



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
Museu Nacional  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

**Estrutura e desenvolvimento das flores  
de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae):  
Subsídios para estudos de filogenia e sistema sexual**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isabella Veríssimo Nader Haddad

Orientadoras: Dra. Lygia Dolores R. S. Fernandes  
Dra. Heloisa Alves de Lima

Rio de Janeiro  
2011

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Museu Nacional

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DAS FLORES  
DE *Maytenus obtusifolia* MART. (CELASTRACEAE):  
SUBSÍDIOS PARA ESTUDOS DE FILOGENIA E SISTEMA SEXUAL

Orientadoras: Dra. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes  
Dra. Heloísa Alves de Lima Carvalho

Isabella Veríssimo Nader Haddad

2011

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Museu Nacional

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DAS FLORES  
DE *Maytenus obtusifolia* MART. (CELASTRACEAE): SUBSÍDIOS PARA  
ESTUDOS DE FILOGENIA E SISTEMA SEXUAL

Isabella Veríssimo Nader Haddad

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

Orientadoras: Dra. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes  
Dra. Heloísa Alves de Lima Carvalho

Rio de Janeiro

2011

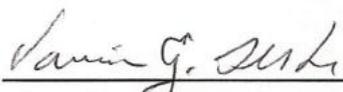
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Museu Nacional

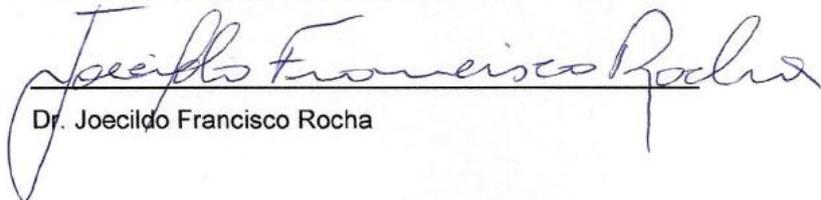
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre.

**Aprovada por:**



Dra. Vânia Gonçalves Lourenço Esteves



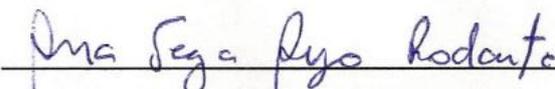
Dr. Joecildo Francisco Rocha

Dra. Vera Lúcia Scatena

**Suplentes:**



Dra. Bárbara de Sá Haiad



Dra. Ana Teresa de Araújo Rodarte

Rio de Janeiro

2011

## Ficha Catalográfica

H126 Haddad, Isabella Veríssimo Nader.  
Estrutura e desenvolvimento das flores de *Maytenus obtusifolia* Mart.  
(Celastraceae): Subsídios para estudos de filogenia e sistema sexual / Isabella  
Veríssimo Nader Haddad. – Rio de Janeiro: UFRJ/MN, 2011.  
xi, 47f.: il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu  
Nacional, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2011.  
Bibliografia: f. 42-47.

Orientadoras: Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes e Heloisa  
Alves de Lima.

1. Celastraceae. 2. *Maytenus obtusifolia*. 3. Desenvolvimento. 4. Flor. 5.  
Ginodioiccia. 6. Esterilidade. I. Santiago-Fernandes, Lygia Dolores Ribeiro de (Orient.).  
II. Lima, Heloisa Alves de (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. IV.  
Museu Nacional (Brasil). Programa de Pós-Graduação em Botânica. V. Título.

CDD 583.271

*À minha avó Paula (in memoriam), minha eterna gratidão.*

## Agradecimentos

À Profa. Dra. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes e Profa. Dra. Heloisa Alves de Lima Carvalho, pela orientação e pelos conhecimentos compartilhados, tornando possível esta dissertação.

À Lygia, pelo comprometimento em transformar os últimos anos em amadurecimento e por sempre me estimular a aceitar novos desafios, missão quase impossível.

À Heloisa, pelos imensuráveis ensinamentos e por me fazer olhar as plantas sob outros pontos de vista.

À Dra. Bárbara Haiad, pela revisão.

À Bárbara, pela amizade e pelo comprometimento em crescer, cujas contribuições durante toda a realização do trabalho foram de valor incalculável.

À Cristine Benevides, pela parceria e oportunidade de participar de um projeto tão especial, pelas incontáveis trocas de informações e pela imensa contribuição, sem o qual o trabalho não seria possível.

À Rita Gama, por todo ensinamento e auxílio prestado desde a iniciação científica.

Ao Daniel Leal, pelo companheirismo em todos os momentos da realização do trabalho, e principalmente, na vida.

Ao Bruno Lopes, pela amizade e por toda troca nas discussões durante o trabalho.

Ao Max, pela amizade e por todas as explicações, fundamentais no processo de seleção.

Ao Rafael Pimentel, pela paciência e auxílio na realização dos testes histoquímicos.

À Natália Barreira, pelo compromisso e excelente trabalho na confecção das lâminas.

À todos do laboratório de Anatomia Vegetal; Márcia da Rocha, Diego Spala, Thabatta da Silva, Pâmela Coelho, Lilian da Cunha e Nathália Pinheiro; cuja amizade e companheirismo tornaram a jornada mais fácil.

À todos do Laboratório de Biologia da Reprodução, em especial à Luciene São Leão, pela amizade e companhia nos trabalhos de campo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), em especial à Professora Mariângela Menezes, pelo compromisso com os discentes.

À CAPES, pela Bolsa de Mestrado e pelo auxílio PROAP para o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Roberto Haddad e Neuci de Paula Veríssimo, por apoiarem, incondicionalmente, meus projetos pessoais.

Aos meus irmãos Samir José Haddad e Roberto Haddad Jr., pela amizade e cumplicidade.

À minha avó Paula Veríssimo, por ter sido mais que uma avó, uma mãe, um porto seguro. Hoje, meu anjo da guarda.

## Resumo

A estrutura floral de *Maytenus obtusifolia* apresenta caracteres cujos estados muitas vezes estão em acordo com a literatura, como diferenciação centrípeta dos verticilos, ausência de indumento floral, abundância de idioblastos de conteúdo fenólico, traço dos estames formado por um anel central circundado por porções de floema, estilete curto, fusão pós-genital dos carpelos com feixes no local de fusão, angiospermia do tipo 4, septo apical, extremidade do cômpito com tricomas, dois tegumentos com mais de dois estratos celulares, presença de endotélio e nucelo delgado. Em alguns casos difere da literatura, por apresentar gineceu bicarpelar, tegumento externo mais espesso que o interno, óvulos antítropos; e ausência de drusas de oxalato, idioblastos de mucilagem, estômatos, papilas ou indumento. Em virtude da inexistência de uma filogenia robusta para Celastraceae, da presença de três linhagens diferentes em *Maytenus*, da reduzida presença de dados anatômicos e ontogenéticos para as espécies amostradas nestes trabalhos, dentre as quais *M. obtusifolia* não se inclui, é impossível estabelecer correlações consistentes entre os dados obtidos e os de gêneros aparentados. Neste contexto, as flores do gênero asiático *Euonymus* são as que mais se assemelham àquelas de *M. obtusifolia*. Do ponto de vista da funcionalidade dos verticilos reprodutivos, os dados obtidos corroboram aqueles provenientes da biologia reprodutiva, apontando para a existência de esterilidade citoplasmática masculina e de um sistema sexual ginodioico. Os resultados mostram que a esterilidade masculina, resultando em plantas femininas, exclusivamente com flores pistiladas, é pré-meiótica. Sugerem, ainda, que a ocorrência de sinérgides hipertrofiadas com citoplasma desorganizado esteja relacionada ao aborto dos óvulos em algumas flores perfeitas das plantas hermafroditas da população estudada.

## Abstract

The floral structure of *Maytenus obtusifolia* encompasses characters whose states are in accordance with the literature, such as centripetal differentiation of whorls, absence of floral indumentum, abundance of idioblasts of phenolic content, stamens traces formed by a central ring surrounded by phloem, short style, post-genital fusion of carpels with bundles in the site of fusion, type 4 angiospermy, apical septum, compitum end with trichomes, two integuments with more than two cell layers, endothelium and thin nucellus. In some cases there are differences such as bicarpelar gynoecium, outer integument thicker than the inner, antitropous ovules and absence of oxalate druses, mucilage idioblasts, stomata, papillae and indument. Due to the absence of a robust phylogeny for Celastraceae, the presence of three different lineages in *Maytenus* and the paucity of anatomical and ontogenetic data for the species sampled in these works - among which *M. obtusifolia* is not included - it is impossible to establish consistent correlations between the data obtained and the related genera. In this context, the flowers of the Asian genera *Euonymus* are the most similar to those of *M. obtusifolia*. From the point of view of reproductive whorls functionality, the data obtained corroborate those of reproductive biology pointing to the existence of male cytoplasmic sterility and of a gynodioecious sexual system. The results show also that male sterility is pre-meiotic, resulting in female plants, exclusively with pistillated flowers. They suggest also that the occurrence of hypertrophied synergids with disorganized cytoplasm may be related to the ovule abortion in some perfect flowers of hermaphroditic plants in the studied population.

## Lista de Figuras

Figura 1: Hábito, inflorescência e tipos florais	13
Figura 2: Organogênese floral	14
Figura 3: Organogênese floral	15
Figura 4: Verticilos protetores e coléter	16
Figura 5: Verticilos protetores, vascularização floral e nectário	17
Figura 6: Microsporogênese das flores perfeitas	18
Figura 7: Microgametogênese das flores perfeitas	19
Figura 8: Androceu das flores perfeitas HAF e anomalias no desenvolvimento	20
Figura 9: Androceu nas flores pistiladas	21
Figura 10: Diferenciação dos óvulos das flores pistiladas	22
Figura 11: Diferenciação dos óvulos das flores pistiladas e perfeitas	23
Figura 12: Óvulos das flores pistiladas	24
Figura 13: Óvulos das flores perfeitas HBF	25
Figura 14: Óvulos das flores perfeitas HBF	26
Figura 15: Óvulos das flores perfeitas HAF	27
Figura 16: Diferenciação dos carpelos	28
Figura 17: Gineceu	29

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Indivíduos de <i>Maytenus</i> estudados e informações de voucher	05
--	----

## Sumário

1. Introdução	01
2. Métodos	04
3. Resultados	06
3.1. Inflorescências e flores	06
3.2. Bráctea	06
3.3. Coléter	06
3.4. Organogênese floral	07
3.5. Verticilos protetores	07
3.6. Nectário	08
3.7. Androceu	08
3.7.1. Flor perfeita HBF	08
3.7.2. Flor perfeita HAF	09
3.7.3. Anomalias no desenvolvimento do grão de pólen	09
3.7.4. Flor pistilada	09
3.8. Gineceu	10
3.9. Vascularização floral	12
4. Discussão e conclusões	30
4.1. Estrutura floral	30
4.2. Funcionalidade dos verticilos reprodutivos e a expressão da ginodioicia	36
5. Perspectivas	41
6. Referências	42

## 1. INTRODUÇÃO

Celastraceae é sub-cosmopolita, possui 98 gêneros e cerca de 1211 espécies; encontra-se distribuída nas regiões tropical e temperada, ausente nas regiões árticas e é mais diversificada nos trópicos e subtropicais (Simmons, 2004a). O gênero *Maytenus* Juss. é composto por árvores ou arbustos, eretos, glabros ou raramente pubescentes, com folhas alternas, inteiras ou serradas. As inflorescências são axilares, cimosas, fasciculadas, raramente racemosas, ou apresentam flores solitárias. As flores são unissexuais ou bissexuais, tetrâmeras ou pentâmeras, as anteras possuem deiscência longitudinal, o ovário possui dois ou três lóculos, óvulos ortótopos, um ou dois por lóculo (Simmons, 2004a). *Maytenus* pertence à subfamília Celastroideae (Simmons, 2004a), tendo sido considerado polifilético em análises filogenéticas morfológicas e moleculares (Simmons *et al.* 2001a, 2001b, 2008), Simmons *et al.* (2008), reconheceram três linhagens oriundas da África, do Pacífico Austral e do Novo Mundo. As espécies sul-americanas analisadas foram *M. boaria* e *M. disticha* (irmãs) e *M. floribunda*, posicionada em um clado irmão que inclui *Moya spinosa* (irmã desta) e *Tricerna texanum*, tradicionalmente incluída em *Maytenus*. Assim, trabalhos adicionais para re-circunscrever este gênero são ainda necessários (Simmons, 2004a).

A família Celastraceae é, assim como Celastrales, bem suportada por caracteres relacionados à morfologia floral (Stevens, 2007; Matthews & Endress, 2005). No entanto, estudos do desenvolvimento floral em Celastraceae são poucos (Matthews & Endress, 2005; 2006; Endress & Matthews, 2006; Tobe & Raven, 1993). A embriologia em Celastraceae foi analisada em muitas espécies por Simmons (2004a) e Tobe & Raven (1993). Não há informações relativas ao desenvolvimento floral para o gênero *Maytenus*. As potenciais sinapomorfias anatômicas da família são a presença de drusas de oxalato de cálcio em tecidos florais e o ovário com septo apical (Matthews & Endress, 2005; Zhang & Simmons, 2006). As anteras são tetrasporangiadas, com endotécio fibroso, estratos parietais comprimidos e tapete com células polinucleadas. Na meiose a citocinese é simultânea, formando tétrades tetraédricas e ou decussadas. O grão de pólen maduro possui duas ou três células (Brewbaker, 1967). Os óvulos são anátropos, bitegmos, crassinucelados ou tenuinucelados, com a formação de um saco embrionário do tipo *polygonum*. (Adatia & Gavde, 1962; Brizicky, 1964a). Berkeley (1953), ao estudar a vascularização das flores de *Celastrus*, *Euonymus* e *Paxistima*, concluiu que Celastraceae possui tubo floral e o disco nectarífero é homólogo aos estames. Em *Celastrus* os traços vasculares do disco divergem dos traços do estame e da pétala. Em *Euonymus* e *Paxistima*, não há traços vasculares irrigando o disco nectarífero.

A ordem Celastrales - composta por Celastraceae, Lepidobotryaceae e Parnassiaceae – é um grupo razoavelmente suportado pela morfologia, anatomia e histologia florais, embora sinapomorfias estruturais ainda não tenham sido estabelecidas (Matthews & Endress, 2005). Os táxons analisados compartilham pétalas com desenvolvimento não retardado nos estádios finais do desenvolvimento, gineceu tricarpelar, cômputos com tricomas longos e tecido transmissor com várias camadas, óvulos com dois tegumentos em geral com mais de dois estratos celulares e indumento floral ausente ou esparso (Simmons *et al.*, 2001b; Simmons, 2004a).

O sub-clado de rosídea denominado COM, no qual Celastrales se insere juntamente com Oxalidales e Malpighiales, é bem caracterizado pelas estruturas florais (Matthews & Endress, 2005, 2006). O caráter de maior destaque é a estrutura do óvulo, no que diz respeito à espessura do nucelo – em geral delgado – e a presença de endotélio (Endress & Matthews, 2006). Outro caráter interessante é o tegumento interno mais espesso que o externo, compartilhado pelo clado COM e as rosídeas II (malvideas). A presença de células de mucilagem, concentradas nas rosídeas, especialmente nas rosídeas I (fabídeas), presentes em todas as ordens do clado fixador de Nitrogênio e no clado COM, não foi até o momento registrada em Celastrales (Matthews & Endress, 2006; Endress & Matthews, 2006).

Estudos estruturais são muito necessários na ordem Celastrales para futuras análises filogenéticas e a caracterização da flor das rosídeas (Endress & Matthews, 2006).

No que diz respeito à anatomia de *Maytenus*, há poucos trabalhos, que tratam em sua maior parte da folha (Sebsebe, 1985; Ciqiu *et al.*, 1986; Müller, 1995; van Wyk & Archer, 1987; Machado, 1945 e Joffily & Vieira, 2005). Joffily & Vieira, (2005), estudaram espécies de *Maytenus* ocorrentes no Estado Rio de Janeiro, dentre elas *M. obtusifolia*, tendo os autores concluído que a grande plasticidade morfológica nos órgãos vegetativos contrasta com a enorme semelhança anatômica dos mesmos (Joffily & Vieira, 2005).

Flores de Celastrales são bissexuais ou funcionalmente unissexuais, neste caso apresentando o verticilo do sexo não funcional apenas levemente reduzido, podendo ter sido consideradas erroneamente como bissexuais (Matthews & Endress 2005). Há registros de dioícia, em *Celastrus*, (Ding Hou, 1955, *apud* Matthews & Endress, 2005) e de trioícia e ginodioícia em *Euonymus europaeus*, (Darwin 1877 e Webb 1979, *apud* Matthews & Endress, 2005), todas Celastraceae.

As espécies de *Maytenus* em geral são referidas como hermafroditas, raramente polígamas ou dióicas (Simmons, 2004). Em algumas espécies, apesar de estarem presentes os dois verticilos reprodutivos, apenas um deles é funcional, como no caso de *M. ilicifolia*, *M. evonymoidis* e *M. patens* (Carvalho-Okano, 1992). Também ocorrem espécies com flores

unissexuais no sudeste dos Estados Unidos (Brizicky, 1964b) e na África, onde flores pistiladas apresentam estaminódios e flores estaminadas apresentam pistilódios (Sebsebe, 1985). Provavelmente, a redução dos órgãos, ora do androceu, ora do gineceu, em algumas espécies de *Maytenus*, indica uma tendência da bissexualidade para a unissexualidade das flores e dos indivíduos (Carvalho-Okano, 1992). Lourteig & O' Donell (1955, *apud* Carvalho-Okano, 1992) relatam que *M. boaria* apresenta flores estaminadas e pistiladas em plantas diferentes.

Este trabalho integra uma pesquisa sobre a biologia reprodutiva de *M. obtusifolia*, conduzida pelo grupo de pesquisa "Reprodução Vegetal", do Museu Nacional, que objetiva esclarecer o sistema sexual da espécie, associando estudos sobre a ontogênese, biologia floral e produtividade de frutos/sementes na população da restinga da APA de Maricá.

Os resultados iniciais revelaram que *M. obtusifolia* apresenta sistema sexual ginodióico - plantas com flores perfeitas e plantas com flores pistiladas – numa razão sexual de 2,8 : 1, respectivamente. O sucesso reprodutivo dos indivíduos femininos é de 41%, ao passo que nos indivíduos hermafroditas varia de 0 a 15%. O estudo da morfologia externa das flores perfeitas revelou variação intra-plantas no tamanho do gineceu, embora os óvulos fossem aparentemente normais, mesmo nas flores com gineceu reduzido. A hipótese de que a maior proporção de flores com gineceu plenamente desenvolvido num indivíduo está relacionada com a capacidade de produzir mais frutos vem norteando os estudos. No que se refere ao androceu, observou-se, ainda, grande variação na viabilidade polínica dos indivíduos (2 a 99%), mantida inalterada em três florações subsequentes (Benevides, tese em desenvolvimento).

Neste contexto o projeto se propôs a realizar estudo ontogenético comparativo das flores pistiladas e perfeitas de *M. obtusifolia*, com ênfase no androceu e gineceu. Os resultados obtidos são os primeiros dados sobre a anatomia e ontogênese floral para o gênero e contribuirão para futuras análises filogenéticas. Além disso, o estudo citológico comparativo do micrósporo e microgametófito das flores perfeitas e do megásporo e megagametófito das flores pistiladas e perfeitas poderão elucidar a caracterização da expressão sexual de *M. obtusifolia*.

A partir dos dados disponíveis foram formuladas as seguintes hipóteses: 1) As flores perfeitas e as pistiladas apresentam as características anatômicas indicadas como sinapomorfias para os diferentes níveis hierárquicos; 2) As flores perfeitas e pistiladas não apresentam as células de mucilagem referidas como sinapomorfias para o clado COM e ausentes em Celastrales; 3) O baixo sucesso reprodutivo das flores perfeitas está relacionado a alterações citológicas do gineceu; 4) Alterações citológicas dos grãos de pólen causam viabilidade variável entre as plantas com flores perfeitas.

## 2. MÉTODOS

Botões florais e flores coletados em vários estádios de desenvolvimento e provenientes de indivíduos de populações naturais da Área de Proteção Ambiental (APA) de Maricá, município de Maricá, Rio de Janeiro (fig. 1a), situada a aproximadamente 60 Km a leste do centro da cidade do Rio de Janeiro, entre os distritos de Barra de Maricá e Itaipuaçu, sob as coordenadas 22° 56' – 22° 58' S – 42° 49' - 42° 54' W. Para este estudo foram selecionadas flores de cinco plantas de *Maytenus obtusifolia* Mart. (tabela 1), uma planta feminina constituída somente por flores pistiladas – M12 (fig. 1e) e quatro plantas hermafroditas: M08 e M09 (fig. 1d) - com flores que apresentam alta viabilidade polínica (98%), estilete e estigma reduzidos e taxa de frutificação quase zero, que foram tratadas como perfeitas com baixa taxa de frutificação (HBF); e M14 e 521 (fig. 1c) – com flores que apresentam viabilidade polínica baixa (33%), variação no tamanho do estilete e estigma, mas com taxa de frutificação de 11%, que foram tratadas como perfeitas com alta taxa de frutificação (HAF). As amostras foram fixadas em solução de formaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,2 (Gahan, 1984) e submetidas à baixa pressão. Para o estudo anatômico os botões foram mensurados, quanto ao comprimento, agrupados em classes de tamanho e, juntamente com as flores, foram desidratados em série etílica e emblocados em glicolmetacrilato (Historesina Leica®). Secções seriadas de 1-3µm de espessura, obtidas com navalha de vidro em micrótomoto rotativo Spencer, foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% (Gahan, 1984).

Os testes histoquímicos foram realizados em material fixado em álcool 70% e emblocado, seccionado em micrótomoto manual de Ranvier e rotativo, respectivamente. Foram utilizados os seguintes reagentes: Sudan IV (Johansen, 1940) para compostos de natureza lipofílica; Lugol (Johansen, 1940) para grãos de amido; dicromato de potássio 10% (Gabe, 1968) para compostos fenólicos; reagente de Fehling (Purvis *et al.*, 1964) para açúcares redutores; vermelho de rutênio (Jensen, 1962) para substâncias pépticas; Ácido periódico/Reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos neutros (Cortelazzo, 1992, Taboga & Vilamaior, 2001, Amaral *et al.*, 2001). Foi aplicado tratamento controle para os testes histoquímicos de acordo com a indicação dos respectivos autores acima citados.

Para observação de calose, o material foi corado com Azul de Anilina (0,1%) em K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 M (Martin, 1959), mantido sob refrigeração por cerca de 2 horas e observadas sob luz UV, em microscópio de fluorescência Olympus BX-51.

Foram confeccionadas e depositadas no Herbário do Museu Nacional (R) excicatas com material botânico correspondente a cada indivíduo analisado.

A documentação e as observações foram realizadas utilizando-se os equipamentos Leitz Orthoplan e Olympus BX-51 com sistema de captura composto por câmera Q color 5 e software Image-Pro Express. As imagens foram editadas no software Photoshop 6.0 e as pranchas montadas utilizando o CoreIDRAW X5.

Tabela 1: Indivíduos de *Maytenus* estudados e informações de voucher.

<b>Indivíduo</b>	<b>Morfo</b>	<b>Coletor /voucher</b>	<b>Data coleta</b>	<b>Nº de registro (R)</b>
<b>M08</b>	[♀♂]	I. V. N. Haddad 001 (R)	24/IX/2010	210889
<b>M09</b>	[♀♂]	I. V. N. Haddad 002 (R)	24/IX/2010	210890
<b>M12</b>	♀	I. V. N. Haddad 003 (R)	24/IX/2010	210891
<b>M14</b>	[♀♂]	I. V. N. Haddad 004 (R)	24/IX/2010	210892
<b>521</b>	[♀♂]	I. V. N. Haddad 005 (R)	24/IX/2010	210893

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Inflorescências e flores

*Maytenus obtusifolia* apresenta hábito subarbustivo (fig. 1b) a arbustivo e inflorescências em racemos de dicásios (fig. 2a, b). Os primórdios apicais encontram-se protegidos por duas brácteas laterais (fig. 2b) enquanto os laterais por apenas uma bráctea localizada externamente a eles (fig. 2a). Posicionados entre os botões florais e as brácteas (fig. 4a) encontram-se longos coléteres (fig. 4c), inseridos na base das brácteas e medindo aproximadamente metade do comprimento destas.

Os botões apresentam formato globoso e coloração esverdeada (fig. 1c). As flores são pequenas, também esverdeadas, porém com as pétalas apresentando variação de amarelada a esverdeada, pouco vistosas, actinomorfas, pentâmeras com cálice gamossépalo e corola dialipétala (fig. 1f). Os estames são alternipétalos com filete de cor verde e anteras amarelas, bitecas, com deiscência rimosa. As flores apresentam um disco nectarífero entre o androceu e o gineceu, este constituído por estilete largo e ovário ínfero, bilocular e tetraovulado.

#### 3.2. Bráctea

As brácteas são revestidas por epiderme uniestratificada, com células de contorno globoso na face adaxial e retangular na face abaxial. Em ambas as faces a maioria das células epidérmicas apresenta conteúdo fenólico. O mesofilo apresenta de três a sete camadas parenquimáticas, com poucos e pequenos espaços intercelulares. Os dois estratos adjacentes à face abaxial reagem fortemente para compostos fenólicos (fig. 4a). Esclereides dispõem-se aleatoriamente ao longo do mesofilo, em maior concentração nos bordos (fig. 2a, b, e).

#### 3.3. Coléter

Os coléteres (fig. 4c) são claviformes, constituídos por aproximadamente oito séries de células com paredes delgadas, citoplasma denso, pequenos vacúolos e núcleo evidente.

### 3.4. Organogênese floral

O surgimento dos verticilos florais é centrípeto e seqüencial, iniciando com as sépalas e posteriormente pétalas, estames e gineceu. O domo meristemático floral (fig. 2c) dá origem a primórdios das sépalas de ápice agudo que logo acumulam compostos fenólicos no parênquima em diferenciação (fig. 2d, e, f). À medida que estes primórdios se alongam e o número de estratos do mesofilo aumenta (fig. 3a), o meristema inicia a formação de projeções correspondentes aos primórdios das pétalas (fig. 3b-e). Paralelamente observa-se a presença de placas metafásicas em células da L3 e do meristema em costela (fig. 3d) indicando o alongamento do eixo floral acompanhado pelo estabelecimento do procâmbio (fig. 3c).

Os estames iniciam-se a partir do aumento no tamanho de algumas células da L1 e posteriores divisões anticlinais, enquanto as camadas L2 e L3 do meristema iniciam divisões (Fig. 3f, g). Este processo leva ao estabelecimento de uma região afilada, que dará origem ao filete, e uma região que dará origem à antera.

Os primórdios de carpelos iniciam sua emergência a partir do alongamento de algumas células protodérmicas, acompanhadas por divisões anticlinais das mesmas e divisões periclinais e anticlinais das camadas L2 e L3 (fig. 3g, h). Divisões sucessivas produzem o aumento em espessura e altura das folhas carpelares, levando ao encontro de seus ápices (fig. 3h) e, em seqüência, à fusão de suas margens, (fig. 16b). Posteriormente, no local da fusão ocorre a diferenciação do procâmbio e divisões celulares promovem a intrusão dessas margens e formação de um septo estabelecendo dois lóculos (fig. 16g). Na região basal do septo inicia-se a diferenciação da protoderme das folhas carpelares em tricomas (fig. 16f-h). A seguir estigma e estilete diferenciam-se e divisões periclinais e anticlinais nas paredes do ovário elevam o número de estratos.

### 3.5. Verticilos protetores

Sépalas (fig. 4b) e pétalas (fig. 4d) são constituídas de epiderme uniestratificada com conteúdo fenólico, em maior concentração nas pétalas (fig. 5a), mesofilo parenquimático onde ocorre a presença de idioblastos de conteúdo fenólico dispostos aleatoriamente, nas sépalas concentrando-se duas camadas adjacentes da face abaxial e nas pétalas concentrando-se uma camada adjacente da face adaxial. Esclereídes são observados em diferentes estádios de desenvolvimento.

### 3.6. Nectário

A espécie apresenta um disco nectarífero posicionado entre o androceu e o gineceu. O disco é revestido por uma epiderme uniestratificada, com idioblastos de conteúdo fenólico e estômatos localizados no nível epidérmico (fig. 5c). O parênquima nectarífero possui células ricas em grãos de amido e idioblastos de conteúdo fenólico se concentram nas camadas subepidérmicas (fig. 5d). Não há vascularização no disco nectarífero.

### 3.7. Androceu

Após a diferenciação das regiões do filete e antera inicia-se a maturação do estame. No filete ocorre a diferenciação do procâmbio, enquanto na antera ocorre o estabelecimento de uma epiderme rica em conteúdo fenólico - exceto na região que dará origem ao estômio - duas camadas médias, tapete e tecido esporogênico. Inicialmente o tapete está representado por células pouco diferenciadas, com núcleo proeminente e pequenos vacúolos. As células do tecido esporogênico têm núcleo proeminente, citoplasma denso com pequenos vacúolos (Fig. 6a, b, c).

Neste estágio, ocorre a divergência no desenvolvimento do estame das flores perfeitas e pistiladas.

#### 3.7.1. Flor perfeita HBF

Nas anteras férteis ocorre aumento no tamanho das lojas, o que provoca o esmagamento da camada média e gera espaços entre as células mãe dos micrósporos. Nesse estágio as células do tapete encontram-se binucleadas ou polinucleadas e com o citoplasma denso (fig. 6d). A microsporogênese é do tipo simultânea, os meiócitos sofrem a primeira divisão da meiose dando origem às díades (fig. 6d) e, após a segunda divisão às tétrades tetraédricas (fig. 6e, f). Após a meiose ocorre a deposição da parede de calose, isolando os micrósporos (fig. 6g, h).

Concomitantemente as células do tapete iniciam processo de vacuolização (fig. 6g), seguido de retração citoplasmática (fig. 7a, b). Os micrósporos livres apresentam um formato irregular, citoplasma denso e um núcleo central (fig. 7a), posteriormente ocorre a formação da parede do micrósporo (fig. 7b) e surgimento de grãos de amido no citoplasma (Fig. 7c, d). As células do tapete por fim se encontram intensamente vacuoladas iniciando o processo de degradação. Neste momento ocorre o espessamento em barra nas paredes

das células do endotécio. O micrósporo sofre mitose gerando grãos de pólen bicelulares, formados por uma célula vegetativa e uma generativa (fig. 7d, e).

Ocorre degradação das células do septo interocular, gerando a união das lojas (fig. 7f, g) e colapso das células do estômio, fazendo com que haja a liberação dos grãos de pólen (fig. 7h).

Em grande parte dos grãos de pólen ocorre uma projeção citoplasmática da célula vegetativa através das aberturas (Fig. 7e). Em seguida a célula generativa sofre uma mitose dando origem aos dois gametas (fig. 7e).

Na flor em antese, o filete apresenta epiderme uniestratificada com conteúdo fenólico, mesofilo parenquimático com idioblastos de conteúdo fenólico e um feixe vascular central (fig. 8d), a parede da antera é constituída por uma epiderme rica em conteúdo fenólico, endotécio e restos celulares provenientes da degeneração da camada média e tapete (fig. 8a, b), e ocorre a degeneração do feixe vascular na região do conectivo (fig. 8c).

### **3.7.2. Flor perfeita HAF**

As anteras deiscentes são constituídas por epiderme; endotécio; uma faixa de restos celulares, provenientes da degeneração das células do septo interocular, tapete e camada média; e grãos de pólen (fig. 8e). Aproximadamente metade destes grãos de pólen apresentam o citoplasma colapsado (fig. 8f).

### **3.7.3. Anomalias no desenvolvimento dos grãos de pólen**

Algumas lojas nas anteras das flores perfeitas HBF e HAF apresentaram anomalias durante o desenvolvimento dos grãos de pólen. Em algumas lojas ocorre a degeneração prematura do tapete e o colapso dos micrósporos o que resulta em uma deposição irregular da parede dos micrósporos (fig. 8g). Em outras, não há a separação dos micrósporos nas tétrades, o que resulta no colapso dos mesmos (fig. 8h).

### **3.7.4. Flor pistilada**

O estabelecimento da esterilidade masculina está relacionado a alterações na diferenciação do tapete e tecido esporogênico.

As células do tecido esporogênico têm núcleo proeminente e citoplasma denso, assim como nas flores perfeitas (fig. 6b, c). No entanto, surgem pequenas estruturas globosas densamente coradas (fig. 9a). Neste estágio surgem numerosos pequenos

vacúolos nas células do tapete (fig. 9b, c), seguido de sua degeneração (fig. 9d), formando uma faixa de restos celulares (fig. 9e, f, g), em algumas lojas há a diferenciação das células mãe dos micrósporos (fig. 9d) em outras o tecido esporogênico permanece (fig. 9c). Em ambas ocorre o surgimento de pequenos ou grandes vacúolos relacionados ao início do processo de degeneração dessas células (fig. 9f, g). As anteras deiscientes são constituídas por epiderme, endotécio e uma faixa de restos celulares (fig. 9h).

### 3.8. Gineceu

Variações morfológicas distinguem o gineceu das flores pistiladas e perfeitas HBF. O maior desenvolvimento do carpelo nas flores pistiladas (fig. 17a) resulta em um maior comprimento do estigma, estilete e ovário, em relação as flores perfeitas HBF (fig. 17b). O maior comprimento promove diferença na posição do ovário entre os tipos florais, nas flores pistiladas é caracterizado como semi-ínfero enquanto nas perfeitas HBF é ínfero.

Anatomicamente, o estigma é formado por uma epiderme composta por células justapostas de contorno quadrangular (fig. 17c, d) e algumas com conteúdo fenólico. Nas flores pistiladas (fig. 17c), a região estigmática apresenta maior sinuosidade que nas flores perfeitas HBF, as camadas adjacentes apresentam espaços intercelulares, onde ocorre o acúmulo da mucilagem proveniente do tecido transmissor. O estilete tem contorno aproximadamente circular, revestido por epiderme uniestratificada com algumas células ricas em conteúdo fenólico. O mesofilo é parenquimático com poucos espaços intercelulares, havendo uma concentração de células com conteúdo fenólico nos três estratos subepidérmicos. Dois feixes vasculares colaterais ocorrem em posição oposta. Na região central do estilete ocorre a diferenciação do compito (fig. 16c), isto é, a reunião de tecido transmissor de cada carpelo (fig. 16d, e) e que na região basal do septo apresenta tricomas (fig. 17a, b). A parede do ovário é constituída de uma epiderme externa uniestratificada, mesofilo com doze a quatorze estratos de parênquima e idioblastos de conteúdo fenólico, em especial nas três camadas subepidérmicas da face abaxial. Ocorrem feixes vasculares e a epiderme na face adaxial é uniestratificada e rica em células com conteúdo fenólico (fig. 17f).

A placenta tem origem na base dos carpelos, exibindo dois óvulos por lóculo. A diferenciação do óvulo inicia-se com o surgimento do nucelo através de divisões anticlinais da protoderme e periclinais e anticlinais das demais células da placenta. Posteriormente há o alongamento seguido da divisão periclinal de algumas células da epiderme nucelar iniciando a formação do tegumento interno (fig. 10a) e em seqüência a formação do

tegumento externo, após sucessivas divisões (fig. 11e). Concomitantemente há a diferenciação de uma célula arquesporial (fig. 10a; 11e) no estrato hipodérmico que se divide periclinalmente dando origem à uma célula parietal voltada para o pólo micropilar e uma célula esporogênica para o calazal (fig. 10b, c). A diferenciação desta em megasporócito é marcada por um alongamento seguido da deposição da parede de calose (fig. 10d-f). A célula parietal sofre degeneração. A formação da díade se dá através de divisão desigual (fig. 10g, h; 11a, f). A partir desse estágio não foi detectada a presença da parede de calose. A meiose II é assíncronica e forma tétrades lineares (fig. 11b, g), cuja célula micropilar inicia a segunda divisão da meiose antes, geralmente no sentido periclinal, embora também tenha sido observada a formação de tétrades em “T” (fig. 11c, h), através da divisão anticlinal da célula micropilar. Os megásporos próximos à micrópila sofrem processo de degeneração, restando funcional o megásporo calazal (fig. 11d). Este após sucessivas mitoses dá origem ao saco embrionário. Não foi possível a tipificação do saco embrionário, devido à ausência de caracterização da megagametogênese, sendo observado apenas o saco embrionário maduro, constituído de sinérgides, oosfera e célula média, sem antípodas.

Na flor em antese, os óvulos são antítropos, tenuinucelados, compostos por tegumento externo, com três a cinco estratos sendo o mais externo rico em compostos fenólicos, e tegumento interno, composto por quatro a sete camadas, a camada mais interna diferenciada em endotélio com células com o núcleo ocupando a posição central e vacúolos preenchidos com composto fenólico (Fig. 12a, b). A micrópila é em zigue-zague, formada por ambos os tegumentos (fig. 17e) e o feixe vascular percorre o funículo e se esgota na altura da calaza (fig. 14c). Em todos os tipos florais, foi observada a proliferação de células do tegumento interno em direção ao saco embrionário (fig. 14b, d). Em algumas flores perfeitas HBF, os óvulos parecem estar atrofiados, o que leva ao surgimento de um espaço entre os tegumentos (Fig. 13c).

A divergência no desenvolvimento do saco embrionário nos diferentes tipos florais ocorre após a megagametogênese. O desenvolvimento pode seguir duas diferentes vias:

Uma primeira, considerada padrão, é encontrada em todos os indivíduos. Esta diferencia sinérgides com citoplasma denso (figs. 12c; 13d-f), polarizado (figs. 12e; 13a, b; 14a), no qual o vacúolo está voltado para a calaza e o citoplasma está voltado para a micrópila, com aparato fibrilar evidente (figs. 12d; 13h; 14a) e núcleo proeminente; uma oosfera polarizada com citoplasma voltado para calaza e vacúolo voltado para micrópila e núcleo evidente (fig. 13h); e uma célula média com um grande vacúolo ocupando quase toda a célula e um núcleo polar (fig. 12f).

E uma segunda, encontrada em algumas flores perfeitas HBF e HAF. Nesta há o início de um processo de vacuolização (fig. 14e, f), embora não tenha sido observada a presença de vacúolo nos estádios seguintes, e hipertrofia das sinérgides (fig. 14g; 15a), esses processos resultam em sinérgides com menor densidade citoplasmática (fig. 14h; 15b) e em um citoplasma desorganizado (fig. 15d, e); apesar de ainda conter um aparato fibrilar evidente (fig. 15c) e uma oosfera polarizada (fig. 15g) com núcleo proeminente (fig. 15f), assim como a via padrão.

### **3.9. Vascularização floral**

A vascularização floral se dá através de um anel de feixes vasculares (fig. 5e) que percorre o pedicelo até a região do hipanto, onde se distribuem dando origem a traços para as sépalas, pétalas, estames e gineceu (fig. 5f). O gineceu é irrigado por quatro feixes vasculares, dois dorsais provenientes da nervura central da folha carpelar e dois ventrais, correspondentes à fusão dos feixes carpelares marginais, estes bifurcam-se na altura na placenta dando origem aos traços que irrigam os óvulos (fig. 5b).

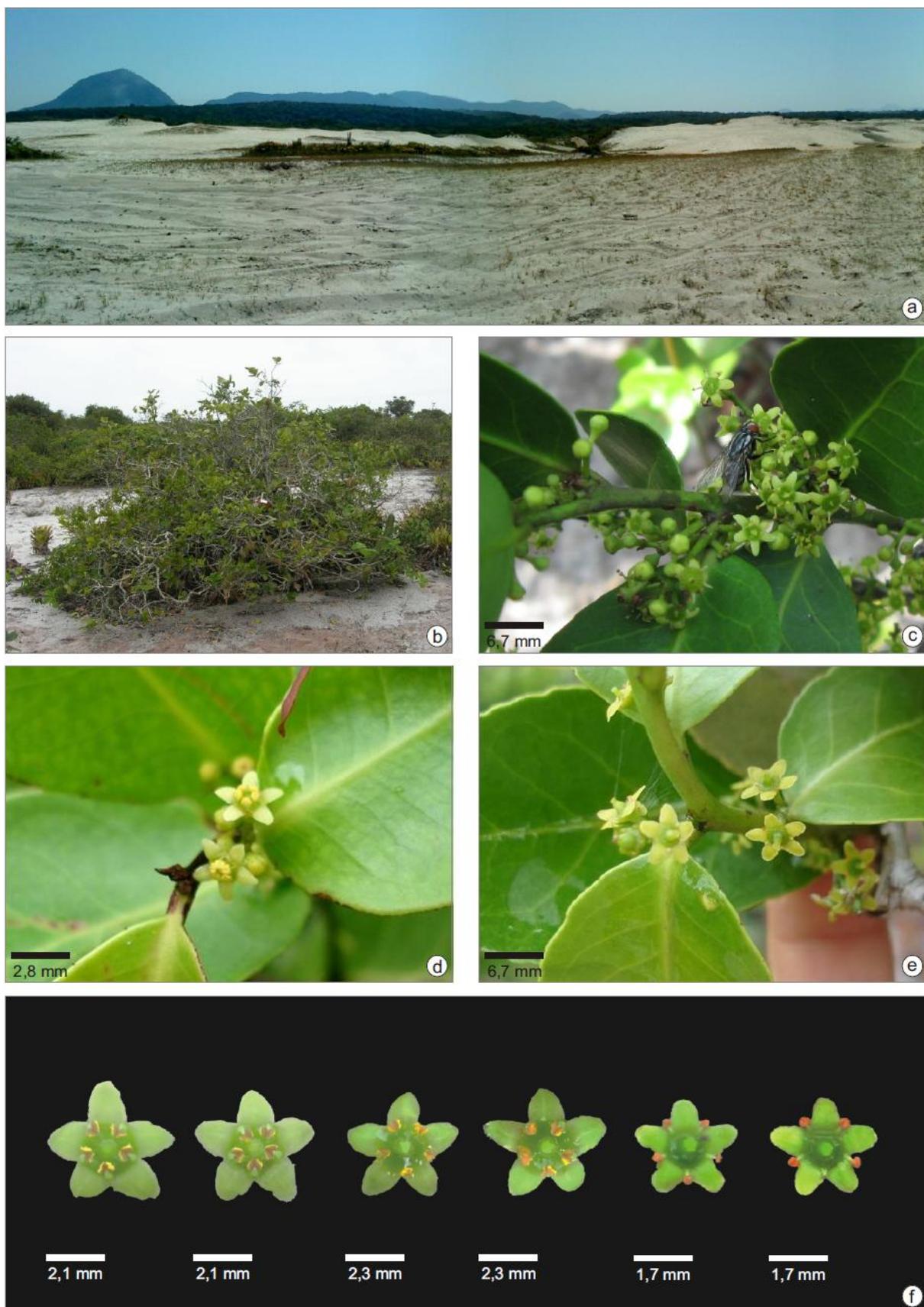


Figura 1 - a - Área de Proteção Ambiental (APA-Maricá); b - f - *Maytenus obtusifolia*. b - Hábito; c - Visitante floral; d - Aspecto geral das flores de um indivíduo hermafrodita; e - Aspecto geral das flores de um indivíduo feminino; f - Flores perfeitas HBF, flores perfeitas HAF e flores pistiladas.

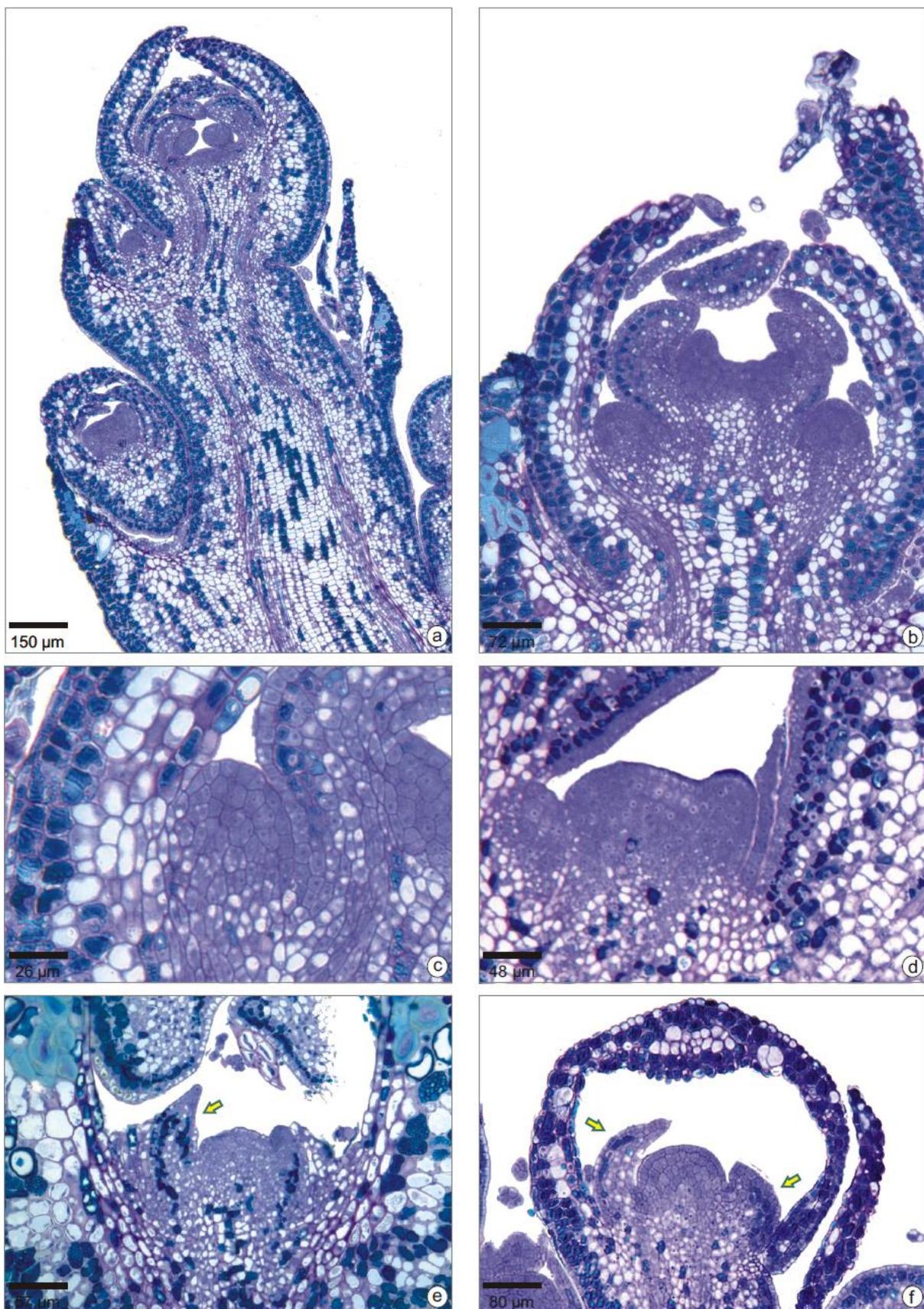


Figura 2 - Organogênese floral. Secções longitudinais. a, b – Inflorescências; c – Domo meristemático; d, e, f – Domo meristemático com primórdio de sépala.

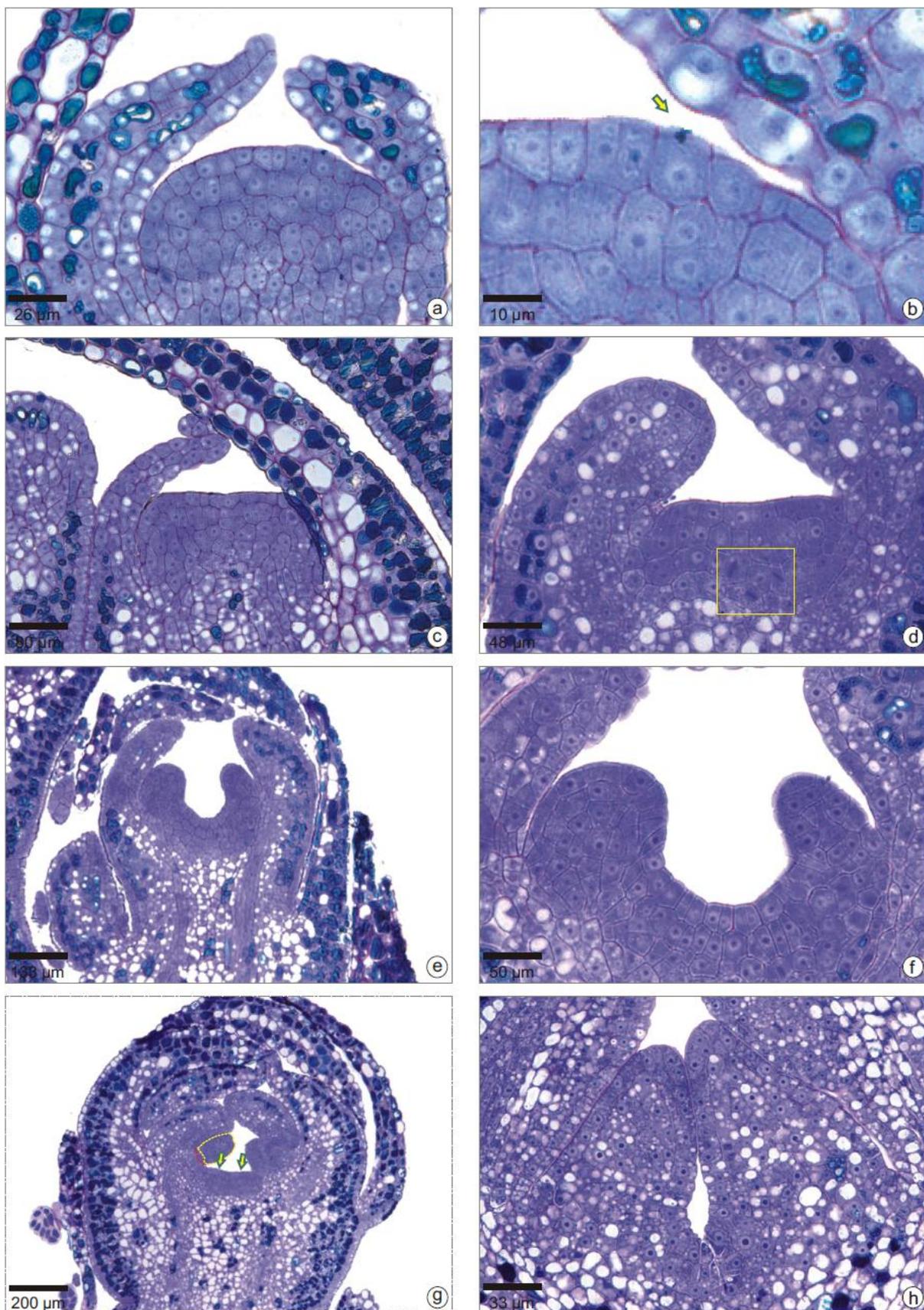


Figura 3 - Organogênese floral. Secções longitudinais. a, b – Iniciação as pétalas; c, d – Iniciação dos estames; e, f – Diferenciação dos estames; g – Iniciação dos carpelos; h – Diferenciação dos carpelos.

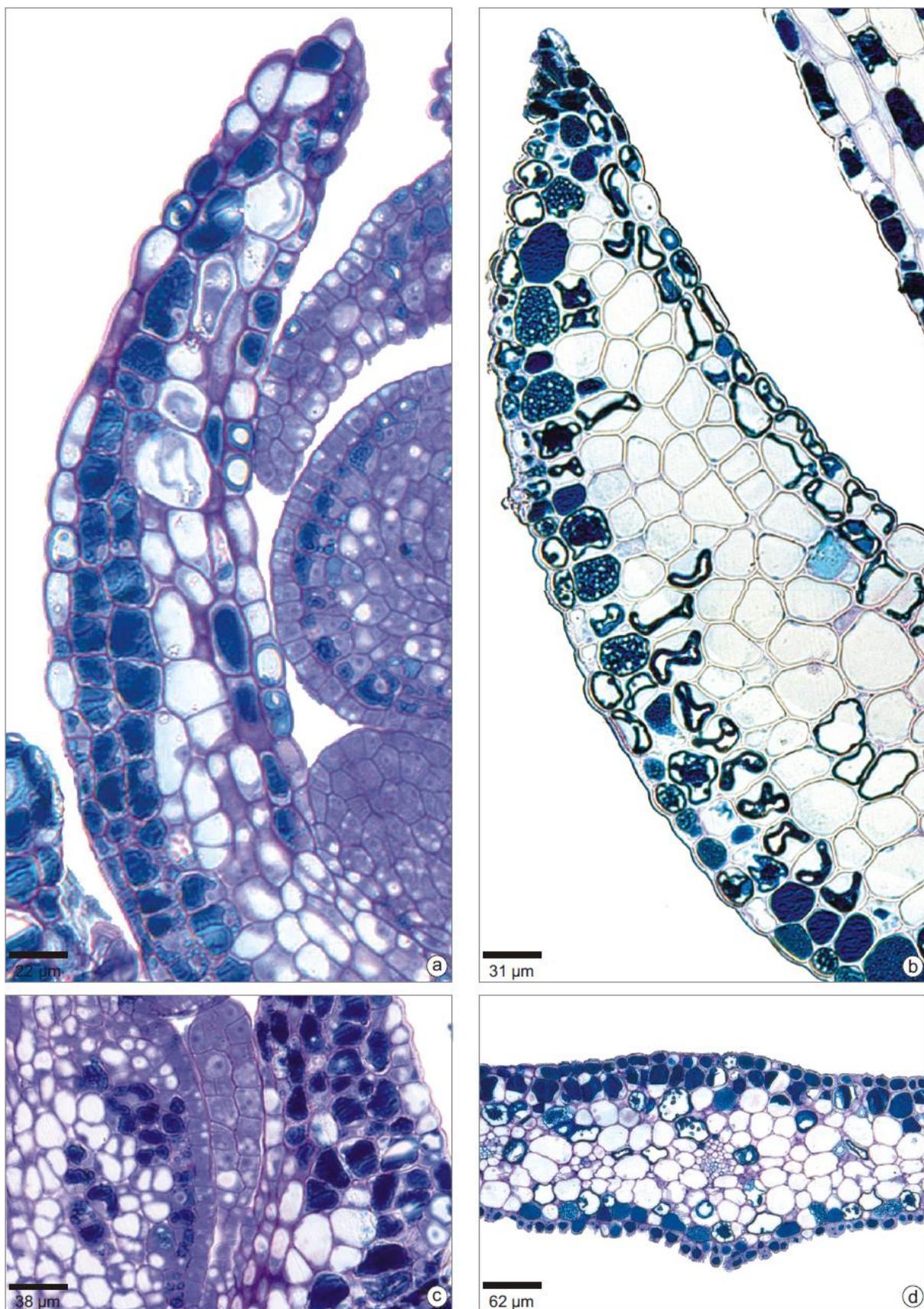


Figura 4 - Verticilos protetores e coléter. a - c - Secções longitudinais. a - Bráctea; b - Sépala; c - Coléter; d - Secção transversal da pétala.

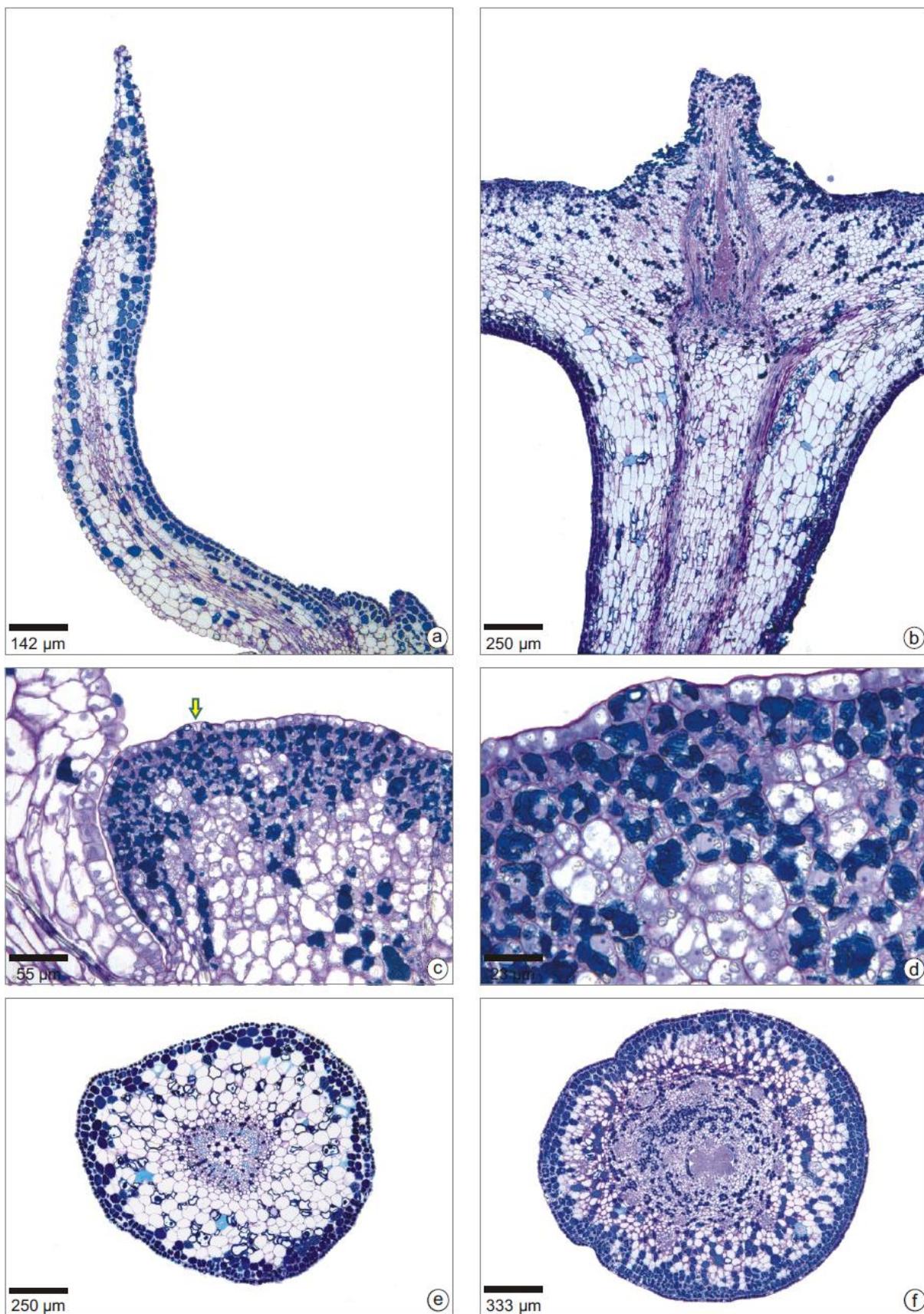


Figura 5- Verticilos protetores, vascularização floral e nectário. a-d – Secções longitudinais. a – Pétala; b – Vascularização floral; c, d – Nectário; e, f – Secções transversais. e – Feixe vascular na altura do pedicelo; f – Distribuição dos feixes vasculares.

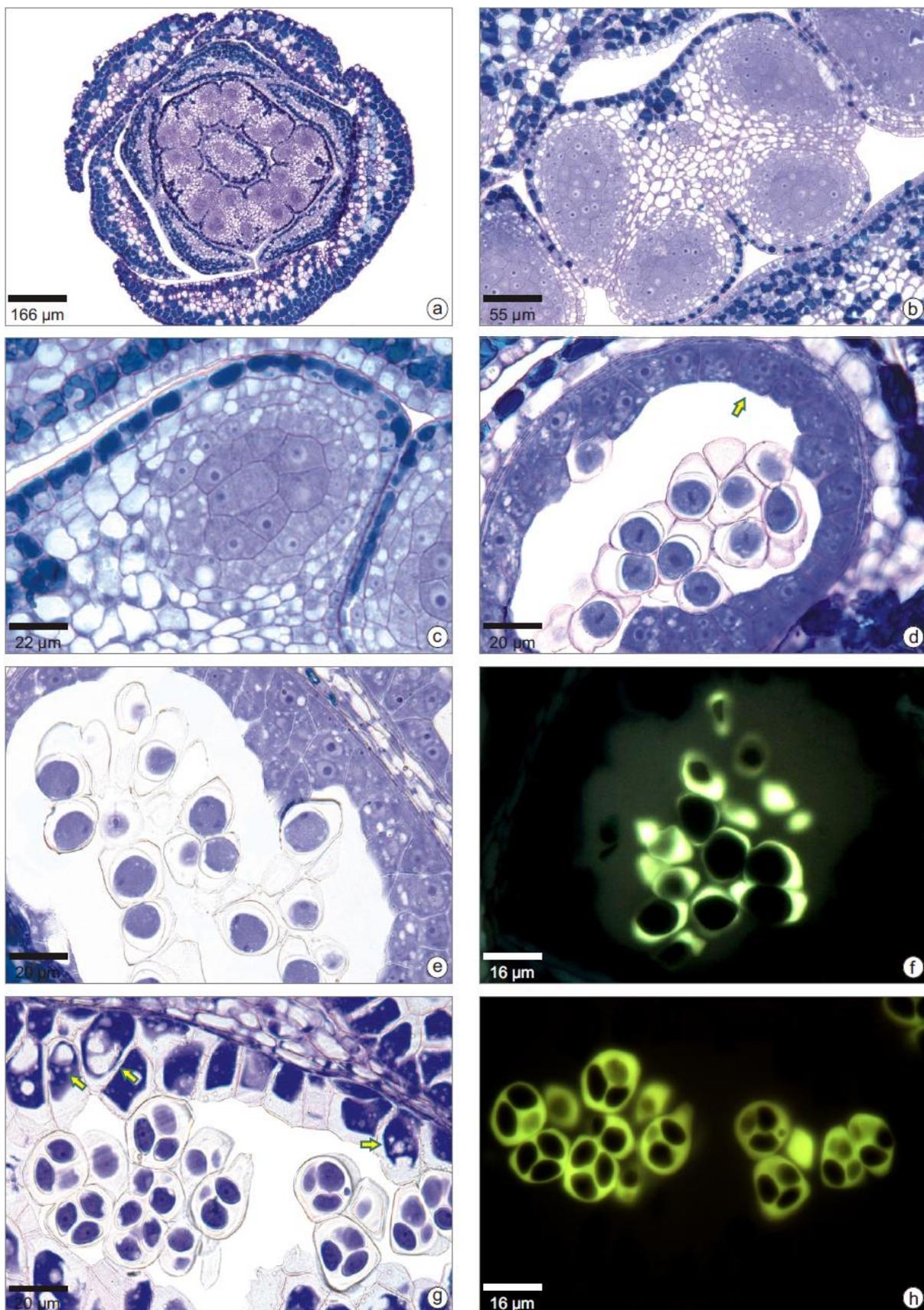


Figura 6 - Microsporogênese das flores perfeitas. Secções transversais. a - c - Tecido esporogênico; d - Meiose I na metáfase; e - Final da meiose II; f - Díades envolvidas por calose; g - Tétrades; h - Tétrades envolvidas por calose.

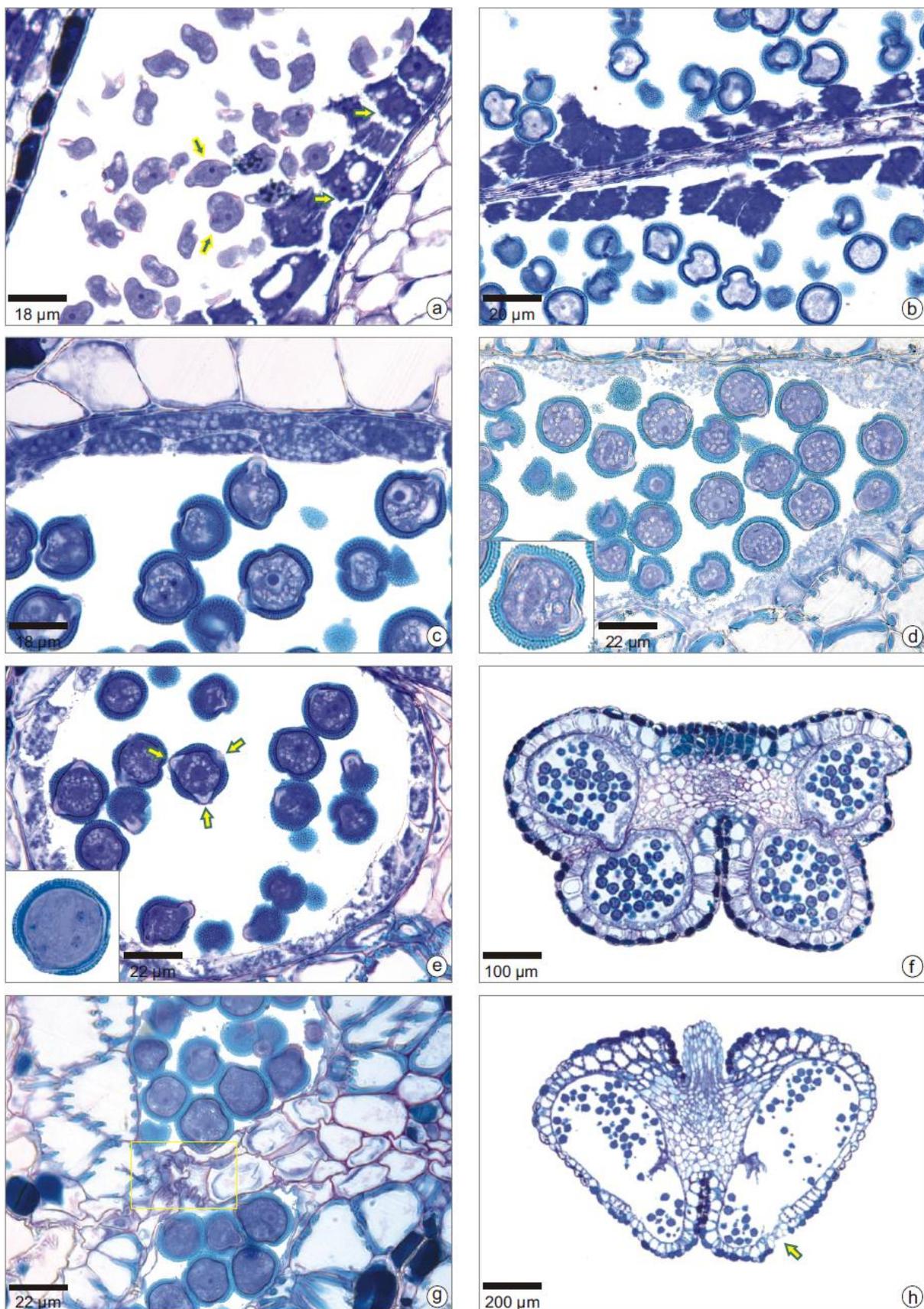


Figura 7 - Microgametogênese das flores perfeitas. Seções transversais. a – Micrósporos livres; b, c – Processo de degeneração do tapete; d – Mitose do micrósporo; e – Diferenciação dos gametas; f, g – Degeneração do septo interlocular; h – Degeneração das células do estômio.

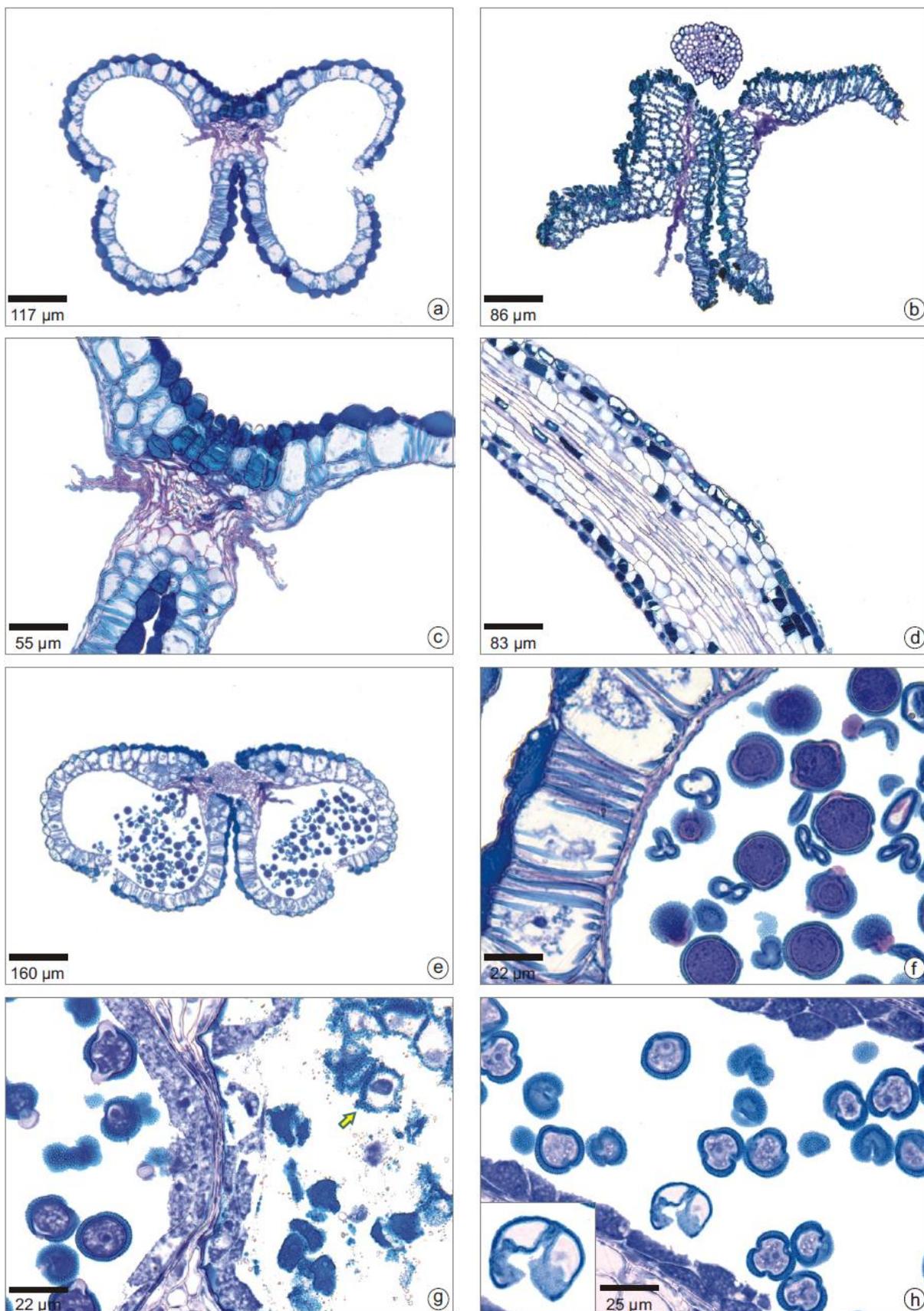


Figura 8 - Androceu das flores perfeitas HAF e anomalias no desenvolvimento. a, b, c, d, e, f, h - Secções transversais. a, b - Antera deiscente; c - Colapso do parênquima do conectivo; d - Filete em secção longitudinal; e, f - Grãos de pólen; g - Loja com micrósporos viáveis e loja com micrósporos colapsados; h - Tétrade anômala.

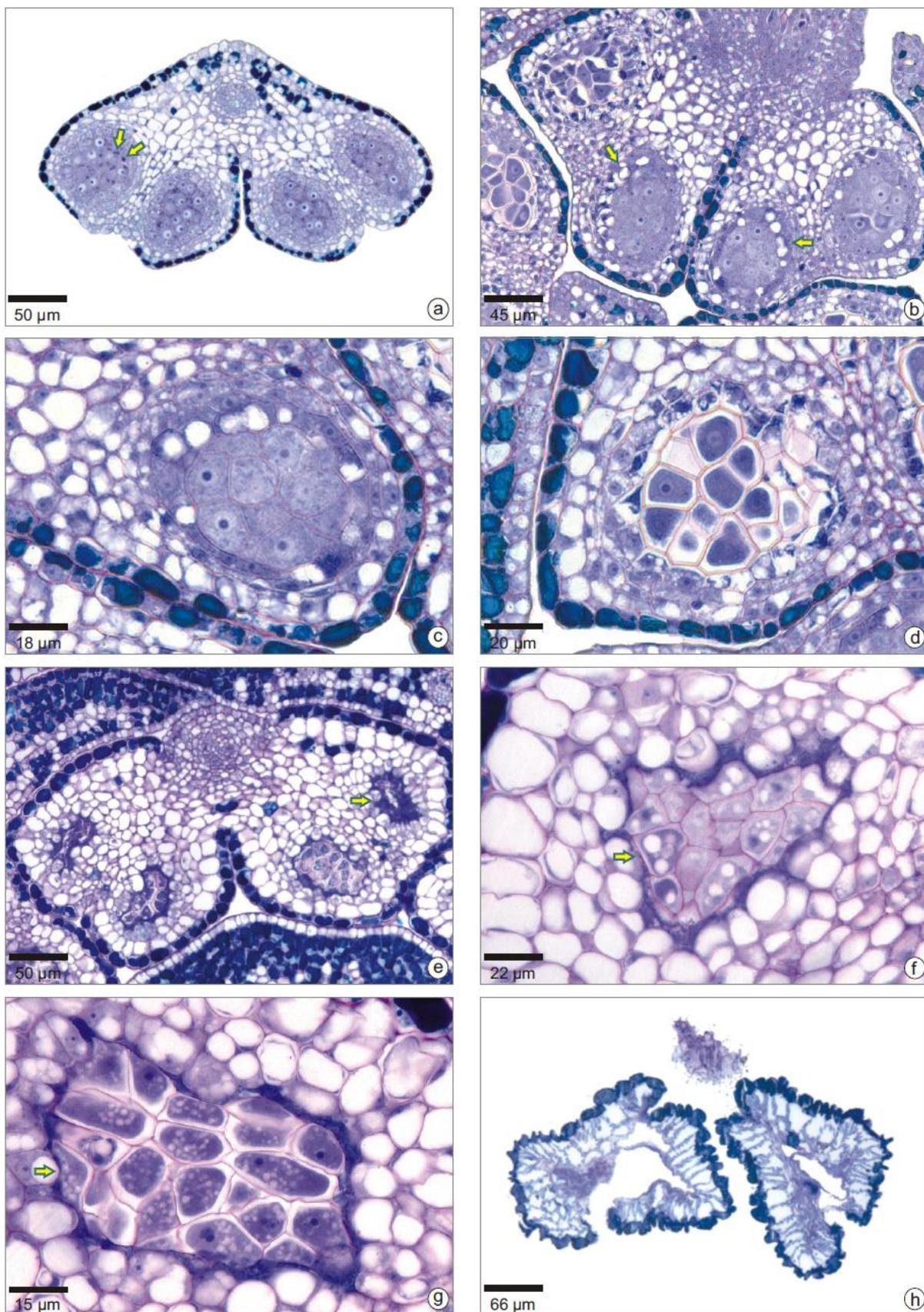


Figura 9 - Androceu nas flores pistiladas. Secções transversais. a – Alteração na diferenciação do tecido esporogênico; b, c – Vacuolização do tapete; d – Contração do tapete; e – Colapso do tapete; f – Vacuolização do tecido esporogênico; g – Vacuolização dos meiócitos; h – Antera deiscente sem grãos de pólen.

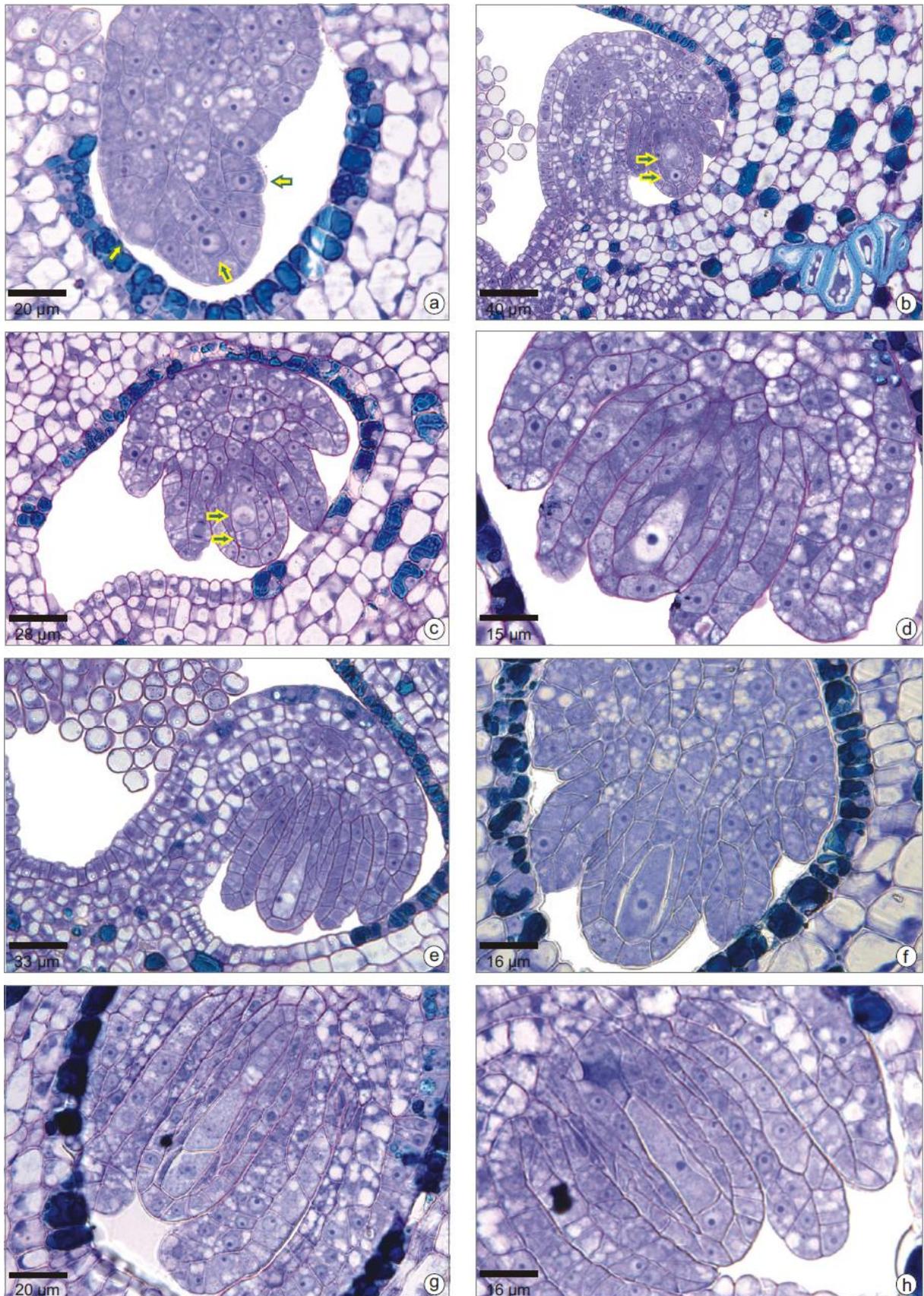


Figura 10 - Diferenciação dos óvulos das flores pistiladas. Secções longitudinais. a – Célula arquesporial e início da formação do tegumento interno; b, c – Célula parietal, célula esporogênica e início da formação do tegumento externo; d, e – Célula esporogênica; f – Meiócito; g, h – Meiose I.

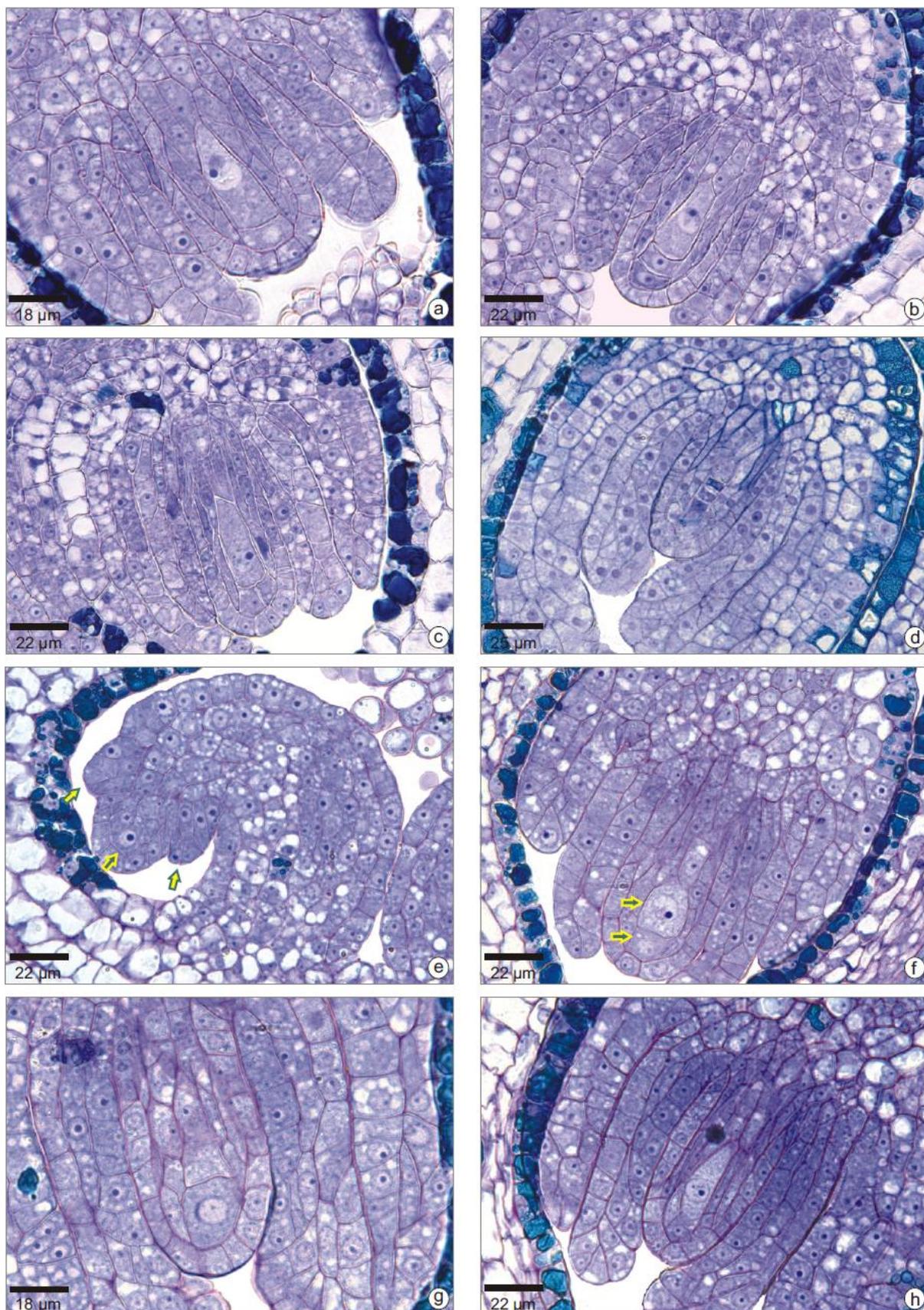


Figura 11 - Diferenciação dos óvulos das flores pistiladas e perfeitas. Secções longitudinais. a – d – Flores pistiladas. a - Meiose I; b, c – Meiose II; d – Megáspero funcional. e – h – Flores perfeitas. e – Célula arquesporial; f – Célula esporogênica e célula parietal; g – Meiose I; h – Meiose II.

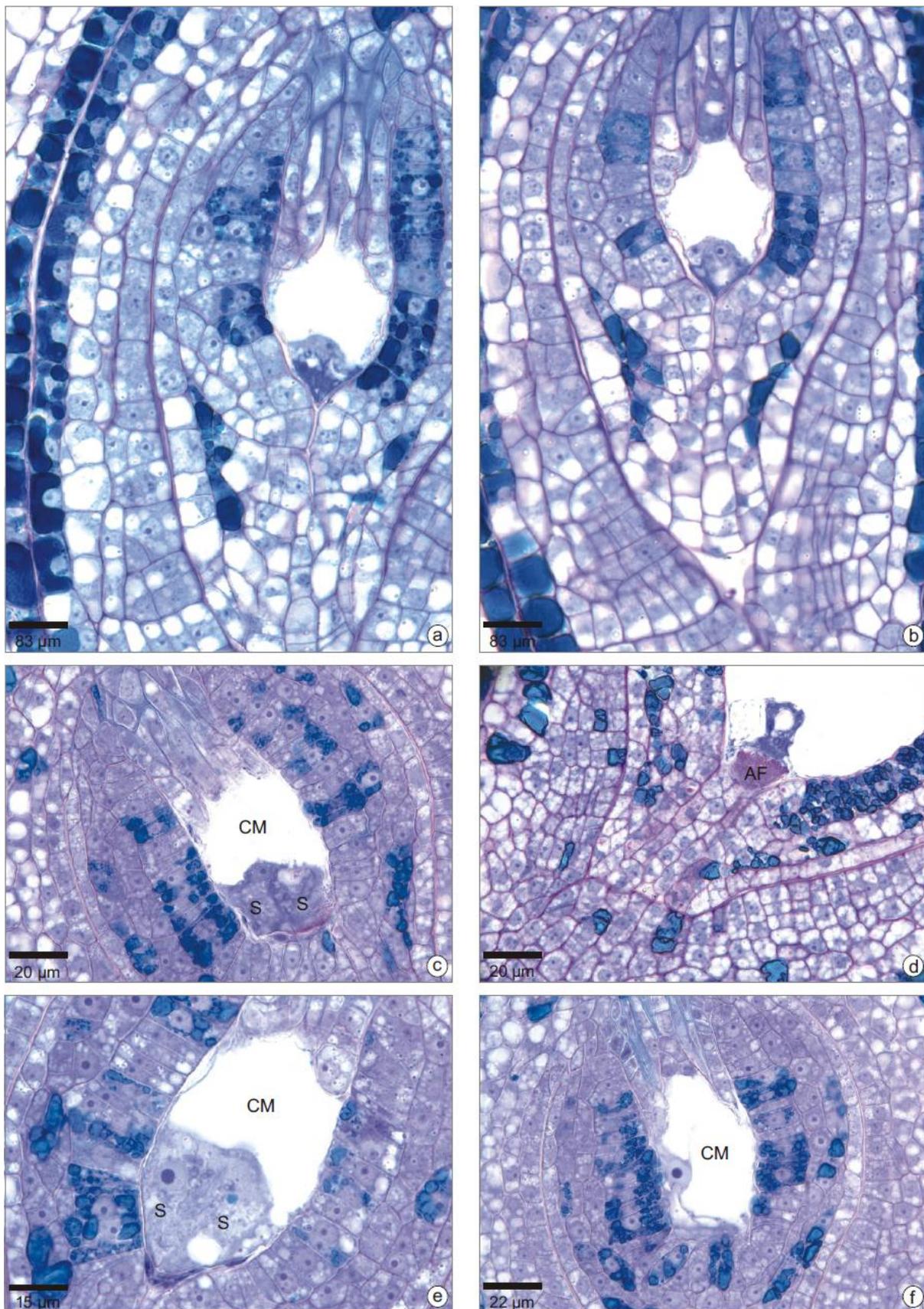


Figura 12 - Óvulos das flores pistiladas. Secções longitudinais. a – Saco embrionário: Sinérgides; b – Saco embrionário: Oosfera; c – Sinérgides e núcleo da oosfera; d – Aparato fibrilar das sinérgides; e – Sinérgides; f – Núcleo polar da célula média. CM - Célula média; S - Sinérgide; AF - Aparato fibrilar.

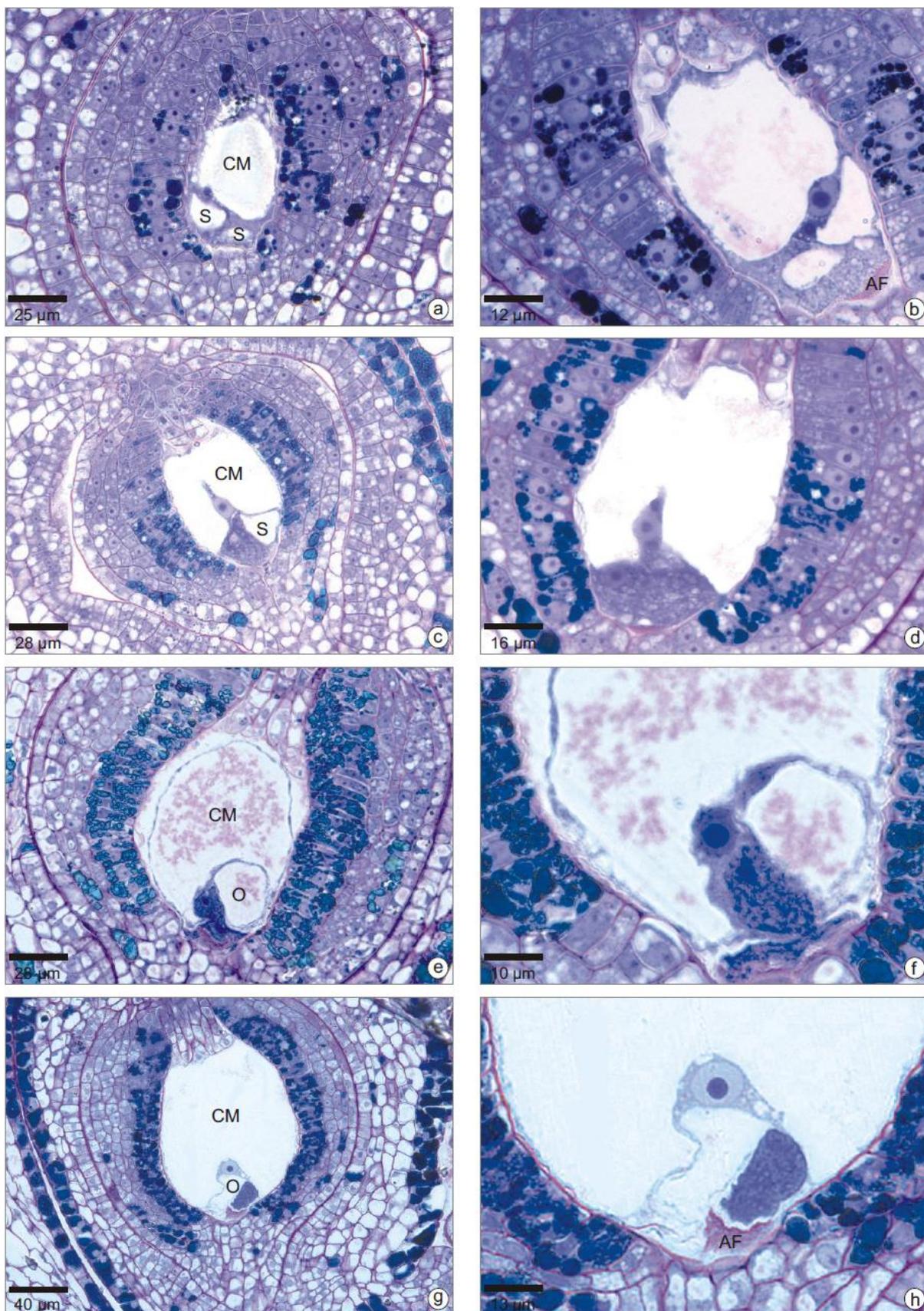


Figura 13 - Óvulos das flores perfeitas HBF. Secções longitudinais. a – Saco embrionário: Sinérgides; b – Aparato fibrilar; c, d – Núcleo polar da célula média; e, f – Sinérgide e oosfera; g, h – Sinérgide e oosfera polarizada. CM - Célula média; S - Sinérgide; O - Oosfera; AF - Aparato fibrilar.

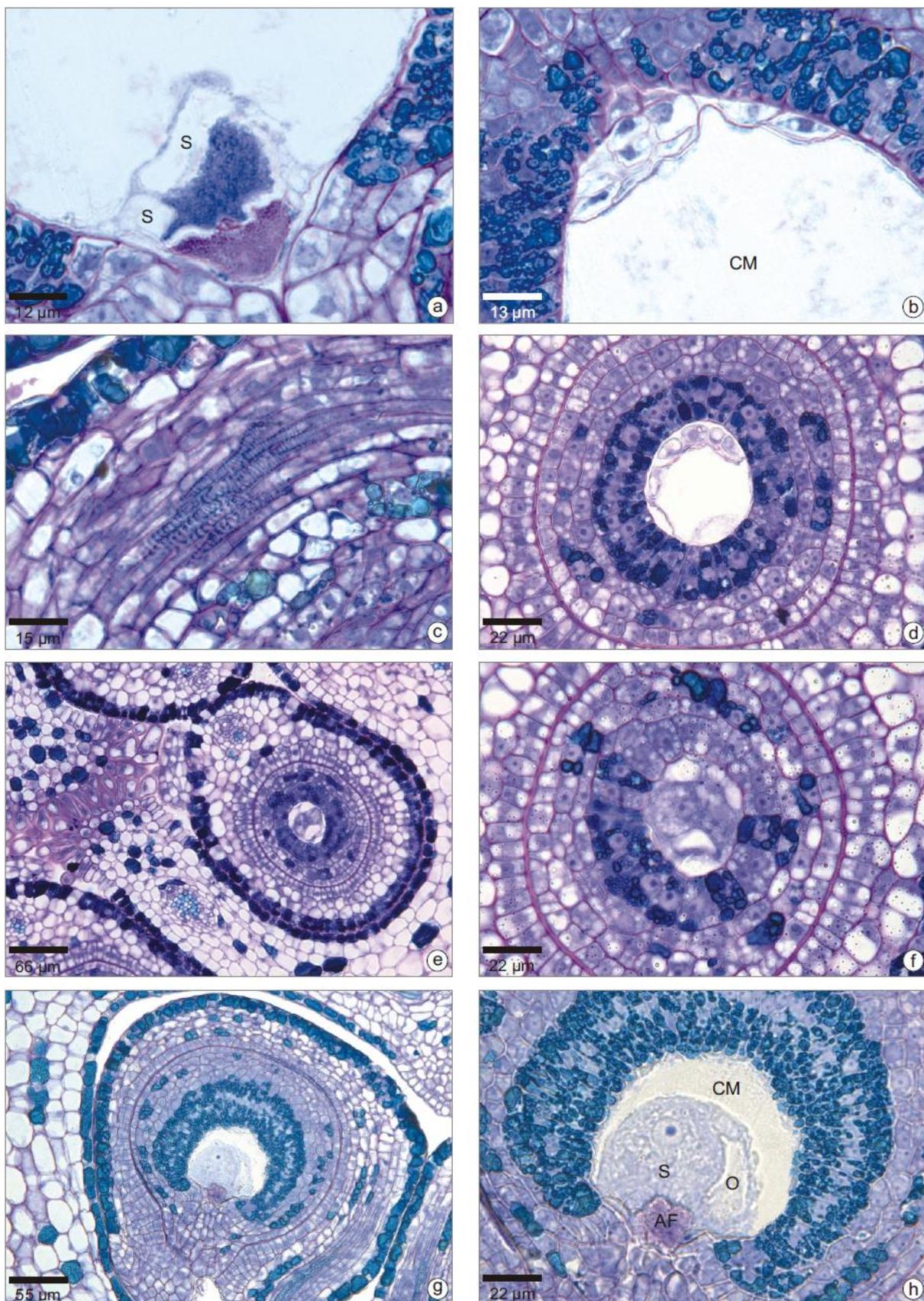


Figura 14 - Óvulos das flores perfeitas HBF. a - h - Secções longitudinais. d - f - Secções transversais. a - Saco embrionário: Sinérgides; b - Proliferação celular na região da calaza; c - Feixe vascular na altura da calaza; d - Proliferação celular na região da calaza; e, f - Sinérgides; g, h - Sinérgides hipertrofiadas. CM - Célula média; S - Sinérgide; O - Oosfera; AF - Aparato fibrilar.

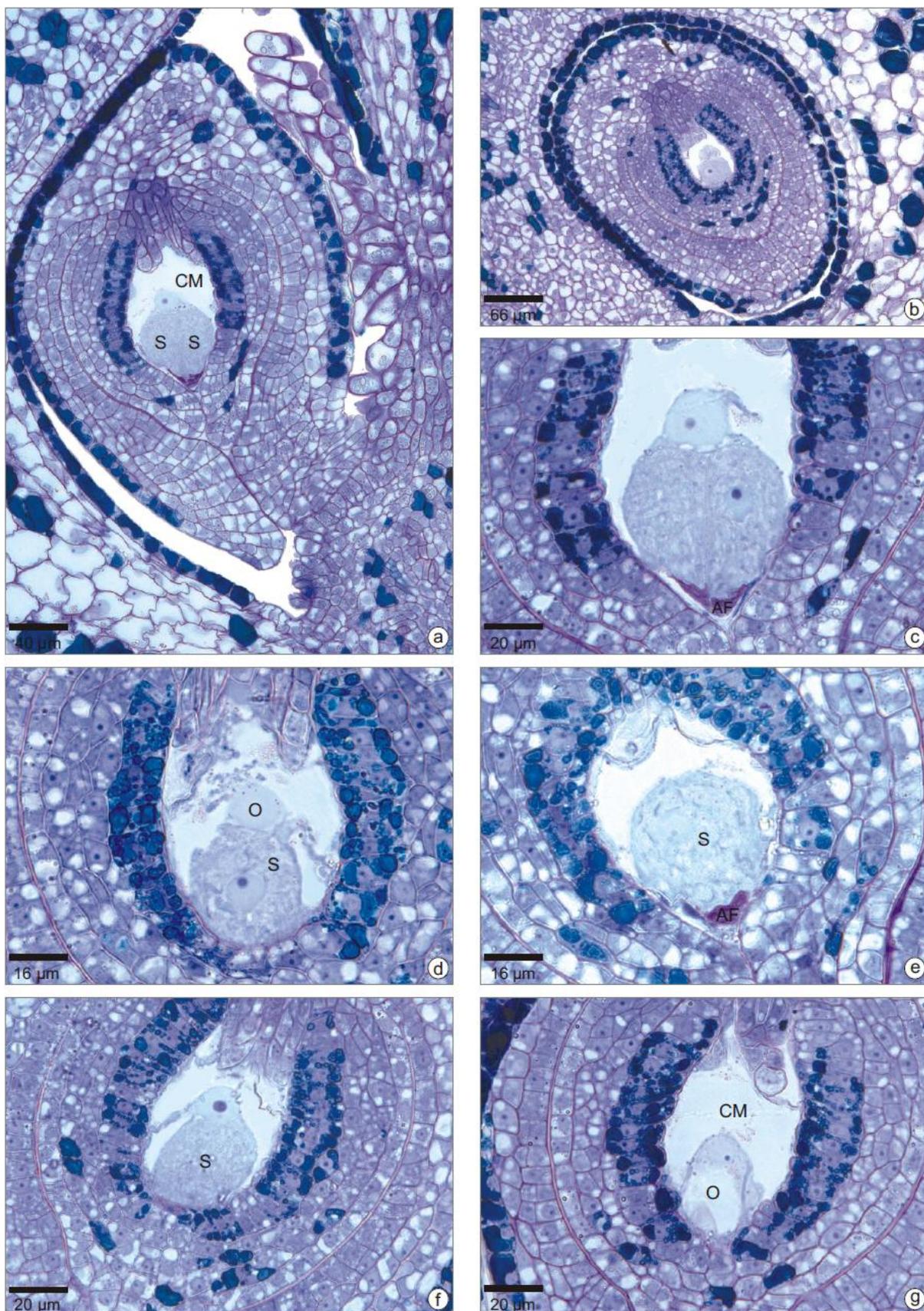


Figura 15 - Óvulos das flores perfeitas HAF. Secções longitudinais. a - c – Sinérgides hipertrofiadas e núcleo da oosfera; d, e – Sinérgides com desorganização citoplasmática; f – Sinérgide e núcleo da oosfera; g – Oosfera polarizada. CM - Célula média; S - Sinérgide; O - Oosfera; AF - Aparato fibrilar.

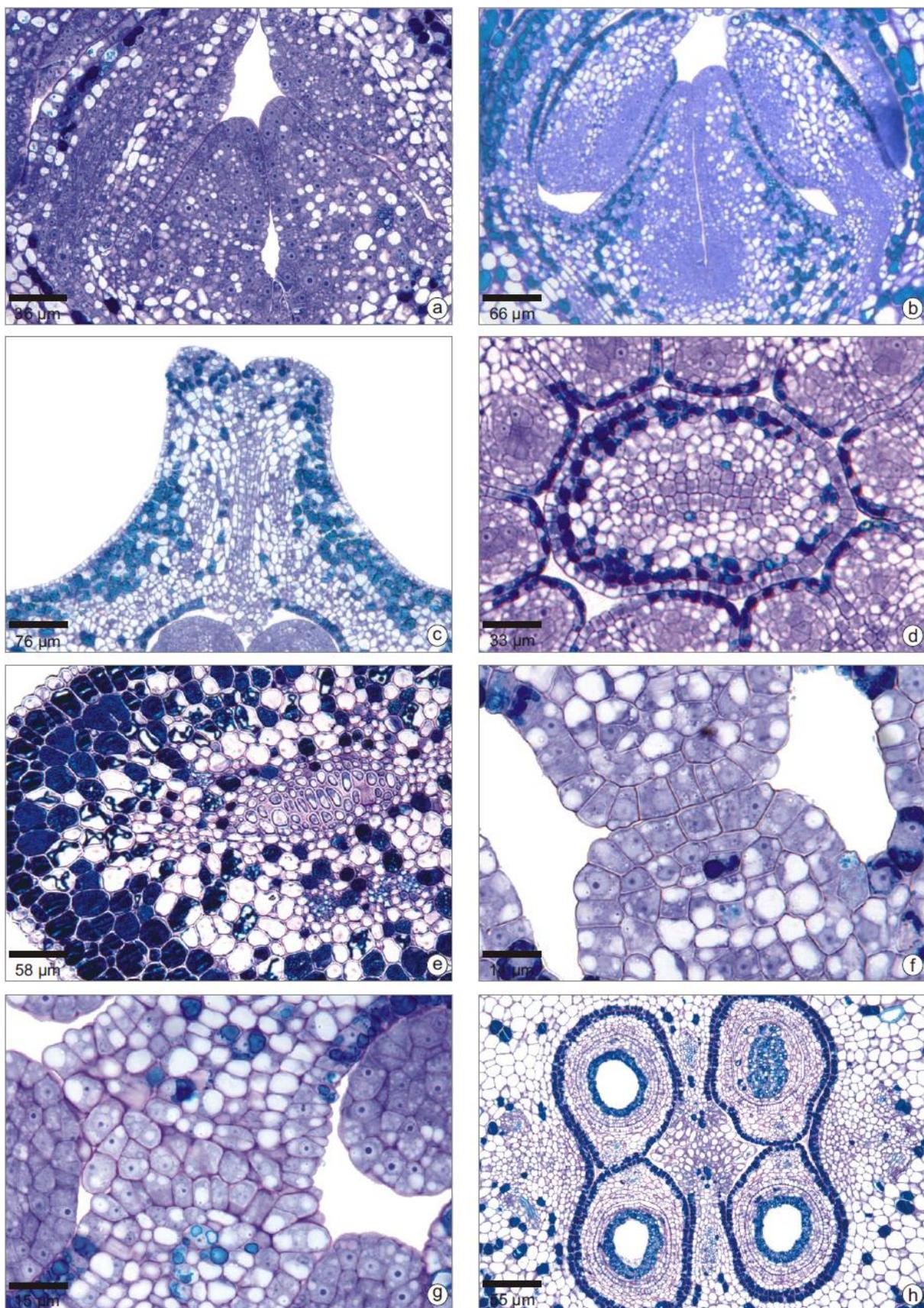


Figura 16 - Diferenciação dos carpelos. a – c – Secções longitudinais. d – h – Secções transversais. a – Alongamento dos carpelos; b – Fusão carpelar; c - e – Diferenciação do tecido transmissor; f – h – Diferenciação do cômputo.

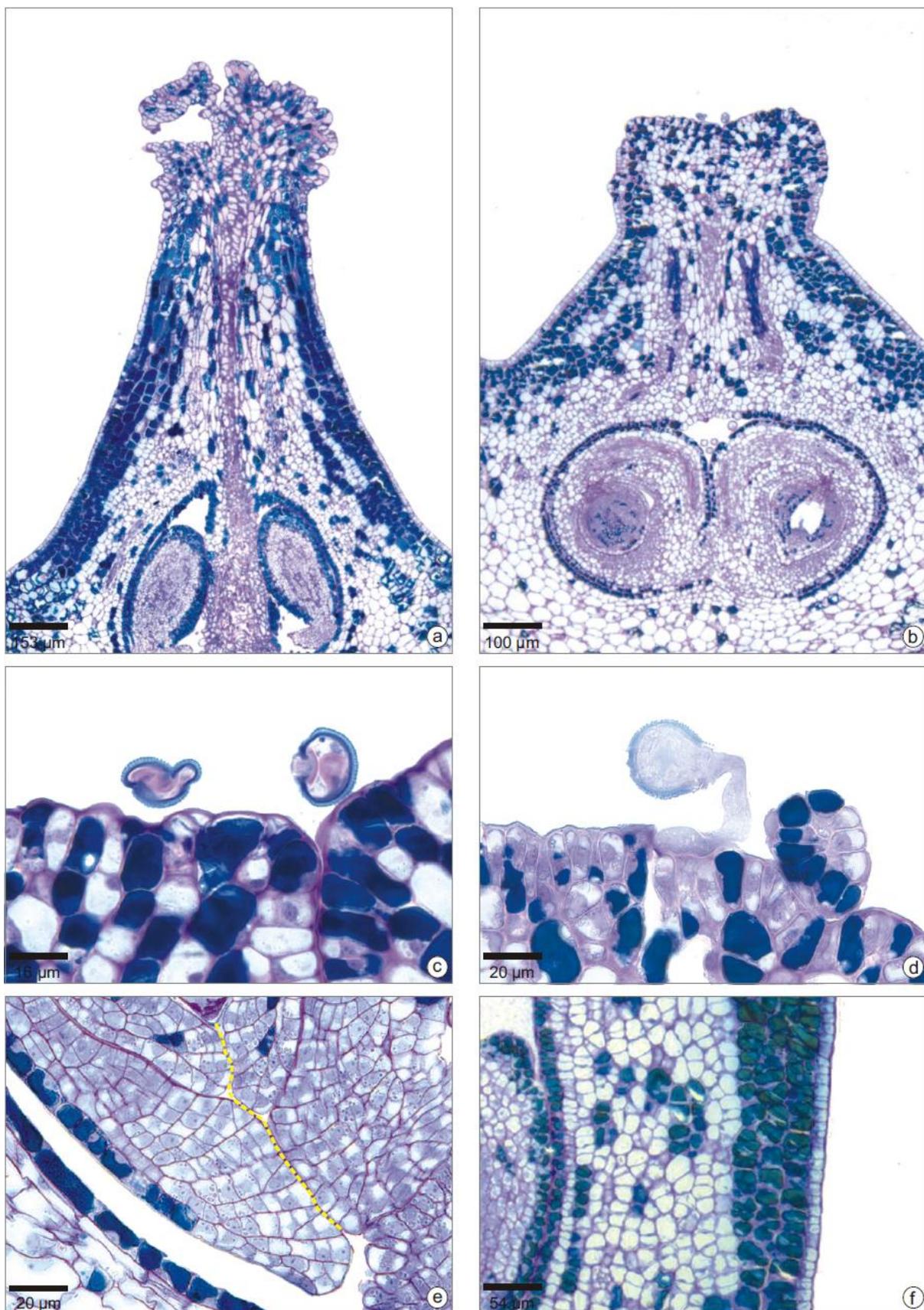


Figura 17 - Gineceu. Secções longitudinais. a – Gineceu das flores pistiladas; b – Gineceu das flores perfeitas; c – Grãos de pólen no estigma das flores pistiladas; d – Germinação do grão de pólen no estigma das flores perfeitas; e – Micrópila em zigue-zague; f – Parede do ovário.

## 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### 4.1. Estrutura floral

A estrutura floral da ordem Celastrales (APG, 1998, 2003) é pouco explorada, provavelmente porque suas flores parecem ser morfológicamente simples e de fácil compreensão (Matthews & Endress, 2005). Da mesma forma, estudos de desenvolvimento floral são quase inexistentes (Matthews & Endress, 2005; Tobe & Raven, 1993). O extenso trabalho de Matthews & Endress (2005) destaca-se pelo estudo comparativo da morfologia, anatomia e histologia florais de representantes das três famílias da ordem - Celastraceae, Parnassiaceae e Lepidobotryaceae. Segundo os autores, todas as três famílias apresentam pétalas sem atraso de desenvolvimento após a iniciação no botão, gineceu tricarpelar, fendas ventrais dos carpelos seladas por células epidérmicas longas e tecido transmissor com vários estratos celulares, os dois tegumentos em geral com mais de dois estratos celulares e indumento esparso ou ausente. Celastraceae compartilha com Parnassiaceae um gineceu completamente sincárpico com lobos estigmáticos comissurais, no qual há o desenvolvimento intenso de feixes vasculares no local da comissura, e redução dos feixes carpelares medianos; óvulos fracamente crassinucelados ou incompletamente tenuinucelados com endotélio; sépalas e pétalas parcialmente franjadas e estames fusionados ao ovário. As flores são bissexuais protândricas e hercogâmicas, graças ao movimento dos estames e à abscisão das anteras (Matthews & Endress, 2005). Com Lepidobotryaceae, Celastraceae compartilha poucos caracteres, tais como flores pseudohermafroditas e estames unidos pelas bases formando um colar em torno do gineceu (Matthews & Endress, 2005).

*Maytenus obtusifolia* segue o padrão da ordem em relação à diferenciação centrípeta dos verticilos florais. As pétalas iniciam a diferenciação pouco após a emissão dos primórdios das sépalas cujo desenvolvimento reduzido, associado à ausência de retardo no desenvolvimento da corola faz desta a principal proteção do botão. O mesmo ocorre em outras ordens de rosídeas, como Vitales (Gerrath & Posluszny, 1988), Myrtales (Schönenberger & Conti, 2003) e Sapindales (Ronse de Craene & Haston, 2006; Bachelier & Endress, 2009). A extremidade do cômputo com tricomas, a presença de dois tegumentos com mais de dois estratos celulares, assim como ausência de indumento floral são também comuns à ordem. Por outro lado, a espécie difere das demais estudadas da ordem, por apresentar gineceu bicarpelar e não tricarpelar.

Em Celastraceae e Parnassiaceae, comumente há o desenvolvimento de feixes vasculares no local de fusão dos carpelos e redução dos feixes carpelares medianos. Em *M.*

*obtusifolia*, há a diferenciação de dois feixes vasculares no local de fusão dos carpelos, no entanto não há redução dos feixes carpelares medianos. A vascularização do gineceu se dá através de quatro feixes vasculares, dois provenientes da fusão carpelar, responsáveis pela irrigação da placenta em conjunto com feixes oriundos do pedicelo, e dois provenientes dos feixes medianos das folhas carpelares, que percorrem a parede do ovário em direção ao estigma.

Matthews & Endress (2005) apontam Celastraceae como uma família bem suportada pela estrutura floral, e consideram as características drusas de oxalato nos tecidos florais e lóculos ovarianos com a face dorsal distendida, formando o septo apical, possíveis sinapomorfias. *M. obtusifolia* difere pela ausência de drusas ou cristais de oxalato de cálcio, porém se assemelha pela presença de septo apical. Este, porém, é mais desenvolvido e se estende até a base do ovário. O tecido transmissor conspícuo, também considerado potencial sinapomorfia para Celastraceae pelos autores é reduzido em *M. obtusifolia*.

A comparação da flor de *M. obtusifolia* com aquelas dos gêneros de Celastraceae analisados por Matthews & Endress (2005) exclui a única espécie de *Maytenus* amostrada, *M. emarginata* pelo fato de sua estrutura interna não ter sido estudada em detalhe, havendo menção apenas à estrutura do gineceu. Verificou-se que os lobos estigmáticos são comissurais e a fronteira entre o estilete e estigma é constrita. *M. obtusifolia*, assim como *M. emarginata*, apresenta lobos estigmáticos comissurais, no entanto não foi observada constrição entre o estilete e estigma.

*M. obtusifolia* assemelha-se a muitas espécies da família pela a ausência de tricomas e a abundância de idioblastos de conteúdo fenólico nos diversos órgãos florais. No entanto, não apresenta idioblastos de mucilagem e os estômatos não ocorrem nas sépalas e pétalas como é comum em Celastraceae, se restringindo ao disco nectarífero. O traço vascular nos estames é formado por um feixe central circundado por porções de floema, como em diversas Celastraceae, divergindo, no entanto, pela ausência de vascularização nos nectários. Na maioria dos táxons a vascularização destes é feita por numerosos e pequenos feixes floemáticos. No disco nectarífero, caracteristicamente posicionado entre o androceu e o gineceu, os estômatos encontram-se ao nível epidérmico compatível com a ausência de um padrão sistemático na família.

As sépalas, como em Celastrales, apresentam uma base larga com um ápice arredondado. No entanto, não apresentam a variação encontrada em algumas Celastraceae em relação à espessura entre sépalas e pétalas, estas divergindo somente no comprimento.

O androceu é haplostêmone e, assim como descrito em outras espécies do gênero, ocorre senescência das anteras após a antese masculina, provavelmente devido à presença de um conectivo delgado e ausência de um endotécio sustentando a região, que após a

liberação dos grãos de pólen inicia um processo de degeneração. Nos gêneros de Celastraceae com flores bissexuais (*Denhamia*, *Euonymus*, Matthews & Endress, 2005; *Maytenus*, Robson *et al.*, 1994) as anteras senescem na fase final da antese masculina. O conectivo é geralmente delgado e o endotécio não é contínuo sobre o conectivo (Matthews & Endress, 2005).

A estrutura do gineceu é relativamente uniforme na família (Simmons, 2004a). *M. obtusifolia* tem estilete curto, como a maioria das Celastraceae e o estigma difere por não possuir papila ou indumento. O gineceu bicarpelar e sincárpico com vascularização que difere da maioria dos gêneros de Celastraceae (Matthews & Endress, 2005) por se estender até a altura do estilete. Em *Celastroideae* – sub-família a qual pertence a espécie estudada - o gineceu é sinascidiado, ou seja, cada carpelo é congenitamente fechado e unido aos demais, pelo menos na base do ovário. Pode variar desde ovários quase completamente simplicados a quase completamente sinascidiados, caso de *Euonymus* e *Lepidobotrys*.

Em *M. obtusifolia* a fusão é pós-genital como em cerca de dezessete gêneros de Celastraceae (Simmons, 2004a). Em todos os táxons de Celastrales, analisados por Matthews & Endress (2005), a angiospermia corresponde ao tipo 4 (*sensu* Endress & Igersheim, 2000), que consiste na fusão pós-genital sem secreção, em oposição aquela somente por meio de secreção (tipo 1), predominante nas angiospermas basais. Dois tipos intermediários apresentam uma combinação entre fusão por secreção e fusão pós-genital, predominantes em várias ordens de rosáceas.

*M. obtusifolia* apresenta distinção em relação à posição do ovário nos diferentes tipos florais. Em flores pistiladas o ovário é semi-ífero diferindo das flores hermafroditas, cujo ovário é ífero. No gênero, a variação em relação à posição do ovário - de súpero a ífero - em uma mesma espécie ou indivíduo, foi primeiramente observada por Carvalho-Okano (1992). Segundo a autora, provavelmente as flores que apresentam ovário completamente ífero são funcionalmente estaminadas, tal fato pode explicar, em parte, o grande número de flores produzidas e o baixo número de frutos formados, de acordo com o observado por Benevides (dados não publicados).

Em *M. obtusifolia*, o cômputo se estende ao longo de toda a zona simplicada, desde o estigma até a base do septo onde a epiderme está diferenciada em tricomas, como é comum nas espécies de Celastraceae com placentação axial. No entanto, sua placentação é parietal marginal basal. Nos táxons de Celastraceae com placentação parietal, o cômputo se restringe ao estilete sendo visível desde o estigma até a região da placenta com vários estratos celulares (Matthews e Endress, 2005). Em Celastraceae, a placenta está situada em parte ou completamente na zona sinascidiada assim como em *M. obtusifolia*, *Euonymus*, *Siphonodon* e *Stackhousia*, ou está restrita à zona simplicada (*Perrottetia* e *Salacighia*).

A espécie analisada apresenta dois óvulos bitegmos e antítropos por carpelo e a curvatura se dá em direção oposta à do ovário; com ambos os tegumentos lobados, tal como em todos os táxons da família analisados por Matthews & Endress (2005). Em Celastraceae, os óvulos são, principalmente, anátropos, no entanto a curvatura se dá em direção à do ovário (Endress, 1994), raramente antítropos (Endress, 1994), ou pleurótropos (Mauritzon, 1936a *apud*. Matthews & Endress, 2005). Tegumento interno mais espesso que o externo foi encontrado na maioria das Celastraceae (Matthews & Endress, 2005). Este caráter é referido como sinapomorfia para o clado COM – composto por Celastrales, Oxalidades e Malpighiales - e as rosideas II (malvideas), estando ausente em *M. obtusifolia*. Celastrales e diversas Celastraceae, inclusive *M. obtusifolia*, caracterizam-se por apresentar tegumento externo maior que o interno e micrópila formada por ambos os tegumentos e em zigue-zague. Nos óvulos de *M. obtusifolia* o feixe vascular se esgota na calaza, tal como observado em grande parte das Celastraceae (Matthews & Endress, 2005). *M. obtusifolia* apresenta endotélio diferenciado na camada mais interna do tegumento interno, estando, nas flores em antese, diretamente em contato com o saco embrionário.

O acompanhamento da ontogênese dos óvulos de *M. obtusifolia* revelou que a divisão da célula arquesporial sempre origina uma célula parietal no estrato hipodérmico. No entanto a célula parietal não foi observada após a diferenciação do megasporócito, o que sugere que seja efêmera. Além disso, a espécie também apresenta potencial de divisão em diferentes planos durante a megasporogênese e formação das tétrades assincronica.

Diversas possibilidades na diferenciação do megasporócito foram observadas por Fernando & Cass (1996) em *Butomus umbellatus*. Um único arquesporo diferencia-se no estrato hipodérmico do megasporângio, este se divide originando uma célula esporogênica e uma parietal, tal divisão pode ocorrer em diferentes planos e, ocasionalmente, originar uma única célula parietal no estrato hipodérmico, seguida da diferenciação da célula esporogênica em megasporócito. Este mantém a capacidade de divisão em diferentes planos, podendo levar à formação de diferentes tipos de tétrades (linear, decussado e em “T”).

Pozner (2001) descreve diferentes vias na diferenciação do megasporócito, levando em consideração a célula precursora do megasporócito e as demais células nucelares nos diferentes tipos de nucelo. Em *M. obtusifolia*, a diferenciação do megasporócito difere em alguns aspectos do modelo “Extended meiosis with central-acropetal gradient, partial meiotic selection of GMCs and postmeiotic selection of spores” apresentado pelo autor e encontrado em *Casuarina montana* (Swamy, 1948). Pozner (l.c.) interpreta que em óvulos crassinucelados há células, localizadas duas camadas abaixo do epitélio nucelar, capazes de divisão. Estas iniciam divisões mitóticas em um gradiente centro-acropetal,

diferenciando centralmente uma célula parietal, voltada para o pólo calazal, e uma célula esporogênica, voltada para o pólo micropilar, esta retém o potencial se diferenciando em megasporócito e posteriormente iniciando a divisão meiótica.

Em óvulos tenuinucelados o megasporócito se desenvolve diretamente a partir de uma célula arquesporial. Nos crassinucelados, a célula arquesporial se divide formando um megasporócito e uma célula parietal. O conceito, introduzido por Van Tieghem (1898), baseia-se na formação do megasporócito: se este deriva-se diretamente ou indiretamente da célula arquesporial. De acordo com Takhtajan (1991) um óvulo crassinucelado caracteriza-se pela separação do megasporócito do epitélio nucelar por células parietais.

Em *M. obtusifolia*, a diferenciação da célula esporogênica ocorre no estrato hipodérmico do nucelo; com inversão da posição entre a célula esporogênica e da célula parietal em relação ao apresentado em *Casuarina montana*. A existência desta caracteriza um nucelo crassinucelar; porém a posterior degeneração da célula parietal produz um nucelo tenuinucelar derivado. Desta forma, há uma variação em relação ao número de estratos nucleares nas diferentes etapas de diferenciação do megasporócito. Além disso, também foi encontrada variação durante a megasporogênese, tal fato sugere que possa haver uma variação entre os diferentes tipos de nucelo na espécie e faz com que a espécie não se enquadre nas tipificações de nucelo existentes. Em Celastraceae e Parnassiaceae, os óvulos são quase sempre fracamente crassinucelados ou incompletamente tenuinucelados (Matthews & Endress, 2005). Nestes óvulos com um nucelo relativamente delgado, o endotélio é muitas vezes presente na epiderme interna do tegumento interno, como observado em *Euonymus* (Andersson, 1931; Naumova, 1970 *apud*. Matthews & Endress, 2005), *Hippocratea* (Matthews & Endress, 2005), *Maytenus* (Andersson, 1931 *apud*. Matthews & Endress, 2005).

Relacionando a tipificação de nucelo apresentada por Matthews e Endress (2005) com o observado em *M. obtusifolia*, esta apresenta variação em diferentes tipos de nucelo durante o desenvolvimento do megasporócito. Enquanto célula arquesporial, os óvulos são incompletamente tenuinucelados, por esta estar recoberta somente pela epiderme; durante a diferenciação da célula esporogênica, os óvulos são fracamente crassinucelados, por ter havido divisão da célula arquesporial levando à formação de uma célula parietal no estrato subepidérmico; no entanto, esta parece degenerar, visto que, só foram observados megasporócitos recobertos somente pela epiderme, caracterizando óvulos incompletamente tenuinucelados.

O gênero *Maytenus* revelou-se polifilético nas duas filogenias em que foi amostrado – para a família Celastraceae e para a tribo *Celastrae* (Simmons *et al.*, 2001b, 2008). Distribuído em três grandes linhagens - Austral-pacífico, Africana e Novo Mundo, esta última

composta por *M. boaria*, *M. disticha* e *M. floribunda* - necessita recircunscrição. Face à ausência de *M. obtusifolia* nas análises filogenéticas existentes consideramos a mesma compartilhando o clado em que se localizam as demais espécies de *Maytenus* do Novo Mundo. Em razão de não haver dados referentes à estrutura floral para as referidas espécies, buscou-se a comparação com espécies do clado irmão. Neste, o gênero asiático *Euonymus* foi o melhor analisado do ponto de vista da estrutura floral e apresenta semelhanças na estrutura do óvulo, como a presença de tegumentos lobados, o tegumento externo mais espesso que o interno, micrópila formada por ambos os tegumentos e a extinção do feixe vascular na região da calaza.

A filogenia proposta por Simmons *et al.* (2001b) baseada em análises moleculares e morfológicas revelou Celastraceae como um grupo polifilético cujos limites foram ampliados no APG III (2009). Simmons *et al.* (*l.c.*) apontam quatro sinapomorfias morfológicas em Celastraceae: número de estames e estaminódios igual ao número de pétalas, filetes inseridos na margem externa do disco, presença de estiletos conados, e dois óvulos por lóculo. As observações morfológicas e estruturais evidenciaram a ocorrência destas características em *M. obtusifolia*. Posteriormente, Matthews & Endress (2005) e Zhang & Simmons (2006), baseados em análises estruturais e moleculares, respectivamente, propuseram duas potenciais sinapomorfias anatômicas nas flores de Celastraceae: a presença de drusas de oxalato de cálcio e um ovário com septo apical. Dentre estas, em *M. obtusifolia* ocorre somente a presença de um septo apical no ovário.

No sub-clado COM, de rosids, dentre as sinapomorfias apontadas (Endress & Matthews 2006), destaca-se a estrutura do óvulo, no que diz respeito à espessura do nucelo – em geral delgado – e a presença de um endotélio, ambos os caracteres observados em *M. obtusifolia*.

Os dados estruturais da flor de *M. obtusifolia* acrescentam informações valiosas em um grupo carente de resultados estruturais e podem contribuir em futuras análises filogenéticas.

#### 4.2. Funcionalidade dos verticilos reprodutivos e a expressão da ginodioicia

Na restinga de Maricá *Maytenus obtusifolia* é ginodioica; a população apresenta plantas de dois morfos sexuais distintos: um feminino, com flores exclusivamente pistiladas, e outro hermafrodita, com flores perfeitas. A dificuldade na caracterização do sistema sexual de espécies do gênero e da família, anteriormente registrada por diversos autores (Brizicky, 1964; Sebsebe, 1985; Matthews & Endress, 2005), foi também percebida ao longo da pesquisa de Benevides (tese em desenvolvimento), principalmente em função de uma contínua plasticidade de caracteres morfológicos (tamanho do gineceu, sinuosidade da superfície estigmática) e reprodutivos (viabilidade polínica, porcentagem de frutificação), intra e interplantas hermafroditas.

O morfo feminino mostrou-se invariável com relação à morfologia floral e ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas. Nas flores pistiladas não há a produção de grãos de pólen. O estudo ontogenético destas flores revelou que alterações estruturais nas células do tapete – vacuolização e contração citoplasmática - associadas ao surgimento de estruturas densamente coradas no citoplasma das células esporogênicas são os primeiros indícios de esterilidade masculina e caracterizam uma morte celular precoce nestes tecidos. Somente após a total degradação das células do tapete, o tecido esporogênico e/ou meiócitos iniciam um processo de vacuolização resultando na degradação dessas células.

O tapete é fundamental no desenvolvimento do grão de pólen, é a camada de tecido esporofítico que está em contato direto com o microgametófito em desenvolvimento (Papini *et al.*, 1999; Shivanna *et al.*, 1997), produz substâncias - como esporopolenina, proteínas e lipídios – essenciais ao desenvolvimento e maturação do grão de pólen (Jin *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1998; Ma, 2005). Nas anteras férteis, o tapete sofre degradação nos estádios finais do desenvolvimento dos grãos de pólen, após a formação das paredes (Papini *et al.*, 1999; Wu & Cheung, 2000). A eliminação seletiva de células indesejáveis, desnecessárias, ou que tiveram sua função esgotada é um processo fisiológico denominado morte celular programada (Ellis *et al.*, 1991; Pennell & Lamb, 1997). A morte prematura das células do tapete causa o aborto do grão de pólen e pode estar relacionada à atividade de genes nucleares, muitos destes identificados em mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Chaudhury, 1993; Yang *et al.*, 2003).

A esterilidade masculina associada à degradação pré-meiótica das células do tapete das flores pistiladas de *M. obtusifolia* parece também ocorrer em *Sorghum*, *Aegilops ovata* (Poaceae) e *Beta* (Chenopodiaceae) (Laser & Lersten, 1972; Bhandari, 1984; Sawhney & Shukla, 1994) e contrasta com o observado na maioria dos sistemas de esterilidade, nos

quais o aborto do micrósporo ocorre após a meiose e antes do final da maturação do grão de pólen.

A esterilidade masculina pode ser com frequência determinada por genes mitocondriais e estar associada ao fenótipo de esterilidade dos grãos de pólen (Chase, 2006). Muitas espécies ginodioicas estudadas apresentam determinação sexual nuclear-citoplasmática (Charlesworth, 1981; Bailey & Delph, 2007a,b). Neste caso, a esterilidade citoplasmática masculina (ECM), pode ser suprimida por genes nucleares conhecidos como “genes restauradores da fertilidade masculina” (*Rf*) (Kaul, 1988; Chase, 2006). Sistemas ginodioicos podem conter múltiplos alelos para ECM, cada um requerendo seu próprio modo de restauração (McCauley & Bailey, 2009). Na maioria das vezes, os indivíduos femininos são aqueles que apresentam genes ECM não restaurados, enquanto os hermafroditas apresentam ECM suprimida por determinados alelos *Rf*. Alguns dos fenótipos relacionados à ECM são a degeneração de estames, anteras ou tapete, ou ainda problemas no desenvolvimento ou funcionalidade dos grãos de pólen. Na maioria dos casos, as plantas que apresentam ECM são fenotipicamente normais em todos os aspectos, exceto quanto à fertilidade masculina (Chase, 2006).

No morfo hermafrodita de *M. obtusifolia*, os indivíduos apresentam uma variação contínua na viabilidade dos grãos de pólen (2 a 99%) e nas porcentagens de frutificação (0 a 15%). As taxas de viabilidade e de frutificação por indivíduo são mantidas em sucessivas florações (C. Benevides, tese em desenvolvimento). Os resultados aqui apresentados mostraram que, após a microsporogênese, ocorre degeneração de uma fração maior ou menor de grãos, resultando em viabilidade polínica variável. Situação semelhante também foi registrada em outras espécies ginodioicas como *Plantago lanceolata* (Haan *et al.*, 1997), *Lobelia siphilitica* (Bailey, 2002) e *Beta vulgaris* (Dufay *et al.*, 2008) e interpretada como resultado de um custo na restauração da fertilidade masculina no morfo hermafrodita (Koelewijn & Van Damme, 1995; Bailey, 2002; Chase, 2006). Este custo afeta primariamente a função masculina (Bailey & Delph, 2007a, b) e tem sido associado à ginodioicia controlada por herança nuclear-citoplasmática (Koelewijn & Van Damme, 1995; Bailey & Delph, 2007a, b; Dufay *et al.*, 2008; Case & Caruso, 2010).

Considerando a hipótese ECM em *M. obtusifolia*, a variação nas taxas de viabilidade polínica aponta para a presença, nos grãos de pólen, de diferentes combinações de genes nucleares restauradores interagindo com os mesmos genes de esterilidade citoplasmática das mitocôndrias herdadas da planta mãe. Nas anteras jovens, o tecido esporogênico diferencia células mães que, após a meiose, formam cada qual, quatro micrósporos geneticamente diferentes. Estes, por mitoses, produzem indivíduos haplóides – os gametófitos masculinos. Assim, o conjunto de grãos de pólen gerados numa antera

corresponde a um pool de genótipos nucleares com diferentes combinações de alelos de genes restauradores nos núcleos das células de cada grão de pólen. No citoplasma de todos os grãos, as mitocôndrias, herdadas da planta mãe, carregam os genes determinantes de esterilidade, idênticos em todos os grãos e na planta mãe, incluindo as células do tapete. Pode-se hipotetizar que, se genes *Rfs* são expressos no pólen, permanecem viáveis os grãos que apresentam alelos de restauradores capazes de suprimir funcionalmente os genes ECM mitocondriais promotores da esterilidade citoplasmática. Ao contrário, outros grãos de pólen que não apresentam os genes restauradores necessários iniciam um processo de degeneração.

Embora os dados estruturais de *M. obtusifolia* sugiram uma ginodioicia controlada por herança nuclear-citoplasmática, para uma perfeita caracterização da esterilidade citoplasmática tornam-se necessárias análises ultra-estruturais e genéticas, a fim de identificar a ocorrência de alterações mitocondriais e dos genes envolvidos nesse processo.

Embora análises da biologia reprodutiva tenham evidenciado grande variação na produção de frutos entre os indivíduos hermafroditas da população estudada, os resultados obtidos mostraram que o desenvolvimento dos óvulos é semelhante em todas as flores perfeitas. Da mesma forma, não foram apontadas diferenças anatômicas entre as flores pistiladas e de plantas hermafroditas com alta frutificação (HAF) e com baixa frutificação (HBF). Nos três casos o número de estratos do tecido transmissor é igual, o cômputo é desenvolvido e o estigma é seco e não papiloso; entretanto observou-se variação na sinuosidade da superfície estigmática, maior nas flores pistiladas, leve nas flores perfeitas de plantas HAF e quase imperceptível nas flores perfeitas de plantas HBF. Estudos para avaliação da germinação de tubos polínicos podem esclarecer se as variações na superfície estigmática influenciam a capacidade de frutificação do morfo hermafrodita.

Por outro lado, as sinérgides hipertrofiadas (com baixa densidade citoplasmática e ausência de vacúolo) observadas em algumas flores de indivíduos hermafroditas podem estar relacionadas a um suposto aborto dos sacos embrionários levando à impossibilidade de frutificação em algumas flores perfeitas. Estruturalmente as sinérgides caracterizam-se por apresentarem citoplasma polarizado, núcleo e maior parte do citoplasma voltado para o pólo micropilar e um único e grande vacúolo no pólo calazal. O citoplasma é rico em ribossomo, plastídeo, mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, o que sugere uma alta atividade metabólica nessas células (Willemse & van Went, 1984; Huang & Russell, 1992). A baixa densidade citoplasmática observada nas sinérgides hipertrofiadas de algumas flores perfeitas de *M. obtusifolia* pode representar uma deficiência em determinadas organelas e sugerir uma menor atividade metabólica.

Por outro lado, em *M. obtusifolia*, a presença de um aparato fibrilar evidente, tanto nas sinérgides das flores perfeitas, hipertrofiadas ou não, como nas das pistiladas, indica que a esterilidade não deve estar relacionada à impossibilidade de penetração do tubo polínico, já que o aparato fibrilar das sinérgides é importante na atração e recepção do tubo polínico (Willemse & van Went, 1984; Huang & Russell, 1992; Higashiyama, 2002). Na maioria das espécies, após ser penetrada pelo tubo polínico, a sinérgide inicia um processo de degeneração, no qual o citoesqueleto se reorganiza e forma duas “coronas” de actina. Estas formam o caminho no qual os gametas masculinos vão percorrer até a oosfera e célula média. Portanto o citoesqueleto desempenha um papel importante no transporte dos gametas (Russell, 1993, 1996). A presença de um citoplasma aparentemente desorganizado nas sinérgides hipertrofiadas de algumas flores perfeitas de *M. obtusifolia* sugere também problemas na reorganização do citoesqueleto necessária à fusão gamética, inviabilizando a fecundação.

Levando-se em conta o papel fundamental das sinérgides no processo de recepção de tubo polínico e redirecionamento dos gametas masculinos para a oosfera e a célula média, podemos supor que sua hipertrofia pode levar à perda de funcionalidade e conseqüente redução da produção de sementes levando a um menor sucesso reprodutivo nos indivíduos hermafroditas. A hipertrofia das sinérgides observada tem poucos registros na literatura (cf. Maheshwari, 1950 e Johri 1984) é até o momento, associadas apenas à formação de embriões apomíticos em arroz (Mu *et al.*, 2010).

Benevides (dados não publicados) estabeleceu uma relação direta entre a esterilidade do verticilo feminino em flores perfeitas com o menor tamanho do estilete e do estigma. Entretanto, os resultados ora apresentados não permitiram estabelecer uma relação direta entre presença de sacos embrionários com sinérgides hipertrofiadas e flores perfeitas com estilete e estigma menores. Para tal seria necessário um número maior de flores amostradas nos estudos anatômicos. Até o momento, sugere-se que a esterilidade feminina em *M. obtusifolia* pode estar relacionada a um conjunto de alterações sutis no carpelo como: estigma com superfície reduzida e pouco sinuosa, estilete e ovário encurtados e sacos embrionários com sinérgides hipertrofiadas.

Os dados reprodutivos e de estrutura floral de *M. obtusifolia* revelaram uma ampla variação em diversas características morfológicas, anatômicas e embriológicas que, se associadas à extrema variedade na forma e no tamanho observadas nas folhas de *M. obtusifolia* (Joffily & Vieira, 2005) evidenciam uma grande plasticidade fenotípica na espécie.

As hipóteses cujo estudo realizado objetivou testar, reavaliadas à luz dos resultados obtidos, leva às seguintes conclusões:

- 1) As flores perfeitas e pistiladas não apresentam todas as características anatômicas indicadas como sinapomorfias para os diferentes níveis hierárquicos.
- 2) As flores perfeitas e pistiladas não apresentam as células de mucilagem referidas como sinapomorfias para o clado COM e ausentes em Celastrales.
- 3) O baixo sucesso reprodutivo das flores perfeitas está relacionado à alterações morfológicas e citológicas do gineceu.
- 4) Entre as plantas com flores perfeitas, as alterações citológicas dos grãos de pólen causam viabilidade variável.

## **5. PERSPECTIVAS:**

- a) Análise ultra-estrutural das mitocôndrias nas células do tapete.
  
- b) Análise anatômica com amostragem significativa de flores, a fim de avaliar a possível correlação entre comprimento do estilete, área estigmática e vias de desenvolvimento do saco embrionário com a fertilidade nas flores perfeitas HBF e HAF.

## 6. REFERÊNCIAS

- Adatia, R. D., Gavde, S. G., 1962. Embryology of the Celastraceae. In: Plant embryology: a symposium. New Delhi: **Council of Scientific & Industrial Research**, pp. 1-11.
- Amaral, L. I. V., Pereira, M. F. & Cortelazzo, A. L., 2001. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. – Bixaceae). **Acta Botanica Brasilica** 15: 125-132.
- APG I (The Angiosperm Phylogeny Group), 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 85: 531–553.
- APG II (The Angiosperm Phylogeny Group), 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** 141: 399–436.
- APG III (The Angiosperm Phylogeny Group), 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** 161 (2):105-121.
- Bachelier, J. B. & Endress, P. K., 2009. Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (Sapindales), with a special focus on gynoeceum structure and evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society** 159: 499–571.
- Bailey, M. F., 2002. A cost of restoration of male fertility in a gynodioecious species, *Lobelia siphilitica*. **Evolution** 56: 2178–2186.
- Bailey, M. F. & Delph, L. F., 2007a. A field guide to models of sex-ratio evolution in gynodioecious species. **Oikos** 116: 1609–1617.
- Bailey, M. F. & Delph, L. F., 2007b. Sex-ratio evolution in nuclear-cytoplasmic gynodioecy when restoration is a threshold trait. **Genetics** 176: 2465 – 2476.
- Berkeley, E., 1953. Morphological studies in the Celastraceae. **J. Elisha Mitchell Sci. Soc.** 69: 185-208.
- Bhandari, N. N., 1984. The microsporangium. In B. M. Johri [ed.], **Embryology of angiosperms**, 53-121. Springer, New York, NY.
- Brewbaker, J. L., 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. **Am. J. Bot.** 54: 1069-1083.
- Brizicky, G. K., 1964a. Polyembryony in *Euonymus* (Celastraceae). **J. Arnold Arbor** 45: 251-259.
- Brizicky, G. K., 1964b. The genera of Celastrales in the southeastern United States. **J. Arnold Arbor** 45: 206-218.
- Carvalho-Okano, R. M., 1992. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 252p.

- Case, A. L. & Caruso, C. M., 2010. A novel approach to estimating the cost of male fertility restoration in gynodioecious plants. **New Phytologist** 186 (2): 549-557.
- Charlesworth, D., 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. **Heredity** 46: 27–39.
- Chase, C., 2006. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. **TRENDS in Genetics** 23(2): 81-90.
- Chaudhury, A. M., 1993. Nuclear genes controlling male fertility. **The Plant Cell** 5: 1277-1283.
- Ciqiu, Z.; Yanhui, L.; Shiwang Z.; Shenji P., 1986. Anatomy of leaves on 17 species and one variety of *Maytenus* in relation to classification. **Acta Botanica Yunnanica** 8(1): 53-59.
- Cortelazzo, A. L., 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Revista Brasileira de Botânica** 15: 157-162.
- Dufay, M.; Vaudey, V.; De Cauwer, I.; Touzet, P.; Cuguen, J.; Arnaud, J. F., 2008. Variation in pollen production and pollen viability in natural populations of gynodioecious *Beta vulgaris* ssp *maritima*: evidence for a cost of restoration of male function? **Journal of Evolutionary Biology** 21: 202–212.
- Ellis, R. E.; Yuan, J. & Horvitz, H. R., 1991. Mechanisms and function of cell death. **Annu Rev Cell Biol.** 7: 663-698.
- Endress, P. K., 1994. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Endress, P. K., Igersheim, A., 2000. Gynoecium structure and evolution in basal angiosperms. **International Journal of Plant Sciences** 161: S211–S223.
- Endress, P. K. & Matthews, M. L., 2006. First steps towards a floral structural characterization of the major rosid subclades. **Pl. Syst. Evol.** 260: 223–251.
- Fernando, D. D. & Cass, D. D., 1996. Development and structure of ovule, embryo sac, embryo, and endosperm in *Butomus umbellatus* (Butomaceae). **International Journal of Plant Sciences** 157 (3): 269-279.
- Gabe, M. 1968. **Techniques Histologiques**. Paris: Masson & Cie.
- Gahan, P. B., 1984. **Plant Histochemistry and Cytochemistry - an introduction**. London: Academic Press Inc., 1984 xi + 301 p., il.
- Gerrath, J. M., Posluszny, U., 1988. Morphological and anatomical development in the Vitaceae. II. Floral development in *Vitis riparia*. **Can. J. Bot.** 66: 1334-51.
- Haan, A. A.; Hundscheid, M. P. J., van Hinsberg, A., 1997. Effects of CMS types and restorer alleles on plant performance in *Plantago lanceolata* L.: an indication for cost of restoration. **Journal of Evolutionary Biology** 10: 803–820.
- Higashiyama, T., 2002. The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. **J. Plant Res.** 115: 149-160.

- Huang, B. Q. & Russell, S. D., 1992. Female germ unit: organization, isolation, and function. **Int. Rev. Cytol.** 140: 233-292.
- Jensen, W. A., 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice.** San Francisco, W. H. & Co., 408p.
- Jin, W.; Horner, H. T. & Palmer, R. G., 1997. Genetics and cytology of a new genic male-sterile soybean (*Glycine max* (L.) Morr). **Sex Plant Reprod.** 10: 13–21.
- Joffily, A. & Vieira, R. C., 2005. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrentes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 19(3): 549-561.
- Johansen, D. A., 1940. **Plant microtechnique.** 3 ed. N. York. Paul B. Hoeber, Inc. 790p.
- Johri, B. M., 1984. **Embryology of Angiosperms.** Springer, New York, NY. 830pp. 278 figs.
- Kaul, M., 1988. **Male sterility in higher plants**, Vol. 10. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- Koelewijn, H. P. & van Damme, J. M. M., 1995. Genetics of male sterility in gynodioecious *Plantago coronopus* 2. Nuclear genetic variation. **Genetics** 139: 1759–1775.
- Laser, K. D. & Lersten, N. R., 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. **Botanical Review** 38 (3): 425-454.
- Ma, H., 2005. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** 56: 393–434.
- Machado, O., 1945. Contribuição ao estudo das plantas medicinais do Brasil: *Maytenus obtusifolia* Mart. **Rodriguésia** 9 (18): 9-15.
- Maheshwari, P., 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms.** McGraw-Hill Book Company, Inc. New York Toronto London.
- Martin, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technol.** 34: 125-128.
- Matthews M. L. & Endress, P. K., 2005. Comparative floral structure and systematics in Celastrales (Celastraceae, Parnassiaceae, Lepidobotryaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 149: 129–194.
- Matthews, M. L. & Endress, P. K., 2006. Floral structure and systematics in four order of Rosids, including a broad survey of floral mucilage cells. **Pl. Syst. Evol.** 260: 199-221.
- McCauley, D. E. & Bailey, M. F., 2009. Recent advances in the study of gynodioecy: the interface of theory and empiricism. **Annals of Botany** 104: 611–620.
- Mu, X.; Jin, B.; Teng, N., 2010. Studies on the early development of zygotic and synergid embryo and endosperm in polyembryonic rice ApIII. **Flora** 205: 404-410.
- Müller, I. H., 1995. **Systematics and leaf anatomy of the Celastraceae sensu strict of New Caledonia.** Doctoral dissertation. Zurich. Universitat Zurich.

- Papini, A.; Mosti, S.; Brighigna, L., 1999. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. **Protoplasma** 207: 213-221.
- Pennell, R. I. & Lamb, C., 1997. Programmed cell death in plants. **Plant Cell** 9: 1157-1168.
- Pozner, R., 2001. Approach to the early sporangial development in angiosperms considering meiosis control and cellular differentiation. **Plant Syst. Evol.** 230: 25-42.
- Purvis, M. J., Collier, D. C., Walls, D., 1964. **Laboratory techniques in botany**. London: Butterwoths.
- Robson, N. K. B.; Hallé, N.; Mathew, B.; Blakelock, R., 1994. Celastraceae. In: Polhill RM, ed. **Flora of tropical East Africa** 108. Rotterdam: A.A. Balkema, 1–78.
- Ronse de Craene, L. P. & Haston, E., 2006. The systematic relationships of glucosinolate-producing plants and related families: a cladistic investigation based on morphological and molecular characters. **Botanical Journal of the Linnean Society** 151: 453–494.
- Russell, S. D., 1992. Double fertilization. **Int. Rev. Cytol.** 140: 357-388.
- Russell, S. D., 1993. The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. **The Plant Cell** 5: 1349-1359.
- Russell, S. D., 1996. Attraction and transport of male gametes for fertilization. **Sex Plant Reprod.** 9: 337-342.
- Sawhney, V. K. & Shukla, A., 1994. Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? **American Journal of Botany** 81 (12): 1640-1647.
- Schönenberger, J. & Conti, E., 2003. Molecular phylogeny and floral evolution of Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae, and Alzateaceae (Myrtales). **Amer. J. Bot.** 90: 293-309.
- Sebsebe, D., 1985. The genus *Maytenus* (Celastraceae) in NE tropical Africa and tropical Arabia. **Acta Universitatis Upsaliensis Symbolae Botanicae Upsaliensis** 25(2): 1-101.
- Shivanna, K. R.; Cresti, M. & Ciampolini, F., 1997. Pollen development and pollen-pistil interaction. In Pollen **Biotechnology for Crop Production and Improvement**, K. R. Shivanna & V. K. Sawhney, Ed (Cambridge, UK: Cambridge University Press), pp. 15-39.
- Simmons, M. P.; Clevinger, C. C.; Savolainen, V.; Archer, R. H.; Mathews, S.; Doyle, J. J., 2001a. Phylogeny of the Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequence and morphology. **American Journal of Botany** 88(2): 313-325. 2001.
- Simmons, M. P.; Savolainen, V.; Clevinger, C. C.; Archer, R. H.; Davis, J. I., 2001b. Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, *rbcL*, *atpB*, and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 19 (3): 353–366.
- Simmons, M. P. 2004a. Celastraceae. In: Kubitzki, K., ed. **Families and genera of vascular plants** VI. Berlin: Springer, 29–64.
- Simmons, M. P.; Cappa, J. J.; Archer, R. H.; Ford, A. J.; Eichstedt, D.; Clevinger, C. C., 2008. Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat)

inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 48: 745–757.

Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007.

Swamy, B. G. L., 1948. A contribution to the life history of *Casuarina*. **Proc. Amer. Acad. Arts** 77: 1-32.

Taboga, S. R. & Vilamaior. P. S. L., 2001. Citoquímica. *In* Carvalho, H. F. & Recco-Pimentel, S. M. (eds.). **A célula**. 19-27. Manoli Ltda, Barueri.

Takhtajan, A., 1991. **Evolutionary trends in flowering plants**. Columbia University Press, New York.

Taylor, P. E.; Glover, J. A.; Lavithis, M.; Craig, S.; Singh, M. B. & Knox, R. B., 1998. Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analyses of postmeiotic developmental mutants. **Planta** 205: 492–505.

Tobe, H., Raven, P. H., 1993. Embryology of *Acanthothamnus*, *Brexia* and *Canotia* (Celastrales): a comparison. **Botanical Journal of the Linnean Society** 112: 17–32.

Van Tieghem, P., 1898. Structure de quelques ovule et parti qu'on peut tirer pour améliorer la classification. **J. Bot.** 12:197-220.

Van Wyk A. E. & Archer, R. H., 1987. *Maytenus oleosa* (Celastraceae), a new species from southern Natal and Pondoland. **South African Journal of Botany** 53(2): 155-160.

Willemse, M. T. M. & van Went, J. L., 1984. **The female gametophyte**. In: Johri BM (ed) Embryology of angiosperms. Springer, Berlin, pp 159-196.

Wu, H. & Cheung, A. Y., 2000. Programmed cell death in plant reproduction. **Plant Molecular Biology** 44: 267–281.

Yang, X.; Makaroff, C. A.; Ma, H., 2003. The *Arabidopsis* MALE MEIOCYTE DEATH 1 gene encodes a PHD-finger protein the is required for male meioses. **The Plant Cell** 15: 1281:1295.

Zhang, L. B. & Simmons, M. P., 2006. Phylogeny and delimitation of the Celastrales inferred from Nuclear and Plastid Genes. **Systematic Botany** 31(1): 122–137.