

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

MARCOS LETAIF GAETA

**Isolamento e caracterização de sequências de *PISTILLATA* em
Bromeliaceae e estudo de expressão em tecidos florais de
Tillandsia aeranthos (Loisel.) LB Sm.**

Porto Alegre – RS

2016

MARCOS LETAIF GAETA

Isolamento e caracterização de sequências de *PISTILLATA* em Bromeliaceae e estudo de expressão em tecidos florais de *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) LB Sm.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de A. Mariath

Porto Alegre

2016

Isolamento e caracterização de sequências de *PISTILLATA* em Bromeliaceae e estudo de expressão em tecidos florais de *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) LB Sm.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. João Marcelo Santos de Oliveira

Programa de Pós-graduação em Agrobiologia na Universidade Federal de Santa Maria - UFSM.

Dr. Luis Fernando Revers

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Uva e Vinho) - Bento Gonçalves.

Prof. Dra. Vera Lucia da Silva Valente Gaiesky

Professora Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular na Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Membros suplentes da banca examinadora:

Prof. Dr. Adriano Silvério

Professor Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva - UNICENTRO - Guarapuava.

Profa. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti

Professora Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Botânica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Porto Alegre, 22 de Julho de 2016.

Dedico esse trabalho

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmão e família, pela força, paciência e incentivo.

Ao Prof. Dr. Jorge Mariath, meu orientador, que acreditou e confiou na minha capacidade, dando a oportunidade e apoio para a realização desse trabalho. Obrigado também por me colocar na família LAVeg.

Aos parceiros Sofia, Fernanda, Juliana Troleis, Jéferson, Juliana Garcia, Bruna, Juca, e a todos professores e colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal - LAVeg e “ex-LAVeguianos”, que de alguma forma participaram e contribuíram, ajudando, incentivando, tanto nos momentos dentro como fora do laboratório. Em especial, aos que se tornaram meus grandes amigos.

À Professora Dra. Márcia Margis que me deu grande ajuda abrindo as portas do seu laboratório, pelos esclarecimentos das minhas dúvidas e pelas ideias relacionadas aos meus problemas científicos.

A toda equipe do Núcleo de Genômica Funcional de Plantas (NGFP), que além da parceria e ajudas no desenvolvimento do meu trabalho, sempre que precisei, também contribuíram com boas ideias.

Aos Professores Janet Palma Fett e Artur Germano Fett Neto, que juntamente dos alunos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, me auxiliaram sempre que precisei.

Às instituições que apoiaram esse trabalho, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico - CNPq por verbas e apoios financeiros concedidos, essenciais para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, tanto para a Milene e membros da secretaria, como para os demais membros da Comissão de Pós-Graduação em Botânica, pela ajuda dada e pela compreensão nos momentos de dificuldade.

A todos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica, pelo convívio e aprendizado.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu mais sincero MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Bromeliaceae é uma família importante entre as monocotiledôneas devido ao seu elevado número de espécies distribuídas no Neotrópico, e por uma riqueza de caracteres adaptativos a diferentes habitats. Flores de bromélias possuem uma grande variação morfológica, frequentemente negligenciada em estudos de morfoanatomia e de filogenia. Para uma melhor compreensão dos mecanismos de desenvolvimento que levam a essas variações, foram analisados aspectos moleculares e evolutivos do fator de transcrição *MADS-box PISTILLATA (PI)*, a partir de sequências de transcritos isolados de inflorescências de bromélias nativas brasileiras. Sequências *PI* de Bromeliaceae foram comparadas com outras monocotiledôneas, com verificação de expressão em inflorescências de *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) LB Sm. com o uso de hibridação *in situ*. Sequências de *PI* mostraram alta conservação, inclusive em um sítio de deleção encontrado para todos os membros analisados da família. Todos os membros da família se agruparam em um único clado em reconstruções filogenéticas. Entretanto, devido a características de taxas de mutações rápidas e divergência antiga do gene, não foi possível obter uma relação precisa entre diferentes famílias ou ordens. Todavia, *PI* mostrou ter potencial como ferramenta de análise filogenética para espécies proximalmente relacionadas. Os transcritos de *PI* foram localizados principalmente em tecidos meristemáticos de regiões menos desenvolvidas de inflorescências de *Tillandsia aeranthos*. Flores mais desenvolvidas presentes nas inflorescências mostraram um padrão de acúmulo preferencial de transcritos *PI* em pétalas e sépalas, assim como esperado para flores com perianto diferenciado em sépalas e pétalas. De qualquer forma, *Tillandsia aeranthos* se mostrou eficiente para estudos morfoanatômicos com enfoque em desenvolvimento evolutivo.

Palavras-chave: bromélias; expressão gênica; hibridação *in situ* fluorescente; *MADS-box*; sonda de ssDNA; sequências transcritas.

ABSTRACT

Bromeliaceae is an important monocotyledon family due to its high number of species in the Neotropic, and a wealth of adaptive characters to different habitats. Bromeliad flowers have large morphological variations, often neglected in morpho-anatomy, floral development and phylogeny studies. For a better understanding of its floral developmental mechanisms that lead to morphological variations, molecular and evolutionary aspects of the transcription factor *MADS-box PISTILLATA (PI)* encoding gene isolated had been investigated in native bromeliad inflorescences. Bromeliaceae *PI* sequences were compared with other monocots, and the expression of these transcripts was detected in *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) LB Sm. inflorescences using *in situ* hybridization. The *PI* sequences display high conservation, including a specific deletion site found in all family members. Likewise, all Bromeliaceae members grouped into a single clade in phylogeny reconstruction. However, due to rapid mutation rate and ancient divergence in *PI*, it was not possible to obtain a precise relationship between different monocot families and orders. Nevertheless, *PI* showed potential as a phylogenetic tool for analysis between closely related species. *PI* transcripts were located mainly in meristematic tissues from less developed regions of the inflorescences. More developed flowers showed a preferential *PI* transcripts accumulation in petals and stamens as expected for differentiated perianth, found in Bromeliaceae flowers. Anyway, *Tillandsia aeranthos* showed good potential skills for morpho-anatomy focused in evolutionary development.

Keywords: bromeliads; gene expression; fluorescent *in situ* hybridization; *MADS-box*; ssDNA; transcribed sequences.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Características gerais de Bromeliaceae.....	1
Características de <i>Tillandsia aeranthos</i>	4
Estudos Filogenéticos em Bromeliaceae.....	5
Desenvolvimento floral.....	8
Genes de <i>MADS-box</i> de classe B e desenvolvimento floral.....	11
Uso potencial de <i>Tillandsia aeranthos</i>	14
Uso de <i>Tillandsia aeranthos</i> como planta modelo dentro das Bromeliaceae.....	15
Autofluorescência em plantas e seus usos potenciais.....	17
OBJETIVOS	20
Objetivo geral.....	20
Objetivos específicos.....	20
MATERIAIS E MÉTODOS	20
Material biológico.....	20
Reconstrução tridimensional de inflorescências de <i>Tillandsia aeranthos</i>	21
Fixação, desidratação, inclusão e preparação de lâminas de secções de inflorescências de <i>Tillandsia aeranthos</i>	21
Extração de RNA, síntese de cDNA, clonagem e sequenciamento.....	23
Caracterização de sequências de <i>PISTILLATA/GLOBOSA</i> de Bromeliaceae.....	23
Teste Z de seleção.....	24
Análises filogenéticas entre <i>PISTILLATA/GLOBOSA</i> de Bromeliaceae e de outras monocotiledôneas.....	25
Síntese de sonda de fita simples de DNA (ssDNA) fluorescente.....	26
Hibridação <i>in situ</i>	27
Análise de autofluorescência em tecidos de <i>Tillandsia aeranthos</i>	28
RESULTADOS	29
Caracterização das sequências de <i>PISTILLATA</i> isoladas em Bromeliaceae.....	29
Teste Z de seleção.....	30
Análise filogenética de transcrito <i>PISTILLATA</i> de monocotiledôneas.....	30
Análise de expressão em tecidos de <i>Tillandsia aeranthos</i>	32
Análise de autofluorescência em tecidos de <i>Tillandsia aeranthos</i>	33
DISCUSSÃO	36
<i>PISTILLATA</i> em Bromeliaceae.....	36
Reconstrução filogenética de <i>PISTILLATA</i> em Bromeliaceae.....	37
Análise da expressão <i>in situ</i> de <i>PISTILLATA</i> em <i>Tillandsia aeranthos</i>	40
Análise de autofluorescência em tecidos de <i>Tillandsia aeranthos</i>	42
Perspectivas futuras e dificuldades encontradas.....	44

CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	47
FIGURAS	63
QUADROS	79

INTRODUÇÃO

Características gerais de Bromeliaceae

A família Bromeliaceae Juss., pertencente às monocotiledôneas, está incluída em Poales (APG IV, 2016) e possui uma distribuição neotropical, exceto por uma espécie de *Pitcairnia* L'Her. localizada no oeste da África (Benzing *et al.*, 2000; Porembski & Barthlott, 1999), compreendendo 3408 espécies organizadas em 58 gêneros (Luther, 2014). A grande quantidade de espécies que possui a torna uma das maiores famílias de Angiosperma, sendo a maior do Neotrópico (Stevens, 2013). Evidências sugerem que sua origem seja há aproximadamente 100 milhões de anos no Escudo das Guianas, com dispersão relativamente recente, por volta de 15 a 10 milhões de anos atrás (Givnish *et al.*, 2011).

Classificações recentes baseadas em dados moleculares reconhecem que Bromeliaceae é dividida em oito subfamílias monofiléticas: Pitcairnioideae, Tillandsioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Puyoideae, Lindmanioideae, Brocchinioideae, Navioideae (Givnish *et al.*, 2007; Givnish *et al.*, 2011), porém a ocorrência no Brasil é principalmente das três primeiras subfamílias.

Em sua grande maioria são plantas herbáceas de diversos tamanhos, com folhas normalmente verdes, podendo ter tons acinzentados, vermelhos ou roxos; com distribuição de cor uniforme ou variegada, podendo ter listras, pontuações ou manchas irregulares, com formas e texturas variadas, podendo ter bordo liso, serrado ou com espinhos, normalmente possuindo bainha, arranjadas de forma espiralada em um caule que normalmente é curto (Smith & Downs, 1974; Benzing *et al.*, 2000; Wanderley *et al.*, 2009).

Apesar de Bromeliaceae ser uma das famílias mais importantes das monocotiledôneas, com um grande número de espécies, muitas delas apresentam uma distribuição restrita, com alto grau de endemismo (Kessler, 2000; Wendt *et al.*, 2001; Versieux *et al.*, 2007; Versieux *et al.*, 2010; Lavor *et al.*, 2014). Fatores como crescimento dos centros urbanos e zonas agrícolas levam à degradação das áreas de ocorrência natural das bromélias (Wendt, 2001; Versieux *et al.*, 2007). Ainda, o forte

apelo ornamental das bromélias, com potencial econômico, junto da carência de planos de cuidados das áreas naturais, podem levar à facilitação de práticas de extrativismo ilegal (Flores-Palacios & Valencia-Diaz, 2007; Negrelle & Anacleto, 2012). Devido a esses fatores de degradação, muitas espécies estão classificadas pela “Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas” como, “em risco de extinção” ou “vulneráveis” (IUCN, 2015).

Na família é possível encontrar diversas adaptações como, presença de escamas peltadas nas folhas ou tanques de reserva de água em suas bainhas foliares, com função de absorção de água e nutrientes; raízes especializadas em fixação, e ainda, metabolismo ácido crassuláceo (CAM) (Crayn *et al.*, 2004; Papini *et al.*, 2005; Papini *et al.*, 2010), juntamente do metabolismo C₃ (Smith *et al.*, 1986). Ou ainda, é possível encontrar espécies que possuem raízes que fazem absorção em todas as suas fases de desenvolvimento, existindo até raízes com velame (Smith & Downs, 1974; Benzing, 1980; Reitz, 1983; Pita & Menezes, 2002).

Muitas dessas adaptações fazem com que as bromélias constituam um grupo ecologicamente diverso, presente em habitats diversificados como, terrestres, em solos férteis ou pobres em nutrientes, campos rupestres, ambientes rochosos ou epifíticos, desde ambientes mais úmidos como os do bioma Mata Atlântica ou em outros ambientes mais expostos a estresse hídrico (Martin, 1994; Bernal *et al.*, 2005; Reyes-García *et al.*, 2008; Sousa & Wanderley, 2014).

No caso específico das folhas em rosetas, com sua arquitetura típica, formam os tanques de reserva de água, que além de conferir vantagens para as plantas, também permitem que muitos organismos vivam associados a essas estruturas. A gama de organismos varia desde microrganismos (Giongo *et al.*, 2013), invertebrados (Romero *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2006), até anfíbios (Oliveira & Rocha, 2015; Mageski *et al.*, 2016; Motta-Tavares *et al.*, 2016). Em contrapartida do uso dos tanques, os seus hóspedes fornecem nutrientes essenciais para a planta (Giongo *et al.*, 2013). A associação entre organismos faz com que a necessidade de conservação de muitas bromélias seja ainda maior, pois muitos dos organismos possuem dependência obrigatória das plantas ou são endêmicos de onde ocorrem determinadas espécies de bromélias (Oliveira &

Rocha, 2015; Mageski *et al.*, 2016). Ainda, tanques de reserva de água de muitas bromélias são vistos como locais próprios para ovoposição de insetos, e conseqüentemente, são ligados a epidemias (Stein *et al.*, 2013). Assim, muitas vezes ocorrem tendências à eliminação dessas plantas de áreas próximas a centros urbanos de forma indiscriminada (Reitz, 1983), agravando problemas de conservação relacionados à família.

Outros tipos de adaptações presentes na morfologia floral são características diretamente ligadas à ornitofilia, como flores com formato tubular, néctar abundante, ausência de odor e longa distância entre nectários, estames e estigma (Canela & Sazima, 2003; Krömer *et al.*, 2008). Colorações chamativas, como encontradas em folhas vermelhas e brácteas vermelhas, amarelas ou rosas de algumas bromélias, também são fatores que colaboram para atração de polinizadores.

Bromeliaceae é considerada uma das mais importantes fontes de néctar para beija-flores, sendo essas aves, os polinizadores mais importantes para o grupo (Buzato *et al.*, 2000; Fumero-Cabán, 2007). Existem sugestões de que ocorreu coevolução entre flores de Bromeliaceae e seus polinizadores (Buzato *et al.*, 2000; Krömer *et al.*, 2008; Givnish *et al.*, 2014). É possível até que beija-flores tenham acelerado o processo de especiação de Bromeliaceae a partir da seleção preferencial de formatos florais tubulares (*gullet shape*) que favorecessem a coleta de néctar, em relação ao formato de taça (*cup-shaped*) ancestral (Givnish *et al.*, 2010).

Bromélias são reconhecidas por possuírem grandes variações morfológicas florais. As inflorescências podem ser simples ou compostas, principalmente terminais, raramente sendo laterais ou pseudolaterais, quase sempre indeterminadas, com sequência de desenvolvimento das flores normalmente orientada da base para o ápice, podendo ser no sentido oposto, ou de regiões intermediárias para as extremidades (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979; Reitz, 1983; Wanderley *et al.*, 2009).

Suas flores podem ser noturnas ou diurnas, com perianto heteroclamídeo, normalmente trímero, com pétalas de cores e tamanhos variados, membranáceas ou suculentas, com texturas e formatos variados (Reitz, 1983; Wanderley *et al.*, 2009), podendo apresentar apêndices petalíneos,

com aspecto de escamas, lígulas ou calosidades (Reitz, 1983; Brown & Terry, 1992). O perianto é diferenciado em pétalas e sépalas, sendo que ambos podem possuir colorações atrativas (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979; Reitz, 1983). Os frutos de Bromeliaceae podem ser do tipo baga ou cápsula, com sementes nuas, aladas ou plumosas (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979; Reitz, 1983).

Outro aspecto morfológico é a posição do ovário, que pode variar de ínfero a súpero, no qual foi um critério importante na separação de subfamílias do grupo. A posição do ovário, juntamente do uso de outros caracteres morfológicos para a organização taxonômica e sistemática da família possui aceitação bastante controversa entre pesquisadores (de Faria *et al.*, 2004; Sass & Specht, 2010).

Muitos estudos dentro de Bromeliaceae levam em consideração as características morfológicas e suas variações, porém, grande parte deles é voltada para o campo da filogenia e evolução (Brown & Gilmartin, 1984; Rex *et al.*, 2007; Horres *et al.*, 2007; Sass & Specht, 2010). No entanto, poucos são os estudos voltados para a compreensão da origem e desenvolvimento das estruturas morfológicas presentes no grupo (Papini *et al.*, 2005; Papini *et al.*, 2010), ainda mais se forem levadas em conta, características que envolvam regiões florais (Sajo *et al.*, 2004a; Sajo *et al.*, 2004b; Fagundes & Mariath, 2010; Nogueira *et al.*, 2015, Santos-Silva *et al.*, 2015), sendo quase inexistentes os que envolvam morfologia, anatomia e biologia molecular (Neuteboom *et al.*, 2002).

Características de *Tillandsia aeranthos*

Conforme descrições feitas por Azeredo & Citadini-Zanette (2012) e Reitz (1983), *Tillandsia aeranthos* é uma planta com hábito epifítico e rupícola, com rizoma forte, arcadamente caulescente. Possui muitas folhas, com comprimento de aproximadamente 10 centímetros e com 2 a 3 centímetros de largura, com bainhas curtas de aparência pálida e clara. Suas folhas não formam tanques de armazenamento de água. Sua inflorescência é do tipo espiga simples, densamente cilíndrica, com aproximadamente 3 centímetros em estádios imaturos, quando começam a emergir do centro da roseta foliar, sendo protegidas por brácteas em cor rosa, que recobrem toda a

inflorescência. Quando a inflorescência está madura, possui escapo ereto, com aproximadamente 12 centímetros de comprimento, recoberta por brácteas escapais verdes claras com margens inferiores levemente arroxeadas e ápice levemente acinzentado. Possuem brácteas florais rosas, côncavas. Apresentam 7 ou mais flores, eretas e sésseis. As sépalas são menores que as pétalas, simétricas, com coloração rosa, lanceoladas, glabras, com ápice agudo. As pétalas são azuis, livres, com ápice agudo, arredondado, sem apêndices petalíneos. Os estames são posicionados abaixo das pétalas, com anteras de colorações amarelo-claro, com grãos de pólen amarelos. O ovário é súpero e oblongo. Os frutos são do tipo cápsulas, verdes claros quando imaturos e paleáceos quando maduros. As sementes são castanhas, com apêndices plumosos, com função adaptativa para dispersão aérea, se assemelhando a pelos brancos e sedosos na base que formam cabeleiras umbeliformes. Ocorrências no Sudeste (estado de São Paulo) e Sul brasileiro (Santa Catarina e Rio Grande do Sul), também presente no Uruguai, Argentina e Paraguai. Encontrada mais frequentemente em áreas relativamente sombreadas de caules de árvores. Os períodos de florescimento e frutificação podem variar conforme a região.

Estudos Filogenéticos em Bromeliaceae

Muitos dos estudos filogenéticos em Bromeliaceae tiveram início com a organização da família através de caracteres morfológicos e anatômicos, como o uso de posição do ovário, ou através de características presentes ou ausentes nas pétalas, como os apêndices petalíneos, morfologia de pólen, entre outras várias características, organizando a família em três subfamílias monofiléticas (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979). Bromeliaceae é reconhecida por conter muita variabilidade morfológica entre as espécies, porém, por mais que existam muitas características morfoanatômicas para a classificação das plantas da família, ainda havia problemas para a sua organização filogenética (Gilmartin & Brown 1986; de Faria *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2009). De certo modo, esses problemas eram (e ainda são) relacionados com delimitações artificiais de espécies, gêneros ou a organização dentro das subfamílias, sendo normal a sugestão sobre

transferência entre diferentes grupos taxonômicos (Gilmartin & Brown, 1986; Varadarajan & Gilmartin, 1988; Almeida *et al.*, 2009).

Grande parte dos problemas com a organização da família ou nas reconstruções filogenéticas ocorreu pela quantidade desproporcional de amostras usadas nas análises, em relação à quantidade total de espécies existentes em diferentes taxa da família (Versieux *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2015). Outra causa, é que além dos estudos terem sido realizados em uma proporção pequena de indivíduos, as identificações dos caracteres morfológicos foram realizadas em exemplares desidratados, em que a denominação correta ou sua identificação foi comprometida pela qualidade da exsicata, ou ainda, o material disponível se tratava de partes da inflorescência. Por outro lado, ainda existem evidências de haver hibridações naturais dentro da família (Wendt *et al.*, 2001; Versieux *et al.*, 2012). Nesses casos, mesmo havendo material em boa qualidade para identificação, ocorrem dificuldades na delimitação de espécies por haver estados de transição entre espécies contrastantes, podendo levar a problemas em reconstruções filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos (Wendt *et al.*, 2001; Versieux *et al.*, 2012).

Ainda, parte dos problemas encontrados com os marcadores morfológicos está no fato que muitos deles eram usados de maneira equivocada, pois determinadas características presentes em diferentes espécies, na verdade tinham origens evolutivas diferenciadas, se tratando de caracteres com altos níveis de homoplasia (de Faria *et al.*, 2004; Schulte & Zizka, 2008; Sass & Specht, 2010), não podendo ser tratados como um único caracter válido. Além da natureza diversa de um mesmo caracter, foi sugerido que muitos deles surgiram ou regrediram de forma independente ou múltipla ao longo da evolução de membros da família, tornando mais complexa a compreensão dos aspectos evolutivos (Versieux *et al.*, 2012).

Com o início de estudos moleculares, a densidade de informação e de possíveis marcadores úteis para a família começou a aumentar de forma exponencial, porém, ao contrário do que acontecia com os caracteres morfológicos altamente variáveis de Bromeliaceae, os marcadores moleculares se mostraram bastante estáveis e pouco variáveis (Souza *et al.*, 2007). Havendo um

aumento de informação com o uso de marcadores moleculares e morfológicos, muitas das espécies de bromélia que primeiramente estavam organizadas dentro das três subfamílias clássicas de forma monofilética, começaram a mostrar outras configurações de árvores filogenéticas, se organizando de modo polifilético (ou parafilético), tornando necessária uma reorganização das subfamílias de Bromeliaceae (Ranker *et al.*, 1990).

Em geral, os estudos de natureza filogenética molecular em Bromeliaceae revelam uma baixa resolução gerada por muitos marcadores moleculares quando analisados individualmente, como visto com marcadores plastidiais (Horres *et al.*, 2000; Barfuss *et al.*, 2005; Horres *et al.*, 2007; Rex *et al.*, 2009; Krapp *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015) e nucleares ribossomais (Chew *et al.*, 2010). O efeito prático gerado por esses marcadores é uma grande quantidade de politomias nas árvores de reconstruções filogenéticas. Uma das causas para esse problema é a baixa variabilidade das sequências desses marcadores (Barfuss *et al.*, 2005), bem como devido a radiações iniciais apresentadas por alguns grupos como Bromelioideae (Evans *et al.*, 2015).

Outro problema dos marcadores plastidiais, é o fato de serem transmitidos somente via semente, e não por meio polínico, podendo ocorrer diferenças de transmissão genética, conforme o tipo de dispersão que cada semente possui. Ainda, sementes como encontradas no gênero *Dyckia*, desprovidas de adaptações para dispersão aérea, são consideradas menos eficientes na dispersão de genes plastidiais, tendendo a formar agrupamentos geográficos de dispersão (Schulte & Zizka, 2008; Sass & Specht, 2010). Já no caso da subfamília Tillandsioideae, onde ocorrem adaptações nas sementes para dispersões aéreas, o padrão de agrupamento geográfico dos genes plastidiais pode possuir uma abrangência mais ampla (Paggi *et al.*, 2010; Krapp *et al.*, 2014). Por outro lado, genes de origem nuclear possuem formas de dispersão tanto por sementes, como por via polínica, possuindo tipo de dispersão ligada aos polinizadores, nos quais muitas vezes são animais que percorrem grandes distâncias durante a polinização, como aves e insetos (Krapp *et al.*, 2014).

Outro problema existente em relação a reconstruções filogenéticas de Bromeliaceae é relacionado com sua origem e evolução. Existem evidências de que a família tenha sua origem bastante antiga, há aproximadamente 100 milhões de anos, com uma evolução bastante lenta até o surgimento de caracteres adaptativos em um período relativamente recente, culminando na dispersão do grupo há aproximadamente 10 milhões de anos (Givnish *et al.*, 2011). Esse tipo de evolução característica da família, muitas vezes acaba refletindo na topologia das reconstruções filogenéticas, com ramos longos próximos aos nós ancestrais e ramos bastante curtos nos topos das árvores. Ainda, existem problemas nas delimitações de períodos geológicos para a espécie, uma vez que na família há quase uma inexistência de registros fósseis para uso em trabalhos de reconstrução de características ancestrais. Porém, há sugestões de que muitas características morfológicas formam indicativo de um ancestral comum ao invés do surgimento de múltiplos ancestrais em paralelo, havendo convergência morfológica ao hábito epifítico, pelo menos em Bromelioideae (Sass & Specht, 2010).

A ampliação na densidade de informações moleculares pode auxiliar na resolução de problemas filogenéticos da família. Para isso, podem ser usados genes nucleares com poucas cópias e marcadores genéticos baseados em produtos de expressão de genes ligados a caracteres morfológicos florais, como alternativa aos genes usados classicamente, como forma de contornar problemas expostos acima. Ainda, muitos dos caracteres que antes eram só interpretados pelas suas características morfológicas, atualmente podem ter seus mecanismos compreendidos em nível molecular, sendo que ao invés da observação do fenótipo em si, podem ser feitas observações em regiões de um genoma que culminem em um fenótipo final.

Desenvolvimento floral

O desenvolvimento floral consiste em um processo de transformações que ocorrem em Angiospermas que leva a planta de um estado vegetativo para um estado reprodutivo. Primeiro

ocorrem estímulos para que aconteçam divisões celulares e a transformação de meristemas apicais vegetativos em meristemas florais, culminando com a formação de sépalas, pétalas, estames e carpelos, que são os órgãos de uma flor (Meyerowitz *et al.*, 1991). Esse processo coordenado ocorre em resposta da atuação de diversos produtos gênicos, em um conjunto de interações com fatores ambientais adequados para cada espécie (Krizek & Fletcher, 2005).

Um dos precursores mais notáveis dos estudos de desenvolvimento floral foi Johann Wolfgang von Goethe, com sua “Teoria Foliar”, criada no século 18 no ensaio “Metamorfose das Plantas”, em que sugeria que as partes constituintes de uma flor se tratavam de folhas funcionalmente modificadas para reprodução e proteção (Goethe, 1790).

Avanços de técnicas moleculares, unidos ao uso de linhagens de plantas modelo mutantes, como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e *Antirrhinum majus* L., levaram a criação do “Modelo ABC do Desenvolvimento Floral” que descreve mecanismos de estabelecimento de identidade de órgãos florais (Weigel & Meyerowitz, 1994). Nesse modelo, a flor é representada pela área de um círculo, em que as letras A, B e C representam diferentes classes de genes. Genes de classe A são responsáveis pelo destino celular de regiões mais externas do raio floral. Os genes de classe B são responsáveis pelo destino celular de regiões intermediárias do raio floral. Por fim, genes de classe C são responsáveis pelo destino celular no centro do raio floral. Dessa forma, sépalas têm o desenvolvimento controlado por genes de classe A. Pétalas têm o desenvolvimento controlado por genes de classe A e B em conjunto. Estames têm o desenvolvimento controlado por genes de classe B e C, também em conjunto. Por fim, os carpelos têm o desenvolvimento controlado por genes de classe C. Além de ser observado que genes de classes A e B ou B e C poderiam atuar em conjunto para o desenvolvimento de pétalas ou estames, respectivamente, foi visto que os genes de classe A e C funcionavam de maneira antagônica, e que na região floral onde um deles atuasse, o outro seria inibido (Pelaz *et al.*, 2000; Sablowski & Meyerowitz, 1998). Dessa maneira, é gerada uma barreira que impede que genes de outra região do raio floral estejam ativos em áreas equivocadas, evitando a formação de órgãos ectópicos. Assim, foi visto que plantas com mutação em genes de classe A ou

C, com conseqüente silenciamento, ocorrem dominâncias de destino pelo seu gene antagônico na região que teve sua função silenciada, gerando morfologias atípicas na flor.

Com o progresso dos estudos em desenvolvimento floral houve descobertas de mais genes que não se encaixavam de maneira apropriada no modelo ABC. Primeiro foi observado que alguns genes, semelhantes aos genes de classe C, participavam no desenvolvimento de rudimentos seminiais, sendo atribuída a classe D para esses genes (Colombo *et al.*, 1995). Mais adiante, foi observada uma nova classe gênica, a classe E, em que o funcionamento adequado dos seus genes é fundamental para o desenvolvimento de todos os verticilos florais (Pelaz *et al.*, 2000). Com descoberta das duas classes novas, o modelo ABC foi expandido para “Modelo ABCDE do desenvolvimento floral”. Ainda, foi observado que as classes de desenvolvimento floral (A, B, C, D e E) eram governadas por mais de um gene de forma redundante, pois, em alguns casos, quando um determinado gene estava silenciado, outro gene com a mesma função assumia o seu papel (Pelaz *et al.*, 2000). Em outros casos, alguns genes também atuam de forma complementar, necessitando que mais de um gene seja expresso de forma concomitante. Com isso, foi observado que no caso de determinados genes serem silenciados, outros genes correlatos obrigatoriamente deixavam de funcionar (Davies *et al.*, 1996).

Com os estudos de isolamento e caracterização dos genes responsáveis pelo desenvolvimento floral, foi descoberto que muitos deles se tratavam de fatores de transcrição pertencentes a uma grande família gênica chamada *MADS-box*. A família *MADS-box*, tem como característica uma estrutura com divisão em subunidades MIKC, composta de um domínio *MADS* (M), principalmente envolvido na ligação de DNA (*DNA binding*), seguido de um domínio *Intervening* (I), mediador da formação de dímeros (Weigel & Meyerowitz, 1994). O domínio I é sucedido de um domínio *Keratin-like* ou *K-box* (K), com papel na interação proteína/proteína, tanto na dimerização, como na formação de complexos multiméricos (Weigel & Meyerowitz, 1994). Por último, existe uma região C-terminal (C), com a sequência codificante mais variável do gene, com

função de ativação da transcrição, e responsável pela formação de complexos multiméricos (Weigel & Meyerowitz, 1994).

Genes homeóticos *MADS-box* codificam fatores de transcrição que especificam a identidade de órgãos florais de modo interativo e combinatório. Assim, foi criado um “Modelo do quarteto floral” que promoveu avanços ao modelo ABCDE, pela interação de estudos de genes florais *MADS-box* e dados moleculares, demonstrando interações entre diferentes proteínas de domínio *MADS* para o desenvolvimento de uma determinada característica ou destino floral. O “Modelo do Quarteto” admite a hipótese de que proteínas do domínio *MADS* formam complexos homodiméricos ou heterodiméricos específicos de diferentes proteínas para cada órgão (Theissen & Sadler, 2001). O modelo de quarteto é suportado por observações em que proteínas de domínio *MADS* formam complexos diméricos ou multiméricos em experimentos de duplo e triplo híbrido de leveduras (Favaro *et al.*, 2003), sendo postulado que esses complexos quaternários de genes *MADS-box* podem estar envolvidos na ativação e repressão de genes alvo pela ligação de seus promotores.

Genes de *MADS-box* de classe B e desenvolvimento floral

Entre as diferentes classes gênicas da família *MADS-box*, os de classe B é uma das mais estudadas, sendo possivelmente um dos grupos melhores representados entre os genes nucleares de plantas. Exemplos de genes de classe B são *PISTILLATA (PI)* e seu ortólogo *GLOBOSA (GLO)*, isolados e caracterizados inicialmente em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., e em *Antirrhinum majus* L., respectivamente (Goto & Meyerowitz, 1994; Trobner *et al.*, 1992). *PI/GLO*, juntamente dos seus parálogos de classe B, *APETALA3 (AP3)* e *DEFICIENS (DEF)*, constitui um grupo de genes nucleares extensivamente estudados em muitas taxa de plantas (Preston & Hileman, 2012; Hsu *et al.*, 2014; Nakatsuka *et al.*, 2016).

Genes de classe B são característicos por terem sequências curtas de aminoácidos altamente conservadas localizadas próximo ao final do domínio C-terminal, que é o domínio gênico menos

conservado entre todas as porções codificadoras desses fatores de transcrição. Os genes *PISTILLATA/GLOBOSA* possuem uma sequência de aminoácidos - sequência *PI (PI-motif)*: MPF_xFRVQP_xQPNLQE, o qual é usada para identificação do gene (Kramer *et al.*, 1998). Essa sequência foi encontrada de forma altamente conservada em muitas Angiospermas, porém sua função não é clara em monocotiledôneas (Kramer *et al.*, 1998).

Os genes de classe B normalmente participam nos processos de identidade de desenvolvimento de pétalas e estames de periantos diferenciados de eudicotiledôneas (Goto & Meyerowitz, 1994; Ng & Yanofsky, 2001), com a localização de expressão do gene nos dois órgãos florais, sendo este o padrão mais comum em plantas que possuem sépalas e pétalas diferenciadas (Goto & Meyerowitz, 1994; Benlloch *et al.*, 2009).

Porém, esse não é o único padrão de desenvolvimento morfológico floral encontrado em Angiospermas, podendo ser encontrados diferentes tipos de conformação. O perianto de monocotiledôneas pode desenvolver três formas: i) Os dois verticilos do perianto são petaloides e indiferenciáveis (ex.: Liliales, Asparagales); ii) Os dois verticilos do perianto são sepaloídes e indiferenciáveis (Algumas Alismatales e Poales); iii) Existe uma clara diferenciação entre o verticilo interno e o externo, com sépalas verdes e pétalas coloridas. (Alimastaceae, algumas Melanthiaceae, Commelinaceae e Bromeliaceae).

Essas variações morfológicas presentes tanto em eudicotiledôneas como em monocotiledôneas podem ser explicadas por variações da localização da expressão de genes de classe B. O desenvolvimento de sépalas petaloides pode ocorrer pela expressão dos genes de classe B no primeiro verticilo floral, e não somente restrita aos segundo e terceiro verticilos, o que pode ser uma das explicações para a conversão de sépalas em tépalas (Tsafaris *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). Já o desenvolvimento de pétalas sepaloídes pode ser causado por diminuição ou por padrões de expressão ectópica de genes de classe B no segundo verticilo (Kim *et al.*, 2007; Yoshida, 2012).

Em alguns casos, a atuação de genes classe B pode estar relacionada com o desenvolvimento

de outros órgãos florais como ovários (Cantone *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2012), ou ainda, pode ser responsável pelo desenvolvimento de flores com simetria bilateral (Mondragón-Palomino *et al.*, 2009; Preston & Hileman, 2012).

Independente do local de expressão dos genes de classe B, o resultado do seu funcionamento como um fator de transcrição parece ser bastante conservado dentro de Angiospermas (Whipple *et al.*, 2004; Berbel *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006; Whipple *et al.*, 2007). Até mesmo em Poaceae, onde ocorreram grandes alterações adaptativas que levaram ao desenvolvimento de órgãos especializados nas espiguetas, genes de classe B atuam no desenvolvimento de estames e lodículas (Münster *et al.*, 2001; Yoshida, 2012).

Nos processos de desenvolvimento de uma planta há necessidade de atuação de muitos fatores de transcrição, que agem principalmente na regulação da expressão de um gene, se ligando em distintas sequências de DNA, ou na regulação pela interação entre diferentes produtos gênicos (Davies *et al.*, 1996; Bartlett *et al.*, 2016). Fatores de transcrição possuem uma grande importância no desenvolvimento floral, atuando em diversos processos em cadeia, que culminam na formação das flores. Muitos dos fatores de transcrição possuem uma origem evolutiva comum, diferenciando através de processos que se baseiam na duplicação de uma determinada sequência gênica, podendo ser translocada para outra região do genoma, com aquisição de diferentes destinos funcionais mais prováveis: a perda de função com silenciamento, se transformando em um pseudogene; a perda de função parcial do papel gênico ou subfuncionalização, podendo ocorrer a complementação de função entre as cópias do gene; o ganho de uma nova função; ou então, pode ocorrer o funcionamento das duas cópias gênicas de maneira redundante (Pinyopich *et al.*, 2003).

Genes *MADS-box* de classe B como o *PISTILLATA* e *GLOBOSA* também possuem processos evolutivos baseados na duplicação gênica (Kramer *et al.*, 1998). A própria origem dos genes de classe B, *PISTILLATA* e seu parálogo *APETALA3* possui base evolutiva que se iniciou com a duplicação de um gene ancestral, dando origem a genes que tomaram rumos evolutivos diferenciados. Na classe B, a duplicação gênica não é restrita à origem dos genes *PI* e *AP3*.

Duplicações gênicas ocorreram em todos os níveis filogenéticos, tanto antes como depois de derivações evolutivas que separam linhagens de plantas (Kanno *et al.*, 2007; Bartlett *et al.*, 2010).

Outra parte do processo evolutivo dos genes são as modificações das suas sequências que podem ocorrer através de substituições, deleções, ou inserções de nucleotídeos, resultando na alteração do produto gênico final. As deleções dentro das sequências são bastante comuns em genes e podem funcionar como ferramenta para entender delimitações de linhagens de Angiospermas e para compreender a rota evolutiva entre essas diferentes linhagens gênicas dentro de diferentes Angiospermas (Kanno *et al.*, 2007; Bartlett *et al.*, 2010). De maneira funcional, deleções de nucleotídeos podem influir em algum domínio de ligação que medeia a ligação de DNA ou na interação de proteína/proteína, realizada pelo produto do gene em questão (Vandenbussche *et al.*, 2003; Bartlett *et al.*, 2016). A identificação dessas deleções é um passo importante para se compreender a evolução de genes de classe B, aos quais geram impacto sobre aspectos funcionais do gene, ou ainda, ser um marcador evolutivo para a identificação de diferentes linhagens filogenéticas.

Uso potencial de *Tillandsia aeranthis*

Tillandsia L. é um dos gêneros mais bem representados de todas as Bromeliaceae no Brasil, sendo possível encontrar espécies desde regiões semiáridas no Nordeste brasileiro (Pontes & Agra, 2006) até o Sul do país (Buzatto *et al.*, 2008).

Muitas *Tillandsia* possuem um forte apelo ornamental, com presença de flores com coloração que variam de rosa a azul, podendo ser brancas, dependendo da espécie ou variedade (Reitz, 1983). Seu tamanho é reduzido, com pouca exigência de substrato para cultivo, podendo ser mantidas suspensas, o que lhes conferem o nome de *air plant*, sendo bastante visadas em mercados de venda de plantas, principalmente no exterior do Brasil. Pelo fato de ter um apelo ornamental e

consequentemente comercial, atualmente é possível encontrar exemplares de *Tillandsia* em diversos locais do mundo, tornando viável a sua obtenção para usos em estudos com o grupo.

O gênero possui modificações como presença de escamas peltadas em suas folhas, nos quais são responsáveis pela absorção de águas e nutrientes de forma independente em relação ao substrato em que a planta esteja localizada. *Tillandsia* possuem independência da função absorptiva nas suas raízes (Papini *et al.*, 2005; Papini *et al.*, 2010), já que essas são especializadas para a fixação.

Além da absorção de água e nutrientes pelas escamas peltadas, ocorrem trocas gasosas por meio dos estômatos, sendo também responsável pelo balanço hídrico através da perda de vapores de água (Papini *et al.*, 2005). Assim, além de ocorrer trocas de gases, e substâncias essenciais para a planta, também podem ser absorvidas substâncias tóxicas, como metais pesados e outros poluentes, ficando retidas por algum tempo em seus tecidos, podendo ser analisados por diferentes metodologias (Martínez-Carrillo *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2011; Abril *et al.*, 2014). Por isso, *Tillandsia* podem ser usadas como bioindicadores ambientais para monitoramento atmosférico. Há sugestões do uso de *Tillandsia usneoides* ou *Tillandsia capillaris* como alternativas ou complementação a métodos de monitoramento de ar por filtros, para verificação de materiais particulados, metais pesados, hidrocarbonetos entre outros poluentes, sendo uma alternativa com vantagens de custos a formas convencionais de análise (Martínez-Carrillo *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2011; Abril *et al.*, 2014).

Uso de *Tillandsia aeranthos* como planta modelo dentro das Bromeliaceae

Muitas das espécies escolhidas para serem usadas como espécie modelo ou referência têm um papel bastante importante na compreensão dos mecanismos e processos envolvidos dentro do universo das plantas. Exemplos bastante conhecidos de plantas modelo são *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., como modelo de eudicotiledôneas (Meinke *et al.*, 1998; Somerville *et al.*, 2002), arroz (*Oryza sativa* L.) (Izawa & Shimamoto, 1996; Kende *et al.*, 1998) com modelo entre as

monocotiledôneas, com atual tentativa do uso de *Brachypodium distachyon* (L.) P.Beauv. como substituta ao arroz (Draper *et al.*, 2001).

Muitas das escolhas para uma espécie modelo de planta são características próprias que facilitam o estudo de um determinado mecanismo que se deseja compreender, de forma mais restrita, com a menor quantidade de variáveis possíveis que interfiram no processo alvo (Kende *et al.*, 1998). Essas qualidades normalmente estão diretamente ligadas a uma facilitação de trabalho, como por exemplo, ter um cultivo fácil, fácil manipulação, pouca exigência por substratos complexos, tamanho reduzido, permitindo transporte ou até mesmo a sua colocação em ambientes controlados, como incubadoras de tamanho reduzido (Meinke *et al.*, 1998; Draper *et al.*, 2001). Além da manipulação facilitada, é necessário que a espécie seja diploide, tenha um ciclo de vida curto, facilidade na rotina de transformação, genética bem desenvolvida, cromossomos pequenos e ter sintenia com outras espécies.

Uma das espécies que podem ter potencial para uso como modelo dentro de Bromeliaceae é *Tillandsia aeranthos*, já que possui diversas características desejáveis, como: a) tamanho reduzido, se comparado a outras Bromeliaceae e ausência de espinhos foliares, o que permite uma fácil manipulação e cultivo em câmaras incubadoras (BOD); b) facilidade de cultivo, não exigindo uso de substratos especiais, já que suas raízes não tem função de absorção; c) ampla distribuição geográfica e adaptada a ambientes alterados, presente em grande abundância em áreas urbanas, diminuindo o esforço de coleta; d) não é considerada vulnerável; e) tamanho reduzido de inflorescência, com presença de diferentes fases de desenvolvimento, permitindo observação de fases do meristema floral na região mais apical, e flores com todos os órgãos desenvolvidos, na sua região basal. Considerando todos os pontos mencionados acima, *T. aeranthos* possui um grande potencial para ser qualificada como uma planta modelo entre as espécies de Bromeliaceae.

Autofluorescência em plantas e seus usos potenciais

Autofluorescência é a emissão natural de luz gerada por metabólitos ou por componentes estruturais de origem biológica que ocorre após uma excitação por uma radiação com um comprimento de onda definido (Monici, 2005). O comprimento de onda da radiação de excitação é sempre menor e com mais energia do que a da emissão da autofluorescência.

Substâncias presentes em células epidérmicas humanas (Noordzij *et al.*, 2012), hepatócitos de rato (Croce *et al.*, 2004), quitina de *Drosophila melanogaster* (McGurk *et al.*, 2007), metabólicos presentes em meios de cultura (Aubin, 1979) e em diversas regiões das plantas (Talamond *et al.*, 2015), são locais onde naturalmente podem ocorrer autofluorescência.

Para as plantas, a autofluorescência pode ajudar na atração e orientação de polinizadores, sendo considerada como sinais de biocomunicação, que são recebidos por fotorreceptores dos olhos dos insetos (Roshchina, 2003). Muitas das substâncias que emitem autofluorescência nas plantas são metabólitos secundários que atuam como agentes de defesas contra patógenos e danos, como os compostos fenólicos. Esses compostos podem ter papel estrutural, fazendo parte da composição de paredes primárias e secundárias de plantas, podendo também servir de proteção contra herbivoria, ou ainda, servindo de proteção contra ações nocivas da radiação UV excessiva presente no ambiente (Schoenwaelder, 2008).

Diversas substâncias apresentam características próprias quanto a sua autofluorescência emitida que podem ser usadas como assinaturas fluorescentes das plantas, servindo até como diagnóstico de metabolismo da planta (Roshchina, 2003). A fluorescência, tanto dos corantes como das proteínas funcionam como indicadores de reação positiva, porém, em muitos casos, os resultados esperados das reações podem ser mascarados ou confundidos pelas emissões de fluorescências endógenas, com faixas de excitação e de emissões de autofluorescência próximas aos dos indicadores exógenos (Diao *et al.*, 2015).

Autofluorescência de plantas podem estar presentes em diferentes tecidos. Quando folhas verdes de plantas são excitadas por radiação ultravioleta (UV) com comprimentos próximos a 337 nm, ocorrem emissões de autofluorescências vermelha e vermelha distante, relativas à fluorescência da clorofila (Maxwell & Johnson, 2000), e ocorre também a emissão de fluorescência verde azulada, gerada pela presença de ácido ferrúlico, mais comum em monocotiledôneas (Lichtenthaler & Schweinger, 1998). Também, existem outras substâncias que contribuem para a formação de autofluorescência. Muitas delas são compostas, como, ligninas, ácido cinamínico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, assim como vários flavonoides ou outros compostos fenólicos (Schoenwaelder, 2008; Roshchina, 2012; Donaldson & Radotic, 2013), podendo ocorrer variações de emissão conforme a fase de desenvolvimento ou do tecido analisado. Dessa maneira, a autofluorescência gerada por componentes normalmente encontrados em plantas podem atuar como um contaminante endógeno em análises que utilizam corantes como, isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate* - FITC) e rodamina, ou proteínas fluorescentes, como proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* - GFP) e suas variantes (YFP, RFP, CFP, BFP, entre outras).

Diferentes abordagens podem ser feitas com uso da autofluorescência, desde diagnósticos celulares, até modelagem de contato célula a célula e interação com substâncias biologicamente ativas (Roshchina, 2012). A fluorescência de compostos celulares também pode servir como marcadores de diagnósticos celulares, pois muitas vezes pode ser indicador do estado celular, por mostrar mudanças de metabolismos em resposta a sinais externos. Em plantas expostas a espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de ozônio podem ocorrer emissões mais intensas de autofluorescência em amplo espectro, do azul (450-480 nm) ao vermelho (> 600 nm), dependendo da natureza do organismo e ao tempo de exposição ao fator de estresse (Fernandes *et al.*, 2016).

Outra questão sobre uso de autofluorescência como diagnóstico, é que diferentes tipos de organismos, células analisadas, posição taxonômica ou condições ambientais, como luz actínica, temperatura, umidade, estado fisiológico celular, proximidades com outras células ou outros

organismos, podem alterar o tipo de onda emitida, servindo como diferentes assinaturas biológicas, conforme o parâmetro que se deseja analisar, podendo ser usada também como ferramenta taxonômica (Schoenwaelder, 2008).

De forma semelhante, autofluorescência pode ser usada como microanálise de expressão e acúmulo de metabólicos secundários com possíveis utilidades para localização de fármacos em células secretoras, sem que seja feito grandes procedimentos bioquímicos, sendo útil também em diagnóstico e análise de danos celulares, ou ainda, como indicador de polinização ou de compatibilidade de polinização (Roshchina, 2005; Roshchina, 2012).

Compostos produzidos pelas plantas e que são autofluorescentes, normalmente possuem afinidade com diversas substâncias como, tetróxido de ósmio, corando de preto; azul de toluidina, corando normalmente de azul (podendo haver variações de verde ou turquesa); vermelho neutro, corando de vermelho; *Fast Red*, corando de laranja (Schoenwaelder, 2008); porém, a possibilidade de não necessitar de reagentes para sua coloração quando analisadas em microscopia de epifluorescência a torna bastante interessante na análise de tecidos, pois pode facilitar rotinas de trabalho.

Apesar de serem facilmente observados, os compostos fenólicos são difíceis de serem isolados, devido ao seu tamanho, similaridade estrutural e sua reatividade com outros compostos, tornando difícil sua análise quantitativa e caracterização, exigindo em certos casos, o uso de fixadores especiais (Schoenwaelder, 2008). Mesmo assim, estudos que visam à localização de compostos fenólicos são pré-requisitos para a compreensão de suas funções biológicas e fisiológicas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterização de sequências de transcritos do gene *PISTILLATA* de inflorescências das bromélias *Aechmea comata* Baker (subfamília Bromelioideae) e *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) LB Sm. (subfamília Tillandsioideae) com enfoque morfoanatômico e evolutivo.

Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar sequências transcritas de *PISTILLATA* nas espécies *Aechmea comata* e *Tillandsia aeranthos*;
- Comparação de transcritos de *PISTILLATA* de Bromeliaceae com transcritos de *PISTILLATA* de espécies de outras famílias de monocotiledôneas, por meio de ferramentas de reconstrução filogenética por inferência bayesiana;
- Demonstrar a primeira localização de transcritos de *PISTILLATA* em flores e inflorescências de *Tillandsia aeranthos* a partir da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes de DNA de fita simples, sintetizada a partir de técnicas modificadas de PCR em duas etapas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Exemplares das espécies *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B. Sm. da população de Porto Alegre (30°4'04.4"S 51°7'08.29"W) e *Aechmea comata* Baker, da população de Maquiné (29°32'09.84"S 50°18'52.32"W) foram coletados e mantidos em casa de vegetação com condições controladas de rega. Durante o período de floração, tecidos de inflorescência em estádios jovens de desenvolvimento foram removidos e armazenados a -80°C até a extração de seus RNA totais.

Exemplares de plantas testemunhas (*voucher*) estão depositados no Herbário do ICN – UFRGS (*T. aeranthis*: ICN 188807 e *A. comata* ICN 184869).

Reconstrução tridimensional de inflorescências de *Tillandsia aeranthis*

Com a finalidade de se ter uma visão geral do material estudado, foram tiradas fotografias convencionais das plantas em seu ambiente natural. Também, foram feitas macrografias com reconstruções tridimensionais de inflorescências de *T. aeranthis* em estereomicroscópio com auxílio do programa *Leica LAS Montage*. Para isso, foram usadas inflorescências íntegras ou com as brácteas removidas, em estádios imaturos de desenvolvimento. Para ver o aspecto geral da planta e da inflorescência, ver Figura 1.

Fixação, desidratação, inclusão e preparação de lâminas de secções de inflorescências de *Tillandsia aeranthis*

Inflorescências de *Tillandsia aeranthis* foram coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento. As soluções usadas desde as etapas da pré-hibridação até a etapa de lavagens pós-hibridação foram preparadas com água ultrapura, tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich). Cuidados foram tomados para evitar degradação via RNase, com uso de luvas novas e limpando superfícies com dodecil sulfato de sódio (SDS) (Vetec) 0,2%, seguido de aplicação, por aspersão, de peróxido de hidrogênio 3% (água oxigenada comercial 10 volumes). Vidrarias foram esterilizadas a 250°C por pelo menos 3 horas. Nas lavagens de pós-hibridação não houve necessidade de usar luvas, vidrarias esterilizadas, nem de água tratada com DEPC, já que nessa etapa, o RNA alvo está complementado por sonda, não havendo degradação.

A fórmula da solução fixadora para inflorescências de *Tillandsia aeranthis* foi feita com 20 ml de solução concentrada de formaldeído (20%) recém-preparada, 5 ml de ácido acético glacial (P. A.), 70 ml de etanol absoluto, 5 ml de H₂O, totalizando um volume de 100 ml. As inflorescências

foram dissecadas, sendo removidas as brácteas externas, para melhor penetração da solução fixadora. A relação entre volume de inflorescência e volume de fixador não excedeu 30% do volume líquido, com aplicação de vácuo (600 mm de Hg) por 15 minutos, ou até os tecidos submergirem, seguido de um período de fixação de 12 horas, a 4 °C sob agitação.

Depois de fixadas, as inflorescências foram lavadas duas vezes em H₂O, por 10 minutos, seguido de desidratação alcoólica crescente, com concentrações de 10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, com 2 horas de tratamento para cada etapa, sob agitação. Depois da desidratação, o etanol foi substituído por xilol, chegando até a total inclusão em *paraplast* (Sigma-Aldrich), também de forma gradual. As etapas de inclusão foram com tratamentos e em etanol:xilol (1:1 – v:v), por 6 horas, xilol 100% por 6 horas, seguido por substituições de xilol por *paraplast*, em vários passos, com xilol:*paraplast* nas proporções de 3:1 (v:v), 1:1 (v:v), 1:3 (v:v), com pelo menos 6 horas para cada passo; seguido de mais duas etapas em *paraplast* 100% com aproximadamente 12 horas de tratamento para cada passo. Os tratamentos feitos a partir do xilol 100% até o segundo passo de *paraplast* 100% foram realizados a 60 °C.

As inflorescências foram orientadas em moldes, deixando esfriar para a solidificação, sendo fixadas em tacos de madeira. Os blocos foram seccionados a uma espessura de 8 µm em micrótomo de rotação. A distensão das fitas de secção foram feitas em 1 ml de H₂O DEPC aplicada em lâminas carregadas com trietoxissilana (Sigma-Aldrich), e dispostas sobre placa aquecedora. Após a fita se distender, o excesso de água foi removido com pipeta, com incubação das lâminas a 42 °C por 2 dias para uma melhor aderência.

As lâminas geradas com inflorescências incluídas em *paraplast* foram usadas para testes de análise de autofluorescência em tecidos florais e para hibridação *in situ*, seguindo passos particulares de tratamentos de cada um dos procedimentos.

Extração de RNA, síntese de cDNA, clonagem e sequenciamento

Amostras de RNA total foram isoladas dos tecidos com maceração em nitrogênio líquido, seguido da adição de *TRIzol® Reagent* (Life Technologies). Essa mistura foi incubada em temperatura ambiente, centrifugada para remoção de partículas sólidas com posterior adição de 600 µl de clorofórmio, rápida agitação, centrifugação a 4°C e precipitação em isopropanol. De cada uma das amostras de RNA foram utilizados 4 µg como molde para síntese de cDNA, com 200 unidades de transcriptase reversa *M-MLV* (Promega), 0,5 µg de iniciador *oligo(dT)*18 e 12,5 nmol de cada um dos dNTP (Sigma-Aldrich).

Para o isolamento dos fragmentos gênicos de *PI/GLO* de Bromeliaceae foram feitas reações em cadeia de polimerase (PCR), com *Taq* DNA polimerase *Platinum* (Life Technologies) e iniciadores degenerados (Life Technologies) desenhados para amplificar regiões conservadas de *Ananas comosus* (Lv *et al.*, 2012). Os produtos de PCR foram sequenciados, servindo para desenho de novos iniciadores diretos (PIS-F1F: CGGATTAAGAAAGAGAACGA e PIS-F2F: GAAAGAGAACGACAACATGC), destinados a regiões finais dos genes *PI/GLO* e usados em conjunto com *oligo(dT)*23 ancorado (TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN) como iniciador reverso, a fim de obter regiões mais próximas da região 3' dos transcritos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em géis de 1% de agarose, purificados em colunas de centrifugação (Ludwig Biotec) e os produtos foram clonados com o *kit p-GEM-T Easy* (Promega). A triagem de clones positivos foi feita por teste de PCR em colônia com iniciadores universais T7 e SP6. As colônias que geraram produtos de PCR com tamanhos desejados foram usadas para extração de plasmídeos com *kit* de purificação de DNA plasmidial (Ludwig Biotec), os quais foram sequenciados.

Caracterização de sequências de *PISTILLATA/GLOBOSA* de Bromeliaceae

As sequências de cDNA de *T. aeranthos* e de *A. comata* foram traduzidas no programa *EMBOSS Transeq* (Goujon *et al.*, 2010) e comparadas com outras sequências presentes no *National*

Center for Biotechnology Information (NCBI) com o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990), na categoria *Standard Protein BLAST* (*blastp*). A verificação de domínios funcionais foi realizada no *site* do *Conserved Domain Database* (CDD) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Análises de deleções ou inserções de sequências foram feitas através de alinhamento das sequências de bromélias com outras sequências do “*RefSeq: NCBI Reference Sequence Database*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), no programa *MAFFT version 7* (Kato & Standley, 2013), juntamente de outras sequências de monocotiledôneas obtidas a partir de buscas no BLAST. Também como forma de caracterização, a sequência altamente conservada de aminoácidos *PI*: MPF_xFRVQP_xQPNLQE foi localizada nas diferentes sequências analisadas.

Teste Z de seleção

Como forma de avaliar a neutralidade evolutiva dos transcritos de *PI*, foi feito um teste Z de seleção com o pacote de programas do MEGA (versão 6.06) (Tamura *et al.*, 2013). A fórmula do teste Z é: “ $Z = (dN - dS) / \text{SQRT}(\text{Var}(dS) + \text{Var}(dN))$ ”, onde, (dS): substituições sinônimas, (dN): substituições não sinônimas, SQRT: raiz quadrada, Var(dS): variância de (dS), Var(dN): variância de (dN). Uma avaliação quantitativa é feita no teste entre os dois tipos de substituição acontecer, em que local da mutação, e a sua variância. Assim, a hipótese nula é testada, em que H₀: dN=dS. Se a hipótese nula é rejeitada, o nível de significância gerada depende da hipótese alternativa H_A: (A) dN=dS (seleção neutra); (B) dN>dS (seleção positiva); (C) dN<dS (seleção purificadora). O teste foi aplicado dentro dos grupos que representam as famílias de monocotiledôneas, bem como todos os dados de sequência a partir de espécies monocotiledôneas amostradas. O teste não foi realizado em todas as famílias da amostra, devido ao número limitado de sequências em alguns grupos.

Análises filogenéticas entre *PISTILLATA/GLOBOSA* de Bromeliaceae e de outras monocotiledôneas

Buscas de sequências de transcritos dos genes *PISTILLATA* e *GLOBOSA* de monocotiledôneas foram realizadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), com objetivo de incluir uma amostragem representativa do grupo. Os parâmetros de busca no BLAST foram *PISTILLATA* ou *GLOBOSA*, com monocotiledôneas para o grupo interno. Como grupo externo, foram incluídas espécies de linhagens que divergiram anteriormente às monocotiledôneas, dentro de Angiospermas (grupos cedo divergentes), pertencentes às ordens Canellales, Nymphaeales, Piperales, Austrobaileyales, Choranthales, Magnoliales, Laurales e Magnoliales. Nome dos taxa e números de acesso do *GenBank* estão no Quadro 1. O grupo de sequências foi analisado no programa PFAM, versão 27.0 (Finn *et al.*, 2014) para verificar quais eram os *frames* de leitura de cada uma delas, ou ainda, se haviam codons de parada prematuros. As sequências de nucleotídeos que não estavam com o *frame* de leitura +1, tiveram nucleotídeos removidos até obterem a conformação desejada. Após verificação, todas as sequências foram editadas para o *frame* +1, removendo uma ou duas bases no início das sequências que estivessem nos *frames* +2 ou +3.

A fim de evitar viés nas análises, codons de início e de parada foram removidos das sequências, juntamente de todos os nucleotídeos que estavam localizados fora da região compreendida por esses dois codons. As sequências foram então alinhadas com o software MAFFT *version* 7. Em seguida, os alinhamentos foram verificados com o programa GUIDANCE2 (Sela *et al.*, 2015), para a inferência de sequências e colunas com baixos valores de alinhamento. Sequências com valores baixos foram removidas e novos alinhamentos foram feitos. Colunas com *gaps* que comprometiam os alinhamentos também foram removidas. Para escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi realizado um teste de *Akaike Information Criteria* - AIC no programa *jModeltest* (Darriba *et al.*, 2012). A análise de filogenia por estatística bayesiana foi inferida no pacote BEAST v1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012), sob modelo de árvore de especiação de

Yule, usando o modelo de substituição GTR+I+G, com 30 milhões de gerações, amostragem a cada 1000 gerações e descarte de 20% de *burn-in*. A verossimilhança geral e as estimativas de cada parâmetro individual foram conferidas no programa *Tracer* (pacote BEAST) (Rambaut *et al.*, 2014) para avaliação da convergência entre as corridas. O programa *Tree Annotator* (pacote BEAST) foi utilizado para gerar uma árvore de máxima credibilidade de clados. A árvore final foi visualizada no *FigTree* v1.4.2 (Rambaut, 2014).

Síntese de sonda de fita simples de DNA (ssDNA) fluorescente

Para a hibridação *in situ*, foram geradas sondas em duas etapas de amplificação, usando os clones de cDNA, isolados previamente em *Tillandsia aeranthos*, como molde das reações. Na primeira etapa foi amplificado um fragmento de aproximadamente 200 pares de bases via PCR, com iniciadores específicos (PIS-TA-F2: 5'-TGTTGGAGAAGTACCAGCAGA-3' e PIS-CON2-R: 5'-TGAGACCATTTCTGGAGAGCTT-3'), a partir de um plasmídeo contendo parte de transcrito semelhante a *PISTILLATA*, obtido de *Tillandsia aeranthos* (como descrito anteriormente no isolamento e caracterização de *PISTILLATA* de Bromeliaceae). Nessa reação, foram usados 1-5 pg de DNA plasmidial como molde, 1x tampão de reação, 2,5 mM de MgCl₂, 250 µM de cada um dos dNTPs, 500 µM de cada iniciador, 1U de *Taq* polimerase, com um volume final de 20 µl em 30 ciclos no termociclador. Uma pequena alíquota da primeira etapa foi submetida a uma corrida de eletroforese para verificação de amplificação, com limpeza em *kit* de purificação de produtos de PCR (Ludwig Biotec) com o restante do produto da reação. Em seguida, foi feita uma segunda etapa de amplificação, em que foram realizadas duas PCR lineares separadas, cada uma delas usando apenas um dos iniciadores da primeira reação, a uma concentração de 750 µM, 150 ng de DNA molde proveniente da primeira etapa, 1x tampão de reação, 100 µM dos nucleotídeos dATP, dTTP e dGTP, 65 µM de dCTP e 35 µM de dCTP biotilado, 5 mM de MgCl₂ e 1,5U de *Taq* polimerase, em um volume total de 50 µl, com 40 ciclos de reação no termociclador, com as mesmas condições de temperaturas e tempos da primeira etapa. O produto gerado com o iniciador

reverso foi usado como sonda de teste positivo, enquanto que o produto gerado com o iniciador direto funcionou como sonda de controle negativo.

Hibridação *in situ*

Nos ensaios de hibridação *in situ*, as lâminas com material aderido foram tratadas para remoção do *paraplast*, em temperatura ambiente, com dois banhos em xilol 100%, por 10 minutos; seguido por um banho em xilol:etanol (1:1 – v:v), por 1 minuto; e seguindo por mais dois banhos em etanol 100% por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram secas em temperatura ambiente. Para remoção de proteínas, cada uma das lâminas foi tratada com 500 µl de uma solução contendo proteinase K (1 µg/ml em Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,5), cobrindo com lamínula de *Parafilm M*® e incubação por 20 minutos a 37 °C, em câmara úmida. As lâminas tratadas foram lavadas duas vezes com H₂O em jarro de Coplin vertical, por 10 minutos, com agitação branda, à temperatura ambiente, removendo as lamínulas que boiaram no primeiro minuto.

Em cada uma das lâminas hibridadas, foi adicionada uma mistura contendo, 100 ng sonda de ssDNA marcada com biotina, formamida deionizada (50% - v:v), dextran sulfato (10% - m:v), solução de Denhardts (5x), EDTA (10 mM), Triton 100 (0,4% - v:v), Tris-HCl pH 7,5 (0,05 M), em um volume final de 200 µl. Essa mistura foi desnaturada a 70°C por 10 minutos e transferida rapidamente para o gelo picado, evitando possíveis anelamentos entre fitas de ssDNA. Depois de resfriado, o conteúdo foi aplicado sobre cada lâmina, as quais foram incubadas a 42 °C *overnight*.

Com intuito de remover sonda que se ligou ao tecido de forma inespecífica, foram realizados tratamentos pós-hibridações com duas lavagens de 2xSSC e uma com 4xSSC + 0,2 % de Tween 20. Em seguida, foi feito um tratamento de bloqueio para a detecção, com soro albumina bovino (BSA) 5 % por 5 minutos.

Para a detecção foi usada a mesma solução de BSA 5%, porém, com adição de estreptavidina-FITC (2 µg/ml), com incubação de 1 hora a 37 °C. Depois da detecção, foram feitas duas lavagens sob agitação branda, com 4xSSC com 0,2 % de Tween 20 e montagem com meio

contendo, diazabicyclooctano (DABCO) (2,5 % - m:v), Tris-HCl pH 8,0 (20 mM) e glicerol (75 % - v:v).

As observações foram realizadas em microscópio de epifluorescência com filtros para FITC (Filtro de excitação: BP 450-490; espelho dicróico: 510; Filtro de supressão: LP515) e a fotodocumentação com câmera Zeiss (AxioCam ERC5S) com o programa AxioVision SE64.

Análise de autofluorescência em tecidos de *Tillandsia aeranthos*

Lâminas com secções histológicas aderidas e envelhecidas por dois dias foram tratadas para a remoção do *paraplast*, com dois banhos em xilol 100%, por 10 minutos cada, seguido de um banho com 1:1 – xilol 100%:etanol absoluto, por 5 minutos; seguido por mais dois banhos em etanol absoluto, por 5 minutos cada. Depois, as lâminas foram retiradas do etanol e secas em temperatura ambiente. Em cada lâmina foi aplicada 100 µl de meio de montagem para fluorescência (diazabicyclooctano - DABCO (2,5 % - m:v), Tris-HCl pH 8,0 (20 mM) e glicerol (75 % - v:v)), sendo cobertas com lamínulas 24 x 60 mm.

Secções paradérmicas foram feitas em folhas frescas e jovens de *T. aeranthos*, com cortes a mão livre com auxílio de uma lâmina de barbear, sendo diretamente transferidos para uma gota de meio de montagem de fluorescência em lâminas de microscopia e cobertos com lamínula 24 x 24 mm.

Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de epifluorescência com cubo de filtros A4 (faixa de excitação: ultravioleta - UV; filtro de excitação: BP 360/40; espelho dicróico: 400; filtro de supressão: BP 470/40); cubo de filtros I3 (faixa de excitação: azul; filtro de excitação: BP 450-490; espelho dicróico: 510; filtro de supressão: LP 515); cubo de filtros N2.1 (faixa de excitação: verde; filtro de excitação: BP 515-560; espelho dicróico: 580; filtro de supressão: LP 590); e fotodocumentação com câmera Zeiss (AxioCam ERC5S) com o programa AxioVision SE64. A

morfologia adotada para descrever as escamas peltadas foi baseada na descrição de Scatena & Segecin (2005).

RESULTADOS

Caracterização das sequências de *PISTILLATA* isoladas em Bromeliaceae

Os fragmentos de transcritos *PI* de Bromeliaceae foram sequenciados. Resíduos de vetores foram removidos manualmente e as sequências com eletroferogramas confiáveis foram usadas na montagem final dos *contigs* de cDNA putativos de *PISTILLATA*. Fragmentos transcritos de *PI* de *T. aeranthos* foram isolados e caracterizados, sendo possível observar toda a região codante, mais toda a região 3' não transcrita (3'UTR) e parte da região 5' não transcrita (5'UTR), totalizando uma sequência de 847 nucleotídeos (Acesso do GenBank: KX228796). Mesmo depois de várias tentativas, a região codante de *PI* de *A. comata* foi isolada apenas parcialmente, mais toda a região 3' não transcrita, totalizando uma sequência de 744 nucleotídeos (Acesso do GenBank: KX228797). Em seguida, os cDNAs foram traduzidas no EMBOSS Transeq e o *frame* de leitura de cada uma das sequências foi verificado. Os frames de leitura corretos foram encontrados, os codons de início e de parada, bem como regiões não transcritas, delimitadas por ambos os codons, foram removidas. A *open reading frame* (ORF) de *T. aeranthos* resultou em uma sequência de 197 resíduos de aminoácidos. Já a ORF de *A. comata* possui 156 resíduos de aminoácidos, sendo que essa sequência não foi evidenciada por completo (Figura 2). Com a análise de domínios conservados no “CDD: NCBI's Conserved Domain Database” foi encontrado um domínio conservado de proteína semelhante ao da família *MADS_MEF2* na sequência de *T. aeranthos*, com tamanho de 79 resíduos de aminoácidos, *Bit Score*: 148.29 e *E-value*: 1.11e-41. Também foi encontrada a região de *K-box* de *PISTILLATA* de *T. aeranthos*, com tamanho de 95 resíduos de aminoácidos, *Bit Score*: 112.08 e *E-value*: 1.81e-28 (Figura 2). Na análise da sequência de *A.*

comata foi encontrado um domínio semelhante ao da família *MADS_MEF2*, porém, com apenas 39 resíduos, devido ao tamanho reduzido da sequência original de nucleotídeos isolada nessa espécie. A região de *K-box* de *A. comata* contém 100 resíduos de aminoácidos, *Bit Score*: 127.87 *E-value*: 1.97e-35. A sequência conservada de aminoácidos em *PISTILLATA* (*PI-motif*: MPF_xFRVQP_xQPNLQE) – (Kramer *et al.*, 1998) foi encontrada na região C-terminal das duas espécies, porém com um aminoácido diferente (MPMGFRVQPIQPNLQE) do que descrito na *PI-motif* original (Figura 2).

Quando as sequências de resíduos aminoácidos de *PISTILLATA* das espécies *T. aeranthis* e *A. comata* foram comparadas a espécies do *RefSeq* e outras monocotiledôneas, foi possível verificar que nas espécies de Bromeliaceae há uma deleção de aminoácidos, próximo da *PI-motif* na região C-terminal. Outro fato interessante, quando foram feitas buscas com as sequências de aminoácidos de Bromeliaceae no BLAST (*blastp*), é que grande parte das sequências, com valores de identidade de no mínimo 74% de similaridade e com *E-value* próximos de 9e-80, em grande maioria, pertencem a espécies de Orchidaceae.

Teste Z de seleção

O teste Z de seleção mostrou evolução não neutra para a maioria das sequências amostradas dentro das famílias de monocotiledôneas (Quadro 2). As exceções foram as famílias Melanthiaceae e Musaceae, no qual o teste não foi significativo. Bromeliaceae e as famílias restantes, bem como o conjunto de dados total, mostraram valores negativos para dN-dS, indicando seleção purificadora (Quadro 2).

Análise filogenética de transcrito *PISTILLATA* de monocotiledôneas

As sequências de nucleotídeos que codificam as ORF de *PI* de *T. aeranthis* e *A. comata* foram reunidas a outras sequências obtidas no *GenBank* e alinhadas no MAFFT *Server*. As

sequências e colunas que geravam alinhamentos equivocados foram removidas. O conjunto de dados resultante gerado foi de 153 sequências, com 354 nucleotídeos. O conjunto de dados foi submetido à análise de estatística bayesiana no pacote de programas BEAST. Os resultados mostrados no programa *Tracer* exibiram valores altos para o tamanho efetivo da amostra (*Effective sample size* - ESS) para todas as análises estatísticas, mostrando consistência com corridas suficientemente independentes para a reconstrução bayesiana.

Observando a árvore gerada (Figura 3), primeiramente foi possível notar que nós de ramos mais posteriores tiveram valores altos de probabilidade posterior, com poucos nós de valores médios ou baixos (abaixo de 0,70). Já para os nós mais anteriores, onde estão os ancestrais de divergência entre ordens ou algumas famílias, poucos nós possuem valores altos de probabilidade posterior. A maioria dos nós dessa região da árvore ficou com valores abaixo de 0,60. Devido a esses valores baixos nos ramos mais anteriores da árvore filogenética, houve dificuldade de se estabelecer um relacionamento entre grupos superiores, como ordens e famílias de monocotiledôneas de maneira confiável. Desta forma, também não ficou claro o posicionamento real de Bromeliaceae dentro de Monocotiledôneas, já que nós de ancestrais hipotéticos da família possuem valores reduzidos de probabilidade posterior.

Mesmo não sendo possível estabelecer uma relação exata entre diferentes famílias de monocotiledôneas, foi verificado que os indivíduos amostrados da família Bromeliaceae formam um clado monofilético. Esse clado que está ligado ao nó do seu ancestral hipotético por um ramo relativamente maior do que os ramos mais posteriores que divergem para todas as espécies de Bromeliaceae. Os nós internos do clado Bromeliaceae possuem valores altos de probabilidade posterior, variando entre 0,96 a 1. Além do mais, o ramo que compreende Bromeliaceae não possui um relacionamento próximo com outras famílias de Poales.

Por outro lado, as diversas regiões da árvore filogenética parecem reproduzir resultados encontrados em outros trabalhos que fizeram reconstruções filogenéticas dos genes *PISTILLATA/GLOBOSA* em espécies de monocotiledôneas como em Zingiberales (Bartlett &

Specht, 2010), sendo também possível encontrar semelhanças com o trabalho de Kanno *et al.* (2007) que estudaram monocotiledôneas não gramíneas. Essas semelhanças, em diferentes regiões das árvores, com outros estudos realizados anteriormente, inferem confiabilidade para a reconstrução filogenética com inclusão de sequências de *PI* de Bromeliaceae.

Praticamente todas as ordens que apresentavam mais de um representante amostrado na análise formaram clados monofiléticos. Asparagales foi uma exceção, em que um dos seus clados agrupa as famílias Amaryllidaceae, Asparagaceae e Iridaceae. Esse clado não contém espécies de Orchidaceae e alguns dos nós apresentam valores baixos de probabilidade posterior. Outras exceções foram as sequências "*Luzula_sylvatica_PI*" (Juncaceae – Poales), "*Callisia_insignis_PI*" (Commelinaceae - Commelinales) e "*Hypoxis_villosa_PI*" (Hypoxidaceae - Asparagales) (Figura 3) as quais não estão agrupadas com outras espécies das suas ordens. Nesse caso, é possível inferir que provavelmente ocorra uma grande divergência no padrão de suas sequências em relação a outras analisadas na reconstrução filogenética, fato que é reforçado pelos comprimentos dos ramos que ligam cada sequência ao seu nó ancestral hipotético.

Todas as espécies que não fazem parte das monocotiledôneas ficaram agrupadas como grupo externo.

Análise de expressão em tecidos de *Tillandsia aeranthos*

Para os estudos em tecidos florais de *Tillandsia aeranthos* foram geradas sondas de ssDNA com duas etapas de amplificação, gerando fragmentos de aproximadamente 200 pares de base, a partir de clones de cDNA com sequências específicas de *PI* de *Tillandsia aeranthos*.

As lavagens pós-hibridação foram suficientes para a remoção de sinais inespecíficos de hibridação nos tecidos testados, mesmo sendo feitas com baixa estrigência. Os sinais de hibridação gerados pela sonda antissenso e evidenciados pelo fluorocromo FITC foram vistos em diferentes regiões meristemáticas, desde regiões mais centrais, até as mais periféricas, em flores em estádios iniciais de desenvolvimento, posicionadas em regiões mais apicais das inflorescências. (Figura 4 A-

C). Já nas flores em estádios mais desenvolvidos, posicionadas em regiões basais da inflorescência, foram evidenciados sinais em pétalas e estames, não sendo observados sinais em sépalas, brácteas florais e carpelos (Figura 4D). Além dos sinais evidenciados nas flores, também puderam ser vistos marcações em feixes vasculares em desenvolvimento, próximos à porção apical da inflorescência, com ligação às flores em estágio inicial de desenvolvimento (Figura 4E). Feixes vasculares de regiões mais basais das inflorescências, com presença de flores relativamente mais desenvolvidas, não evidenciaram sinais positivos de hibridação (Figura 4A). Nas inflorescências que foram hibridadas com a sonda antissenso, foi possível observar autofluorescência, mas que, devido sua coloração amarela, foram facilmente distinguíveis do fluorocromo FITC, ao qual possui coloração verde.

Como forma de controle, algumas secções de inflorescências foram hibridadas com sonda senso (controle negativo) (Figura 4F), não sendo evidenciadas marcações da sonda, sendo possível observar somente a autofluorescência de cor amarela no filtro de FITC (Figura 4F).

Análise de autofluorescência em tecidos de *Tillandsia aeranthos*

Nas análises de autofluorescência em tecidos de *T. aeranthos* foi possível observar que dependendo do tipo de comprimento de onda empregado na excitação (faixas UV, azul ou verde) houve uma resposta de emissão de fluorescência de diferentes formas. Em alguns casos, tecidos com diferentes composições geraram autofluorescência em intensidades diferentes, e em regiões diversificadas, dependendo do comprimento de onda da radiação da excitação (Figuras 5-7).

Quando os tecidos de *T. aeranthos* foram excitados com radiação com comprimentos de onda na faixa do UV (360 nm) (Figuras 5A, 6A, 6D, 6G), foi possível verificar que regiões com a parede celular mais desenvolvidas, como em tecidos parenquimáticos de regiões mais basais das inflorescências, das brácteas das inflorescências ou nas folhas jovens tenderam a emitir autofluorescência em coloração azul clara, em maior intensidade do que em tecidos meristemáticos.

Geralmente, regiões meristemáticas tenderam a ter uma coloração mais pálida se comparadas com outras regiões da inflorescência, aparentando uma coloração bege nas regiões das axilas. Mesmo assim, alguns núcleos ou nucléolos foram evidenciados nas regiões meristemáticas das regiões apicais da inflorescência. Espessamentos de parede celular de elementos vasculares emitiram autofluorescência em alta intensidade, ficando bastante evidentes nas inflorescências. Em algumas regiões, como nas brácteas, células da epiderme tenderam a emitir mais autofluorescência do que células parenquimáticas. Esse fato pode ser notado com mais facilidade nas secções das folhas jovens, devido à epiderme com parede celular sinuosa.

Em tecidos de *T. aeranthes* excitados por luz com comprimento de onda na faixa do azul (450-490 nm) (Figuras 5B, 6B, 6E, 6H), houve a geração de fluorescências em vários comprimentos de onda que variaram de colorações vermelha, laranja, amarela ou verde, dependendo da região do tecido excitada. Paredes celulares se mostraram evidentes, porém com intensidade um pouco menor do que quando excitadas por UV, com colorações que variaram do amarelo ao laranja nos tecidos florais, porém com emissão de autofluorescência verde nas paredes celulares das folhas jovens. Regiões dos elementos vasculares também ficaram bastante evidenciadas, porém, a região de emissão de autofluorescência foi externa às regiões dos espessamentos de parede evidenciadas pela radiação UV. Ainda, regiões das axilas florais dentro das fluorescências ficaram bastante evidentes.

Quando os tecidos de *T. aeranthes* foram excitados com comprimentos de onda na faixa do verde (515-560 nm) (Figuras 5C, 6C, 6F, 6I), foi observada emissão de autofluorescência em vermelho unicamente. Regiões de parede celular tenderam a emitir menor autofluorescência do que nos outros comprimentos de onda testados. Porém, as axilas florais se mostraram mais evidentes do que nos outros comprimentos de onda, sendo os elementos mais notados nas inflorescências, quando excitadas nesse comprimento de onda. Elementos vasculares também foram evidenciados

nesse comprimento de onda, com a mesma localização de quando foram excitados pelo comprimento de onda na faixa do azul, porém com menor intensidade.

Tanto nas brácteas mais externas das inflorescências, como nas folhas jovens, puderam ser vistas escamas peltadas que exibiram diferentes comportamentos de emissão de autofluorescência, conforme o comprimento de excitação empregado ou conforme diferentes porções da escama (Figura 7).

Quando as escamas foram irradiadas com radiação UV (Figura 7A e 7D), foi possível observar que as células centrais emitiram autofluorescência azul-clara, de tonalidade semelhante ao da parede celular da folha onde estavam localizadas, com alta intensidade de brilho. Células pericentrais, subperiféricas e paredes das células do pedúnculo emitiram autofluorescência em tons que variaram do azul ao amarelo, em menor intensidade do que a autofluorescência das células centrais.

Quando as escamas peltadas foram excitadas por comprimentos de onda na faixa do azul (Figura 7B e 7E), foi possível notar que a intensidade de autofluorescência gerada foi similar ao da excitação com UV, porém, com cores diferentes de emissão de fluorescência. Células centrais emitiram autofluorescência verde, de comprimento de onda semelhante ao emitido pelas paredes celulares da folha, de forma intensa. Células pericentrais, subperiféricas e paredes das células do pedúnculo emitiram autofluorescência em tons de laranja.

Escamas peltadas excitadas por radiação verde (Figura 7C e 7F) mostraram autofluorescência nas células centrais, subperiféricas e nas paredes das células do pedúnculo, com alta intensidade, porém, diferentemente das outras emissões de outros comprimentos de onda, não houve excitação de fluorescência nas células centrais das escamas.

Em todos os comprimentos de ondas emitidos, não foi vista autofluorescência em células periféricas das escamas peltadas.

DISCUSSÃO

***PISTILLATA* em Bromeliaceae**

A sequência de aminoácidos traduzidos da ORF putativa de *PISTILLATA* de *Aechmea comata* não está completa, mesmo assim, mostra grande grau de conservação com a sequência de *Tillandsia aeranthos*. Grau semelhante de conservação pode ser encontrado se essas duas sequências forem comparadas com as sequências de mRNA de *PISTILLATA* depositadas no GenBank, das espécies *Ananas comosus* (L.) Merrill e *Neoregelia schubertii* Röth (ambas Bromeliaceae).

A sequência conservada de *PI* (*PI-motif*) foi encontrada nas duas espécies de Bromeliaceae descritas nesse trabalho e também para a espécie *Ananas comosus*, com a sequência de aminoácidos, MPMGFRVQPIQP NLQE, divergindo um dos aminoácidos em *T. aeranthos* e dois aminoácidos em *A. comata* quando comparadas com a sequência (MPF_xFRVQP_xQPNLQE) descrita por Kramer *et al* (1998). O *PI-motif* já foi encontrado em muitas Angiospermas de maneira bastante conservada (Kramer *et al.*, 1998; Jing *et al.*, 2015). Alterações nas sequências do *PI-motif* podem ser relacionadas com variações morfológicas, influenciando na evolução fenotípica, como sugerida em Commelinaceae (Ochiai *et al.*, 2004). Em alguns casos, há espécies que não possuem o *PI-motif* na região C-terminal de seus genes de *PISTILLATA*, reforçando o fato de que a real função dessa sequência precisa ser melhor elucidada.

Quando as sequências de resíduos de aminoácidos das ORF de *PISTILLATA*, de *T. aeranthos*, *A. comata*, são alinhadas com outras sequências de mRNA de *PI* de Bromeliaceae, presentes no GenBank, foi possível observar um grande nível de conservação entre todas as sequências, mesmo que algumas delas não estejam completas. Existem muitas evidências que genes de classe B, como o *PISTILLATA* sejam bastante conservados em diversos grupos de monocotiledôneas (Tsaftaris *et al.*, 2006). Essa conservação é alta até mesmo se comparada com Poales, em que genes de classe B codificam para a especificação de lodículas ao invés de pétalas (Münster *et al.*, 2001).

Quando as mesmas quatro sequências de Bromeliaceae foram alinhadas com sequências de outros grupos taxonômicos foi possível observar uma deleção próxima à região do *PI-motif* na região C-terminal. Essa deleção de aproximadamente 11 aminoácidos (pode variar o tamanho no alinhamento entre famílias diferentes) também se mostrou constante para todas as Bromeliaceae. Aparentemente, essa região onde ocorre deleção em Bromeliaceae, não é uma região onde ocorra conservação de sequência de aminoácidos, sendo também observadas constantes deleções quando é feito alinhamento entre diferentes espécies de plantas. Algumas regiões do gene *PI*, são responsáveis pelo contato direto entre moléculas de DNA, onde ocorrem sítios de ligação, bastante conservadas e importantes para o funcionamento correto de seus produtos (Lee *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2005). Outras regiões codantes de genes classe B, com papéis na dimerização, tendem a ser mais variáveis, porém, nem toda mudança em regiões codantes têm potencial para afetar o funcionamento da proteína (Bartlett *et al.*, 2016). Dessa forma, porções menos conservadas encontradas na região C-terminal, especialmente onde ocorreu o ponto de deleção, indicam que essas regiões permitem mais mudanças, sem prejudicar o funcionamento do gene. Por outro lado, também há sugestões que modificações na região C-terminal de genes de classe B podem ser determinantes para a formação de diferentes características morfológicas (Nakamura *et al.*, 2005; Bartlett *et al.*, 2016).

Reconstrução filogenética de *PISTILLATA* em Bromeliaceae

Nos resultados das reconstruções filogenéticas, muitos dos valores de probabilidade posterior dos nós da árvore foram baixos ou moderados. Esse fato parece ser bem comum para genes *MADS* de classe B, e conseqüentemente em *PISTILLATA* (Skipper, 2002; Zahng *et al.*, 2011). Em parte, os baixos valores de confiança em nós de árvores filogenéticas, principalmente encontrados em ramos mais profundos das árvores de *PISTILLATA*, são atribuídos a altas taxas de mutações ao longo da evolução desse gene, o que é reforçado pela presença de ramos curtos nas regiões internas, se comparados aos ramos mais superiores em grupos taxonômicos elevados

(Halanych & Robinson, 1999). Taxas de substituições elevadas são consideradas comuns para algumas Poales (Givnish *et al.*, 2010).

Os nós com valores baixos de confiança presentes nos ramos mais profundos da árvore filogenética dificultam o relacionamento entre grupos de monocotiledôneas, e devem ser vistos com cautela para que não ocorram conclusões equivocadas. Os eventos responsáveis por esse comportamento não são claros. Em parte, a homoplasia gerada pela alta taxa de substituições encontrada para o grupo gênico em questão, pode ser apontada como uma causa. Adicionalmente, faltam informações de taxa posicionados na base das árvores, como presença de fósseis, tornando a posição de qualquer apomorfia como incerta. De qualquer forma, a filogenia de Poales nem sempre possui um suporte muito alto (Givnish *et al.*, 2010; Briggs *et al.*, 2014). De maneira mais ampla, reconstruções filogenéticas com commelinids frequentemente geram problemas de nós com baixo valor (Givnish *et al.*, 2010).

Outra hipótese que pode explicar nós com valores baixos em ramos profundos é que a subfamília *DEF/GLO* (genes de classe B) possui uma grande ancestralidade, ou seja, esses genes divergiram de outros em períodos bastante antigos, sofrendo muitas modificações no decorrer do tempo. Nam *et al.* (2003) usaram relógio molecular para estimar que a linhagem *DEF/GLO* se originou há aproximadamente 600 milhões de anos, a qual é anterior à separação entre samambaias e plantas com sementes, que data por volta de 400 milhões de anos.

Ainda, é conhecido que genes *PI/GLO* sofrem efeito de seleção purificadora, assim como já demonstrado em Poaceae (Münster *et al.*, 2001) e em outros grupos de monocotiledôneas (Cantone *et al.*, 2011), o que foi reforçado pelos testes de seleção realizados nesse estudo, mascarando eventos que poderiam mostrar a separação de clados ao longo da evolução. Tal evento também é considerado como um dos responsáveis pela diminuição de valores de confiança em nós de árvores filogenéticas (Münster *et al.*, 2001; Cantone *et al.*, 2011). Ainda, marcadores que não são neutros podem levar a interpretações equivocadas em linhagens naturais que sofreram eventos de divergência ao longo da evolução.

A formação de um clado específico de *PISTILLATA* para determinado grupo de plantas pode ser atribuído a eventos específicos de duplicação gênica dentro de ordens ou famílias, de forma semelhante à constituição de clados exclusivos de Zingiberales, Orchidaceae ou Liliales dentro de monocotiledôneas (Xu *et al.*, 2006; Bartlett & Specht, 2010, Chen *et al.*, 2012).

De forma geral, a filogenia de *PI* e *AP3* em Angiospermas acompanha a filogenia organismal, permitindo uma clara identificação de eventos de duplicação na sua história evolutiva (Kanno *et al.*, 2007; Bartlett & Specht, 2010). Porém, a filogenia de *PISTILLATA* em Bromeliaceae aparentemente não segue o mesmo padrão encontrado em outros estudos filogenéticos baseados em outros genes. Ainda, as divergências de padrões filogenéticos encontrados para Bromeliaceae nesse estudo também podem estar acentuadas devido ao número limitado de sequências amostradas para a família. *PI/GLO* também parecem estar envolvidos em uma taxa de substituição mais rápida que outros genes *MADS-box* (Purugganan, 1997). Essa taxa de evolução rápida pode explicar o porquê de genes individuais não seguirem a filogenia organismal. Já o fato de o ramo de Bromeliaceae apresentar uma grande distância do seu predito ancestral, reforça o fato da família ser um grupo bastante antigo com uma evolução inicial extremamente longa, há aproximadamente 100 milhões de anos, seguida de uma radiação relativamente recente nos últimos 15 a 10 milhões de anos (Givnish *et al.*, 2004; Givnish *et al.*, 2007; Givnish *et al.*, 2014).

Talvez, a divergência encontrada para *PI* em relação a outras Poales seja ocasionada por variações genéticas que culminaram, por exemplo, em adaptações morfológicas de outros grupos da ordem, como em gramíneas, que sofreram grandes alterações adaptativas, que levaram à formação de suas espiguetas, com morfologia bastante diferente das encontradas em flores de bromélias.

PI de Bromeliaceae pode ter sofrido forte seleção ao longo de sua evolução, principalmente quanto aos tipos de polinizadores que possui. Atualmente, a seleção parece ser menos atuante, sofrendo efeito mais leve de seleção purificadora, como evidenciada no teste Z de seleção. Esse tipo de seleção pode agir apenas como forma de evitar que mutações deletérias atuem diminuindo características florais relacionadas à atração de polinizadores. De qualquer forma, parece que a

diferenciação de Bromeliaceae a colocou em um clado único quando se trata do gene *PI*, sendo difícil identificar a sua relação com outros grupos, devido a grande quantidade de mudanças que ocorreram ao longo da história desse gene dentro da família. Como resultado, são gerados valores baixos de confiança nos nós mais antigos da árvore filogenética, problema que é intensificado pela seleção purificadora.

Assim, posições mais anteriores da árvore filogenética de *PI* devem ser olhadas com cautela, e aparentemente perderam grande parte das informações evolutivas, porém, ramos mais superiores parecem ser eficientes como ferramenta de estudos filogenéticos, mostrando um grau de confiança consistente gerado pelos valores relativamente altos de probabilidade posterior dentro de Bromeliaceae ou dentro de outras famílias de monocotiledôneas.

Análise da expressão *in situ* de *PISTILLATA* em *Tillandsia aeranthos*

Entender o funcionamento de genes homeóticos de classe B, como *PISTILLATA*, é fundamental para compreender os mecanismos moleculares do desenvolvimento que levam à formação de pétalas e estames e suas variações morfológicas.

Nos experimentos de hibridação *in situ* com *Tillandsia aeranthos* foi possível observar acúmulo de transcritos de *PI* na região mais apical da inflorescência, onde as flores estão em estádios menos desenvolvidos. Em *Arabidopsis thaliana*, *PI* é detectado, primeiramente, quando os primórdios das sépalas começam a surgir (Goto & Meyerowitz, 1994). Nessa fase, a expressão de *PI* está localizada internamente à região delimitada pelos primórdios de sépalas, incluindo a região central do meristema floral (Goto & Meyerowitz, 1994). A princípio, esse padrão de localização de expressão não é o esperado, pois, além de compreender regiões que originam pétalas e estames, também formam o carpelo em estádios mais avançados de desenvolvimento. Assim como em *Arabidopsis thaliana*, os transcritos de *PI* em *Tillandsia aeranthos* deixam de ser localizados nas regiões mais centrais da flor em fases mais avançadas de desenvolvimento, ficando evidentes somente em pétalas e sépalas em desenvolvimento. Uma das explicações para esse padrão de

expressão de *PI* é que no início do desenvolvimento floral existe acúmulo de transcritos e produtos de outros genes como *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (API)* e *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*, distribuídos de forma ampla no meristema floral em etapas iniciais de desenvolvimento (Goto & Meyerowitz, 1994; Ng & Yanofsky, 2001; Sundström *et al.*, 2006). Esses genes atuam como ativadores da expressão de *PI*, conduzindo a sua expressão por regiões do meristema floral, que incluem não somente as regiões que formarão pétalas e sépalas. Ao longo do desenvolvimento floral, o gene *SUPERMAN (SUP)* atua como repressor de *PI* (Goto & Meyerowitz, 1994; Ng & Yanofsky, 2001). O aumento na expressão de *SUP* na região central do meristema floral, leva a uma diminuição no acúmulo de transcritos de *PI*, impedindo a formação de órgãos semelhantes a pétalas ou estames nessa região. Por consequência, também permite a expressão de outros genes responsáveis pelo desenvolvimento de carpelos durante o desenvolvimento floral.

Elementos vasculares do ápice da inflorescência em desenvolvimento de *Tillandsia aeranthos* foram evidenciados em teste de hibridação *in situ*, com sonda específica para o gene *PI*. De forma semelhante, transcritos de genes *MADS-box* de classe B, geraram marcações semelhantes nos feixes vasculares em desenvolvimento de primórdios florais de *Eranthis hyemalis* e *Solanum tuberosum*, sugerindo papéis mais complexos do que apenas controle do desenvolvimento de pétalas e estames para esses genes (Skipper, 2002). Um ponto importante é que feixes vasculares de flores em estádios mais avançados de desenvolvimento de *Tillandsia aeranthos* e *Eranthis hyemalis* não mostram sinais de acúmulos de transcritos de *PI*.

A presença desses transcritos gênicos que atuam como ativadores de *PI*, nas flores em desenvolvimento inicial, ocorrem em zonas do meristema provascular, formador dos elementos vasculares, levando ao acúmulo nessas regiões. Isso ocorre como uma consequência desse acúmulo, e não como um papel determinante no desenvolvimento de órgãos florais. Caso os genes *MADS-box* de classe B participassem ativamente no desenvolvimento dos feixes, a expressão também deveria ser encontrada em feixes em desenvolvimento de outros locais, como em raízes (Skipper 2002).

Nas fases iniciais de desenvolvimento é provável que transcritos de genes relacionados com a ativação de *PI*, como os genes *LFY*, *API* e *UFO*, estejam em abundância em grande parte da inflorescência nessa etapa de desenvolvimento, sem que ainda tenha ocorrido a presença de transcritos de outros genes responsáveis pela repressão de *PI*, como *SUP*. Dessa forma, onde ocorrem meristemas provasculares, ocorre o acúmulo de *PI*, semelhante ao acúmulo em meristemas florais de regiões centrais de flores do ápice das inflorescências de *T. aeranthos* e de *A. thaliana*.

Análise de autofluorescência em tecidos de *Tillandsia aeranthos*

Tecidos e *T. aeranthos* foram excitados com radiações ultravioleta e luminosas com diferentes comprimentos de onda. A partir daí, foi possível observar que dependendo da porção do tecido ou comprimento de onda irradiado, foram geradas diferentes respostas de autofluorescência. Em geral, tecidos mais desenvolvidos tenderam a emitir uma maior quantidade de autofluorescência, em grande parte devido a maior deposição de compostos naturalmente fluorescentes nas paredes celulares. Substâncias autofluorescentes predominantes na composição da parede celular são a lignina e a celulose, no qual possuem papel estrutural bastante importante, atuando como um mecanismo de resistência e defesa da planta (Roshchina 2012; Tobimatsu *et al.*, 2013).

Folhas verdes de plantas excitadas por radiação ultra UV, com comprimentos próximos a 337 nm, produzem emissão de autofluorescência vermelha e vermelha distante, relativas à fluorescência da clorofila (Maxwell & Johnson 2000), e ocorre também a emissão de fluorescência verde azulada, gerada pela presença de ácido ferrúlico, mais comum em monocotiledôneas (Lichtenthaler & Schweiger, 1998).

Outras substâncias que produzem autofluorescência em paredes celulares vegetais e que são comumente encontradas são ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos, terpenoides, suberina e cutina (Donaldson *et al.*, 2013). Fixadores a base de aldeídos também são potenciais produtores de autofluorescência.

Autofluorescência, quando produzida pela planta em grande intensidade, pode ser tratada como um problema em diversos tipos de análises que usam substâncias com fluorescências exógenas para detecção de determinadas reações positivas de baixa intensidade (Diao *et al.*, 2015). Porém, em certos casos, a autofluorescência pode ser vista de maneira favorável, pois o seu uso permite fazer inferência da presença de compostos diversos presentes em um organismo vivo, sem que haja a necessidade de grandes processamentos de material, evitando degradações das amostras analisadas, com custos e tempos menores.

No caso específico de *Tillandsia*, em que são as bromélias mais utilizadas como bioindicadoras para monitoramento ambiental, o uso da autofluorescência na análise de tecidos pode ser uma ferramenta de auxílio para verificação de estresse ambiental, tanto pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), como pelo acúmulo de compostos fenólicos gerados pela incidência excessiva de radiação UV. Esse tipo de procedimento já foi sugerido como potencialmente útil para outras espécies vegetais, a partir da comparação da autofluorescência emitida por células secretoras expostas a diferentes condições fisiológicas (Roshchina 2003; Schoenwaelder, 2008), podendo ser usada também razões entre a quantidade de diferentes emissões de autofluorescência de uma planta, como azul/vermelho (F440/F690) ou azul/verde (F440/F520), como indicativos de estresse e danos (Buschmann *et al.*, 2007).

No caso específico de estudos de desenvolvimento, a análise de autofluorescência pode ser uma ferramenta adicional para a compreensão do estado fisiológico do material estudado, mostrando a sua composição de forma preliminar e indicando também o estágio de desenvolvimento dos seus tecidos. Ao se fazer análise de hibridação *in situ* fluorescente, é ainda mais importante verificar como os tecidos se comportam quando excitados por radiações com diferentes comprimentos de onda, já que regiões com emissão de autofluorescência podem ser vistas, de forma equivocada, com sendo um sinal positivo.

Perspectivas futuras e dificuldades encontradas

Ao longo do desenvolvimento do trabalho da tese, várias sequências foram isoladas, com o uso de iniciadores degenerados, usando as espécies *Aechmea comata* e *Tillandsia aeranthos*, para serem usadas para análises de expressão *in situ*, ou para análises de PCR quantitativo em tempo real. As sequências destinadas para análises quantitativas em tempo real são provenientes de genes constitutivos e funcionam como referência quantitativa de expressão. Os genes escolhidos foram: Gliceraldeído-3-fostato- desidrogenase, Actina, ATP-sintetase subunidade beta (*ATPb*). Depois dos isolamentos iniciais e sequenciamentos, foram desenhados iniciadores específicos para cada sequência, com tamanho de 200 pares de bases para cada fragmento, com 60°C de temperatura de anelamento.

Na tentativa de obter sequências de iniciadores que fossem conservadas entre diferentes Bromeliaceae, foram buscadas outras sequências de espécies Bromeliaceae para cada gene, tentando conseguir regiões que gerassem anelamento com o máximo de espécies possíveis. Testes preliminares de PCR convencional amplificaram apenas bandas únicas com os iniciadores desenhados. As sequências de iniciadores geradas podem ser testadas e usadas para experimentos com diferentes espécies de Bromeliaceae.

Outra sequência isolada é um fragmento de transcrito do gene *FLOWERING LOCUS T* que tem participação no desenvolvimento floral. No caso desse gene, foram feitos testes preliminares de reconstrução filogenética, mostrando potencial para estudo dentro da família ou entre diferentes grupos de monocotiledôneas. De qualquer forma, ainda falta uma maior amostragem de sequências para que se consiga obter resultados mais consistentes.

Houve também diversas tentativas de isolamento e caracterização de outras sequências da família *MADS-box*, como sequências homólogas dos genes *APETALA1* e *AGAMOUS*, tanto com abordagens com o uso de iniciadores degenerados, desenhados a partir de regiões conservadas de cada gene, como por abordagem *semi-nested*, com uso de iniciadores de regiões conservadas no

domínio *MADS*, seguido do uso de iniciadores conservados para cada subfamília gênica. Independente da abordagem tentada, não houve resultado positivo.

Pela escolha de trabalhar com espécies silvestres não cultivadas, surgiram diversas dificuldades que precisaram ser resolvidas. Muitos dos protocolos de fixação de tecidos, extração de RNA total, síntese de cDNA e isolamentos de fragmentos gênicos tiveram que ser criados desde o início, ou necessitaram sofrer modificações para que gerassem resultados positivos. De qualquer forma, estudos com materiais não convencionais, em que rotinas de trabalho ainda não foram estabelecidas ou não possuem sequências de genoma proximamente aparentadas são bastante importantes para a compreensão das variações morfológicas existentes no mundo vegetal, e que muitas vezes não são explicadas por plantas “modelo”. Ainda, estudos iniciais multidisciplinares, com abrangências que permeiam desde aspectos morfoanatômicos clássicos a técnicas moleculares, com uso de espécies “não convencionais” para abordagens dessa natureza, podem gerar uma aparente falta de resultados, porém, a bagagem de aprendizado é farta e garantida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho representa a primeira análise de expressão por hibridação *in situ* com gene *MADS-box* de classe B relacionado com o desenvolvimento de floral em bromélias silvestres, com enfoque morfológico evolutivo. Os padrões de expressão de *PISTILLATA* encontrados nesse estudo são aparentemente similares aos encontrados em Angiospermas com perianto diferenciado em pétalas e sépalas. A deposição de transcritos *PI* em meristemas provasculares de regiões menos desenvolvidas de inflorescências também foi notada, mas a razão funcional para esse evento ainda não é clara. O protocolo de sondas fluorescentes de ssDNA mostrou eficiência na análise de expressão de *T. aeranthis*, sendo recomendado o seu uso em outras espécies. Também, a escolha de *T. aeranthis* para as análises de hibridação *in situ*, se deu devido a características desejáveis como, tamanho reduzido de inflorescência e vários estádios de desenvolvimento floral em um único

momento. Essa espécie é de fácil manipulação e cultivo, sendo encorajado seu uso em outros estudos similares.

Na análise filogenética comparativa de *PI* com outras monocotiledôneas, Bromeliaceae se agrupou em um único clado, mas não foi encontrada relação da família com outros taxa de Poales. Provavelmente, esse relacionamento distante entre bromélias e Poales foi causado por pressões seletivas intensas ocorridas no passado, direcionadas por diferentes adaptações a polinização de cada grupo. Outro fato, Bromeliaceae é um grupo bastante antigo, com uma radiação relativamente recente, a qual pode influenciar no seu posicionamento na reconstrução filogenética. Ainda, valores baixos de probabilidade posterior, especialmente em nós de ramos mais profundos, não permitem gerar conclusões precisas sobre a relação filogenética entre ordens ou algumas famílias. Mesmo assim, *PI* aparenta ser um marcador molecular efetivo para espécies proximamente relacionadas, ou mesmo para estudos de reconstrução filogenética com membros das diferentes subfamílias de Bromeliaceae.

De qualquer forma, o desenvolvimento floral é um processo complexo que envolve o balanço adequado da expressão de vários genes, muitos deles em cascata, no qual culmina em diversos processos de morfogênese de órgãos florais e outras estruturas da inflorescência. Até o momento, há quase uma ausência de estudos com genes *MADS-box* de classe B e outras sequências de genes relacionados ao desenvolvimento floral em bromélias, tornando interessantes os esforços para novas análises, não apenas com *PI*, mas também com outros genes relacionados com o desenvolvimento desses órgãos tão importantes das plantas e seus processos evolutivos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abril GA, Wannaz ED, Pignata ML (2014) Source characterization and seasonal variations of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons at an industrial and semi-urban area through a local-scale biomonitoring network using *T. capillaris*. *Microchemical Journal* 116: 77–86.
- Almeida VR, Costa AF, Mantovani A, Gonçalves-Esteves V, Arruda RCO, Forzza RC (2009) Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Systematic Botany* 34(4): 660-672.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- APG IV (2106) The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Aubin JE (1979) Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 27(1): 36-43.
- Azeredo TEV, Citadini-Zanette V (2012) Aspectos florísticos, taxonômicos e ecológicos de bromélias da Mata Atlântica do sul de Santa Catarina, Brasil. *REA - Revista de Estudos Ambientais (Online)*. 14(4): 20-43.
- Barfuss MH, Samuel R, Till W, Stuessy TF (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany* 92: 337–351.
- Bartlett ME, Specht CD (2010) Evidence for the involvement of *GLOBOSA*-like gene duplications and expression divergence in the evolution of floral morphology in the Zingiberales. *New Phytologist* 187: 521–541.
- Bartlett M, Thompson B, Brabazon H, Del Gizzi R, Zhang T, Whipple C (2016) Evolutionary dynamics of floral homeotic transcription factor protein-protein interactions. *Molecular Biology and Evolution*. First published online February 22.

- Benlloch R, Roque E, Ferrándiz C, Cosson V, Caballero T, Penmetsa RV, Beltrán JP, Cañas LA, Ratet P, Madueño F (2009) Analysis of B function in legumes: *PISTILLATA* proteins do not require the *PI* motif for floral organ development in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* 60: 102-111.
- Benzing DH (1980) The biology of the bromeliads. California: Eureka, Mad River Press.
- Benzing DH, Bennett B, Brown G, Dimmitt M, Luther H, Ramírez I, Terry R, Till W (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Oberlin College, USA.
- Berbel A, Navarro C, Ferrándiz C, Cañas LA, Beltrán JP, Madueño F (2005) Functional conservation of *PISTILLATA* activity in a pea homolog lacking the *PI* motif. *Plant Physiology* 139: 174-185.
- Bernal R, Valverde T, Hernández-Rosas L (2005) Habitat preference of the epiphyte *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae) in a semi-desert environment in Central Mexico. *Canadian Journal of Botany* 83: 1238-1247.
- Briggs BG, Marchant AD, Perkins AJ (2014) Phylogeny of the restiid clade (Poales) and implications for the classification of Anarthriaceae, Centrolepidaceae and Australian Restionaceae. *Taxon* 63: 24-46.
- Brown G, Gilmartin AJ (1984) Stigma structure and variation in Bromeliaceae - Neglected taxonomic characters. *Brittonia* 36: 364-374.
- Brown, GK, Terry, RG (1992) Petal Appendages in Bromeliaceae. *American Journal of Botany* 79: 1051-1071.
- Buschmann C (2007) Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* 92(2): 261-271.
- Buzato S, Sazima M, Sazima I (2000) Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. *Biotropica* 32: 824-841.

- Buzatto CR, Severo BMA, Waechter JL (2008) Composição florística e distribuição ecológica de epífitos vasculares na Floresta Nacional de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. *Iheringia, Série Botânica* 63(2): 231-239.
- Canela MBF, Sazima M (2003) *Aechmea pectinata*: a hummingbird-dependent bromeliad with inconspicuous flowers from rainforest in south-eastern Brazil. *Annals of Botany* 92: 731-737.
- Cantone C, Sica M, Gaudio L, Aceto S (2009) The *OrcPI* locus: Genomic organization, expression pattern, and noncoding regions variability in *Orchis italica* (Orchidaceae) and related species. *Gene* 434: 9-15.
- Cantone C, Gaudio L, Aceto S (2011) The *PI/GLO*-like locus in orchids: Duplication and purifying selection at synonymous sites within Orchidinae (Orchidaceae). *Gene* 481: 48–55.
- Chen MK, Hsieh WP, Yang CH (2012) Functional analysis reveals the possible role of the C-terminal sequences and *PI* motif in the function of lily (*Lilium longiflorum*) *PISTILLATA* (*PI*) orthologues. *Journal of Experimental Botany* 63(2): 941–961.
- Chew T, Luna ED, González D (2010) Phylogenetic relationships of the pseudobulbous *Tillandsia* species (Bromeliaceae) inferred from cladistic analyses of ITS 2, 5.8S ribosomal RNA gene, and ETS sequences. *Systematic Botany* 35: 86–95.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJ, Angenent GC, van Tunen AJ (1995) The petunia *MADS* box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell* 7(11): 1859-1868.
- Crayn DM, Winter K, Smith JAC (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *PNAS* 101(10): 3703–3708.
- Croce AC, Ferrigno A, Vairetti M, Bertone R, Freitas I, Bottiroli G (2004) Autofluorescence properties of isolated rat hepatocytes under different metabolic conditions. *Photochemical and Photobiological Sciences* 3(10): 920-926.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.

- Davies B, Egea-Cortines M, Silva EA, Saedler H, Sommer H (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic *MADS box* proteins. *EMBO Journal* 15(16): 4330–4343.
- De Faria APG, Wendt T, Brown GK (2004) Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 91: 303–319.
- Diao S, Hong G, Antaris AL, Blackburn JL, Cheng K, Cheng Z, Dai H (2015) Biological imaging without autofluorescence in the second near-infrared window. *Nano Research* 8(9): 3027-3034.
- Donaldson LA, Radotic K (2013) Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. *Journal of Microscopy* 251(2): 178-187.
- Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Hasterok PBR, Routledge APM (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology* 127: 1539–1555.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-1973.
- Evans TM, Jabaily RS, de Faria APG, de Sousa LOF, Wendt T, Brown GK (2015) Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 40: 116-128.
- Fagundes NF, Mariath JEA (2010) Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. *Acta Botanica Brasilica* 24: 765-779.
- Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, Yanofsky MF, Kater MM, Colombo L (2003) *MADS-box* protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15: 2603-2611.
- Fernandes FF, Cardoso-Gustavson P, Alves ES (2016) Synergism between ozone and light stress: structural responses of polyphenols in a woody Brazilian species. *Chemosphere* 155: 573-582.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research. Database Issue* 42: D222-D230.

- Flores-Palacios A, Valencia-Díaz S (2007) Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation* 136: 372–387.
- Frank JH, L. P. Lounibos LP (2009) Insects and allies associated with bromeliads: a review. *Terrestrial Arthropod Reviews*. 1(2): 125–153.
- Fumero-Cabán JJ, Meléndez-Ackerman EJ (2007) Relative pollination effectiveness of floral visitors of *Pitcairnia angustifolia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 94: 419-424.
- Gao XM, Xia YM, Li QJ (2006) Isolation of two putative homologues of *PISTILLATA* and *AGAMOUS* from *Alpinia oblongifolia* (Zingiberaceae) and characterization of their expression. *Plant Science* 170: 674–684.
- Gilmartin AJ, Brown GK (1986) Cladistic tests of hypotheses concerning evolution of xerophytes and mesophytes within *Tillandsia* Subg *Phytarrhiza* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 73(3): 387-397.
- Giongo A, Beneduzi A, Gano K, Vargas LK, Utz L, Luciane Maria Pereira Passaglia LMP (2013) Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) L.B. Smith (Bromeliaceae). *Biota Neotropica*. 13(3)80-85.
- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, et al. (2004) Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American–African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Sciences* 165: S35–S54.
- Givnish TJ, Millam KC, Berry PE, Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhH* sequence data. *Aliso* 23: 3-26.
- Givnish TJ, Ames M, McNeal JR, McKain MR, Steele PR, dePamphilis CW, Graham SW, J. Pires C, Stevenson DW, Zomlefer WB, Briggs BG, Duvall MR, Moore MJ, Heaney JM, Soltis DE, Soltis PS, Thiele K, Leebens-Mack JH (2010) Assembling the tree of the monocotyledons:

- plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 584-616.
- Givnish TJ, Barfuss MH, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JA, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 872-895.
- Givnish TJ, Barfuss MH, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JA, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ (2014) Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55-78.
- Goethe J.W. von (1790) *Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären*. Gotha, Ettlinger; paragraph 120.
- Goto K, Meyerowitz EM (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes & Development* 8: 1548-1560.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 38 Suppl:W695-9.
- Halanych KM, Robinson TJ (1999) Multiple substitutions affect the phylogenetic utility of cytochrome b and 12S rDNA data: examining a rapid radiation in leporid (Lagomorpha) evolution. *Journal of Molecular Evolution* 48: 369-379.
- Horres R, Zizka G, Kahl G, Weising K (2000) Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL(UAA)* intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biology* 2: 306-315.
- Horres R, Shulte K, Weising K, Ziska G (2007) Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso* 23: 27-43.

- Hsu CC, Wu PS, Chen TC, Yu CW, Tsai WC, Wu K, Wu WL, Chen WH, Chen HH (2014) Histone acetylation accompanied with promoter sequences displaying differential expression profiles of B-Class *MADS-box* genes for *Phalaenopsis* floral morphogenesis. PLoS ONE 9: e106033.
- IUCN (2015) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 June 2016.
- Izawa T, Shimamoto K (1996) Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. Trends in Plant Science 1(3): 95-99.
- Jing D, Xia Y, Chen F, Wang Z, Zhang S, Wang J (2015) Ectopic expression of a *Catalpa bungei* (Bignoniaceae) *PISTILLATA* homologue rescues the petal and stamen identities in *Arabidopsis pi-1* mutant. Plant Science 231: 40–51.
- Kanno A, Nakada M, Akita Y, Hirai M (2007) Class B gene expression and the modified ABC model in nongrass monocots. Scientific World Journal 19: 268-279.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30(4): 772–780.
- Kende H, van der Knaap E, Cho HT (1998) Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. Plant Physiology 118: 1105–1110.
- Kessler M (2000) Elevational gradients in species richness and endemism of selected plant groups in the central Bolivian Andes. Plant Ecology 149: 181–193.
- Kim SY, Yun PY, Fukuda T, Ochiai T, Yokoyama J, Kameya T, Kanno A (2007) Expression of a *DEFICIENS*-like gene correlates with the differentiation between sepal and petal in the orchid, *Habenaria radiata* (Orchidaceae). Plant Science 172: 319–326.
- Kramer EM, Dorit RL, Irish, VF (1998) Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: Duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA MADS box* gene lineages. Genetics 149: 765–783.

- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, Weising K (2014) Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematics and Evolution* 300: 1591-1614.
- Krizek BA, Fletcher JC (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics* 6(9): 688-698.
- Krömer T, Kessler M, Lohaus G, Schmidt-Lebuhn AN (2008) Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biology* 10: 502 - 511.
- Lavor P, van den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM (2014) Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101(7): 1167-1175.
- Lee JY, Baum SF, Alvarez J, Patel A, Chitwood DH, Bowman JL (2005) Activation of *CRABS CLAW* in the nectaries and carpels of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 25-36.
- Lichtenthaler HK, Schweiger J (1998) Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology* 152(2-3): 272-282.
- Luther HE (2014) An alphabetical list of bromeliad binomials. 14th Ed. Sarasota, Fla: Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens.
- Lv LL, Duan J, Xie JH, Liu YG, Wei CB, Liu SH, Zhang JX, Sun GM (2012) Cloning and expression analysis of a *PISTILLATA* homologous gene from pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *International Journal of Molecular Science* 13: 1039-1053.
- Mageski MM , Ferreira RB, Beard KH, Costa LC, Jesus PR, Medeiros CC, Ferreira PD (2016) Bromeliad selection by *Phyllodytes luteolus* (Anura, Hylidae): the influence of plant structure and water quality factors. *Journal of Herpetology* 50(1): 108-112.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH (2015) CDD: NCBI's conserved domain database.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

- Martin CE (1994) Physiological ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review* 60: 1-82.
- Martínez-Carrillo MA, Andrade CSE, Isaac-Olivé K, Rocha M, Murillo G, Beltrán-Hernández RI, Lucho-Constantino CA (2010) PIXE analysis of *Tillandsia usneoides* for air pollution studies at an industrial zone in Central Mexico. *Microchemical Journal* 96(2) 386-390.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.
- McGurk L, Morrison H, Keegan LP, Sharpe J, O'Connell MA (2007) Three-Dimensional Imaging of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 9: e834.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean CD, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 678-682.
- Meyerowitz EM, Bowman JL, Brockman LL, Drews GN, Jack T, Sieburth LE, Weigel D (1991) A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development Supplement* 1: 157-167.
- Mondragón-Palomino M, Hiese L, Härter A, Koch MA, Theißen G (2009) Positive selection and ancient duplications in the evolution of class B floral homeotic genes of orchids and grasses. *BMC Evolutionary Biology* 9: 81.
- Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review* 11: 227-256.
- Motta-Tavares T, Maia-Carneiro T, Dantas LF, Van Sluys M, Hatano FH, Vrcibradic D, Rocha CFD (2016) Ecology of the bromeligenous frog *Phyllodytes luteolus* (Anura, Hylidae) from three restinga remnants across Brazil's coast. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88(1): 93-104.

- Münster T, Wingen LU, Faigl W, Werth S, Saedler H, Theißen G (2001) Characterization of three *GLOBOSA*-like *MADS-box* genes from maize: evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. *Gene* 262: 1-13.
- Nakamura T, Fukuda T, Nakano M, Hasebe M, Kameya T, Kanno A (2005) The modified ABC model explains the development of the petaloid perianth of *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Agapanthaceae) flowers. *Plant Molecular Biology* 58: 435–445.
- Nakatsuka T, Saito M, Nishihara M (2016) Functional characterization of duplicated B-class *MADS-box* genes in Japanese gentian. *Plant Cell Reports* 35: 895-904.
- Nam J, dePamphilis CW, Ma H, Nei M (2003) Antiquity and evolution of the *MADS-box* gene family controlling flower development in plants. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1435-1447.
- Negrelle RRB, Anacleto A (2012) Extrativismo de bromélias no Estado do Paraná. *Ciência Rural* 42(6): 981-986.
- Neuteboom LW, Kunimitsu WY, Webb D, Christopher DA (2002) Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science* 163: 1021-1035.
- Ng M, Yanofsky MF (2001) Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by *APETALA1*. *Plant Cell* 13: 739-753.
- Nogueira FM, Fagundes NF, Kuhn SA, Fregonezi JN, Mariath JEA (2015) Ovary and ovule anatomy in the nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 66–77.
- Noordzij MJ, Mulder DJ, Oomen PH, Brouwer T, Jager J, Castro Cabezas M, Lefrandt JD, Smit AJ (2012) Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study. *Diabetic Medicine* 29(12): 1556-1561.
- Ochiai BT, Nakamura T, Mashiko Y, Fukuda T, Yokoyama J, Kanno A, Kameya T (2004) The differentiation of sepal and petal morphologies in Commelinaceae. *Gene* 343: 253–262.

- Oliveira JFC, Rocha CFD (2015) Journal of coastal conservation: a review on the anurofauna of Brazil's sandy coastal plains. How much do we know about it? *Journal of Coastal Conservation* 19: 35-49.
- Paggi, GM, Sampaio JAT, Bruxel M, Zanella CM, Götze M, Büttow MV, Palam-Silva C, Bered F (2010) Seed dispersal and population structure in *Vriesea gigantea*, a bromeliad from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 317–325.
- Papini A, Tani G, Di Falco P, Brighigna L (2005) Interdependence of the ontogeny of two essential foliar structures in a representative of the neotropical genus *Tillandsia* (Bromeliaceae): stomata and absorbing trichomes. *Journal of agriculture and environment for international development* 99(3/4).
- Papini A, Tani G, Di Falco P, Brighigna L (2010) The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. *Flora* 205: 94–100.
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA MADS-box* genes. *Nature* 405(6783): 200-203.
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2003) Assessing the redundancy of *MADS-box* genes during carpel and ovule development. *Nature* 424(6944): 85-88.
- Pita PB, Menezes NL (2002) Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. *Revista Brasileira de Botânica* 25(1): 25-34.
- Pontes RAS, Agra MF (2006) Flora da Paraíba, Brasil: *Tillandsia* L. (Bromeliaceae). *Rodriguésia* 57(1): 47-61.
- Porembski S, Barthlott W (1999) *Pitcairnia feliciana*: The only indigenous african bromeliad. *Harvard Papers in Botany* 4: 175-184.
- Preston JC, Hileman LC (2012) Parallel evolution of TCP and B-class genes in Commelinaceae flower bilateral symmetry. *EvoDevo* 3: 6.

- Purugganan MD (1997) The *MADS-box* floral homeotic gene lineages predate the origin of seed plants: phylogenetic and molecular clock estimates. *Journal of Molecular Evolution* 45: 392–396.
- Rambaut A (2014) FigTree v1.4.2, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/figtree>
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ (2014) Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Reitz R (1983) Bromeliáceas e a malária - Bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense*. Ed. Raulino Reitz. 559 p.
- Rex M, Patzolt K, Schulte K, Zizka G, Vásquez R, Ibsch PL, Weising K (2007) AFLP analysis of genetic relationships in the genus *Fosterella* L.B. Smith (Pitcairnioideae, Bromeliaceae). *Genome* 50: 90-105.
- Rex M, Schulte K, Zizka G, Peters J, Vásquez R, Ibsch PL, Weising K (2009) Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 472–485.
- Reyes-García C, Griffiths H, Rincón E, Huante P (2008) Niche differentiation in tank and atmospheric epiphytic bromeliads of a seasonally dry forest. *Biotropica* 40: 168–175.
- Rodriguez JH, Weller SB, Wannaz ED, Klumpp A, M.L. Pignata (2011) Air quality biomonitoring in agricultural areas nearby to urban and industrial emission sources in Córdoba province, Argentina, employing the bioindicator *Tillandsia capillaris*. *Ecological Indicators* 11(6): 1673–1680.
- Romero GQ, Mazzafera P, Vasconcellos-Neto J, Trivelin PCO (2006) Bromeliad-living spiders improve host plant nutrition and growth. *Ecology* 87(4): 803–808.
- Roshchina VV (2003) Autofluorescence of plant secreting cells as a biosensor and bioindicator reaction. *Journal of Fluorescence* 13(5): 403-420.
- Roshchina VV (2005) Allelochemicals as fluorescent markers, dyes and probes. *Allelopathy Journal* 16(1): 31-46.

- Roshchina VV (2012) Vital autofluorescence: application to the study of plant living cells. International Journal of Spectroscopy 2012, Article ID 124672, 14pp.
- Sablowski RWM, Meyerowitz EM (1998) A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. Cell 92: 93–103.
- Sajo MG, Prychid CJ, Rudall PJ (2004a) Structure and development of the ovule in Bromeliaceae. Kew Bulletin 59: 261–267.
- Sajo MG, Rudall PJ, Prychid CJ (2004b) Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. Plant Systematics and Evolution 247: 215–231.
- Santos-Silva F, Mastroberti AA, Mariath JEA (2015) Capsule structure in three species of *Dyckia* (Bromeliaceae): ontogenetic and taxonomic issues. The Journal of the Torrey Botanical Society 142: 249-257.
- Sass C, Specht CD (2010) Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 55: 559–571.
- Scatena VL, Segecin S (2005) Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 28(3): 635-649.
- Schoenwaelder, MEA (2008) The biology of phenolic containing vesicles. Algae 23(3): 163-175.
- Schulte K, Zizka G (2008) Multi locus plastid phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) and the taxonomic utility of petal appendages and pollen characters. Candollea 63(2): 209-225.
- Sela I, Ashkenazy H, Katoh K, Pupko T (2015) GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. Nucleic Acids Research. 43 (Web Server issue): W7-W14.
- Skipper M (2002) Genes from *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages are expressed in developing vascular bundles of tuberous rhizome, flowering stem and flower primordia of *Eranthis hyemalis*. Annals of Botany 89: 83-88.

- Smith LB, Downs RJ (1974) Pitcairnioideae (Bromeliaceae). In: Zanoni T, ed. Flora Neotropica Monograph. New York: Hafner Press, 1-662.
- Smith LB, Downs RJ (1977) Tillandsioideae (Bromeliaceae). In: Zanoni T, ed. Flora Neotropica Monograph. New York: Hafner Press, 663- 1492.
- Smith LB, Downs RJ (1979) Bromelioideae (Bromeliaceae). In: Zanoni T, ed. Flora Neotropica Monograph. New York: Hafner Press, 1493-2142.
- Smith, JCA, Griffiths H, Lüttge U (1986) Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad Plant, Cell and Environment 9: 359-376.
- Somerville C, Koornneef M (2002) A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. Nature Reviews Genetics 3: 883-889.
- Sousa GM, Wanderley MGL (2014) A new species of *Aechmea* (Bromelioideae-bromeliaceae) from the Brazilian Atlantic Rain Forest. Feddes Repertorium 125: 39–42.
- Stein M, Juri MJD, Oria GI, Ramirez PG (2013) *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) epiphytes, potential new habitat for *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) collected in the province of Tucumán, northwestern Argentina. Florida Entomologist 96(3): 1202-1206.
- Stevens PF (2013) Angiosperm Phylogeny. <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>>.
- Sundström JF, Nakayama N, Glimelius K, Irish VF (2006) Direct regulation of the floral homeotic *APETALA1* gene by *APETALA3* and *PISTILLATA* in *Arabidopsis*. Plant Journal 46: 593-600.
- Talamond P, Verdeil JL, Conéjéro G (2015) Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. Molecules 20(3): 5024-5037.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- Theissen G, Saedler H (2001) Plant biology. Floral quartets. Nature 409(6819): 469-471.

- Tobimatsu YI, Wagner A, Donaldson L, Mitra P, Niculaes C, Dima O, Kim JI, Anderson N, Loque D, Boerjan W, Chapple C, Ralph J (2013) Visualization of plant cell wall lignification using fluorescence-tagged monolignols. *Plant Journal* 76(3): 357-366.
- Trobner W, Ramirez L, Motte P, Hue I, Huijser P, Lonnig W-E, Saedler H, Sommer H, Schwarz-Sommer Z (1992) *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *The EMBO Journal* 11: 4693-4704.
- Tsaftaris AS, Polidoros AN, Pasentsis K, Kalivas A (2006) Tepal formation and expression pattern of B-class paleo*AP3*-like *MADS-box* genes in crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Science* 170: 238-246.
- Vandenbussche M, Theissen G, Van de Peer Y, Geratsa T (2003) Structural diversification and neo-functionalization during floral *MADS-box* gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Research* 31(15): 4401–4409.
- Varadarajan GS, Gilmartin AJ (1988) Phylogeny relationships of group of genera within the subfamily Pitcairnioideae (Bromelioideae). *Systematic Botany* 13(2): 283-293.
- Versieux LM, Wendt T (2007) Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 16: 2989–3009.
- Versieux LM, Lousada RB, Viana PL Mota N, Wanderley MGL (2010) An illustrated checklist of Bromeliaceae from Parque Estadual do Rio Preto, Minas Gerais, Brazil, with notes on phytogeography and one new species of *Cryptanthus*. *Phytotaxa* 10: 1–16.
- Wanderley MGL, Sellaro, M, Moreira BA (2009) Neotropical Bromeliaceae. In: Milliken W, Klitgård, B, Baracat A. (2009 onwards), Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Bromeliaceae.htm>
- Weigel D, Meyerowitz EM (1994) The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78: 203-209.

- Wendt T, Canela MBF, de Faria APG, Rios RI (2001) Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 88(10): 1760-1767.
- Whipple CJ, Ciceri P, Padilla CM, Ambrose BA, Bandong SL, Schmidt RJ (2004) Conservation of B-class floral homeotic gene function between maize and *Arabidopsis*. *Development* 131: 6083-6091.
- Whipple CJ, Zanis MJ, Kellogg EA, Schmidt RJ (2007) Conservation of B class gene expression in the second whorl of a basal grass and outgroups links the origin of lodicules and petals. *PNAS* 104(10): 1081–1086.
- Xu Y, Teo LL, Zhou J, Kumar PP, Hao Yu H (2006) Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum*. *The Plant Journal* 46: 54-68.
- Yoshida H (2012) Is the lodicule a petal: Molecular evidence? *Plant Science* 184: 121–128.
- Zhang J, Guo C, Liu G, Li Z, Li X, Bao M (2011) Genetic alteration with variable intron/exon organization amongst five *PI*-homoeologous genes in *Platanus acerifolia*. *Gene* 473: 82–91.

FIGURAS

Figura 1: Inflorescências de *Tillandsia aeranthos*. A e B: Vista geral da planta e inflorescência em antese. C-E: Reconstruções tridimensionais. C: inflorescência imatura e íntegra, com brácteas rosas ainda fechadas. D: vista superior da inflorescência, com brácteas removidas. E: vista lateral da inflorescência, com brácteas removidas.



Figura 2: Sequências de aminoácidos traduzidos a partir de sequências de nucleotídeos do gene *PISTILLATA* de *Tillandsia aeranthos* (*TaPI01*), *Aechmea comata* (*AcPI01*), *Ananas comosus*, sequências do banco de dados do *RefSeq* e outras sequências similares buscadas a partir do BLAST foram alinhadas com o programa MAFFT. Resíduos de aminoácidos grifados em preto representam alta conservação na sua coluna de alinhamento; resíduos de aminoácidos grifados em cinza representam conservação moderada na sua coluna de alinhamento; Aminoácidos sem grifo representam baixa conservação de alinhamento na sua coluna. Listra vermelha abaixo das sequências alinhadas mostra o domínio *MADS_MADS-like*. Listra azul abaixo das sequências alinhadas mostra o domínio *K-box*. Os dois domínios foram obtidos em busca no CDD. Caixa amarela representa a deleção de sequência específica de Bromeliaceae. Caixa verde representa a sequência conservada *PI* (*PI-motif*). Identificação de sequências do *GenBank*: *Ananas comosus*: ADY39748.1; *Arabidopsis thaliana*: NP_197524.1; *Vitis vinifera*: NP_001267875.1; *Oryza sativa* Japonica Group: NP_001055590.1; *Oryza sativa* Japonica Group: NP_001045012.1; *Joinvillea ascendens*: ABG90947.1; *Phaius tancarvilleae*: ACD85121.1; *Habenaria petelotii*: ACD85103.1; *Musa acuminata* subsp. *malaccensis*: XP_009399166.1.

TaPI01	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	KKAREISVLCDAQVSVVIFSS	SGKMS	ESCSP
AcPI01	1	-----	-----	QVSVVIFSS	SGKMSEYCS
Ananas	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	KKAREISVLCDAQVSVVIFSS	SGKMSEYCS	
Phaius	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	MKKAKEISVLCDAQVSLVIFSS	L	GKMFYCS
Habenaria	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	MKKAKEISVLCDAQVSLVIFSS	L	GKMFYCS
Musa	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	KKAREISVLCDAQVSVVIFSS	SGKMSEYCS	
Oryza1	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	KKAREIGVLCDAEVGVVIFSS	AGKLS	DYCTP
Oryza2	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRSGI	KKAREISVLCDAEVGVVIFSS	AGKLY	DYCS
Joinvillea	1	MGRGSEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	KKAREISVLCDAEVGVVIFSS	AGKLY	DYCS
Vitis	1	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFKRRNGI	MKKAKEITVLCDAHVSLVIFAS	SGKMHE	YCS
Arabidopsis	1	MGRGKIEIKRIENANNRVTFKRRNGI	VKKAKEITVLCDAKVALIIFAS	NGKMI	DYCCP

MADS_MEF2-like

TaPI01	61	STT	-----	LPKLEKYQNSGKKLWDAKHENLS	SEIDRIKKENDNMQIELRH	MKGEDLNS
AcPI01	20	STT	-----	LPKLEKYQNSGKKLWDAKHENLS	SAEIDRIKKENDNMQIELRH	MKGEDLNS
Ananas	61	STT	-----	LPKLEKYQNSGKKLWDAKHENLS	SAEIDRIKKENDNMQIELRH	MKGEDLNS
Phaius	61	STT	-----	LSKMLEKYQNSGKKLWDAKHENLS	SAEIDRIKKENDNMQIELRHL	KGEDLNS
Habenaria	61	STS	-----	LSKMLEKYQNSGKKLWDAKHENLS	SAEIDRIKKENDNMQIELRHL	KGEDLNS
Musa	61	AAT	-----	LPKILERYQNSGRKLDWAKHES	LSAEIDRIKKENDNMQIELRHL	KGEDLNS
Oryza1	61	KTT	SVFPP	LSRILEKYQNSGKILWDEKHKSL	SAEIDRIKKENDNMQIELRH	MKGEDLNS
Oryza2	61	KTS	-----	LSRILEKYQNSGKILWDEKHKSL	SAEIDRIKKENDNMQIELRHL	KGEDLNS
Joinvillea	61	KTT	-----	LPKILEKYQNSGKILWDEKHKSL	SAEIDRIKKENDSMQIELRHL	KGEDLNS
Vitis	61	STT	-----	LIDILDRYHKQSGKRLWDAKHENLS	NEIDRIKKENDSMQIELRHL	KGEDISS
Arabidopsis	61	SMD	-----	LGAMLDQYQKLSGKKLWDAKHENLS	NEIDRIKKENDSLQELRHL	KGEDIQS

MADS_MEF2-like

K-box

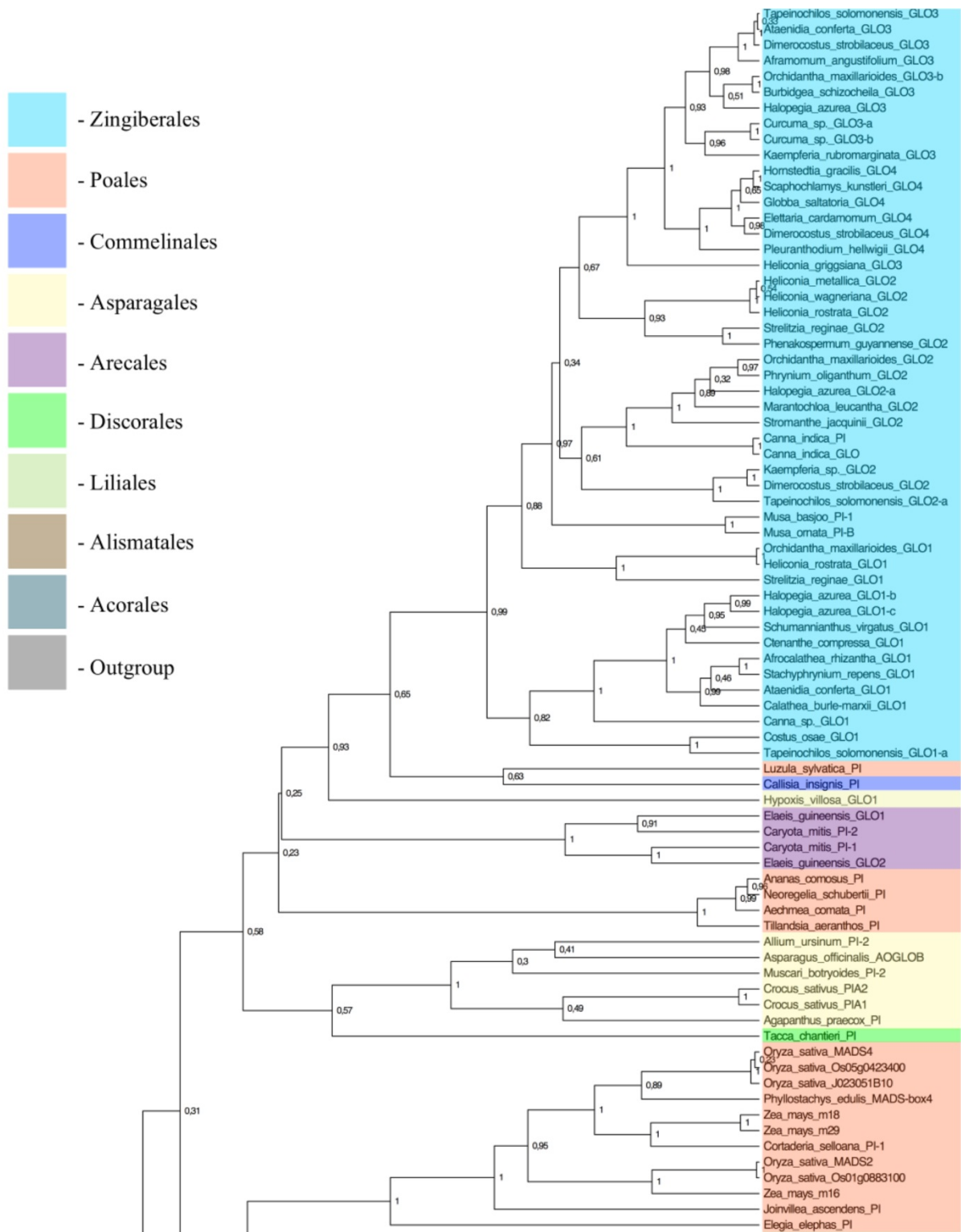
TaPI01	116	LHPKELIPIEEALQNGLTGVGDKOMVYL	RIMKKNRLL	LEENKQLAFM	VPPQERAMN	-GN
AcPI01	75	LHPKELIPIEEALQNGLTGVVDRKQMDYL	RMMKKNRLL	LEENKQLAFM	LHHQEMAMN	-GN
Ananas	116	LHPKELIPIEEALQNGLTGVVDRKQMDYL	RMMKKNRLL	LEENKQLAFM	LHHQEMAMN	-GN
Phaius	116	LNPKELIPIEEALQNGLSTGVRDKQMEFL	KMLKKNERM	LEENKRLTYL	LHHQQLAME	-GS
Habenaria	116	LNPKELIPIEEALQNGLSTGVRDKQMEFL	KMLKKNERM	LEENKRLTYL	LHHQQLAME	-GS
Musa	116	LNPKELIPIEDALQNGLSTGVRDKQMEI	WKLHKKNER	LEENKQOLTYM	LHHQQLAMD	-GN
Oryza1	121	LOPKELIAIEEALNNGQANLRDKMMDHWR	MHKRNEKMLE	DEHKMLAFRVH	QLEVELS	-GG
Oryza2	116	LOPKELIMIEEALDNGIVNVNDKLM	DHWRHVRTDKM	LEDENKLLAFK	LHQQDIALS	-GS
Joinvillea	116	LOPKELISFEEALQNGLTNLRDKQMDH	WKMLRRNGKM	LEENKLLAFRL	HQQDVALS	-GS
Vitis	116	LHHKELMATEDALEIGLASVRNKOMEFY	KMVKKNORILE	ENKHLNYIVH	HQGMPEAGN	
Arabidopsis	116	LNLKNLMAVEHAIEHGLDKVRDHOMEIL	ISKRRNEKMM	AEQROLTFOL	QQQEMATA	-SN

K-box

TaPI01	175	MRE	-----	POM	PMGFRVQPIQPNLOEDK	-----
AcPI01	134	MRE	-----	POI	PMGFRVQPIQPNLOEDK	-----
Ananas	175	MRE	-----	POI	PMGFRVQPIQPNLOEDK	-----
Phaius	175	MRELDIGYHQKD	-REYA-AQM	-PMTFRVQPIQPNLOGNK	-----	
Habenaria	175	MRELDIGYHQKD	-REYAPPPM	-PMTFRVQPIQPNLOGNK	-----	
Musa	175	VRELEIGYHQKG	-REFA-PHMTTMAF	HVQPIQPNLOENK	-----	
Oryza1	180	IRELELGYHHDD	-RDFA-ASM	-PFTFRVQPSHPNLOQEK	-----	
Oryza2	175	MRDLELGYHPD	--RDFA-AQM	-PITFRVQPSHPNLOENN	-----	
Joinvillea	175	MRDLELGYHPD	--REFVAPOM	-PMTFRVQPNHPNLOENK	-----	
Vitis	176	VREVESGYHQRAV	RDYN-POM	-PFAFRVQPIQPNLOERI	-----	
Arabidopsis	175	ARGMMRDHDG	-----	-----	QFGYRVQPIQPNLOEKIMSLVID	

PI-motif

Figura 3: Árvore de reconstrução filogenética de sequências de transcritos do gene *PISTILLATA*, com Monocotiledôneas como grupo interno e espécies de Angiospermas mais cedo divergentes, como grupo externo. As ordens foram identificadas com cores diferentes. Barra de escala representa o comprimento de ramo equivalente a 0,04 substituição de nucleotídeos por sítio. Observação: devido às dimensões da árvore filogenética gerada, foi necessário dividi-la ao meio, permitindo uma melhor observação de seus dados.



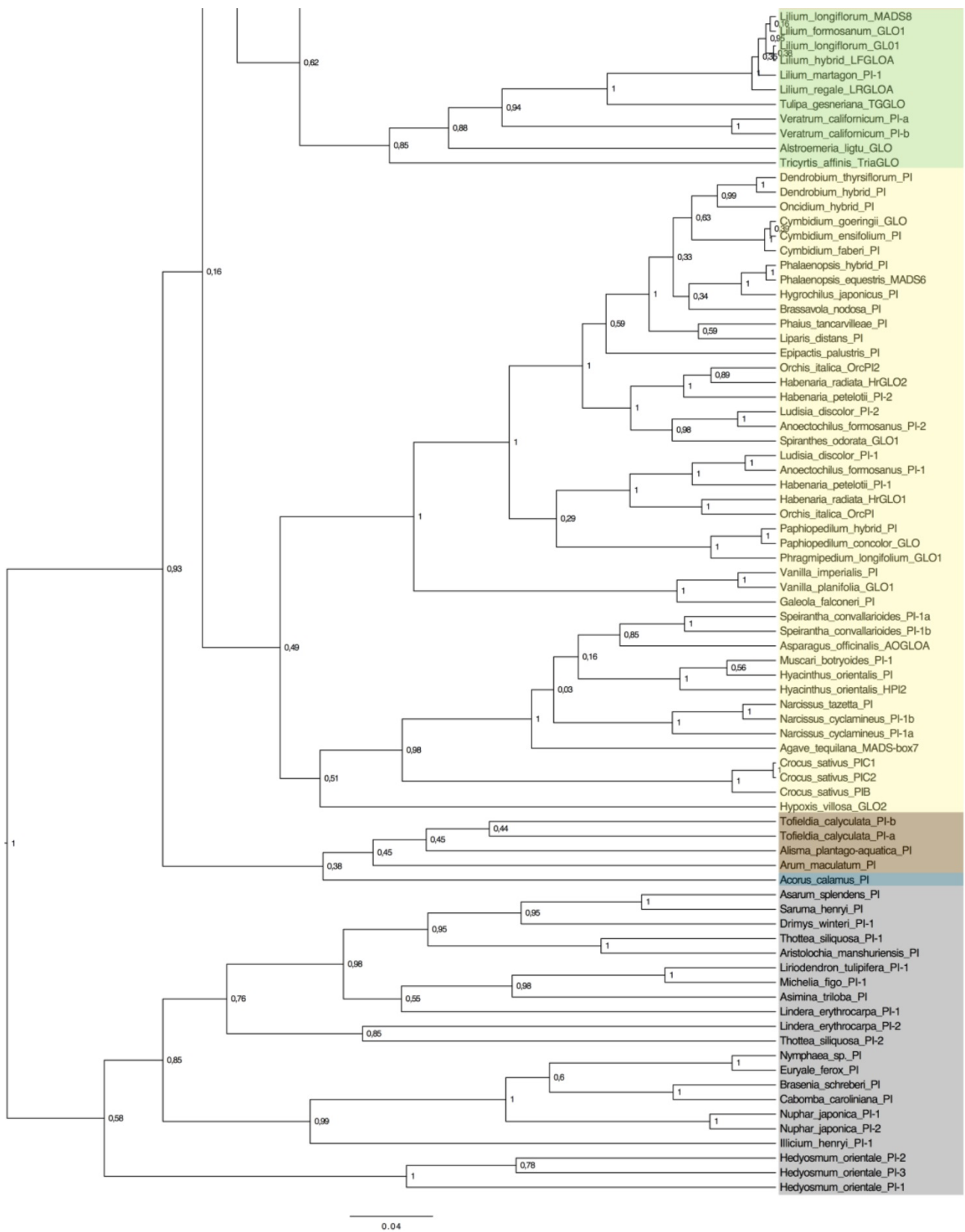


Figura 4: Híbridação *in situ* em cortes anatômicos de *Tillandsia aeranthos* com sonda fluorescente de DNA de fita simples gerada a partir da sequência *TaPI01* como molde, com 200 pb, evidenciada pelo fluorocromo FITC em verde. A: visão geral da se o longitudinal da inflorescência. B-C: meristema floral localizado no ápice da inflorescência, com sinais de híbridaç o localizados de forma ampla. D: flor em desenvolvimento com marcações de híbridaç o em pétalas e estames. E: elementos vasculares em desenvolvimento com híbridaç es de *PI* no ápice da inflorescência. F: controle negativo, com emissão de autofluorescência. Setas apontam para elementos vasculares em desenvolvimento. Cabeças de seta apontam para autofluorescência em elementos vasculares. Asteriscos evidenciam tecidos axilares com emissão de autofluorescência. Abreviações: se = sépala; p = pétala; st = estame. Barras de escala: A = 200 m; B-F = 50 m.

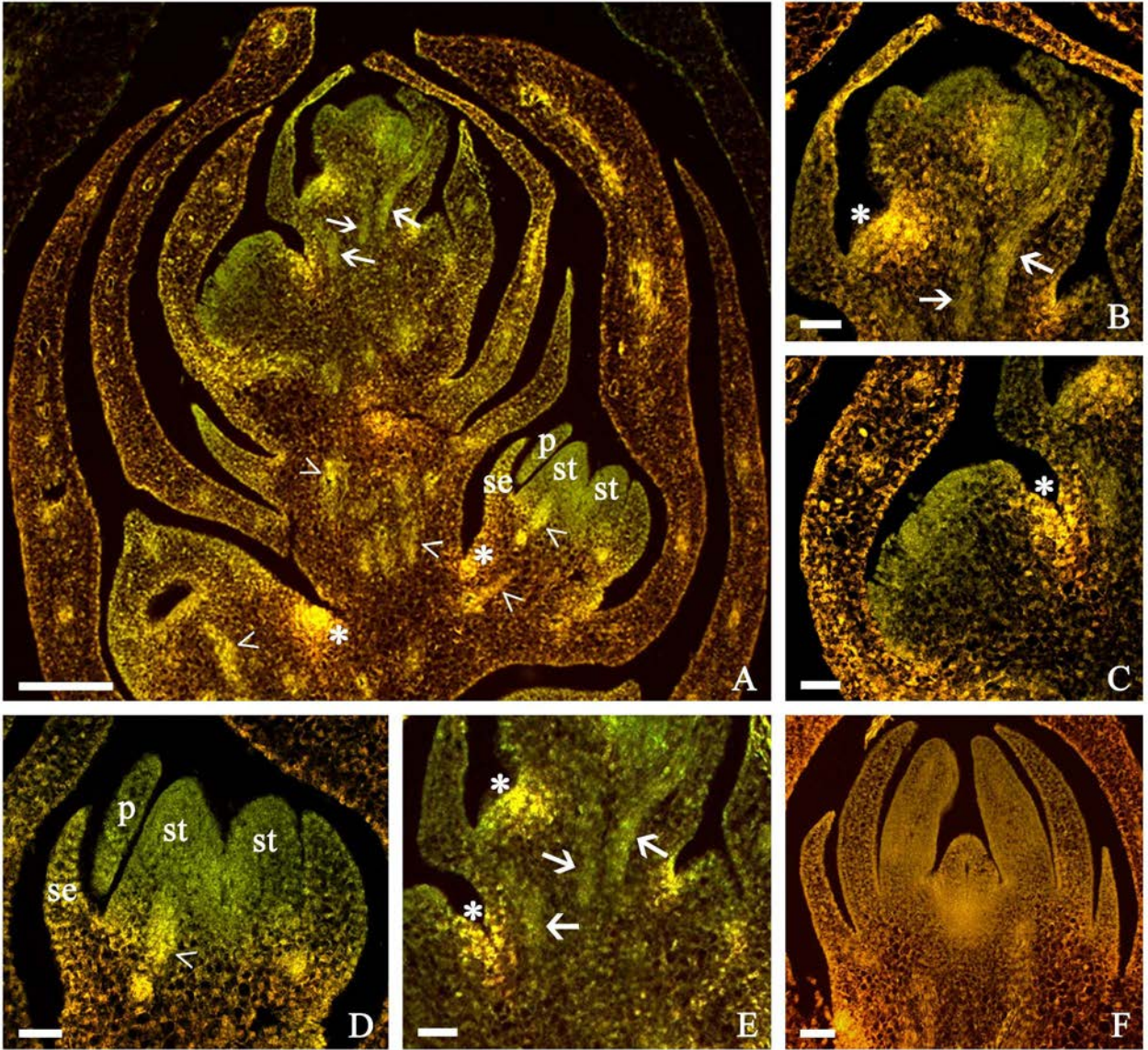


Figura 5: Micrografias de epifluorescência de secções longitudinais de inflorescência integrais de *T. aeranthos* com excitação a partir de radiação com diferentes comprimentos de onda. A: excitação com comprimento de onda na faixa do ultra violeta - UV. B: excitação com comprimento de onda na faixa do azul. C: excitação com comprimento de onda na faixa do verde. Barra de escala: 100 μm .

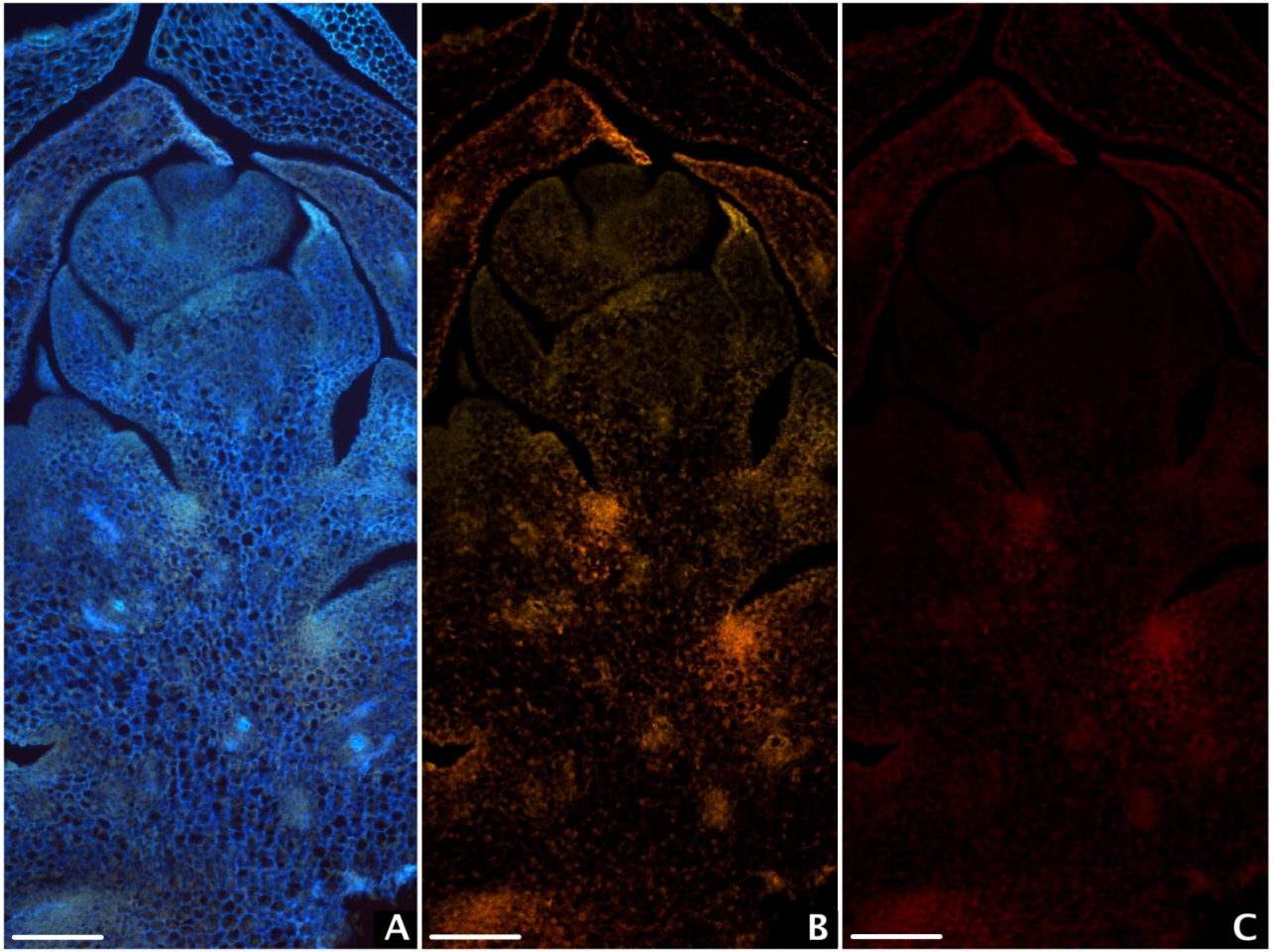


Figura 6: Micrografias de epifluorescência de seções longitudinais de inflorescência de *T. aeranthos* com excitação a partir de radiação com diferentes comprimentos de onda. A, D e G: excitação com comprimento de onda na faixa do ultravioleta - UV. B, E e H: excitação com comprimento de onda na faixa do azul. C, F e I: excitação com comprimento de onda na faixa do verde. A-C: ápice da inflorescência com meristema floral em desenvolvimento. D-F: Flores em estádios intermediários de desenvolvimento, sendo possível observar a presença de brácteas, pétalas e estames em desenvolvimento, com o desenvolvimento do carpelo em estádios iniciais de desenvolvimento. G-I: Flores localizada em regiões mais basais da inflorescência, em estádios mais desenvolvidos do que as das regiões mais apicais. Nessas flores é possível observar a presença de todos os órgãos florais em desenvolvimento. Barra de escala: 50 μm .

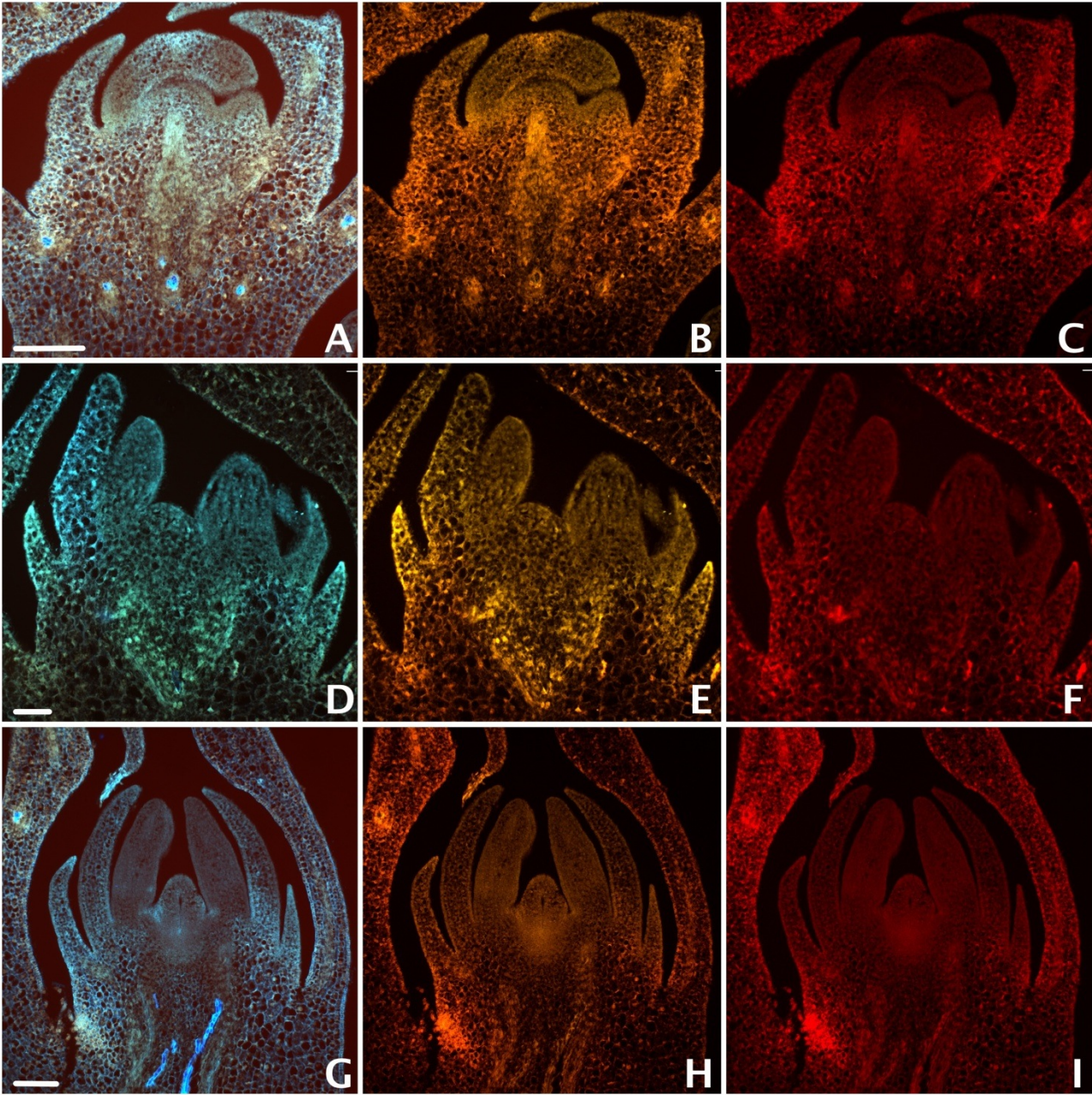
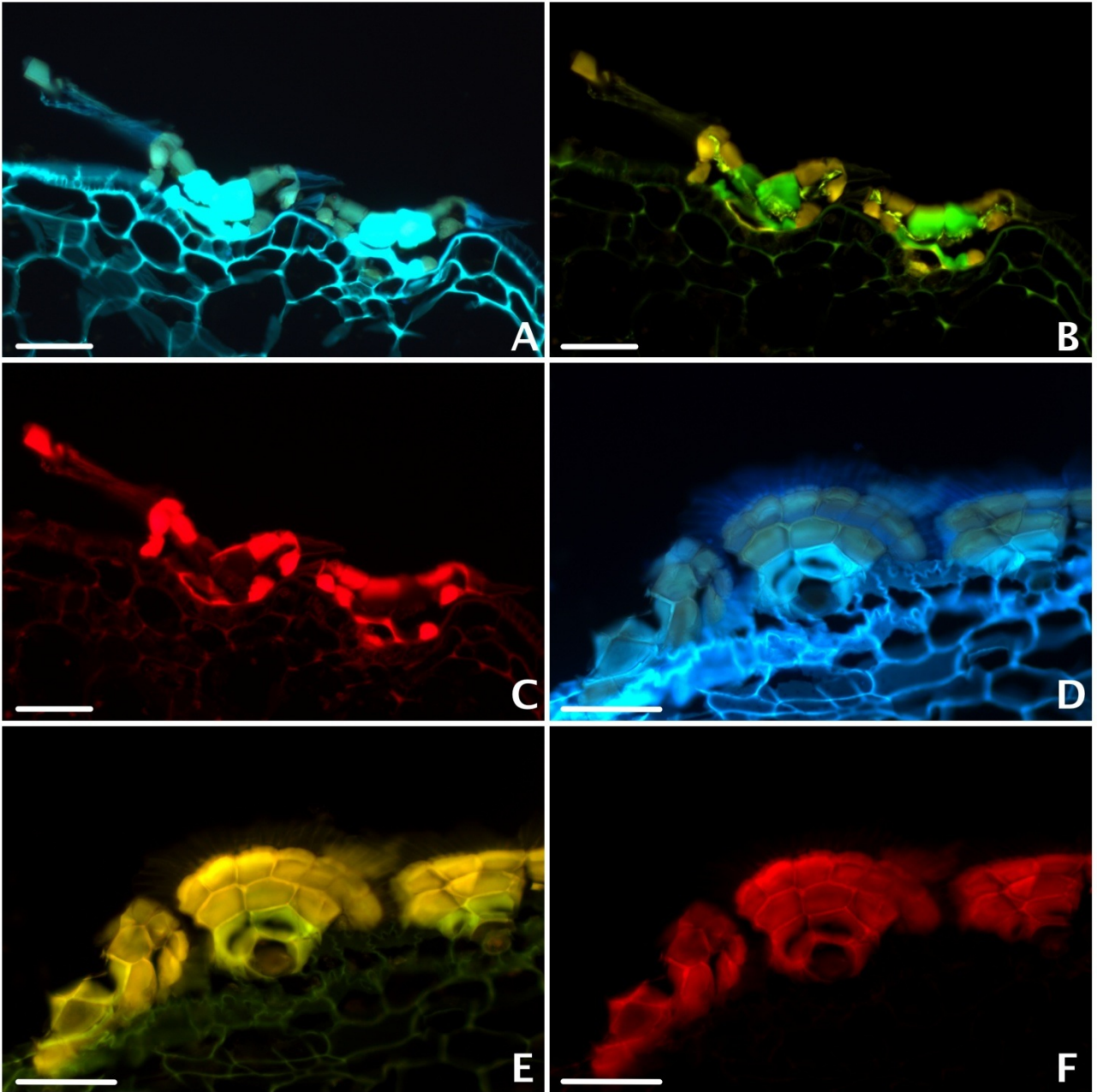


Figura 7: Micrografias de epifluorescência de escamas peltadas obtidas a partir de secções paradérmicas de folhas frescas de *T. aeranthos*, com excitação a partir de radiação com diferentes comprimentos de onda. A e D: excitação com comprimento de onda na faixa do ultra violeta - UV. B e E: excitação com comprimento de onda na faixa do azul. C e F: excitação com comprimento de onda na faixa do verde. Barra de escala: 10 μm .



QUADROS

Quadro 1: informações sobre as sequências de DNA. Coluna 1: Nome das espécies e abreviação do gene. Coluna 2: Número de acesso do GenBank (ID number). Coluna 3: ordem. Coluna 4: família.

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Acorus_calamus_PI</i>	DQ005577.1	Acorales	Acoraceae
<i>Aechmea_comata_PI</i>	KX228797	Poales	Bromeliaceae
<i>Aframomum_angustifolium_GLO3</i>	GU594963.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Afrocalathea_rhizantha_GLO1</i>	GU594909.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Agapanthus_praecox_PI</i>	AB079259.1	Asparagales	Amaryllidaceae
<i>Agave_tequilana_MADS-box7</i>	JF699272.1	Asparagales	Agavaceae
<i>Alisma_plantago-aquatica_PI</i>	DQ005581.1	Alismatales	Alismataceae
<i>Allium_ursinum_PI-2</i>	DQ005594.1	Asparagales	Amaryllidaceae
<i>Alstroemeria_ligtu_GLO</i>	AB267844.1	Liliales	Alstroemeriaceae
<i>Ananas_comosus_PI</i>	HQ717796.1	Poales	Bromeliaceae
<i>Anoectochilus_formosanus_PI-1</i>	EU444019.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Anoectochilus_formosanus_PI-2</i>	EU444020.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Aristolochia_manshuriensis_PI</i>	AB353718.1	Piperales	Aristolochiaceae
<i>Arum_maculatum_PI</i>	DQ005580.1	Alismatales	Araceae
<i>Asarum_splendens_PI</i>	EF424571.1	Piperales	Aristolochiaceae
<i>Asimina_triloba_PI</i>	AY436721.1	Magnoliales	Annonaceae
<i>Asparagus_officinalis_AOGLOA</i>	AB103465.1	Asparagales	Asparagaceae
<i>Asparagus_officinalis_AOGLOB</i>	AB103466.1	Asparagales	Asparagaceae
<i>Ataenidia_conferta_GLO1</i>	GU594910.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Ataenidia_conferta_GLO3</i>	GU594968.1	Zingiberales	Marantaceae

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Brasenia_schreberi_PI</i>	AB158356.1	Nynphaeales	Cabombaceae
<i>Brassavola_nodosa_PI</i>	EU444024.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Burbridgea_schizocheila_GLO3</i>	GU594958.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Cabomba_caroliniana_PI</i>	AB158354.1	Nynphaeales	Cabombaceae
<i>Calathea_burle-marxii_GLO1</i>	GU594920.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Callisia_insignis_PI</i>	DQ005582.1	Commelinales	Commelinaceae
<i>Canna_indica_GLO</i>	JQ180192.1	Zingiberales	Cannaceae
<i>Canna_indica_PI</i>	JQ180193.1	Zingiberales	Cannaceae
<i>Canna_sp._GLO1</i>	GU594917.1	Zingiberales	Cannaceae
<i>Caryota_mitis_PI-1</i>	DQ005601.1	Arecales	Arecaceae
<i>Caryota_mitis_PI-2</i>	DQ005600.1	Arecales	Arecaceae
<i>Cortaderia_selloana_PI-1</i>	DQ005583.1	Poales	Poaceae
<i>Costus_osae_GLO1</i>	GU594905.1	Zingiberales	Costaceae
<i>Crocus_sativus_PIA1</i>	DQ231247.1	Asparagales	Iridaceae
<i>Crocus_sativus_PIA2</i>	DQ231248.1	Asparagales	Iridaceae
<i>Crocus_sativus_PIB</i>	DQ231249.1	Asparagales	Iridaceae
<i>Crocus_sativus_PIC1</i>	DQ231250.1	Asparagales	Iridaceae
<i>Crocus_sativus_PIC2</i>	DQ231251.1	Asparagales	Iridaceae
<i>Ctenanthe_compressa_GLO1</i>	GU594912.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Curcuma_sp._GLO3-a</i>	GU594969.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Curcuma_sp._GLO3-b</i>	GU594967.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Cymbidium_ensifolium_PI</i>	JQ326259.1	Asparagales	Orchidaceae

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Cymbidium_faberi_PI</i>	HQ164433.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Cymbidium_goeringii_GLO</i>	HM106984.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Dendrobium_hybrid_PI</i>	EU444028.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Dendrobium_thyrsiflorum_PI</i>	DQ017701.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Dimerocostus_strobilaceus_GLO2</i>	GU594934.1	Zingiberales	Costaceae
<i>Dimerocostus_strobilaceus_GLO3</i>	GU594970.1	Zingiberales	Costaceae
<i>Dimerocostus_strobilaceus_GLO4</i>	GU594988.1	Zingiberales	Costaceae
<i>Drimys_winteri_PI-1</i>	AY436727.1	Canellales	Winteraceae
<i>Elaeis_guineensis_GLO1</i>	AF227195.1	Arecales	Arecaceae
<i>Elaeis_guineensis_GLO2</i>	AF411848.1	Arecales	Arecaceae
<i>Elegia_elephas_PI</i>	DQ662246.1	Poales	Restionaceae
<i>Elettaria_cardamomum_GLO4</i>	GU594990.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Epipactis_palustris_PI</i>	DQ005588.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Euryale_ferox_PI</i>	AB158350.1	Nynphaeales	Nymphaeaceae
<i>Galeola_falconeri_PI</i>	EU444032.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Globba_saltatoria_GLO4</i>	GU594991.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Habenaria_petelotii_PI-1</i>	EU444034.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Habenaria_petelotii_PI-2</i>	EU444035.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Habenaria_radiata_HrGLO1</i>	AB232665.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Habenaria_radiata_HrGLO2</i>	AB232664.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Halopegia_azurea_GLO1-b</i>	GU594922.1	Zingiberales	Marantaceae

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Halopegia_azurea_GLO1-c</i>	GU594923.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Halopegia_azurea_GLO2-a</i>	GU594947.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Halopegia_azurea_GLO3</i>	GU594972.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Hedyosmum_orientale_PI-1</i>	JX069755.1	Choranthales	Chloranthaceae
<i>Hedyosmum_orientale_PI-2</i>	JX069757.1	Choranthales	Chloranthaceae
<i>Hedyosmum_orientale_PI-3</i>	JX069758.1	Choranthales	Chloranthaceae
<i>Heliconia_griggsiana_GLO3</i>	GU594966.1	Zingiberales	Heliconiaceae
<i>Heliconia_metallica_GLO2</i>	GU594951.1	Zingiberales	Heliconiaceae
<i>Heliconia_rostrata_GLO1</i>	GU594913.1	Zingiberales	Heliconiaceae
<i>Heliconia_rostrata_GLO2</i>	GU594952.1	Zingiberales	Heliconiaceae
<i>Heliconia_wagneriana_GLO2</i>	GU594953.1	Zingiberales	Heliconiaceae
<i>Hornstedtia_gracilis_GLO4</i>	GU594994.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Hyacinthus_orientalis_HPI2</i>	AF134115.2	Asparagales	Asparagaceae
<i>Hyacinthus_orientalis_PI</i>	AF134114.2	Asparagales	Asparagaceae
<i>Hygrochilus_japonicus_PI</i>	KM975642.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Hypoxis_villosa_GLO1</i>	FJ804103.1	Asparagales	Hypoxidaceae
<i>Hypoxis_villosa_GLO2</i>	FJ804104.1	Asparagales	Hypoxidaceae
<i>Illicium_henryi_PI-1</i>	AY436734.1	Austrobaileyales	Schisandraceae
<i>Joinvillea_ascendens_PI</i>	DQ662245.1	Poales	Joinvilleaceae
<i>Kaempferia_rubromarginata_GLO3</i>	GU594971.1	Zingiberales	Zingiberaceae

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Kaempferia_sp._GLO2</i>	GU594943.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Lilium_formosanum_GLO1</i>	JQ996354.1	Liliales	Liliaceae
<i>Lilium_hybrid_LFGLOA</i>	AB359186.1	Liliales	Liliaceae
<i>Lilium_longiflorum_GL01</i>	DQ437527.1	Liliales	Liliaceae
<i>Lilium_longiflorum_MADS8</i>	HQ698550.1	Liliales	Liliaceae
<i>Lilium_martagon_PI-1</i>	DQ005592.1	Liliales	Liliaceae
<i>Lilium_regale_LRGLOA</i>	AB071379.1	Liliales	Liliaceae
<i>Lindera_erythrocarpa_PI-1</i>	AY436738.1	Laurales	Lauraceae
<i>Lindera_erythrocarpa_PI-2</i>	AY436739.1	Laurales	Lauraceae
<i>Liparis_distans_PI</i>	EU444038.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Liriodendron_tulipifera_PI-1</i>	AF052864.1	Magnoliales	Magnoliaceae
<i>Ludisia_discolor_PI-1</i>	EU444039.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Ludisia_discolor_PI-2</i>	EU444040.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Luzula_sylvatica_PI</i>	DQ005586.1	Poales	Juncaceae
<i>Marantochloa_leucantha_GLO2</i>	GU594949.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Michelia_figo_PI-1</i>	AF052863.1	Magnoliales	Magnoliaceae
<i>Musa_basjoo_PI-1</i>	EU433562.1	Zingiberales	Musaceae
<i>Musa_ornata_PI-B</i>	DQ005603.1	Zingiberales	Musaceae
<i>Muscari_botryoides_PI-1</i>	DQ005597.1	Asparagales	Asparagaceae
<i>Muscari_botryoides_PI-2</i>	DQ005596.1	Asparagales	Asparagaceae
<i>Narcissus_cyclamineus_PI-1a</i>	DQ005598.1	Asparagales	Amaryllidaceae

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Narcissus_cyclamineus_PI-1b</i>	DQ005599.1	Asparagales	Amaryllidaceae
<i>Narcissus_tazetta_PI</i>	JQ326262.1	Asparagales	Amaryllidaceae
<i>Neoregelia_schubertii_PI</i>	DQ005585.1	Poales	Bromeliaceae
<i>Nuphar_japonica_PI-1</i>	AB158359.1	Nynphaeales	Nymphaeaceae
<i>Nuphar_japonica_PI-2</i>	AB158360.1	Nynphaeales	Nymphaeaceae
<i>Nymphaea_sp._PI</i>	AY436747.1	Nynphaeales	Nymphaeaceae
<i>Oncidium_hybrid_PI</i>	EU444045.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Orchidantha_maxillarioides_GLO1</i>	GU594919.1	Zingiberales	Lowiaceae
<i>Orchidantha_maxillarioides_GLO2</i>	GU594936.1	Zingiberales	Lowiaceae
<i>Orchidantha_maxillarioides_GLO3-b</i>	GU594956.1	Zingiberales	Lowiaceae
<i>Orchis_italica_OrcPI</i>	AB094985.2	Asparagales	Orchidaceae
<i>Orchis_italica_OrcPI2</i>	AB537504.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Oryza_sativa_J023051B10</i>	AK100233.1	Poales	Poaceae
<i>Oryza_sativa_MADS2</i>	L37526.1	Poales	Poaceae
<i>Oryza_sativa_MADS4</i>	L37527.1	Poales	Poaceae
<i>Oryza_sativa_Os01g0883100</i>	NM_0010515 47.1	Poales	Poaceae
<i>Oryza_sativa_Os05g0423400</i>	NM_0010621 25.1	Poales	Poaceae
<i>Paphiopedilum_concolor_GLO</i>	JN565030.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Paphiopedilum_hybrid_PI</i>	EU444049.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Phaius_tancarvilleae_PI</i>	EU444053.1	Asparagales	Orchidaceae

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Phalaenopsis_equestris_MADS6</i>	AY678299.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Phalaenopsis_hybrid_PI</i>	AY748818.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Phenakospermum_guyannense_GLO2</i>	GU594950.1	Zingiberales	Strelitziaceae
<i>Phragmipedium_longifolium_GLO1</i>	FJ804109.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Phrynium_oliganthum_GLO2</i>	GU594939.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Phyllostachys_edulis_MADS-box4</i>	KJ002713.1	Poales	Poaceae
<i>Pleuranthodium_hellwigii_GLO4</i>	GU594960.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Saruma_henryi_PI</i>	AY436718.1	Piperales	Aristolochiaceae
<i>Scaphochlamys_kunstleri_GLO4</i>	GU594993.1	Zingiberales	Zingiberaceae
<i>Schumannianthus_virgatus_GLO1</i>	GU594907.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Speirantha_convallarioides_PI-1^a</i>	DQ005605.1	Asparagales	Asparagaceae
<i>Speirantha_convallarioides_PI-1b</i>	DQ005606.1	Asparagales	Asparagaceae
<i>Spiranthes_odorata_GLO1</i>	FJ804114.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Stachyphrynium_repens_GLO1</i>	GU594916.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Strelitzia_reginae_GLO1</i>	GU594908.1	Zingiberales	Strelitziaceae
<i>Strelitzia_reginae_GLO2</i>	GU594941.1	Zingiberales	Strelitziaceae
<i>Stromanthe_jacquinii_GLO2</i>	GU594935.1	Zingiberales	Marantaceae
<i>Tacca_chantieri_PI</i>	AF230713.1	Dioscoreales	Dioscoreaceae
<i>Tapeinochilos_solomonensis_GLO1-a</i>	GU594914.1	Zingiberales	Costaceae
<i>Tapeinochilos_solomonensis_GLO2-a</i>	GU594946.1	Zingiberales	Costaceae
<i>Tapeinochilos_solomonensis_GLO3</i>	GU594965.1	Zingiberales	Costaceae

Espécies e abreviação do gene	Número de acesso	Ordem	Família
<i>Thottea_siliquosa_PI-1</i>	AY436708.1	Piperales	Aristolochiaceae
<i>Thottea_siliquosa_PI-2</i>	AY436717.1	Piperales	Aristolochiaceae
<i>Tillandsia_aeranthos_PI</i>	KX228796	Poales	Bromeliaceae
<i>Tofieldia_calyculata_Pia</i>	DQ005578.1	Alismatales	Tofieldiaceae
<i>Tofieldia_calyculata_Pib</i>	DQ005579.1	Alismatales	Tofieldiaceae
<i>Tricyrtis_affinis_TriaGLO</i>	AB244023.1	Liliales	Liliaceae
<i>Tulipa_gesneriana_TGGLO</i>	AB094967.1	Liliales	Liliaceae
<i>Vanilla_imperialis_PI</i>	DQ005587.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Vanilla_planifolia_GLO1</i>	FJ804118.1	Asparagales	Orchidaceae
<i>Veratrum_californicum_PI-a</i>	DQ005589.1	Liliales	Melanthiaceae
<i>Veratrum_californicum_PI-b</i>	DQ005590.1	Liliales	Melanthiaceae
<i>Zea_mays_m16</i>	AJ292959.1	Poales	Poaceae
<i>Zea_mays_m18</i>	AJ292960.1	Poales	Poaceae
<i>Zea_mays_m29</i>	AJ292961.1	Poales	Poaceae

Quadro 2: Resultados do teste Z de seleção, com as famílias amostradas na coluna 1; "Valores P" para o nível de significância e valores de dN-dS para os números médios de substituições sinônimas e não sinônimas.

Família	Valor P	dS-dN
Poaceae	0,00000	-5,71117
Melanthiaceae	0,18235	-1,34131
Orchidaceae	0,00000	-9,53018
Liliaceae	0,00000	-5,57081
Tofieldiaceae	0,00309	-3,01942
Bromeliaceae	0,01750	-2,40939
Costaceae	0,00000	-7,03122
Marantaceae	0,00000	-7,15422
Estrelitziaceae	0,00677	-2,75557
Asparagaceae	0,00000	-6,20845
Zingiberaceae	0,00000	-5,77159
Lowiaceae	0,00000	-5,13231
Amaryllidaceae	0,00000	-6,16782
Musaceae	0,36178	-0,91548
Hypoxidaceae	0,01153	-2,56579
Heliconiaceae	0,00011	-4,00958
Arecaceae	0,00023	-3,79820
Iridaceae	0,00041	-3,63864
Cannaceae	0,00519	-2,84698
Overall	0,00000	-13,38574