitos (masculino) e megasporófitos (feminino), de tal forma que a expressão de alguns genes, restrita a órgãos masculinos ou femininos, tenha ocorrido posteriormente durante a evolução dos genes B e Bs. Assim, a expressão precoce de alguns genes de B em órgãos femininos durante o desenvolvimento das flores de *Meliaceae* pode ser uma característica ancestral mantida. Pela sua origem evolucionária a partir de um único órgão, estames e carpelos podem ter uma relação genético-molecular na regulação gênica, de modo que a evolução de elementos regulatórios (tanto fatores cis, como trans) específicos para órgãos masculinos ou femininos pode ser difícil de ser eliminada durante a evolução (Münster *et al.*, 2001; Becker & Theissen 2003). A aquisição de um controle tão rígido pode ter sido suficiente para genes “*PI-like*” ou “*AP3-like*”, já que a heterodimerização obrigatória ocorreu, e uma vez envolvida, garantiria a co-regulação entre esses genes. Em contraste à situação em *Arabidopsis* e

Antirrhinum, onde a heterodimerização das proteínas “*PI-like*” e “*AP3-like*” parece ser obrigatória na ligação com o DNA e outras funções, algumas proteínas B em gimnospermas (GGM2) e em monocotiledôneas (LRGLOA, LRGLOB), se ligam especificamente em seqüências-motivo CArG-box (“CArG-box motifs”) no DNA, também como homodímeros (Münster *et al.*, 2001; Becker & Theisse, 2003).

Além disso, não é possível excluir a possibilidade de que proteínas “*AP3-like*” em Meliaceae possam interagir com outros elementos de dimerização, além de proteínas “*PI-like*” em primórdios de carpelos. É, portanto, concebível que proteínas “*AP3-like*” possam ter uma função no quarto verticilo das flores em Meliaceae, especialmente naqueles taxa onde flores masculinas se formam e há a ocorrência de atrofia na formação de órgãos femininos. Tem-se observado que a expressão ectópica de genes da função B em órgãos do quarto verticilo promove a masculinização das flores, pela atrofia dos órgãos femininos em espécies tão divergentes como *Arabidopsis* e *Petunia* (Sakay *et al.*, 1995; Nakagawa, 2004). Desta forma, como é muito difícil de se definir se flores funcionalmente masculinas, ou femininas, se formariam nos meristemas florais coletados para os experimentos de hibridização *in situ*, não se pode excluir a possibilidade de que a expressão de genes da classe B observada no presente estudo, seja responsável pela diferenciação de flor masculina, ou feminina, em Meliaceae. De qualquer forma, a provável expressão conservada do gene da classe B nos primórdios dos carpelos, documentada aqui para o homólogo de “*AP3-like*” em Meliaceae é importante, necessitando de maiores estudos.

4.4.3. Padrões de expressão dos homólogos do Grupo-C (*AGAMOUS*) em *Meliaceae*.

O sinal de hibridização dos homólogos de *AG* em *Meliaceae* foi detectado primeiramente no meristema floral ainda sem padrão determinado (estágio 2) em *S. macrophylla* (Figura 23), e com expressão fraca em meristemas no estágio 2 em *M. azedarach* (Figura 25). Para todos os outros taxa, o RNA homólogo do *AG* foi detectado primeiramente na região central apical do meristema floral no final do estágio 3 (Figuras 20-22, 24 e 26). Com a diferenciação dos órgãos florais, RNA de *AG* foi detectado em todo o primórdio do órgão no terceiro e quarto verticilos, onde se desenvolvem estames e carpelos, respectivamente, mas não nos dois verticilos exteriores, correspondentes às sépalas e pétalas. Em estágios posteriores do desenvolvimento floral, *AG* continuou a ser expresso nos órgãos do terceiro e quarto verticilos. Um sinal consistente do RNA de *AG* foi observado na epiderme, especialmente no lado abaxial, dos órgãos florais de *C. fissilis* e *C. odorata* (Figuras 20 e 21, respectivamente). Posteriormente, durante o desenvolvimento da flor, o sinal do RNA de *AG* foi observado também na região da chalaza e no nucelo do primórdio do óvulo em desenvolvimento em *C. fissilis* (Figura 20), mas o sinal não foi observado na possível célula mãe do megásporo (Figura 20).

Os padrões de expressão dos genes de identidade do órgão floral da classe C foram cuidadosamente documentados nas plantas-modelo *Arabidopsis* e *Antirrhinum* (Bowman *et al.*, 1991; Deyholos & Sieburth, 2000). No início do desenvolvimento da flor, o RNA mensageiro de homólogos do gene *AG* é detectado primeiramente na região apical e central no final do estágio 3 de desenvolvimento do meristema floral em *Arabidopsis*. Enquanto os órgãos se desenvolvem, *AG* continua se

expressando nos primórdios dos órgãos no terceiro e quarto verticilos, onde se formam os estames e os carpelos, respectivamente, mas não nos dois verticilos externos, onde se formam as sépalas e as pétalas. Com a continuação do desenvolvimento dos órgãos florais, AG continua a ser expresso nos órgãos do terceiro e quarto verticilos. Posteriormente, durante o desenvolvimento da flor, o RNA mensageiro de AG é encontrado somente em tipos específicos de células como nos primórdios do óvulo (Bowman *et al.*, 1991). Os padrões de expressão descritos aqui para os taxa de Meliaceae estudados, são consistentes com estes observados para *Arabidopsis*. Há um consenso geral na literatura de que este padrão de expressão é altamente conservado entre as eudicotiledôneas e parece ser conservado, pelo menos parcialmente, entre as plantas com semente (Becker & Theissen, 2003).

Há quatro genes “AG-like” no genoma de *Arabidopsis*; AG, AGL11, SHATTER-PROOF1 (SHP1), e SHP2 (Yanofsky *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995). AG foi o primeiro gene floral homeótico da classe C a ser clonado (Yanofsky *et al.*, 1990). Assim como outros membros deste grupo, como PLENA de *Antirrhinum* (Bradley *et al.*, 1993), além de sua participação na especificação da identidade do estame e do carpelo, AG atua também na determinação do meristema floral. Os genes SHP1 e SHP2, anteriormente conhecidos como AGL1 e AGL5, respectivamente, codificam as proteínas funcionalmente redundantes que são necessárias para o desenvolvimento adequado da zona deiscente do fruto de *Arabidopsis* (Liljegren *et al.*, 2000). O gene AGL11 parece ser ortólogo dos genes homeóticos florais FBP7 e FBP11 (FLORAL BINDING PROTEIN), pertencentes à classe D em petúnia (*P. hybrida*), que são genes fundamentais no controle da identidade do óvulo (Angenent & Colombo, 1996). Nessa mesma linha, estes genes são expressos

principalmente nos óvulos em desenvolvimento, do mesmo modo que *AGL11*, e este, aparentemente, está envolvido na especificação da identidade do óvulo (Becker & Theissen, 2003). Embora existam genes “*AG-like*” específicos para óvulo ou carpelo tanto em eudicotiledôneas como em monocotiledôneas (Theissen *et al.*, 1995; Lopez-Dee *et al.*, 1999), reconstruções filogenéticas sugerem que esses genes não são monofiléticos, mas que tais genes foram perdidos e re-estabelecidos na linhagem que conduziu ao aparecimento das monocotiledôneas.

Membros da clade de genes “*AG-like*” foram encontrados em todos os principais grupos de plantas com semente, mas não em plantas sem semente como os musgos e as samambaias (Theissen *et al.*, 2000), sugerindo que esta clade de genes foi estabelecida entre 300 e 400 milhões de anos atrás. Nos diversos grupos de gimnospermas, genes “*AG-like*” são expressos nos órgãos reprodutivos masculinos e femininos (Tandre *et al.*, 1995, 1998; Rutledge *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999), podendo representar o estado ancestral de expressão do gene. Propõe-se que a função ancestral desses genes pode ser a especificação de órgãos reprodutivos (ambos masculinos ou femininos) e a distinção desses órgãos daqueles não reprodutivos (Winter *et al.*, 1999). Desta forma, a expressão dos padrões observados para os homólogos de *AG* em *Meliaceae* foi similar àquela observada para outras angiospermas.

Surpreendentemente, os genes da classe A não são os únicos expressos durante o desenvolvimento das sépalas em *Meliaceae*. Da mesma forma, tem-se relatado que alguns dos genes das classes B e C também se expressam nas sépalas (Becker & Theissen, 2003; Vandenbusshe *et al.*, 2003). Embora a expressão de *AG* seja baixa nas sépalas, comparada com a sua expressão nos verticilos três e quatro (Mizukami & Ma, 1992), expressão simultânea de genes das classes A e C não deveria

ser possível, de acordo com Drews *et al.* (1991). Diversos genes da classe B de *Petunia* e *Antirrhinum*, os quais apresentam um papel central no estabelecimento do modelo ABC, parecem ser transcritos nas sépalas. Tais observações indicam que mesmo em plantas modelo, o modelo ABC (Coen & Meyerowitz, 1991; Meyerowitz *et al.*, 1991) é insuficiente para descrever inteiramente o desenvolvimento da flor. Entretanto, a identidade das sépalas não parece ser dependente da expressão do gene da classe C em Meliaceae.

A expressão de homólogos MADS-box de *APETALA1* de Meliaceae em estames diverge do modelo ABC. De acordo com o modelo, a identidade do estame é definida pela transcrição simultânea de genes das classes B e C. Genes da classe A não devem ser transcritos no terceiro verticilo. Entretanto, todas as sete espécies de Meliaceae estudadas, apresentaram o sinal de transcrição do homólogo de *AP1* nos estames. Discrepâncias entre as observações aqui apresentadas e o proposto pelo modelo ABC tornam-se mais aparentes quando analisamos os genes transcritos nos carpelos. Neste verticilo, o modelo ABC prevê que somente genes da classe C devem ser transcritos, entretanto, todas as sete espécies de Meliaceae estudadas, mostraram o sinal de transcrição do homólogo da classe A nos carpelos. A expressão de genes das classes A e B nos carpelos não pode, portanto, ser considerada como um padrão anormal de transcrição em Meliaceae. Recentemente, relatou-se que os únicos genes da classe A não transcritos nos carpelos são os genes *CAL* e *AP1* de *Arabidopsis* (Becker & Theissen, 2003). Portanto, aparentemente, a principal planta-modelo do modelo ABC (*Arabidopsis*), parece ser aquela que apresenta um padrão anormal.

O modelo ABC não sugere explicitamente quais genes MADS-box são expressos no óvulo. Entretanto, outro modelo elaborado a partir do ABC, o modelo

ABCD, reconhece *FBP11* e *FBP7* como genes de identidade do óvulo (Colombo *et al.*, 1995). Não é provável que genes que pertençam à mesma clade de *FBP11*, sozinhos sejam responsáveis pela determinação do óvulo, já que apenas os genes *AGL8*, *EgrGM3*, *AGL17*, e os genes pertencentes à clade *JOINTLESS* não são transcritos no óvulo (Johansen *et al.*, 2002; Becker & Theissen, 2003). No total, 34 genes representando todas as principais clades filogeneticamente foram relatados como tendo sido transcritos no óvulo (Becker & Theissen, 2003). Conseqüentemente, a expressão no óvulo, e provavelmente a determinação da identidade do óvulo, não são restritas a um único grupo de genes.

O resultado surpreendente é que a maioria dos homólogos de Meliaceae dos genes das classes A, B, e C descritos aqui, contradizendo o modelo ABC, são todos transcritos nos estames e nos carpelos. A principal razão para esta discrepância poderia ser que o modelo é baseado apenas em *Arabidopsis*. Conseqüentemente, estudos realizados em plantas de *Arabidopsis* transformadas geneticamente, em que os genes MADS-box de outras espécies são introduzidos no genoma desta planta, são de pouco valor, porque não se sabe se a função desses genes em *Arabidopsis* é a mesma no organismo doador desses genes.

A complexa relação entre o genótipo e o fenótipo de um organismo representa um dos maiores desafios da biologia, especialmente quando consideradas em termos de dimensões evolucionárias. Todos os resultados apresentados aqui, para alguns taxa de Meliaceae, indicam que estudos sobre os padrões de expressão de genes da família MADS-box, no contexto filogenético, podem contribuir consideravelmente para uma melhor compreensão das relações entre a filogenia dos

genótipos e a evolução dos fenótipos, e assim à origem de novidades evolucionárias e à biodiversidade das plantas.

5. CONCLUSÕES

O estudo morfo-anatômico do desenvolvimento floral em Meliaceae com o uso de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica, permitiu a caracterização do desenvolvimento dos verticilos florais e a determinação de estágios arbitrários do desenvolvimento reprodutivo das espécies estudadas. Esta caracterização auxiliou a descrição do padrão de expressão de homólogos de Meliaceae dos genes do modelo ABC.

Identificaram-se flores funcionalmente masculinas ou femininas em *S. macrophylla*, *C. fissilis*, *C. odorata* e *T. ciliata*. Em *G. guidonea* e *T. clausenii* o dimorfismo sexual não foi observado.

Detectou-se uma variação merística no segundo e terceiro verticilos de *G. guidonea*. Nas demais espécies, esta variação não foi constatada.

O estudo do padrão de expressão dos genes do modelo ABC em Meliaceae indicou a existência de discrepâncias, em relação ao previsto pelo modelo teórico. Os homólogos de *AP1* expressaram-se por todo o meristema floral em estágios iniciais do desenvolvimento, em todas as espécies estudadas, concentrando-se, posteriormente, nos primórdios de sépalas e pétalas, como proposto pelo modelo ABC.

Porém observaram-se também sinais de hibridização no terceiro e quarto verticilos, onde a expressão de homólogos de *AP1* não é usual.

A expressão dos homólogos de *AP3* nas espécies de Meliaceae estudadas mostrou-se parcialmente conservada, e um sinal forte de hibridização foi detectado no segundo e terceiro verticilos, em vários estágios de desenvolvimento. No entanto, um fraco sinal de hibridização foi igualmente observado no quarto verticilo floral, onde a expressão de homólogos de *AP3* não é prevista pelo modelo teórico.

O padrão de expressão dos homólogos do gene *AG* foi o mais concordante com as predições do modelo ABC. O sinal da expressão concentrou-se no terceiro e quarto verticilos florais para a maioria das espécies, porém para *C. fissilis*, *C. odorata* e *T. ciliata* este sinal foi também detectado na face abaxial das sépalas e pétalas em estágios mais avançados de desenvolvimento. Os homólogos dos genes *AP1*, *AP3* e *AG* de Meliaceae apresentaram variações em seu padrão de expressão em relação ao proposto pelo modelo ABC, apesar do sinal de expressão ter sido detectado nas regiões esperadas de atuação de cada gene.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGALEIL, S.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T., SATO, A.; MIYAHARA, I.; DOE, M.; NAKATINI, M. Khayanolides, rearranged phragmalin limonoid antifeedants from *Kraya senegalensis*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 57, p. 119-126, 2001.

ABOUTABL, E. A.; EI-SAKHAWY, F. S.; FATHY, M. M.; MEGID, R. M. Composition and antimicrobial activity of the leaf and fruit oils from *Amoora rohituka* Wight et Arn. **Journal of Essential Oil Research**, Oregon, v. 12, p. 635-638, 2000.

ALBERT, V. A.; GUSTAFSSON, M. H. G.; DILAURENZIO, L. Ontogenetic systematics, molecular developmental genetics, and the angiosperm petal. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998, p. 349-374.

AMBROSE, B. A.; LERNER, D. R.; CICERI, P.; PADILHA, C. M.; YANOFSKY, M. F.; SCHMIDT, R. J. Molecular and genetic analyses of the *SILKY1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 5, p. 569-579, 2000.

ANGENENT, G. C.; COLOMBO, L. Molecular control of ovule development. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, p. 228-232, 1996.

BAMBA, F. A.; VANHAELEN, F. R.; VANHAELEN, M. L. O. I.; TOPPET, M.; FESTER, A.; FONDU, P. *In vitro* antisickling activity of a rearranged limonoid isolated from *Khaya senegalensis*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, p. 209-212, 1999.

BAUM, D. A. The evolution of plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 79-86, 1998.

BECKER, A.; WINTER, K. U.; MEYER, B.; SEADLER, H.; THEISSEN, G. MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, p.1425-1434, 2000.

BECKER . A.; THIESSEN, G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 29, p. 464-489, 2003.

BENENCIA, F.; COURREGES, M. C.; COULOMBIE, F. C. *In vivo* and *in vitro* immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 69, p. 199-205, 2000.

BENOSMAN, A.; RICHOMME, P.; ROUSSAKS, C.; SEVENET, T.; HADI, A.; BRUNETON, J. Effects os triterpenes from the stem bark of *Dysoxylum cauliflorum* on a

nom-small-cell bronchopulmonary carcinoma cell line. **Anticancer Research**, Attiki, GR, v. 20, p. 1855-1859, 2000.

BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN, A.; LEJEUNE, P. Physiological signals that induce flowering. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1147-1155, 1993.

BRADLEY, D.; CARPENTER, R.; SOMMER, H.; HARTLEY, N.; COEN, E. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *PLENA* locus of *Antirrhinum*. **Cell**, Cambridge, v. 72, p. 85-95, 1993.

BOWMAN, J. L.; SMYTH, D. R.; MEYEROWITZ, E. M. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 1, p. 37-52, 1989.

BOWMAN, J. L.; DREWS, G. N.; MEYEROWITZ, E. M. Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 749–758, 1991.

CARLSBECKER, A.; SUNDSTROM, J.; TANDRE, K.; ENGLUND, M.; KVARNHEDEN, A.; JOHANSON, U.; ENGSTROM, P. The *DALL10* gene from Norway spruce (*Picea abies*) belongs to a potentially gymnosperm-specific subclass of MADS-box genes and is specifically active in seed cones and pollen cones. **Evolution Development**, Bloomington, v. 5, n. 6, p. 551–561, 2003.

COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, London, v. 353, p. 31-37, 1991.

COLOMBO, L.; FRANKEN, J.; KOETJE, E.; VANVENT, J. J. J.; DONS, H. J. M.; ARGENENT, G. C.; VANTUNEN, A. J. The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1859-1868, 1995.

COUPLAND, G. Flower development. *LEAFY* blooms in aspen. **Nature**, London, v. 377, p. 482-483, 1995.

COUTO, J. M. F. **Germinação e morfogênese *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2002. 60 f. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

CUCO, S.; BANDEL, G. Hermaphroditism in the rubber tree *Hevea brasiliensis* (Wild. Ex Adr. De Juss) Muel. Arg. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 523-526, 1998.

DAVIES, B.; EGEE-CORTINES, M.; SILVA, A. E.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. Multiple interactions among floral homeotic MADS box proteins. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, p. 4330-4343, 1996.

DEZAR, C. A.; TIONI, M. F.; GONZALES, D. H.; CHAN, R. L. Identification of three MADS-box genes expressed in sunflower capitulum. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 387, p. 1637-1639, 2003.

DEYHOLOS, M. K.; SIEBURTH, L. E. Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 1799-1810, 2000.

DORNELAS, M. C.; WITTICH, P.; VON RECKLINGHAUSEN, I.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; KREIS, M. Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 137-147, 1999.

DREWS, G. N.; WEIGEL, D.; MEYEROWITZ, E. M. Floral patterning. **Current Opinion in Genetics and Development**, Philadelphia. 1, p. 174-8, 1991.

ENGELMEIER, D.; HADACEK, F.; PACHER, T.; VAJRODAYA, S.; GREGER, H. Cyclopenta [b] benzofurans from *Aglaia* species with pronounced antifungal activity against rice blast fungus (*Pyricularia grisea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 1400-1404, 2000.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 55, n. 1, p. 123–142, 1968.

FERRARIO, S.; IMMINK, R. G.; ANGENENT, G. C. Conservation and diversity in flower land. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 84-91, 2004.

FERRARIO, S.; IMMINK, R. G.; SHCHENNIKOVA, A.; LANGE, J. B.; ANGENENT, G. C. The MADS box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in *Petunia*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 914-925, 2003.

FOLTER, S.; IMMINK, R. G. H.; KIEFFER, M.; PARENICOVÁ, L.; HENZ, S. R.; WEIGEL, D.; BUSSCHER, M.; KOOIKER, M.; COLOMBO, L.; KATER, M.; DAVIES, B.; ANGENENT, G. C. Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box Transcription Factors. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 1424-1433, 2005.

FUKUI, M.; FUTAMURA, N.; MUKAI, Y.; NAGAO, A.; SHINOHARA, K. Ancestral MADS box genes in Sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don (Taxodiaceae), homologous to the B function genes in angiosperms. **Plant and Cell Physiology**, Tohyo, v. 45, p. 566-575, 2001.

GANDARA, F. B. M. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas, Campinas, 1996.

GASPARETTO, O. **Síntese da situação do Mogno, a nível internacional**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 1998. (Relatório Informativo, 1-98).

GOLOVKIN, M.; REDDY, A. S. Expression of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70K antisense transcript using *APETALA 3* promoter supresses the development of sepals and petals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1884-1891, 2003.

GOVINDACHARI, T. T.; SURESH, G.; BANUMATHY, B.; MASILALAMI, S.; GOPALAKRISHNAM, G.; KRISHNA, K. G. N. Antifungal activity of some B,D-seco limonoids from two meliaceous plants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, p. 923-933, 1999.

GOTO, K.; MEYEROWITZ, E. M. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. **Genes and Development**, New York, v. 8, 1548-1560, 1994.

GREGER, H.; PACHER, T.; BREM, B.; BACHER, M.; HOFER, O. Insecticidal flavaglines and other compounds from Fijian *Aglaia* species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 57-64, 2001.

GUO, H.; YANG, H.; MOCKLER, T. C.; LIN, C. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. **Science**, Washington, v. 279, p. 1360-1363, 1998.

HART, J. K.; HANNAPEL, D. J. *In situ* hybridization of the MADS-box gene *POTM1* during potato floral development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 368, p. 465–471, 2002.

HONG, R. L.; HAMAGUCHI, L.; BUSCH, M. A.; WEIGEL, D. Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic foot printing and shadowing. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, n. 6, p. 1296-1309, 2003.

HONMA, T.; GOTO, K. Complexes of Mads-box proteins sufficient to convert leaves into floral organs. **Nature**, London, v. 409, p. 525-529, 2001.

HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley, 1995. 464p.

HUIJSER, P.; KLEIN, J.; LONNING, W. E.; MEIJER, H.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *SQUAMOSA* in *Antirrhinum majus*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, p. 1239–1249, 1992.

IRISH, V. F. Patterning the flower. **Developmental Biology**, New York, v. 209, p. 211-220, 1999.

JACK, T.; BROCKMAN, L. L.; MEYEROWITZ, E. M. The homeotic gene *APETALA 3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. **Cell**, Cambridge, v. 68, p. 683-651, 1992.

JACKSON, D. ***In situ* hybridisation in plants**. Molecular Plant Pathology: A Practical Approach. Disponível em: <<http://www.cco.caltech.edu/~plantlab/index.html>>. Acesso em: novembro 2004.

JAGER, M.; HASSANIN, A.; MANUEL, M.; GUYADER, H. L.; DEUTSCH, J. MADS-box genes in *Ginkgo biloba* and the evolution of the *AGAMOUS* family. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, v. 5, p. 842–854, 2003.

JOHANSEN, B.; PEDERSEN, L. B.; SKIPPER, M.; FREDERIKSEN, S. MADS-box gene evolution-structure and transcription patterns. **Molecular Phylogenetics Evolution**, San Diego, v. 23, n. 3, p. 458-480, 2002.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics**. A phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 464p.

KANG, H. G.; JEON, J. S.; LEE, S.; AN, G. Identification of class B and class C floral organ identify genes from rice plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 1021-1029, 1998.

KATER, M. M.; COLOMBO, L.; FRANKEN, J.; BUSSCHER, M.; MASIERO, S.; VAN LOOKEREN-CAMPAGNE, M.; ANGENENT, G.C. Multiple *AGAMOUS* homologs from cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 171-182, 1998.

KEMPIN, S. A.; SAVIDGE, B.; YANOFSKY, M. F. Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. **Science**, Washington v. 267, p. 522-525, 1995.

KOORNNEEF, M.; HANHART, C. J.; VAN DER VEEN, J. H. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 229, p. 57-66, 1991.

KRAMER, E. M.; DORIT, R. L.; IRISH, V. F. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA 3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. **Genetics**, Bethesda, v. 149, p. 765-783, 1998.

KRAMER E. M.; IRISH, V. F. Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. **Nature**, London, v. 399, p. 144-148, 1999.

KUMAR, S.; GOPAL, K. S. Screening of plant species for inhibition of bacterial population of raw water. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v. 34, p. 975-987, 1999.

LAWTON-RAUCH, A. L.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; PURUGGANAN, M. D. Molecular evolution of flower development. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 15, p. 144-149, 2000.

LILJEGREN, S. J.; DITTA, G. S.; ESHED, Y.; SAVIDGE, B.; BOWMAN, J. L.; YANOFSKY, M. F. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 404, p. 766-770, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 368p.

LOPEZ-DEE, Z. P.; WITTICH, P.; ENRICO, P. E. M.; RIGOLA, D.; Del BUONO, I.; GORLA, M. S.; KATER, M. M.; COLOMBO, L. *OsMADS13*, a novel rice MADS-box gene expressed during ovule development. **Development and Genetics**, Bethesda, v. 25, n. 3, p. 237-244, 1999.

MA, H.; YANOFSKY, M. F.; MEYEROWITZ, E. M. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. **Genes and Development**, Woodbury, v. 5, p. 484-495, 1991.

MABBERLEY, D. J.; PANNELL, C. M.; SING, A. M. Meliaceae. **Flora Malesiana Series I**, Leiden, n. 12, p. 1-407, 1995.

MANDEL, M. A.; GUSTAFSON-BROWN, C.; SAVIGE, B.; YANOFSKY, M. F. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA 1*. **Nature**, London, v. 360, p. 273-277, 1992.

MANDEL, M. A.; YANOFSKY, M. F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 377, p. 522-524, 1995.

MENA, M.; AMBROSE, B. A.; MEELEY, R. B.; BRIGGS, S. P.; YANOFSKY, M. F.; SCHMIDT, R. J. Diversification of C-function activity in maize flower development. **Science**, Washington, v. 274, p. 1537-1540, 1998.

MESSENGUY, F.; DUBOIS, E. Role of MADS-box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. **Gene**, Amsterdam, v. 316, p. 1-21, 2003.

MEYEROWITZ, E. M.; BOWMAN, J. L.; BROCKMAN, L. L.; DREWS, G. N.; JACK, T.; SIEBURTH, L. E.; WEIGEL, D. A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. **Development Supplement**, Cambridge, v. 1, p. 157-167, 1991.

MIZUKAMI, Y.; MA, H. Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. **Cell**, Cambridge, v. 71, p. 119-131, 1992.

MOON, Y.; JEON, J. S.; SUNG, S. K.; AN, S. Determination of the motif responsible for interaction between the rice *APETALA1/ AGAMOUS-LIKE* family proteins using a yeast two-hybrid system. **Plant physiology**, Rockville, v. 120, p. 1193-1204, 1999.

MOURADOV, A.; HAMDORF, B. D.; TEASDALE, J. T.; WINTER, K. U.; THEISSEN, G. A *DEF/GLO-like* MADS-box gene from a gymnosperm; *Pinus radiata* contains a ortholog of angiosperm B class floral homeotic genes. **Developmental Genetics**, New York, n. 25, p. 245-252, 1999.

MUELLNER, A. N.; SAMUEL, R.; JOHNSON, S. A.; CHEEK, M.; PENNINGTON, T. D.; CHASE, M. W. Molecular Phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, New York, v. 90, n. 3, p. 471-480, 2003.

MÜNSTER, T.; DELEU, W.; WINGEN, L. U.; OUZUNOVA, M.; CACHARRON, J.; FAIGL, W.; WERTH, S.; KIM, J. T. T.; SAEDLER, H.; THEISSEN, G. Maize MADS-box genes galore. **MAYDICA**, Bergamo, v. 47, p. 287-301, 2002.

NAKAGAWA H.; FERRARO, S.; ANGENENT, G.; KOBAYASHI, A.; TAKATSUJI, H. The *Petunia* ortholog of *Arabidopsis SUPERMAN* plays a distinct role in floral organ morphogenesis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 920-932, 2004.

NG, M.; YANOFSKY, M. F. Three ways to learn the ABCs. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 1, p. 47-52, 2000.

PARCY, F.; NILSSON, O.; BUSCH, M. A.; LEE, I.; WEIGEL, D. A genetic framework for floral patterning. **Nature**, London, v. 395, p. 561-566, 1998.

PELAZ, S.; DITTA, G. S.; BAUMANN, E.; WISMAN, E.; YANOSFSKY, M. F. B and C floral identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. **Nature**, London, v. 405, p. 200-203, 2000.

PENNINGTON, J. D.; STYLES, B. T. A serotaxonomic appraisal of Amphipterygium and leitneria: Two amentiferous taxa of Rutiflorae (Rosidae). **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 8, p. 134-148, 1975.

POETHIG, R. S. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. **Science**, Washington, v. 250, p. 923-930, 1991.

PURUGGANAN, M. D.; ROUNSLEY, S. D.; SCHMIDT, R. J.; YANOFSKY, M. F. Molecular evolution of flower development: Diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. **Genetics**, Bethesda, v. 140, p. 345-356, 1995.

PRASAD, K.; SRIRAM, P.; KUMAR, S.; KUSHALAPPA, K.; VIJAYRAGHAVAN, U. Ectopic expression of rice *OsMADS1* reveals a role in specifying the lemma and palea, grass floral organs analogous to sepals. **Development Genes and Evolution**, Berlin, v. 211, p. 281–290, 2001.

RIECHMANN, J. L.; KRIZEK, B. A.; MEYEROWITZ, E. M. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA 1, APETALA 3, PISTILLATA,

and AGAMOUS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, p. 4793–4798, 1996.

RIZZINI, C. T. **Plantas do Brasil**. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia Brasileira. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1971. 294 p.

RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, Leipzig, v. 204, n. 1-2, p. 71-83, 1998.

ROUNSLEY, S. D.; DITTA, G. S.; YANOFSKY, M. F. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1259-1269, 1995.

RUTLEDGE, R.; REGAN, S.; NICOLAS, O.; FOBERT, P.; COTÉ, C.; BOSNICH, W.; KAUFFELDT, C.; SUNOHARA, G.; SÉGUIN, A.; STEWART, D. Characterization of an AGAMOUS homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 15, p. 625–634, 1998.

SAEDLER, H.; BECHER, A.; WINTER, K.; KIRCHNER, C.; THEISSEN, G. MADS-box genes are involved in floral development and evolution. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 48, n. 2, p. 351–358, 2001.

SAKAY, H.; MEDRANO, L. J.; MEYEROWITZ, E. M. Role of *SUPERMAN* in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. **Nature**, London, v. 378, p. 199–203, 1995.

SAMACH, A.; KOHALMI, S. E.; MOTTE, P.; DATLA, R.; HAUGHN, G. W. Divergence of function and regulation of class B floral organ identity genes. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 559-570, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITISCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. Plainview: CHS Laboratory Press, 1989.

SCHNEIDER, C.; BOHNENSTENGEL, F. I.; NUGROHO, B. W.; WRAY, V.; WITTE, L.; HUNG, P. D.; KIET, L. C.; PROKSCH, P. Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia spectabilis* (Meliaceae). **Phytochemistry**, Oxford, v. 54, p. 731-736, 2000.

SCHULTZ, E. A.; HAUGHN, G. W. Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. **Development**, Washington, v. 119, p. 745-765, 1993.

SCHWARS-SOMMER, Z.; HUE, I.; HUIJSER, P.; FLOR, P.; HANSEN, R.; TETENS, F.; LONNING, W.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: Evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, p. 251-263, 1992.

SCHMIDT, R. J.; AMBROSE, B. A. The blooming of grass flower development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 60-67, 1998.

SMYTH, D. R.; BOWMAN, J. L.; MEYEROWITZ, E. M. Early flower development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 2, p. 755-767, 1990.

SIMMONDS, M. S. J.; STEVENSON, P. C.; PORTER, E. A.; VEITCH, N. C. Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 64, p. 1117-1120, 2001.

SINGH, A. K.; SINGH, M. Antiviral activity and physical properties of the extracts of *Azadirachta indica* L. **Indian Journal of Virology**, Hisar-Haryana, v. 4, p. 76-81, 1988.

SOMMER, H.; BELTRAN, J. P.; HUIJSER, P.; PAPE, H.; LONNING, W. E.; SAEDLER, H.; SCHWARZ-SOMMER, Z. *DEFICIENS*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. **EMBO Journal**, Oxford, v. 9, p. 605–613, 1990.

STYLES, B. T. The flower biology of the Meliaceae and its bearing on tree breeding. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 21, n. 5, p. 149-204, 1972.

SUNDSTRÖM, J.; CARLSBECKER, A.; SVENSSON, M. E.; SVENSON, M.; JOHANSEN, J.; THIESSEM, G.; ENGSTRÖN, P. MADS-box genes active in developing pollen cones of Norway spruce are homologous to B-class floral homeotic genes in angiosperms. **Development and Genetics**, v. 25, p. 253-266, 1999.

TANDRE, K.; ALBERT, V.; SUNDAS, A.; ENGSTROM, P. Conifer homologs to genes that control floral development in angiosperms. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, p. 69-78, 1995.

TANDRE, K.; SVENSON, M.; SVENSON, M. E.; ENGSTROM, P. Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. **Plant Journal**, Oxford, v. 15, p. 615-623, 1998.

THEISSEN, G; SAEDLER, H. MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's "biogenetic law" revisited. **Current Opinion Genetics and Development**, Philadelphia, v. 5, p. 628-639, 1995.

THEISSEN, G.; KIM, J. T.; SAEDLER, H. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.43, n. 5, p. 484-516, 1996.

THEISSEN, G.; BECKER, A.; DI ROSA, A.; KANNO, A.; KIM, J. T.; MÜNSTER, T.; WINTER, K. U.; SAEDLER, H. A short history of MADS-box genes in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 115-149, 2000.

THEISSEN, G. Evolutionary developmental genetics of floral symmetry: the revealing power of Linnaeus' monstrous flower. **Bioessays**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 209-213, 2000.

THEISSEN, G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 4, p. 75–85, 2001.

THEISSEN, G.; SAEDLER, H. Plant biology: floral quartets. **Nature**, London, v. 409, p. 469-471, 2001.

TRÖBNER, R.; RAMIREZ, L.; MOTTE, P.; HUE, I.; HUIJSER, P.; LONNING, W. E.; SAEDLER, H.; SOMMER, H.; SCHWARZ-SOMMER, Z. *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, p. 4693–4704, 1992.

VALLADARES, G. R.; FERREYRA D.; DEFACO, M. T.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. Effects os *Melia azedarach* on *Triotoma infestans*. **Fitoterapia**, Milano, v. 70, p. 421-424, 1999.

VANDENBUSSHE, M.; THEISSENN, G.; VAN DE PEER, Y.; GERATS, T. Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, p. 4401-4409, 2003.

ZAHN, L. M.; LEEBENS-MACK, J.; DePAMPHILIS, C. W.; MA, H.; THEISSEN, G. To B or not to B a flower: The role of *DEFICIENS* and *GLOBOSA* orthologs in the evolution of the angiosperms. **Journal of Heredity**, Washington, v. 96, n. 3, p. 225-240, 2005.

WAGNER, W. L.; SOHMER, H.; SOHMER, S. H. **Manual of the flowering plants of Hawaii**. Revised edition. Honolulu: University of Hawaii Press, 1999. 920p.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants**: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version 2000. Disponível em: <<http://biodiversity.uno.edu/delta/>>. Acesso em: maio 2001.

WEIGEL, D.; ALVAREZ, J.; SMYTH, D. R.; YANOFSKY, M. F.; MEYEROWITZ, E. M. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. **Cell**, Cambridge, v. 69, p. 843-859, 1992.

WEIGEL, D.; MEYEROWITZ, E. M. The ABCs of floral homeotic genes. **Cell**, Cambridge, v. 78, p. 203-209, 1994.

WEIGEL, D. The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 29, p. 19-39, 1995.

WINTER, K. U.; BECKER, T.; MÜNSTER, T. K.; SAEDLER, H.; THEISSEN, G. MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to coniferous than to flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 7342-7347, 1999.

WINTER, K. U.; SAEDLER, H.; THEISSEN, G. On the origin of class B floral homeotic genes: functional substitution and dominant inhibition in *Arabidopsis* by expression of an orthologue from the gymnosperm *Gnetum*. **Plant Journal**, Oxford, v. 31, p. 457 – 475, 2002a.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilia* Zuccarini.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 99, n. 4, p. 2038-2042, 2002.

YANOFSKY, M. F.; MA, H.; BOWMAN, J. L.; DREWS, G. N.; FELDMANN, K. A.; MEYEROWITZ, E. M. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcriptional factors. **Nature**, London, v. 346, p. 35-39, 1990.