

LUANA DE JESUS PEREIRA

**MORFOANATOMIA FOLIAR DE *MICROSTACHYS* A. JUSS. E
SEBASTIANA SPRENG. (HIPPOMANEAE-EUPHORBIACEAE):
CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS SECRETORAS E
CONTRIBUIÇÕES PARA A DISTINÇÃO DOS GÊNEROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436m
2019
Pereira, Luana de Jesus, 1985-
Morfoanatomia foliar de *Microstachys* A. Juss. e
Sebastiania Spreng. (Hippomaneae-Euphorbiaceae) :
caracterização das estruturas secretoras e contribuições para a
distinção dos gêneros / Luana de Jesus Pereira. – Viçosa, MG,
2019.

xi, 82 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Renata Maria Strozi Alves Meira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Euforbiácea. 2. Glândulas. 3. Secreção. 4. Ultraestrutura
(Biologia). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica.
II. Título.

CDD 22. ed. 583.69

LUANA DE JESUS PEREIRA

**MORFOANATOMIA FOLIAR DE *MICROSTACHYS* A. JUSS. E
SEBASTIANA SPRENG. (HIPPOMANEAE-EUPHORBIACEAE):
CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS SECRETORAS E
CONTRIBUIÇÕES PARA A DISTINÇÃO DOS GÊNEROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de maio de 2019

Deborah Aragão Soares

Katiúscia Freire de Souza

Aristéa Alves de Azevedo

Juliana de Lanna Passos

Renata Maria Strozi Alves Meira
(Orientadora)

DEDICO

A Deus e aos meus amados pais. “Para os montes elevo os olhos, de onde virá o meu socorro? O meu socorro virá do Senhor, Criador do céu e da terra.” (Salmos 120, 1-2).

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o sentido da minha vida, por ter me presenteado com o Doutorado que sonhei. Senhor agradeço-te por ser o meu sustento, refúgio, proteção e por me amar incondicionalmente. “Ainda bem que tenho Deus e ele me tem, porque assim fica tudo bem”.

A Universidade Federal de Viçosa pela fantástica infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento da minha tese.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

A minha amada Orientadora Renata (“Mamis Poderosa”) que sempre me inspirou, incentivou, acreditou no meu potencial, me orientou de forma carinhosa e atenciosa. O seu jeito descontraído de ser me cativou, não podemos esquecer a sua famosa frase “E aí, tudo dominado? ” rrsrrs. Você é uma das melhores pessoas e profissional que conheci. Lembro-me como se fosse hoje o dia que fui aprovada no Doutorado, a sua alegria em me receber como orientada, nunca vou me esquecer. Agradeço-te pela paciência, dedicação e confiança que depositou em mim.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal por todo conhecimento que me passaram, especialmente a professora Aristéa pela inspiração enquanto excelente profissional e por ter me ajudado no momento em que mais precisei.

A minha primeira mãe científica Maria Olívia por ter me apresentado esse mundo lindo que é a Anatomia Vegetal, tenho um carinho e respeito imenso por você, nunca me esqueço da sua famosa frase: “vocês tem que entender a alma do vegetal” rrsrrs você também é umas das responsáveis por eu ter chegado até aqui.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal Ângelo, Luciene, Marcele, Mauro e Vera por todo empenho e dedicação.

Aos meus amados pais por serem minhas inspirações, sempre me incentivaram a ir em busca dos meus sonhos, se cheguei até aqui foram eles que sempre me apoiaram e me deram o essencial todo amor. Amo vocês.

A minha irmã gêmea Dayana que sempre esteve comigo desde a barriga de mãe rrsrrs sempre me apoiou e incentivou na busca dos meus objetivos. Amo você.

Ao quarteto fantástico Lays (“Lala”), Itainá (“Tinene”), Priscila (“Pri”) e Patrícia (“Patineti”), vocês foram meu porto seguro quando cheguei em Viçosa,

cuidaram de mim como se fossem minhas mães rrsrrsrsr, nunca vou esquecer de tudo que fizeram por mim. A minha chegada em Viçosa foi calorosa, aconchegante, me sentia em casa na república de vocês, era incrível. As meninas lá de casa tinham ciúmes rrsrrs. Amo vocês minhas amigas irmãs.

Ao Rafael Perácio (“Mocares”) meu amigo irmão, pela amizade, carinho e pelas orações. Amo você meu irmão.

A Ludmila (“Ludinha”) pela amizade, carinho e por ser minha companheira fiel das missas aos domingos.

As minhas amigas Auroritinha, Paty e Rosinha que sempre tornaram meus dias mais felizes e por toda ajuda no laboratório, pela amizade e por todo o carinho amo vocês.

A Carol (“Carolitinha”) minha “gêmula” por todo companheirismo e amizade assim que cheguei para o mestrado. Em muitos momentos eu sentia que Deus tinha colocado você no meu caminho para essa caminhada ser mais leve e emocionante. Às vezes você me pirraçava, mas eu sabia que era porque você me amava rrsrrsrsr te amo minha amiga irmã.

A Valéria (“Claudinha”) pelo cuidado que sempre teve comigo, conselhos sábios, incentivos, pelas longas conversas em seu quarto, por me influenciar a ouvir boas músicas rrsrrsrsr. Se eu sou a sua aquisição mineira, você é a minha aquisição Baiana também amo você minha amiga irmã.

A Amanda (“Mandioquinha”) minha amiga irmã que morou comigo no quarto em frente ao meu assim que cheguei para o mestrado. Nunca me esqueço de quando você dizia: Luaneca não fecha a porta do seu quarto, vamos estudar uma olhando uma para outra, e eu te ameaçava: se você conversar comigo, eu fecho a porta rrsrrsrsrsr. Deus colocou você em minha vida no momento certo pois a caminhada foi muito mais leve e prazerosa ao seu lado. Te amo minha irmã.

A Martielly (“Piu-Piu”) pela amizade e carinho, lembro-me de ficar brava sempre que você esquecia tudo: chave, celular, caderno de protocolo rrsrrsrsrsr. Amo você minha amiga.

A Daniela (“Docinho”) pela amizade sincera, pelo companheirismo e cuidado nos momentos difíceis, você é uma amiga irmã que levarei para vida toda.

A Ivan (“Becks”) pela amizade, incentivo e pelos jantares no RU rrsrrsrsrs, pelas boas conversas e por todo carinho que você tem por mim.

A Ivanilson (“Chico”) por tornar meus dias ainda mais felizes no

laboratório e ter o dom de arrancar de mim os mais sinceros e espontâneos sorrisos.

A Marinalva (“Mary”) pela amizade, carinho, incentivo e por me escutar muitas vezes mesmo à distância, você me inspira minha amiga.

A Crístielle (“Hermana”) pela amizade, carinho, companheirismo nas diversas festas de Viçosa rrsrsr, mais do que isso pelas suas orações, apoio e amor de irmã. Amo você minha amiga.

Analú (“Meridinha”) sempre carinhosa comigo, atenciosa, amiga de todas as horas sei que posso contar com você sempre “menina veia feia” rrsrsr. Amo você.

A Jéssyca (“Jel”) minha amiga irmã um presente de Deus me deu, por toda amizade, orações, carinho e incentivo, a nossa amizade prova que não existe distância que atrapalhe a amizade verdadeira entre duas pessoas. Amo você.

A Vera pela amizade, carinho, orações pelos incentivos para que eu nunca desistisse dos meus sonhos. A distância nunca foi um obstáculo para a nossa grande amizade.

A dona Lourdes pela amizade, incentivo, orações, agradeço por me ouvir em uns dos momentos mais difíceis da minha vida, não nos conhecemos pessoalmente ainda, mas tenho certeza que foi Deus que nos apresentou.

A todos os meus amigos de Montes Claros por todos os bons momentos vividos juntos.

Aos presentes que Viçosa me deu Regiane e sua família pelo carinho e atenção ao me convidarem para os almoços nos dias das mães e dos pais.

A minha estagiária Priscila (“Pri”) por toda dedicação ao trabalho e conversas descontraídas.

A todos os amigos do laboratório por todos os bons momentos vividos juntos, com vocês eu me diverti muito rrsrsr Renatétis: Katiúscia (“Keitinha”), Izabel (“Belzinha”), Dayana (“Day”), Danizete (“Abafadinho”), Miller (“Milocas”), Elienai (“Margarida”), João Victor (“Byrsa”); Aristétis: Ana Paula (“Gatinha manhosa”); Luzinétis: Thamires (“Mãe Natureza”), Daniel (“Denis”), Michel, Franklin (“fogo”), Iara (“Mãe d’água”), Caio (“Ar”) e Bruna (“Mãe terra”).

BIOGRAFIA

LUANA DE JESUS PEREIRA, filha de Raul Nunes Pereira e Ana de Jesus Pereira, nascida em Montes Claros-MG, em 5 de setembro de 1985. Ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) em fevereiro de 2008 e concluiu o curso de Ciências Biológicas Bacharelado em 2011. Durante todo esse percurso foi Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Anatomia Vegetal. Iniciou o mestrado em 2012, na Universidade Federal de Viçosa (UFV) no Programa de Pós-graduação em Botânica, concluindo em de 2014. Iniciou o Doutorado em 2015 pela mesma instituição concluindo o trabalho com a defesa da tese intitulada: Anatomia aplicada a taxonomia de *Microstachys* e *Sebastiania* (Hippomaneae-Euphorbiaceae): Aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais, em maio de 2019.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	04
ARTIGO I: LATICÍFEROS E NECTÁRIOS FOLIARES CRATERIFOMRES EM <i>MICROSTACHYS SERRULATA</i> (MART. & ZUCC.) Müll.Arg. (HIPPOMANEAE: EUPHORBIACEAE): ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURA	
RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
INTRODUÇÃO.....	07
MATERIAL E MÉTODOS.....	09
RESULTADOS.....	11
PRANCHAS E TABELAS.....	14
DISCUSSÃO.....	24
AGRADECIMENTOS.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
ARTIGO II: <i>MICROSTACHYS</i> A. JUSS. E <i>SEBASTIANA</i> SPRENG. (HIPPOMANEAE-EUPHORBIACEAE): ANATOMIA CONTRIBUI PARA O TRATAMENTO COMO GÊNEROS DISTINTOS?	
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	43
PRANCHAS E TABELAS.....	50
DISCUSSÃO.....	71
AGRADECIMENTOS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
CONCLUSÕES GERAIS.....	82

RESUMO

PEREIRA, Luana de Jesus, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2019. **Morfoanatomia foliar de *Microstachys* A. Juss. e *Sebastiania* Spreng. (Hippomaneae-Euphorbiaceae): caracterização das estruturas secretoras e contribuições para a distinção dos gêneros.** Orientadora: Renata Maria Strozi Alves Meira.

Microstachys A. Juss. (24 espécies) e *Sebastiania* Spreng. (79 espécies) destacam-se dentre os maiores gêneros da tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) e encontram-se distribuídos na região Neotropical. Nas abordagens filogenéticas utilizando dados morfológicos e moleculares, as espécies da seção *Microstachys* que estavam inseridas no gênero *Sebastiania* foram elevadas ao status de gênero, sendo estes apontados como irmãos. Entretanto, a delimitação desses gêneros sempre foi controversa devido ao uso de caracteres florais, que são pouco informativos. Em estudo filogenético recente, *Microstachys* foi apontado como monofilético e dois clados Neotropicais foram reconhecidos, sem, contudo, serem identificadas sinapomorfias morfológicas para os estes. Mesmo com a exclusão de *Microstachys*, *Sebastiania* foi apontado como polifilético com base em dados morfológicos e moleculares. Uma diferença enfatizada nas descrições taxonômicas das espécies destes gêneros é a presença de glândulas foliares em *Microstachys* que são ausentes em *Sebastiania*. Outra informação comum nas descrições é a exsudação de látex esbranquiçado e leitoso em todas as espécies de *Microstachys* e em parte das espécies de *Sebastiania*. Assim, a presença e a morfologia das estruturas secretoras podem ser úteis para distinguir espécies de *Sebastiania* e *Microstachys*, como reportado em outros taxons de Euphorbiaceae. Em *Microstachys*, não existem descrições sobre as tipologias das estruturas genericamente denominadas como glândulas crateriformes, tampouco das estruturas secretoras de látex. Embora os caracteres anatômicos tenham contribuído para a resolução de problemas taxonômicos e filogenéticos em Euphorbiaceae, na tribo Hippomaneae tal abordagem ainda não foi sistematicamente explorada. Este trabalho pretende verificar se existem caracteres morfoanatômicos foliares que possam contribuir para a delimitação entre *Microstachys* e *Sebastiania*, bem como para a distinção de espécies, corroborando o tratamento destes como gêneros distintos e se existem sinapomorfias anatômicas que sustentem os dois clados Neotropicais de *Microstachys*. São caracteres comuns aos dois gêneros lâmina foliar plana, epiderme unisseriada, estômatos paracíticos, mesofilo dorsiventral, nervura central projetada para face adaxial, feixe colateral,

parênquima paliçadico na nervura central e traqueídes alargadas. Destacam-se como caracteres distintivos em *Microstachys* a margem serreada com células epidérmicas altas, de contorno reto a levemente ondulado, epiderme com tricomas simples e estrelados, cutícula estriada, folhas anfiestomáticas, nervuras de menor porte areoladas com terminação dicotômica e presença de glândulas marginais ou submarginais. Em *Sebastiania* a margem foliar é denteada e não apresenta células altas, a cutícula é lisa e a parede das células epidérmicas é sinuosa, as folhas são hipoestomáticas, glabras e eglandulares, nervuras de menor porte são areoladas com terminações dendríticas. A presença de glândulas marginais em *S. klotzschiana* e *S. serrata*, laticíferos em *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis*, *S. macrocarpa* e topograficamente uma hipoderme exclusivamente em *S. pallens* devem ser consideradas em futuras revisões taxonômicas pois foram exceções apontadas no estudo. Utilizando *M. serrulata* como modelo, as glândulas foliares crateriformes foram descritas anatômica e ultraestruturalmente e os laticíferos anatomicamente, permitindo descrever a tipologia, a natureza química da secreção produzida, as organelas envolvidas na produção da secreção e o mecanismo de exsudação. Em relação aos caracteres ultraestruturais, as células da epiderme secretora em paliçada e do parênquima secretor subepidérmico possuem núcleo conspicuo, citoplasma denso com vacúolos, numerosas mitocôndrias de formato alongado com cristas evidentes, retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos, leucoplastos ameboides e plasmodesmos conectando as células secretoras adjacentes. A secreção é hidrofílica composta essencialmente por polissacarídeos e proteínas. A eliminação da secreção ocorre por ciclos de deslocamento, ruptura e recomposição da cutícula. As características anatômicas e ultraestruturais são compatíveis com a descrição destas estruturas como nectários. Os laticíferos são não-articulados ramificados e ocorrem no mesofilo por entre o parênquima paliçadico e lacunoso, na região cortical do pecíolo e próximos aos feixes. O látex é esbranquiçado e leitoso e é composto por polissacarídeos, proteínas, lipídios e borracha. Os caracteres anatômicos corroboraram com as abordagens taxonômicas embora não tenham sido encontradas diferenças entre os clados de *Microstachys*. A presença de nectários e o tipo de laticíferos devem ser considerados nos trabalhos taxonômicos.

ABSTRACT

PEREIRA, Luana de Jesus, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2019. **Foliar morphoanatomy of *Microstachys* A. Juss. and *Sebastiania* Spreng. (Hippomaneae-Euphorbiaceae): characterization of the secretory and aided structures for selection of genera.** Adviser: Renata Maria Strozi Alves Meira.

Microstachys (24 species) and *Sebastiania* (79 species) are among the largest genera of the tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae), and both are Neotropical genera. Phylogenetic studies using morphological and molecular data have indicated that the species of *Microstachys*, previously belonged to the genus *Sebastiania*, should be elevated to the genus status, being *Microstachys* and *Sebastiania* considered sister genera. However, the delimitation of these genera remains a matter of ongoing debate among researchers, since only floral characters have been pointed as less informative than the vegetative ones. In a recent phylogenetic study, the results indicated *Microstachys* as a monophyletic group and two Neotropical clades emerged, without any morphological synapomorphies being reported. Even with the exclusion of *Microstachys*, *Sebastiania* was pointed out as polyphyletic based on both morphological and molecular data. Marginal leaf glands are emphasized as a distinctive character in *Microstachys*, which is absent in *Sebastiania*. Another common information in the descriptions is the exudation of white milky latex in all species of *Microstachys* and in part of the species of *Sebastiania*. Therefore, the presence and morphology of leaf glands may be an important tool for distinguishing species of *Sebastiania* and *Microstachys*, as they have been used in other genera of Euphorbiaceae. Although the usefulness of anatomical data in solving both taxonomical and phylogenetic problems in Euphorbiaceae, such approach has not been used in the tribe Hippomaneae. This work intends to verify if there are leaf anatomy characters that could contribute to the delimitation of *Microstachys* and *Sebastiania*, and distinction of the species, corroborating with the distinct genera; and if there are anatomical synapomorphies that support the two Neotropical clades of *Microstachys*. Flat foliar blade, uniseriate epidermis, paracytic stomata, dorsiventral mesophyll, central midrib projected for the adaxial face, and enlarged tracheids are common characters to both genera. They stand out as distinctive characters, serrulate margin, with high epidermal cells, epidermis with simple and stellated trichomes, striated cuticle and cells with straight anticlinal contour with a wavy plane, amphistomatic leaves, small veins with dichotomous termination, and presence of marginal or

submarginal glands stand out as distinctive characters in *Microstachys*. In *Sebastiania* the leaf margin is dentate and does not present high cells, the cuticle is smooth and the anticlinal wall of the epidermal cells is sinuous, the leaves are hypostomatic, glabrous and eglandular, smaller veins are areolated with dendritic terminations. The presence of marginal glands in *S. klotzschiana* e *S. serrata*, laticifer in *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis* and *S. macrocarpa* and hypoderm in *S. pallens* have been considered in future taxonomical revision, since are exception and may represent important parameters. Using *M. serrulata* into as model, the leaf crateriform glands and laticifer were anatomically and ultrastructurally described, allowing describing the types of secretory structures, the chemical nature of the secretion produced, the organelles involved in both the production of the secretion and the mechanism of exudation. In relation to the ultrastructural characters, both the secretory cells and secretory parenchyma have a conspicuous nucleus dense cytoplasm with vacuoles, numerous elongated-shaped mitochondria with evident ridges, rough endoplasmic reticulum, dictyosomes, ameboid leucoplasts and plasmodesms connecting the adjacent secretory cells. The hydrophilic secretion is composed by of polysaccharides and proteins main. The mechanism of secretion occurs by cycles of dislocation, rupture and recomposition of the cuticle. Structural and ultrastructural traits indicate that such glands are nectaries. The laticifers are branched non-articulated and occur in the mesophyll between the palisade and spongy parenchyma, as well as in the cortex and near the bundles of the petiole. The latex is composed of polysaccharides, proteins, lipids and rubber particles. The anatomical features corroborated with the taxomical approaches although we could not find distinctive charater for the two clades of *Microstachys*. The presence of nectaries and the type of laticifers have to be considered in the future taxomical works.

INTRODUÇÃO GERAL

Euphorbiaceae está entre as maiores famílias de angiospermas com aproximadamente 246 gêneros e cerca de 6.300 espécies (Wurdack e Davis, 2009). De acordo com dados moleculares, a família foi dividida em três subfamílias Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae (Chase et al., 2002). Três gêneros se destacam pelo elevado número de espécies, *Acalypha* (450 espécies), *Croton* (1.300 espécies) e *Euphorbia* (2.400 espécies), compreendendo aproximadamente 2/3 da família (Judd, 2009), enquanto os demais 243 gêneros possuem um número menor de espécies.

Hippomaneae com 33 gêneros e 300 espécies, é a segunda maior tribo da subfamília Euphorbioideae, que também compreende as tribos Euphorbieae, Hureae, Pachystromateae e Stomatocalyceae (Esser 2001, 2012; Webster, 1994). Hippomaneae é pantropical e no Brasil foram registrados 13 gêneros e 120 espécies (Esser, 2012). As espécies desta tribo são caracterizadas pelo hábito herbáceo, arbustivo, arbóreo ou trepador; pela presença de látex branco; folhas pecioladas, estipuladas, alternas a raramente opostas, inteiras, penínervas e algumas vezes triplinérvias, com glândulas na face adaxial ou abaxial da lâmina; inflorescências tirsoídes espiciformes, terminais ou axilares; flores apétalas com brácteas biglandulares ou raramente nulas; frutos septícidia, loculícidia ou indeiscente; e sementes secas ou com arilo, com carúncula ou não (Pscheidt, 2015).

Hippomaneae foi descrita por Jussieu em 1824 e no decorrer do tempo, várias mudanças foram realizadas na delimitação dos gêneros que compõem a tribo. (Endlicher 1840, Agardh 1858, Grisebach 1864, Pax e Hoffmann 1912, Webster 1994, Esser 2001, Esser 2012). Entretanto, a tribo ainda é considerada taxonomicamente complexa devido à circunscrição controversa ou incerta de alguns gêneros (Webster, 1994; Esser, 2001). As relações filogenéticas dentro de Hippomaneae têm sido assunto de discussão e permanecem por serem elucidadas (Wurdak *et al.* 2005, Pscheidt 2011, Esser 2012, Webster 1994a 2014b). Ao revisar a tribo Esser (2001) enfatizou que o tamanho reduzido e a estrutura conservada das flores têm dificultado a distinção entre os táxons, gerando problemas taxonômicos. Dentre a diversidade de gêneros da tribo destaca-se *Microstachys* (24 espécies), que é constituído por espécies com hábito herbáceo e subarbustivo, folhas com margem contendo vários denticulos ou margem inteira, com glândulas foliares crateriformes, inflorescências opostas às folhas, ovários

e frutos com estruturas denominadas de cornículos e sementes contendo carúncula (Pscheidt, 2015). *Microstachys* já foi descrito como uma seção do gênero *Sebastiania* por compartilhar com este: inflorescência bissexual do tipo espiciforme, flores solitárias ou reunidas em grupos de dois a três; na base da raque as flores são pistiladas e nos nós distais elas são estaminadas; estames livres ou conados na base; brácteas biglandulares; cálice trilobado; pétalas e disco ausentes e ovário tricarpelar com três filetes inteiros (Esser, 2001; Webster, 1994). *Sebastiania* é exclusivamente Neotropical (Esser 2001), composto por 79 espécies (Pax e Hoffmann 1912), com hábito arbustivo ou subarbustivo, em casos raros herbáceos ou arbóreos, e normalmente são encontradas em ambientes xéricos ou próximos a curso d'água (Esser, 2001). No estudo morfológico e filogenético realizado por Athiê-Souza (2011) *Sebastiania* emergiu como polifilético.

Microstachys foi revisado recentemente, e foram levados em consideração caracteres morfológicos e moleculares sendo reconhecidas 24 espécies (Pscheidt, 2015). Em um estudo de filogenia molecular foram analisadas 13 espécies Neotropicais resultando em uma árvore com dois clados (Pscheidt, 2015). As espécies do clado 1 (*M. bidentata*, *M. corniculata*, *M. daphnoides*, *M. glandulosa*, *M. hispida*, *M. revoluta*, *M. salicifolia*, e *M. uleana*) são morfológicamente homogêneas e de ampla distribuição no Cerrado, Campo Rupestre e Restinga, exceto *M. revoluta* e *M. uleana* que não apresentam ampla distribuição (Pscheidt, 2015). Enquanto que, o clado 2 (*M. nummularifolia*, *M. nana*, *M. marginata*, *M. ditassoides* e *M. heterodoxa*) é formado por espécies morfológicamente heterogêneas com distribuição restrita ou endêmica, na Caatinga, Cerrado, Campo Rupestre e Restinga (Pscheidt, 2015). Embora *M. anisodonta* e *M. serrulata* mas não entraram na filogenia do grupo. Ressalta-se ainda que *Sebastiania* emergiu como grupo irmão de *Microstachys* (Pscheidt, 2015).

Euphorbiaceae possui uma grande diversidade de estruturas secretoras como na tribo Crotoneae onde foram relatados laticíferos, nectários florais e extraflorais, idioblastos, tricomas glandulares e coléteres (Vitarelli et al 2015). Estas estruturas secretoras mostraram-se relevantes nos estudos taxonômicos, pois variam quanto ao formato e posição, além da composição química do exsudato (Soares 2013, Vitarelli et al 2015, Feio et al 2016, Souza 2018). Na tribo Hippomaneae estudos anatômicos foliares, enfatizando a caracterização anatômica e ultraestrutural de estruturas secretoras, são escassos (Coutinho et al. 2010, Demarco et al. 2013). Nas descrições

morfológicas das espécies de *Microstachys* é mencionada a presença de glândulas foliares crateriformes que podem ser caracteres promissores para a taxonomia do grupo. Já na revisão taxonômica de *Sebastiania*, as folhas das espécies foram descritas como eglandulares. Dessa forma, estudos anatômicos que busquem elucidar a tipologia dessas glândulas, composição química da secreção e quais são os compartimentos envolvidos na sua produção, contribuirão com informações para a composição de banco de dados promissores para os estudos taxonômicos e filogenéticos de Hippomaneae.

Dessa forma, foram elaboradas as seguintes perguntas:

- I. Existem caracteres ou conjunto de caracteres anatômicos que contribuem para a separação de *Microstachys* e *Sebastiania* e que possam ser indicados como possíveis sinapomorfias micromorfológicas?
- II. Serão evidenciados caracteres que possam ser indicados como possíveis sinapomorfias micromorfológicas para os dois clados Neotropicais de *Microstachys*?
- III. Os Nectários foliares de *Microstachys serrulata* são semelhantes aos nectários descritos em Euphorbiaceae?
- IV. As folhas de *Sebastiania* são eglandulares?
- V. Laticíferos estão presentes em *Microstachys* e ausentes em *Sebastiania*?

O texto da tese foi elaborado na forma de dois artigos científicos. O primeiro intitulado: “Laticíferos e nectários foliares crateriformes em *Microstachys serrulata* (Mart. & Zucc.) Müll.Arg. (Hippomaneae: Euphorbiaceae): anatomia, histoquímica e ultraestrutura” e foi formatado para ser submetido a revista *Protoplasma*. O Segundo intitulado “*Microstachys* A. Juss. e *Sebastiania* Spreng. (Hippomaneae-Euphorbiaceae): anatomia contribui para o tratamento como gêneros distintos?” foi formatado para ser submetido ao periódico *International Journal of Plant Science*.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Athiê-Souza SM. 2011. Estudos Morfológicos e Filogenéticos de *Sebastiania* Spreng. (Hippomaneae, Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco – PPGB/UFRPE.
- Chase MW, Zmarzty S, Lledo MD, Wurdack KJ, Swensen SM, Fay MF. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. *Kew Bulletin* 57: 141-181.
- Esser HJ. 2001. Tribes Hippomaneae, Hureae, Pachystromateae. In: Radcliffe-Smith, A. *Genera Euphorbiacearum*. Kew Royal Botanic Gardens, pp. 352-397.
- Esser HJ. 2012. The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil. *Rodriguésia* 63: 209-225.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. *Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético*. Artmed Editora, Porto Alegre.
- Pax F, Hoffmann K 1912 Euphorbiaceae-Hippomaneae. In: Engler, A. (ed.). *Das Pflanzenreich Regni vegetabilis conspectus IV.147.V. (Heft 52)*. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Pscheidt AC. 2015. O gênero *Microstachys* A. Juss. e a tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae). Tese (Doutorado Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo.
- Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MBR, Cordeiro I, Fuertes-Aguilar J, Meira RMS. 2015. Foliar secretory structures in crotonae (Euphorbiaceae): diversity, anatomy, and evolutionary significance. *American Journal of Botany* 102: 1-15.
- Webster GL. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 33-144.
- Wurdack KJ, Davis CC. 2009. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* 96: 1551–1570.

ARTIGO I: LATICÍFEROS E NECTÁRIOS FOLIARES CRATERIFORMES EM *MICROSTACHYS SERRULATA* (MART. & ZUCC.) Müll.Arg. (HIPPOMANEAE: EUPHORBIACEAE): ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURA

¹Luana de Jesus Pereira, ²Valeria Ferreira Fernandes, ¹Analú Zanotti, ¹Renata Maria Strozi Alves Meira

1. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36.570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2. Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Botânica 45.662-900 - Ilhéus, BA – Brasil. Autor de correspondência: rmeira@ufv.br

Resumo

Microstachys serrulata é uma espécie de ocorrência restrita no Cerrado e Campo Rupestre. Na folha, a presença de látex e nectários marginais de formato crateriforme é mencionada na sinopse da espécie. A presença e o tipo de estrutura secretora são caracteres de importância taxonômica, o que motivou a realização do presente trabalho. Amostras foliares contendo nectários e laticíferos foram processadas conforme técnicas usuais de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. O nectário da margem foliar é constituído por uma região central que é composta pela epiderme secretora em paliçada e recoberta por cutícula fina. As células epidérmicas que delimitam a região central são vacuolizadas e recobertas por cutícula espessa. O parênquima nectarífero subepidérmico é constituído por aproximadamente quatro camadas de células volumosas, com paredes delgadas, e vascularizado por xilema e floema. O citoplasma das células do parênquima é denso com núcleo conspícuo, numerosas mitocôndrias com formato alongado e numerosas cristas, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, dictiossomos, vacúolos com conteúdo granuloso e alguns leucoplastos ameboides. Plasmodesmos foram visualizados entre as células da epiderme secretora. A secreção hidrofílica composta por proteínas e polissacarídeos é eliminada por meio da ruptura da cutícula. Os laticíferos são do tipo não-articulados ramificados e se distribuem por entre as células do parênquima e associados ao sistema vascular no mesófilo e no pecíolo. Este é mais um relato da presença de laticíferos não-articulados ramificados na subfamília Hippomaneae.

Palavras-chave: nectários foliares, laticíferos não-articulados ramificados, Euphorbioideae.

Abstract

Microstachys serrulata is a species occurring in the Brazilian Cerrado and Campo Rupestre. The existence of latex and marginal crateriform-like glands in leaves is mentioned in the species synopsis. The presence and type of secretory structures are taxonomically relevant characters, which led us to perform this study. Leaf samples containing glands and laticifers were prepared according to usual methodologies for light and transmission electron microscopies. The leaf margin glands present a central region composed of a palisade secretory epidermis covered with a thin cuticle. The epidermal cells surrounding the central region are vacuolated and covered with a thick cuticle. The subepidermal secretory parenchyma is comprised of approximately four layers of large thin-walled cells and vascular tissues, xylem and phloem. The cytoplasm of parenchyma cells is dense, containing a prominent nucleus, numerous elongated mitochondria with developed mitochondrial cristae, developed rough endoplasmic reticulum, dictyosomes, vacuoles containing granular material, and a few amoeboids leucoplasts. Plasmodesmata were visualized between secretory epidermal cells. The hydrophilic secretion, composed of proteins and polysaccharides, is released through ruptures in the cuticle. The anatomical structure and the nature of the exudate allowed us to classify such glands as nectars. Laticifers are nonarticulated branched and they are located both between parenchyma cells and associated with the vascular system in the mesophyll and in the petiole. This is another report of nonarticulated branched laticifers in the subfamily Hippomaneae.

Key words: Leaf nectaries, nonarticulated branched laticifers, Euphorbioideae

Introdução

Microstachys serrulata Mart. & Zucc. (tribo Hippomaneae, subfamília Euphorbioideae) é um arbusto ou subarbusto latescente que apresenta 1 a 8 pares de glândulas marginais de formato crateriforme (Pscheidt 2015). Com base em dados morfológicos e moleculares, *Microstachys* A. Juss, que era uma seção de *Sebastiania* Spreng. Pax e Hoffmann (1912), foi segregado (Esser, 1998) e elevado ao nível de gênero (Pscheidt, 2015). A presença de látex e glândulas marginais ou submarginais é uma característica marcante que foi utilizada para distinguir *Microstachys* (Pscheidt, 2015), uma vez que as folhas de *Sebastiania* são eglandulares (Esser, 1998). Adicionalmente, no estudo de anatomia aplicada à taxonomia, a ausência de glândulas na margem da folha de *Sebastiania* e a presença em *Microstachys* foi apontada como uma possível sinapomorfia micromorfológica (Capítulo 1). Apesar da importância dessas estruturas para fins taxonômicos e filogenéticos, carecem de descrições que permitam identificar o tipo de laticífero e o tipo de glândula nas folhas de *Microstachys*, o que pode limitar o uso deste caráter.

Estruturas secretoras foliares já foram anatomicamente descritas em diversas espécies de Euphorbiaceae, como os nectários marginais de *Sapium glandulosum* Müell. Arg (Coutinho et al. 2010), laticíferos do tipo articulado anastomosado de *Sapium haematospermum* Müll.Arg. (Demarco et al. 2013) e não articulado ramificado em *Sapium glandulosum* (Andrade et al. 2017) na tribo Hippomaneae. Já na tribo Crotonaeae foram descritos laticíferos do tipo articulado anastomosados e não-anastomosados, tricomas secretores, idioblastos secretores, coléteres e nectários em *Astraea*, *Brasiliocroton* e diversas seções de *Croton* (Vitarelli et al. 2015; Feio et al. 2016; Feio et al. 2018), além de nectários em *Croton urucurana* Baill. Freitas e Paoli (1999) e *Croton amentiformis* Riina, sp. nov. (Rinna et al. 2015). Na tribo Crotonaeae, essas estruturas secretoras foram enfatizadas como caracteres relevantes para a taxonomia (Feio et al. 2018) e para abordagem evolutiva (Vitarelli et al. 2015). Assim, caracterizar as glândulas presentes em Hippomaneae, contribuirá para futuros estudos filogenéticos.

Nectários são estruturas secretoras de formatos variados que secretam néctar, uma substância açucarada composta principalmente por glicose, frutose e sacarose e também por outras substâncias, tais como: polissacarídeos, proteínas, aminoácidos, lipídios, alcaloides, dentre outras (Fahn 1979; Nepi 2007). A variação

morfoanatômica, e os distintos padrões de distribuição dos nectários foliares têm sido utilizados em abordagens taxonômicas e evolutivas em diferentes famílias botânicas (Pascal et al. 2000; Dalvi et al. 2013). Anatomicamente, os nectários das folhas de Euphorbiaceae geralmente são vascularizados por xilema e floema e constituídos por epiderme secretora em paliçada, com cutícula delgada ou espessa, o parênquima nectarífero é composto por uma a 12 camadas de células, cujas paredes são finas com citoplasma denso (Coutinho et al. 2010; Vitarelli et al. 2015; Feio et al. 2016).

Nectários podem ser confundidos com outras estruturas secretoras como, por exemplo, coléteres que podem ocupar a mesma posição, ter semelhança em sua morfologia e composição química do exudado (Thomas 1991; González 1998; Feio et al. 2016). Por exemplo, na margem das folhas de *Croton orinocensis* (seção *Cleodora* subseção *Spruceani*) ocorrem coléteres de forma alternada com os nectários (Vitarelli et al. 2015). Anatomicamente é possível diferenciar nectários e coléteres por meio da sua estrutura, composição química da secreção e período de atividade, uma vez que coléteres são estruturas secretoras presentes na superfície adaxial de órgãos vegetativos e reprodutivos, secretam mucilagem ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas que protegem os órgãos jovens das plantas contra a dessecação (Evert 2006; Fahn 1979). Essas estruturas secretoras são precoces quando comparadas aos nectários, pois secretam ativamente em órgãos jovens, senescem e geralmente são caducos quando os botões abrem e as folhas se expandem (Evert 2006; Fernandes et al. 2016). Em contrapartida os nectários são estruturas secretoras especializadas que secretam néctar, ocorrem nos diferentes órgãos das plantas e sua atividade é assincrônica com as dos coléteres, pois quando os coléteres já se encontram em plena atividade nos órgãos jovens das plantas, os nectários ainda estão se diferenciando, e quando os nectários se tornam ativos os coléteres estão senescentes (Feio et al. 2016; JD Miranda unpubl). Portanto, estudos anatômicos e ultraestruturais que permitam identificar a natureza química da secreção, a precocidade da atividade e os mecanismos envolvidos no processo secretor são de fundamental importância para esclarecer se a glândula da margem é um nectário ou um coléter.

Laticíferos também são estruturas secretoras amplamente difundidas nas Euphorbiaceae (Metcalfe e Chalk 1983). São caracterizados como células ou conjuntos de células especializadas na produção de látex, que é uma suspensão ou emulsão de pequenas partículas, tais como: óleos, resinas, ceras e borrachas dispersas num líquido contendo carboidratos, sais, ácidos orgânicos, esteróis, gorduras, mucilagem, dentre

outros componentes (Fahn 1979; Evert 2006). De acordo com Metcalfe e Chalk (1983) a composição química do látex nas Euphorbiaceae é variada, podendo ser rico em borracha como em *Hevea brasiliensis* ou rico em resinas como nas espécies de *Euphorbia*. A coloração do látex também pode variar de esbranquiçada e com aspecto leitoso que é característico de Euphorbioideae e viscoso, translúcido, amarronzado ou avermelhado característico de Crotonoideae (Rudall 1994; Feio et al. 2016).

Os laticíferos podem ser classificados em articulados quando apresentam origem multicelular e não-articulados quando se originam de uma única célula (Fahn 1979; Evert 2006; Hagel 2008). Laticíferos não articulados são mais comumente encontrados em Euphorbiaceae (Metcalfe e Chalk 1983; Rudall 1994), como registrado para *Croton amentiformis* (Riina et al. 2015) e *Croton urucurana* (Feio et al. 2016) da subfamília Crotonoideae e *Euphorbia plucherrima* (Fineran 1983) da subfamília Euphorbioidea. Entretanto, laticíferos articulados foram recentemente descritos para espécies de *Croton* das seções *Lamprocroton* e *Cleodora* (Vitarelli et al. 2015). Embora a presença de látex seja comum em Euphorbiaceae, estudos que descrevem o tipo de laticífero em Hippomaneae são escassos, tendo sido descritos laticíferos articulados anastomosados em *Sapium haemospermum* (Demarco et al. 2013) e não articulado ramificado em *Sapium glandulosum* (Andrade et al. 2017). Assim, fica evidente a necessidade de descrições anatômicas do tipo de laticíferos nas espécies de Hippomaneae para que esse caráter possa ser considerado em futuras abordagens taxonômicas e evolutivas.

Utilizando *M. serrulata* como uma espécie modelo para descrever o nectário foliar crateriforme e tipo de laticífero em *Microstachys* foram elaboradas as seguintes perguntas 1. A atividade secretora e a exsudação dos nectários seguem o padrão descrito para os nectários foliares nas espécies de Euphorbiaceae. 3. Os laticíferos de *M. serrulata* são não articulados e ramificados e o látex tem natureza química diversa e complexa.

Material e Métodos

Área de coleta e material vegetal

As coletas foram realizadas no *Campus* Morro do Cruzeiro da Universidade

Federal de Ouro Preto (UFOP), na cidade de Ouro Preto (Minas Gerais, Brasil) em área de campo rupestre sobre canga (Fig. 1A-C), sob as coordenadas 20°23'46.55''S e 43°30'30.96''O, onde o clima é o tropical de montanha com temperatura média de 18,5C° (Scalon et al 2012). O material testemunho está depositado no herbário VIC (Universidade Federal de Viçosa-UFV) sob o número VIC 52386.

Microscopia de luz

Foram coletadas folhas expandidas do terceiro nó sentido ápice para a base (Fig. 1D) provenientes de ramos de três indivíduos, e fixadas em formalina neutra tamponada – FNT (Johansen, 1940). No laboratório, as amostras foram mantidas por 48 horas sob vácuo. Para caracterização anatômica, amostras da região mediana e da margem da lâmina foliar foram incluídas em historresina (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2265, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), utilizando navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,7 (O'Brien e McCully, 1981) e as lâminas foram montadas com resina sintética (Permount-Fisher New Jersey, USA).

Para a análise histoquímica, amostras do pecíolo contendo laticíferos e da margem foliar contendo nectários crateriformes e da porção mediana da lâmina foliar foram seccionadas transversal e longitudinalmente com auxílio de um micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil). Os testes histoquímicos empregados encontram-se sumarizados na Tabela 1, sendo os testes controles realizados simultaneamente.

As observações e a captura de imagens foram realizadas em microscópio de luz (modelo Olympus® AX70TRF Olympus Optical, Tokyo, Japan) com sistema U-Photo, com câmara digital acoplada (modelo: Zeiss HRC Göttingen, Germany), no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para as análises ultraestruturais, amostras do pecíolo e da porção mediana e glândula crateriforme na margem foliar foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 (10-12 horas). As amostras foram lavadas

no mesmo tampão, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratadas em série acetônica e incluídas em resina Spurr (1969). Secções de 60-70 nm foram obtidas com um ultramicrotomo (modelo RMC Products Power Tome-X), e contrastadas com acetato de uranila 5%, em solução aquosa, e citrato de chumbo (Reynolds 1963). A análise e a captura de imagens foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão (modelo Zeiss, Libra 120) com câmera digital acoplada. As análises foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Resultados

Descrição anatômica e histoquímica das glândulas crateriformes e laticíferos

As glândulas crateriformes são diminutas, não tendo sido notada exsudação durante os trabalhos de campo. Estas glândulas ocorrem aleatoriamente distribuídas em pares na margem foliar, que é serreada (Fig. 1D). Anatomicamente são visualizadas duas regiões nesta glândula: a porção periférica que delimita a depressão central (Fig. 2A). Na depressão central, a epiderme é secretora e constituída por células altas de parede e cutícula delgada e citoplasma denso, em arranjo compacto e organizadas em uma paliçada uniestratificada (Fig. 2A). As células da porção periférica são vacuolizadas e possuem parede e cutícula espessada (Fig. 2A). Não foi observado acúmulo de secreção no espaço subcuticular (Fig. 2B), inclusive na região que recobre a depressão central, cuja cutícula é fina. O parênquima subepidérmico é secretor e composto por duas a quatro camadas de células volumosas de parede delgada e citoplasma denso, sendo esta região vascularizada por xilema e floema (Fig 2C).

Nos cortes obtidos de amostras frescas e não submetidas aos reagentes nota-se uma coloração castanha nas células da região periférica da glândula (Fig. 2B). Os testes histoquímicos (Tab. 2), detectaram proteínas pela reação positiva ao azul de Coomassie (Fig. 2C). Polissacarídeos gerais foram identificados pela reação com o PAS (Fig. 2D). Tais compostos foram detectados nas células da epiderme secretora e nas células do parênquima secretor subepidérmico. Compostos fenólicos e alcalóides não foram detectados em nenhuma região da glândula crateriforme.

Os laticíferos não-articulados e ramificados encontram-se distribuídos pela

lâmina foliar e pecíolo (Fig. 3, 4). Na lâmina, encontram-se distribuídos entre as células do parênquima paliçádico, lacunoso (Fig. 3A-B) e próximos aos feixes vasculares (Fig. 3B). No pecíolo ocupam posição cortical dispondo-se por entre as células parenquimáticas e encontram-se associados ao sistema vascular (Fig 4). O látex tem coloração esbranquiçada e aspecto leitoso (Fig. 1D), rico em proteína e polissacarídeos (Tab. 2). Foram detectados grãos de amido em formato de bastão (4 B), polissacarídeos gerais pela reação com PAS (Fig. 4C). A reação com Xylidine Ponceau revelou a presença de proteínas no látex de *M. serrulata* (Fig. 4D). Foi detectada a presença de lipídios no látex pela reação com Sudan IV (4E) e borracha pela reação com Oil red (4F). Não foram detectados alcaloides, mucilagem/pectinas e compostos fenólicos no látex (Tab. 2).

Compartimentos e atividade secretora das glândulas crateriformes e dos laticíferos

Nas glândulas crateriformes, as células da epiderme secretora em paliçada apresentam núcleo proeminente e de formato alongado com cromatina descondensada e nucléolo evidente, tipicamente em intensa atividade de síntese (Fig. 5A). O citoplasma é denso e contém leucoplastos ameboides, muitas mitocôndrias com cristas evidentes, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido (Fig. 5B-D) e numerosos dictiosomos (Fig. 5E). Plasmodesmos entre as células epidérmicas secretoras adjacentes são comuns (Fig. 5 D, F).

As células do parênquima secretor subepidérmico possuem citoplasma denso com numerosos vacúolos que armazenam secreção de aspecto granuloso (Fig. 6A). Leucoplastos, mitocôndrias com formato alongado e cristas evidentes (Fig.6 A-D) são comuns. As células do parênquima secretor subepidérmico diferem das células do clorênquima que possuem inúmeros cloroplastos contendo evidentes grãos de amido temporário (Fig. 6E)

Nas células da epiderme que delimitam a depressão central, vacúolos repletos de material granuloso são mais evidentes (Fig. 7A) que nas células da epiderme secretora em paliçada da porção central (Fig. 7B). Outra diferença marcante pode ser notada na parede celular, que nas células que delimitam a depressão central é delgada e sem espaços intercelulares, em um arranjo compacto e é coberta por cutícula espessa, sem indícios de ruptura (Fig. 7A). Em contraste, os espaços intercelulares são amplos

entre as células da depressão central, inclusive contendo material granuloso semelhante ao observado no interior dos vacúolos (Fig. 7B). A cutícula que recobre essa região é mais delgada, e apresenta pontos de ruptura (Fig. 7B).

Em relação ao processo secretor verifica-se que vesículas contendo secreção saem dos dictiossomos, se aderem à membrana plasmática e a secreção é acumulada no espaço periplasmático (8A). A secreção que atravessa a membrana plasmática é acumulada nos espaços intercelulares, que se formam pela dissolução da lamela média (8B). O aumento no acúmulo de secreção pressiona as camadas cuticulares, forçando a passagem deste conteúdo até as camadas mais superficiais da cutícula (8C). Em alguns locais foi visualizada a distensão da cutícula (8B, C) que parece sofrer ruptura permitindo a exsudação da secreção (8D). Aparentemente esse processo é contínuo, levando a recomposição da cutícula a cada ciclo de secreção, sendo visualizado pequenos pontos de camadas cuticulares sobrepostas (Fig. 8E, F).

PRANCHAS E TABELAS

Tabela 1. Principais classes de compostos investigadas na região mediana da lâmina foliar, na glândula da margem e no pecíolo de *M. serrulata*.

	GRUPO DE METABÓLITO	TESTE APLICADO	REFERÊNCIAS
LÍPIDEOS	Lipídeos totais	Sudan IV	(Pearse 1980)
	Borracha	Oil Red	(Pearse 1980)
COMPOSTOS FENÓLICOS	Compostos fenólicos gerais	Dicromato de potássio	(Gabe 1968)
ALCALÓIDES	Alcalóides	Reagente de Wagner	(Furr & Mahlberg, 1981).
PROTEÍNAS	Proteínas	Xilidine Ponceau	(O'Brien & McCully, 1981)
		Azul de coomassie	(Fisher 1968)
POLISSACARÍDEOS	Polissacarídeos gerais	(PAS)	(O'Brien & McCully, 1981)
		Lugol	(Johansen 1940)
	Amido	Vermelho de Rutênio	(Johansen 1940)
	Pectinas		

Tabela 2. Resultados das reações para detecção das principais classes de compostos na região mediana da lâmina foliar, na margem e no pecíolo de *Microstachys serrulata*.

	GRUPO DE METABÓLITO	TESTE APLICADO	Nectário	Laticífero
LÍPIDEOS	Lipídeos totais	Sudan IV	-	-
	Borracha	Oil Red	-	-
COMPOSTOS FENÓLICOS	Compostos fenólicos gerais	Dicromato de potássio	-	-
ALCALÓIDES	Alcalóides	Reagente de Wagner	-	-
		Xilidine Ponceau	+	+
PROTEÍNAS	Proteínas	Azul de coomassie		+
POLISSACARÍDEOS	Polissacarídeos gerais	(PAS)	+	+
		Lugol	-	+
	Amido			
	Pectinas/mucilagem	Vermelho de Rutênio	-	-



Figura 1. *Microstachys serrulata* no campo. A campo Rupestre sob canga. B hábito arbustivo. C ramo reprodutivo. D seta branca indicando uma gota de látex.

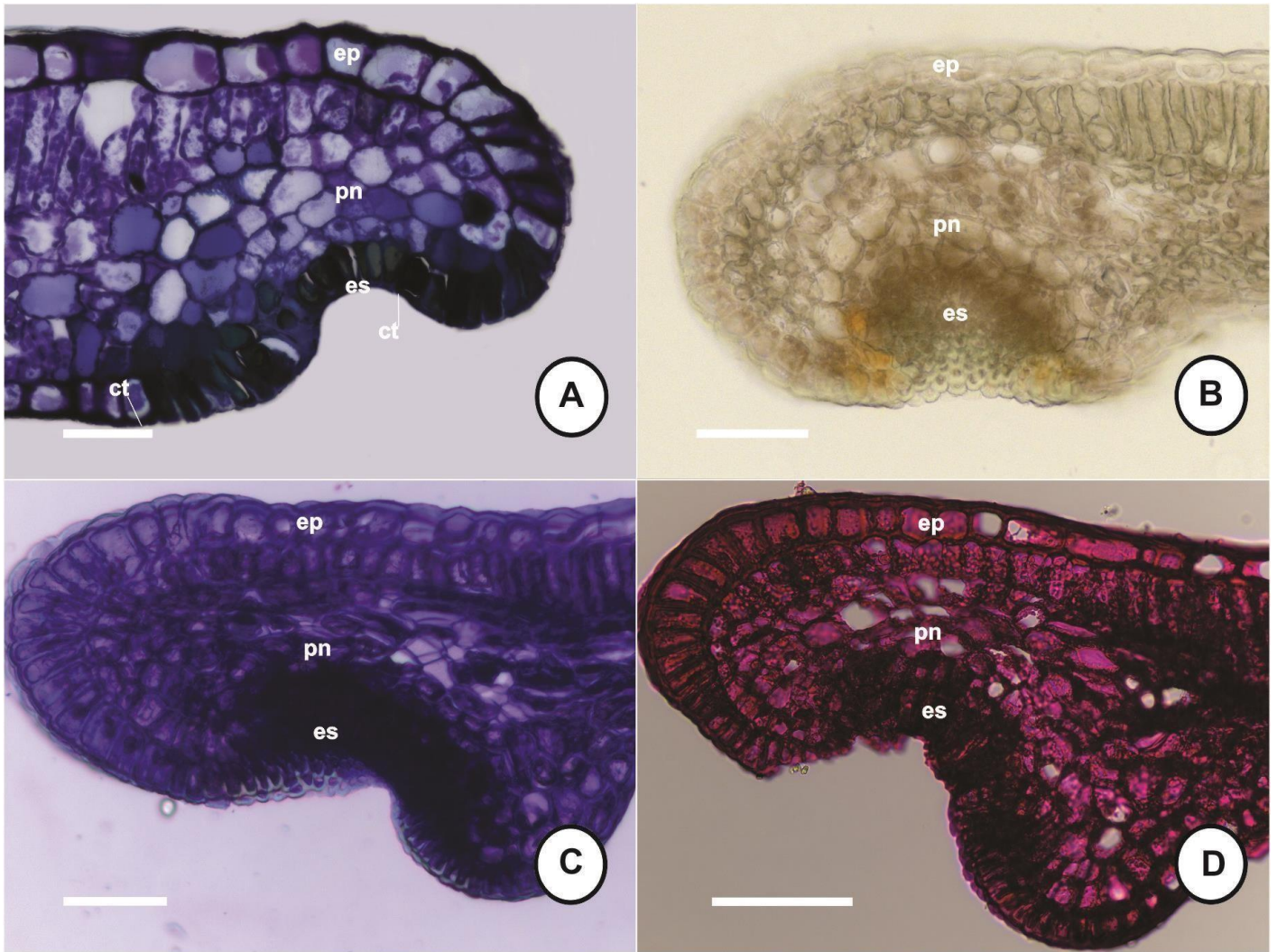


Figura 2. Nectário foliar crateriforme de *Microstachys serrulata*. A material corado com azul de toluidina. B branco. C azul de Coomassie evidenciando proteínas coradas fortemente de azul na região secretora. D PAS evidenciando polissacarídeos gerais. ep: epiderme, ct: cutícula, es: epiderme secretora, pn: parênquima nectarífero. Barra de escala = 50 µm.

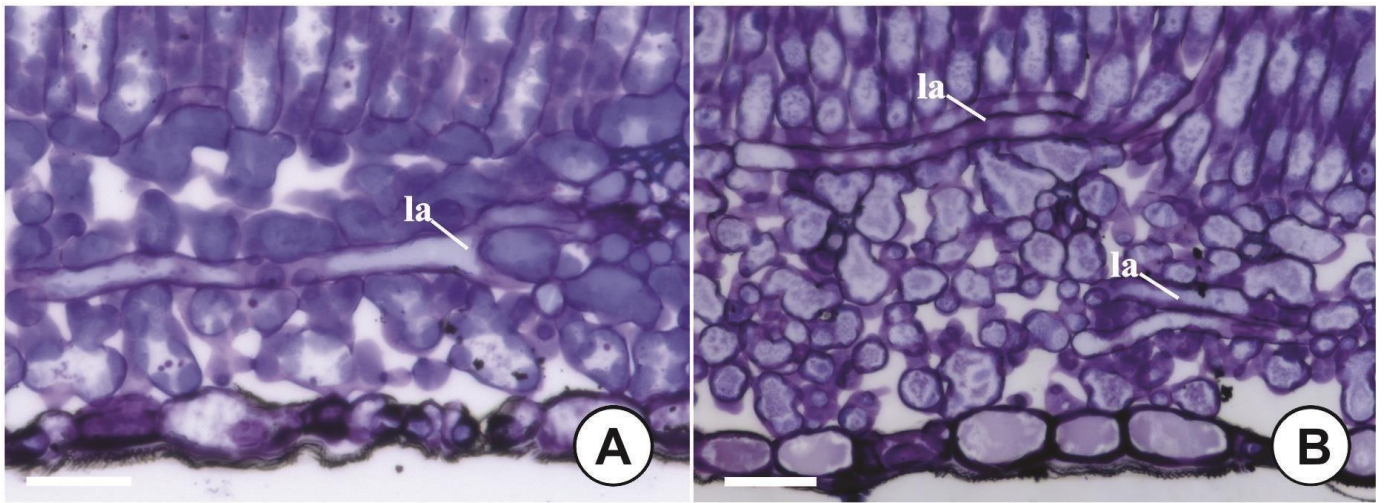


Figura 3. Laticíferos não articulados ramificados no mesofilo de *Microstachys serrulata*. la: laticífero. Barras de escala = 30 μm

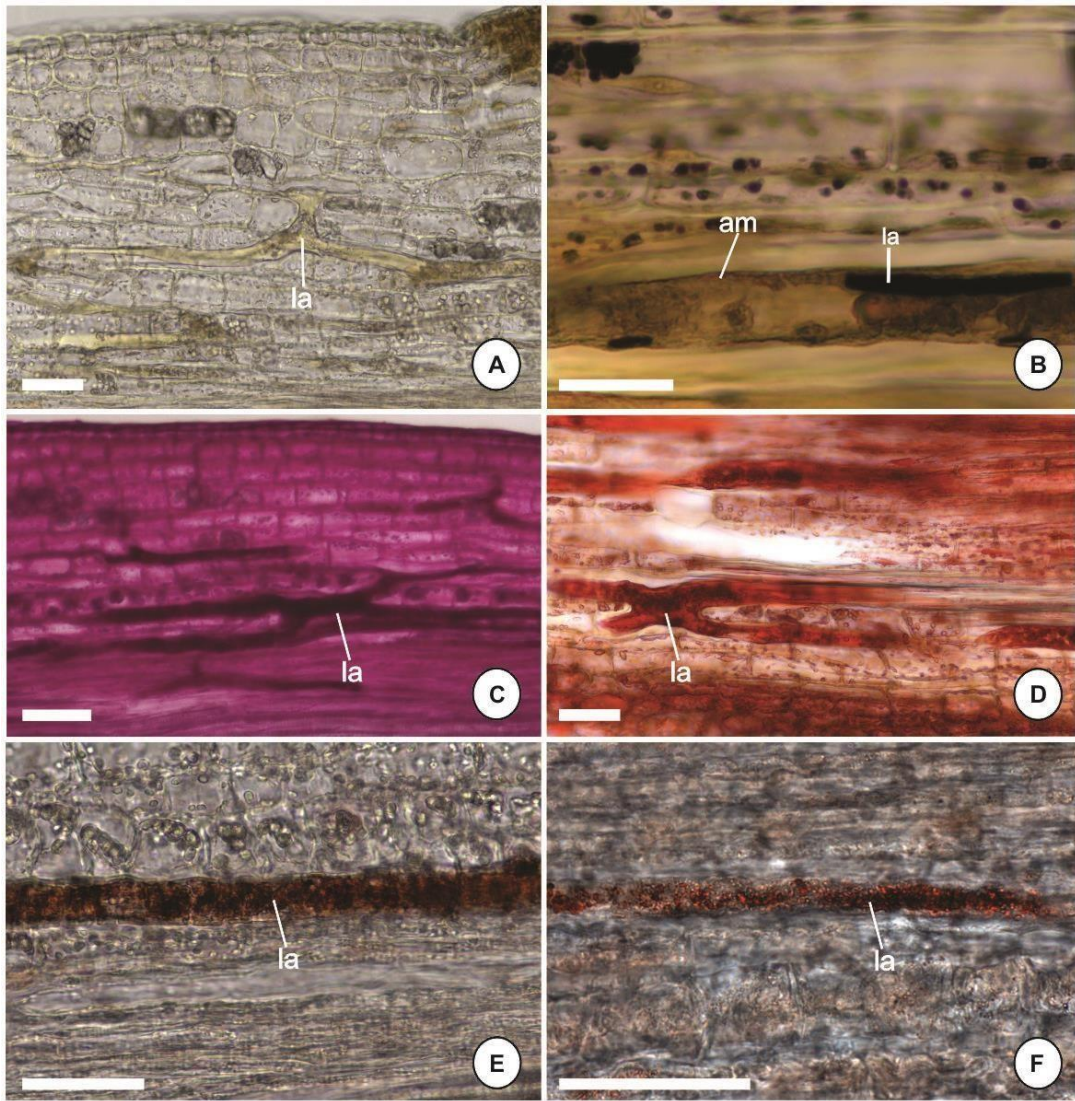


Figura 4. Testes histoquímicos evidenciando a composição química do látex contido nos laticíferos de *Microstachys serrulata*. A branco. B Lugol evidenciando grãos de amido em formato de bastão. C PAS evidenciando polissacarídeos gerais. D Xylidine Ponceau indicando proteínas. E Sudan IV evidenciando lipídios gerais. F Oil red evidenciando partículas de borracha. am: grãos de amido, la: laticífero. Barras de escala = A, B 50 μm ; C 80 μm . D, E, F 50 μm .

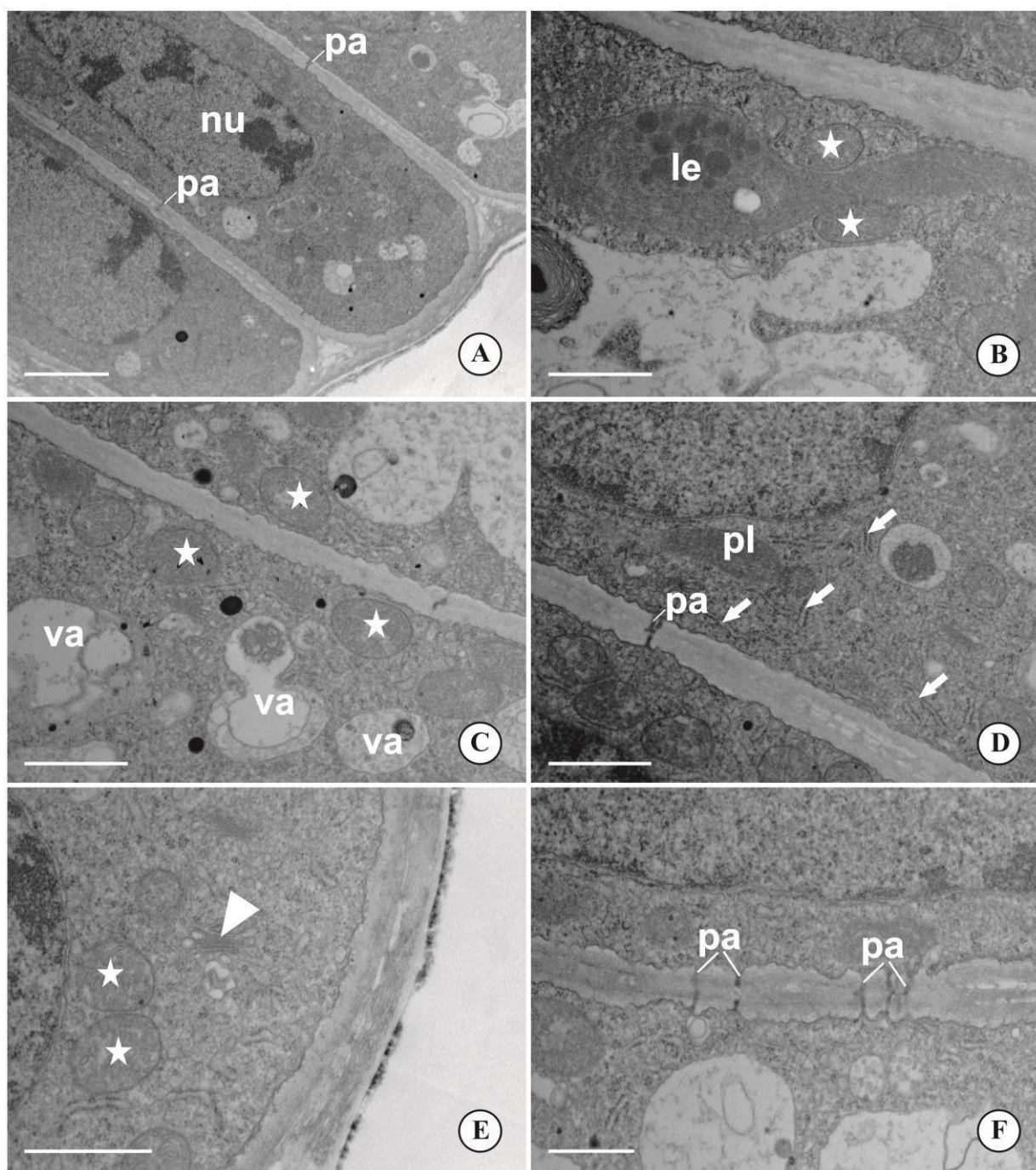


Figura 5. Ultraestrutura do nectário craterifome na folha de *Microstachys serrulata*. A epiderme secretora em paliçada com núcleo alongado, plasmodesmos e citoplasma denso. B detalhe da célula secretora com plastídios de formato ameboide e mitocôndrias. C, D numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos e plastídio. E mitocôndrias e dictiossomos. F detalhe dos plasmodesmos conectando as células secretoras adjacentes. Cabeça de seta: dictiossomo, le: leucoplasto, estrelas mitocôndrias, nu: núcleo, pa: plasmodesmos, pl: plastídio, seta: retículo endoplasmático rugoso, va: vacúolo. Barras de escala= A 2 μ m, B-F 1 μ m.

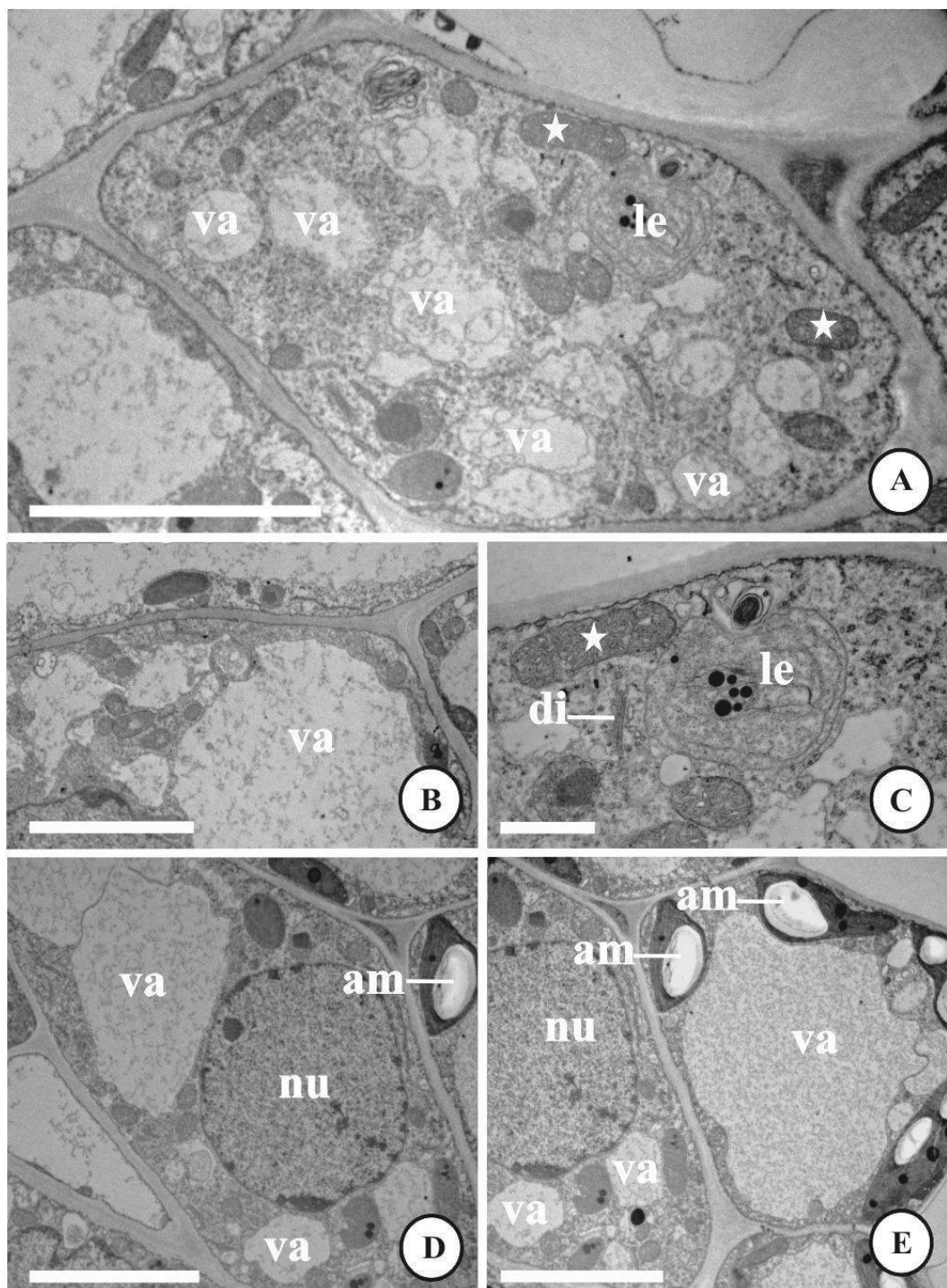


Figura 6. Ultraestrutura da glândula crateriforme na folha de *Microstachys serrulata*. (A) Célula do parênquima nectarífero com parede delgada, citoplasma denso com alta quantidade de mitocôndrias, vacúolos e leucoplastos. (B) detalhe da célula do parênquima secretor evidenciando mitocôndrias e um grande vacúolo com secreção. (C) detalhe das mitocôndrias com cristas evidentes formato alongado (seta branca) e arredondado (seta preta) e complexo de golgi (cabeça de seta). (D) detalhe do núcleo, vacúolos cheio de secreção. (E) Célula do parênquima secretor com núcleo evidente, célula do parênquima contendo cloroplastos com grãos de amido. am: grãos de amido, di: dictiossomo, le: leucoplastos, mi: mitocôndria, nu: núcleo, va: vacúolo. Barras de escala= A-B 5 μ m, C 1 μ m, D-E 5 μ m.

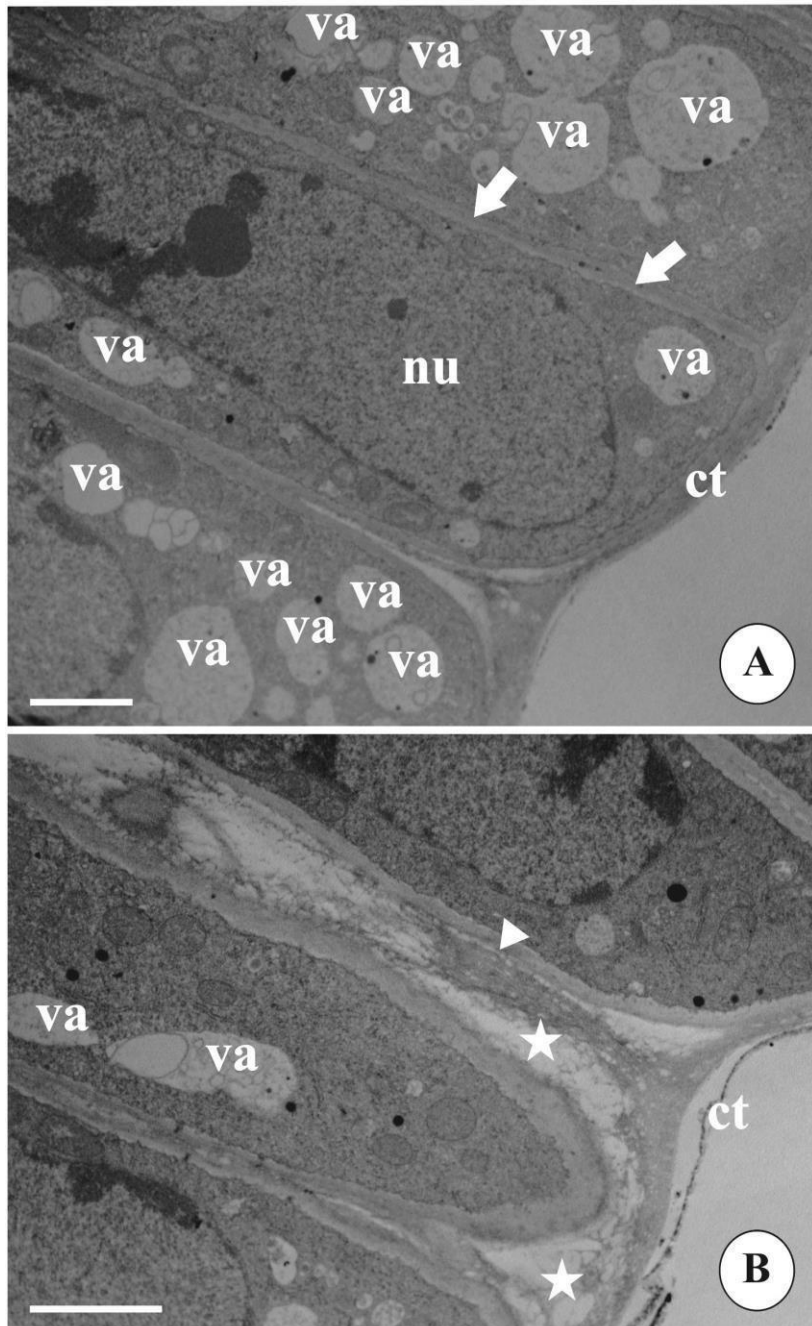


Figura 7. Ultraestrutura da glândula foliar de *Microstachys serrulata*. (A) célula da porção periférica com núcleo alongado, grande quantidade de vacúolos e parede aderida. (B) célula da porção central com núcleo conspícuo, pouca quantidade de vacúolo e amplo espaço intercelular cheio de secreção. Cu: cutícula, estrelas: secreção, nu: núcleo, setas brancas: parede celular aderida, cabeça de seta branca: parede celular não aderida, va: vacúolo. Barras de escala= A-B 2 μ m.

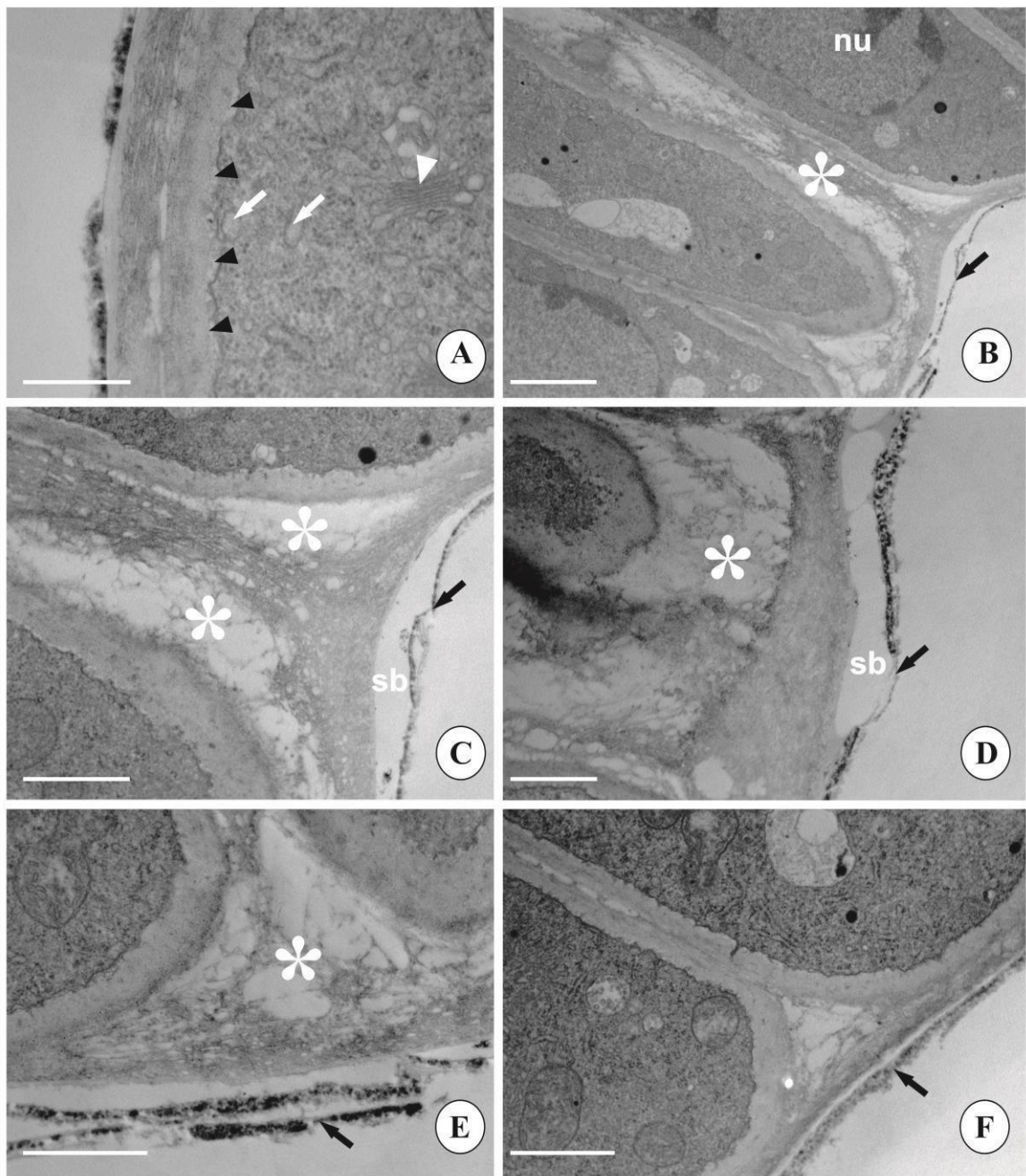


Figura 8. Ultraestrutura da glândula foliar *Microstachys serrulata*. Eventos que descrevem a eliminação da secreção. (A) vesículas saem do dictiossomo e se aderem à membrana plasmática e a secreção se acumula no espaço periplasmático. (B) devido a dissolução da lamela média a secreção é acumulada no espaço intercelular. (C) o grande acúmulo de secreção no espaço subcuticular desloca a cutícula. (D) ocorre ruptura da cutícula e liberação da secreção. (E) cutícula se reconstituindo (F) cutícula reconstituída e a secreção eliminada. Asteriscos: espaço intercelular com secreção, cabeça de seta preta: espaço periplasmático, cabeça de seta branca: dictiossomos, es: espaço subcuticular, seta branca: vesículas, seta preta: cutícula. Barras de escala = A 500nm, B 2 μ m, C-F 1 μ m.

Discussão

A estrutura anatômica, os compartimentos celulares e a ausência de compostos lipídicos e detecção de secreção rica em proteínas e polissacarídeos permitem-nos concluir que as glândulas marginais crateriformes de *M. serrulata* são nectários. Os laticíferos são não articulados ramificados e o látex é esbranquiçado de aspecto leitoso rico em proteínas e polissacarídeos além de conter grãos de amido em formato de bastão, lipídios e borracha.

Anatomicamente o nectário foliar de *M. serrulata* com epiderme secretora em paliçada, parênquima secretor subepidérmico e vascularização é semelhante às glândulas marginais descritas para as outras 15 espécies de *Microstachys* anatomicamente avaliadas (capítulo I). O arranjo em paliçada das células epidérmicas do nectário de *M. serrulata* também foi reportado em espécies de outros gêneros de Euphorbiaceae, como em *Sapium biglandulosum* Müell. Arg. da tribo Hippomaneae (Coutinho et al. 2010), em espécies da tribo Crotonae, como *Croton fragrans* (Vitarelli et al. 2015), *C. urucurana* Baill. (Feio et al. 2016) e *C. sarcopetalus* Müll. Arg. (Freitas et al. 2001).

A forma, a posição e a estrutura anatômica dos nectários foliares têm sido enfatizadas como caracteres importantes para a taxonomia de Euphorbiaceae. O formato crateriforme do nectário marginal de *M. serrulata* é comum entre as espécies de *Microstachys* (Pscheidt, 2015). Assim, os nectários crateriformes marginais nas folhas podem ser indicados como característica diagnóstica para o gênero. Em Euphorbiaceae, já foram descritos outros formatos de nectários foliares dentre eles, pateliforme em *Croton sarcopetalus* (Freitas et al. 2001), séssil em *Croton imbricatus* (Vitarelli et al. 2015), globular em *C. echinocarpus* (Feio et al. 2016) e circular reportado em *Maprounea brasiliensis* (Delgado et al. 2014). De acordo com Vitarelli et al. (2015) a presença de um par de nectário acropeciulares é característico da seção *Cleodora*, e a semelhança anatômica entre os nectários foliares das espécies de *Croton* e *Brasiliocroton* reforça a proximidade filogenética entre os dois gêneros. Os caracteres morfológicos, ontogenético e a presença de nectários não vascularizados em *Astrea* e vascularizados em *Croton* sustentam a segregação desses dois gêneros (De-Paula et al. 2011). A confirmação da presença, aliada a descrição da forma dos nectários foliares é, portanto, uma característica promissora para a taxonomia de

Euphorbiaceae que merece atenção em futuros trabalhos sistemáticos no grupo.

O tamanho diminuto e a exsudação por epiderme secretora em paliçada podem estar relacionados a pequena quantidade de exsudado produzido pelos nectários de *M. serrulata*. De acordo com Paiva et al. (2017), nectários extraflorais geralmente não possuem estômatos, o que implicaria em uma menor quantidade de néctar produzido, quando comparados com aqueles que possuem. Adicionalmente, fatores ambientais como a temperatura, umidade atmosférica e do solo podem influenciar a composição e a quantidade do néctar produzido pelos nectários (Fanh 1979; Nicolson et al. 2007). Apesar de não ter sido notada exsudação nos nectários foliares de *M. serrulata*, foram detectados proteínas e carboidratos o que evidencia a atividade destas estruturas. Resultados semelhantes foram obtidos para nectários foliares de outras espécies de Euphorbiaceae, que também foram histoquimicamente avaliados, como em *Ricinus comunis* (Fahn, 1979), *Sapium biglandulosum* (Coutinho et al. 2010), em *Croton echinocarpus* e em *C. urucurana* (Feio et al. 2016). O néctar é uma solução açucarada composta por glicose, frutose e sacarose, mas também pode conter outras substâncias como proteínas e polissacarídeos (Nicolson et al. 2007).

As características ultraestruturais presentes nas células secretoras do nectário de *M. serrulata*, tais como: núcleo conspicuo, numerosas mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático rugoso, plastídios e plasmodemos, foram relatadas como típicas de nectários e são um indicativo de alta atividade metabólica das células secretoras (Fahn 1988; Freitas e Paoli 1999; Paiva e Machado 2006; Gonçalves-Souza et al. 2016). A ocorrência de numerosas mitocôndrias confirma que o processor secretor requer alta demanda energética (Lüttge 1971; Fanh 1979). A ocorrência de dictiossomos e retículo endoplasmático rugoso está de acordo com a natureza química da secreção produzida, já que os testes histoquímicos confirmaram a natureza polissacarídica e proteica da secreção produzida por *M. serrulata* e são organelas comuns em nectários (Fahn, 1988).

Numerosos plasmodemos observados entre as células do parênquima secretor subepidérmico e as células da epiderme secretora em paliçada observados em *M. serrulata* evidenciam a via simplástica de transformação do pré-néctar em néctar (Lüttge 1971; Fahn 1988; Gonçalves-Souza et al. 2016). Adicionalmente aos açúcares e água transportados pelo xilema e floema que vascularizam o nectário de *M. serrulata*, a presença de cloroplastos contendo grãos de amido no parênquima adjacente indica a

contribuição desta fonte de açúcares para compor o néctar exsudado. Resultados semelhantes foram reportados para nectários foliares de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Leguminosae), de acordo com os autores cloroplastos contendo grãos de amido próximos aos nectários, indicam a participação dessas organelas na produção do néctar (Paiva e Machado et al. 2006).

As evidências ultraestruturais indicam que a exsudação do néctar pelo nectário foliar de *M. serrulata* ocorra em ciclos de produção, rompimento e recomposição da cutícula. Este evento é compatível com o modelo de secreção proposto por Paiva et al. (2017). Este autor descreve o deslocamento, ruptura e recomposição da cutícula em nectários cuja epiderme é destituída de estômatos, como ocorre em *M. serrulata*. O deslocamento inicial da cutícula pelo acúmulo de secreção no espaço subcuticular gera a pressão que promove a ruptura da cutícula e consequente liberação do néctar, com posterior recomposição da cutícula.

A presença de laticíferos não-articulados ramificados no mesofilo e pecíolo, próximos aos feixes vasculares de *M. serrulata*, também foi relatada em *Euphorbia antiquorum* (Kumar et al. 2012), e em espécies de *Croton* (Vitarelli et al. 2015). Essas estruturas secretoras são bastante comuns em Euphorbiaceae, e foram apontadas como caracteres plesiomórficos na família (Rudall, 1994). Os laticíferos representam caracteres importantes na taxonomia de Euphorbiaceae, pois em espécies de *Croton*, *brasiliocroton* e *Astrea*, a presença de laticíferos não-articulados juntamente com outros caracteres foliares indicam a semelhança morfológica entre os três gêneros da tribo Crotoneae (Sá-Haiad et al. 2009). Embora os estudos sobre laticíferos na subfamília Euphorbioideae sejam bem documentados, ainda são necessários estudos anatômicos mais acurados na tribo Hippomaneae.

Em *M. serrulata* o látex apresenta coloração branca e aspecto leitoso o que foi considerado como uma característica típica da tribo Hippomaneae (Gilbert, 1994). O látex presente em *M. serrulata* possui substâncias hidrofílicas, tais como: proteínas e polissacarídeos, essa informação corrobora dados relatados sobre a presença de substâncias hidrofílicas no látex de outras espécies de Euphorbiaceae como: *Euphorbia sipolisii* e *Joannesia princeps* (Gagliardi et al. 2016). Grãos de amido em formato de bastão observados no látex de *M. serrulata* foram relatados por Biesboer e Mahlberg (1981) em outras espécies de Euphorbiaceae, esses autores descreveram a morfologia dos grãos de amido presentes nas espécies de *Euphorbia*, um dos maiores

gêneros de Euphorbiaceae, com uma grande variabilidade morfológica (Horn et al. 2012). Eles descreveram formato fusiforme (*E. myrsinites*), osteóide (*E. pseudocactus*), discóide (*E. lactea*) e o formato em bastão em (*E. lathyris*) como o encontrado em *M. serrulata*. Com base nas diferentes morfologias destes grãos de amido, os autores separaram grupos de espécies dentro de *Euphorbia*, verificando qual tipo predominava em cada grupo. As espécies suculentas cactiformes possuem grãos de amido no formato osteóide e discóide, as suculentas anãs osteóides, as herbáceas possuem o formato bastão, as suculentas o formato de fuso, as suculentas de Madagascar e as suculentas coralline o osteóide. Assim, um estudo sistemático sobre a presença e formato dos grãos de amido do látex de Hippomaneae são necessários para se averiguar a seu potencial uso em estudos taxonômicos e sistemáticos.

Com base no estudo anatômico, histoquímico e ultraestrutural pode-se concluir que as glândulas marginais crateriformes de *M. serrulata* são nectários. Estes diminutos nectários produzem pouco exsudado, mas suas células exibem características histoquímicas e ultraestruturais relacionadas a alta atividade secretora que seguem o padrão registrado para espécies de Euphorbiaceae. Os laticíferos de *M. serrulata* são não-articulados ramificados e produzem látex rico em proteínas e polissacarídeos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Nós agradecemos ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e pela bolsa de produtividade em pesquisa para RMSAM (# 307762/2016-5), a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio e financiamento de toda a pesquisa. Agradecemos ao laboratório de anatomia vegetal pela infraestrutura, Aurora e Rosana pela assistência técnica. Ao núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV na pessoa do Gilmar pela assistência técnica. Agradecemos a Analú e Elienai pelo processamento das amostras. A Deborah Aragão Soares pelo apoio na coleta no Campus da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Referências Bibliográficas

- Andrade EA, Folquitto DG, Luz LEC, Paludo KS, Farago PV, Budel JM (2017) Anatomy and histochemistry of leaves and stems of *Sapium glandulosum*. Rev bras Farmacogn 27: 282-289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.001>
- Biesboer DD, Mahlberg PG (1981). Laticifer starch grain morphology and laticifer evolution in *Euphorbia* (Euphorbiaceae). Nord J Bot 1: 447-457. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1756-1051.1981.tb00710.x>
- Coutinho IAC, Valente VMM, Meira RMSA (2010). Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). Australian J Bot 58: 224-232. <http://dx.doi.org/10.1071/BT09200>
- Coutinho IAC, Francino DMT, Azevedo AA, Meira RMSA (2012). Anatomy of the extrafloral nectaries in species of *Chamaecrista* section *Absus* subsection *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae). Flora 207: 427-435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2012.03.007>
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA (2013). Extrafloral nectaries in neotropical Gentianaceae: occurrence, distribution patterns, and anatomical characterization. Am J Bot 100: 1779–1789. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1300130>
- Delgado MN, Bão NS, Amaral LIV, Rossatto DR, Morais HC (2014). Extrafloral nectary morphology and the role of environmental constraints in shaping its traits in a common Cerrado shrub (*Maprounea brasiliensis* A. St.-Hill: Euphorbiaceae). Braz J Bot 37: 495-504. <http://dx.doi.org/10.1007/s40415-014-0062-5>
- Demarco D, Castro MM, Ascensão L (2013). Two laticifer systems in *Sapium haemospermum* new records for Euphorbiaceae. Botany 91:545-554. <http://dx.doi.org/10.1139/cjb-2012-0277>
- De-Paula OG, Sajo MG, Prenner G, Cordeiro I, Rudall PJ (2011). Morphology, development and homologies of the perianth and floral nectaries in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae-Malpighiales). Plant Syst Evol 292: 1-14. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-010-0388-9>
- Esser HJ (1998). New combinations in *Microstachys* (Euphorbiaceae). Kew Bulletin 53: 955-960.
- Evert, RF (2006). Esau's Plant anatomy. Meristems, cells, and tissues of the plant body their structure, function, and development. 3 ed. Wiley, New Jersey.
- Fahn A (1979). Secretory tissues in plants. London: Academic Press.
- Fahn A (1998). Secretory tissues in vascular plants. New Phytologist 108: 229-257.
- Feio AC, Riina R, Meira RMSA (2016). Secretory structures in leaves and flowers of two dragon's blood *croton* (Euphorbiaceae): new evidence and interpretations. Int. J. Plant Sci 177: 511-522.

<http://dx.doi.org/10.1086/685705>

- Feio AC, Meira RMSA, RIINA R (2018). Leaf anatomical features and their implications for the systematics of dragon's blood, *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae). Bot J Linn Soc 187: 614-632. <http://dx.doi.org/10.1093/botlinnean/boy038>
- Fernandes VF, thadeo M, Dalvi VC, Marquete R, Meira RMSA (2016). Colleters in *Casearia* (Salicaceae): a new interpretation for the theoid teeth. Bot J Linn Soc 181: 682-691. <http://dx.doi.org/10.1086/690460>
- Fineran BA (1983). Differentiation of Non-articulated Laticifers in *Poinsettia* (*Euphorbia pulcherrima* Willd.). Annals of Botany. 52: 279-293.
- Freitas L, Paoli AAS (1999). Structure and ultrastructure of the extrafloral nectaries of *Croton urucurana* BaILL. (Euphorbiaceae). Bol Bot Univ São Paulo 18: 1-10.
- Freitas L, Bernardello G, Galetto L, Paoli AAS (2001). Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). Bot J Linn Soc 136: 267- 277. <http://dx.doi.org/10.1006/bojl.2000.0437>
- Furr M, Mahlberg PG (1981). Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153–159.
- Gabe M (1968). Techniques histologiques. Masson & Cie., Paris.
- Gagliardi KB, Cordeiro I, Demarco D (2016). Protection and attraction: bracts and secretory structures in reduced-in florescences of Malpighiales. Flora 220: 52-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2016.02.003>
- Gilbert MG (1994). The relationships of the Euphorbieae (Euphorbiaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 81: 283-288.
- Gonçalves-Souza P, Gonçalves EG, Sousa Paiva EA (2016). Extrafloral nectaries in *Philodendron* (Araceae): distribution and structure. Bot J Linn Soc 180: 229-240. <http://dx.doi.org/10.1111/boj.12366>
- Gonzalez AM. 1998. Colleters in *Turnera* and *Piripeta* (Turneraceae). Bot J Linn Soc 128: 215-228. <http://dx.doi.org/1095-8339.1998.tb02118.x>
- Hagel JM, Yeung EC, Facchini PJ (2008). Got milk? The secret life of laticifers. Trends in Plant Science 13:631-639. <http://dx.doi.org/10.101>
- Horn JW, Van Ee BW, Morawetz JJ, Riina R, Steinmann VW, Berry PE, Wurdack KJ. 2012. Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). Mol Phylogenetics Evol 63: 305-326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.022>
- Johansen DA (1940). Plant Microtechnique. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Kumar SP, Rajeswari B, Rao AP, Reddy LV, Khan PSSV (2012). Anatomical and ultrastructural peculiarities in the laticifers of *Euphorbia antiquorum* L. A potential source for the biofuel production. Curr Bot 4: 12-17.
- Lüttge U (1971). Structure and function of plant glands. Annual Review of Plant Physiology 22: 23-44.

- Metcalf CR, Chalk L (1983). *Anatomy of the dicotyledons*, Vol. 2, 2nd edn. Oxford: Clarendon Press.
- Nepi M (2007). Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. (eds.) *Nectaries and Nectar*. Dordrecht, Springer. p. 129-167.
- Nicolson, S.W., Thornburg, R.W (2007). Nectar chemistry. In: Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht.
- O'brien TP, Mccully ME (1981). *The study of plant structure principles and selected methods*. Termarcarphi Pty. Ltda., Melbourne.
- Paiva EAS, Machado SR (2006). Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae). *Acta Bot Bras* 20:471-482. <http://dx.doi.org/10.1>
- Paiva EAS (2017). How does the nectar of stomata-free nectaries cross the cuticle? 31: *Acta Bot. Bras* 525-530. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-33062016abb0444>
- Pascal LM, Motte-Florac EF, Mckey DB (2000). Secretory Structures on the Leaf Rachis of Caesalpinieae and Mimosoideae (Leguminosae): Implications for the Evolution of nectary glands. *Am J Bot* 87: 327-338. <http://dx.doi.org/10.2307/2656628>
- Pax F, Hoffmann. K (1912). Euphorbiaceae-Hippomaneae. In: Engler, A. (ed.). *Das Pflanzenreich Regni vegetabilis conspectus* IV.147.V. (Heft 52). Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Pearse AGE (1980). *Histochemistry: Theoretical and applied*. vol. 2, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingston.
- Pscheidt AC (2015). O gênero *Microstachys* A. Juss. e a tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae). Tese (Doutorado Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo.
- Reynolds ES (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque staining in electron microscopy. *J. Cell Biol* 17: 208–212.
- Riina R, Cumbicus N, Feio AC, Ceróne CE, Meira RMSA, Berry PE (2015). A new species of dragon's blood *Croton* (Euphorbiaceae) from South America with singular inflorescences. *J Plant Taxonomy Geography* 70: 187-192. <http://dx.doi.org/10.1080/00837792.2015.1020129>
- Rudall P (1994). Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): Homology and Evolution. *Ann Missouri Bot Gard* 81: 270-282. <http://dx.doi.org/10.2307/2992097>.
- Sá-Haiad B, Serpa-Ribeiro ACC, Barbosa CN, Pizzini D, Leal DO, Senna-Valle L, Santiago-Fernandes LDR (2009). Leaf structure of species from three closely related genera from tribe Crotonae Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). *Plant Syst Evo* 283:179-202. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-009-0229-x>
- Scalon VR, Martins C, Cândido ES (2012). Florística dos remanescentes de campo rupestre sobre canga no Campus Morro do Cruzeiro/UFOP, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. *MG Biota* 5: 19-23.

- Spurr AR (1969). A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-43.
- Thomas V (1991). Structural, Functional and Phylogenetic Aspects of the Colleter. *Ann Bot* 68: 287-305. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088256>.
- Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MBR, Cordeiro I, Fuertes-Aguilar J, Meira RMS (2015). Foliar secretory structures in crotonae (Euphorbiaceae): diversity, anatomy, and evolutionary significance. *Am J Bot* 102: 1-15. [10.3732/ajb.1500017](https://doi.org/10.3732/ajb.1500017)

**ARTIGO II: *MICROSTACHYS* A. JUSS. E *SEBASTIANA* SPRENG.
(HIPPOMANEAE-EUPHORBIACEAE): A ANATOMIA FOLIAR
CORROBORA PARA O TRATAMENTO COMO GÊNEROS DISTINTOS?**

¹Luana de Jesus Pereira, ²Allan Carlos Pscheidt, ³Sarah Maria Athiê-Souza, ⁴Inês Cordeiro, ³Margareth Ferreira de Sales, ³André Laurênio de Melo, ^{1*}Renata Maria Strozi Alves Meira

*Autor de correspondência: rmeira@ufv.br

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36.570- 000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ²Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU. Rua Taguá, 337, Liberdade, CEP: 01508010 - São Paulo, SP – Brasil.

³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Área de Botânica, Pós- graduação em Botânica, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Instituto de Botânica, Divisão de Fitotaxonomia, Seção de curadoria do Herbário, AV. Miguel Stefano, 3687 Água Funda, CEP: 04301-012 - São Paulo, SP- Brasil

Premissa da pesquisa: Com base nos estudos morfológicos e filogenéticos *Microstachys* foi reestabelecido como um gênero distinto de *Sebastiania*. Os caracteres anatômicos são dados adicionais que corroboram a distinção desses gêneros, bem como o reconhecimento das espécies dentro de cada táxon.

Metodologia: Para análise em microscopia de luz, foram utilizados protocolos usuais. Amostras foliares foram incluídas em historresina, seccionadas, coradas e as lâminas montadas com resina sintética. Parte das amostras foi submetida a técnica de diafanização para observação dos padrões de vascularização e tipologia de estômatos.

Resultados principais: Lâmina foliar plana, epiderme unisseriada, estômatos paracíticos, mesofilo dorsiventral, nervura central projetada para face adaxial, feixe colateral, parênquima paliçádico na nervura central e traqueídes alargadas são caracteres comuns aos dois gêneros. Destacam-se como caracteres distintivos a margem serreada com células epidérmicas altas, epiderme com tricomas simples e estrelados, cutícula estriada e células com contorno reto a levemente ondulado, folhas anfiestomáticas, nervuras de menor porte areoladas com terminação dicotômica, presença de nectários marginais ou submarginais crateriformes em *Microstachys*. Em *Sebastiania* a margem foliar é denteada e não apresenta células altas, a cutícula é lisa e a parede das células epidérmicas é sinuosa, as folhas são hipoestomáticas, glabras e eglandulares, nervuras de menor porte são areoladas com terminação dendrítica. Nectários com crateriforme ocorrem em posição marginal somente em *S. klotzchiana*, e *S. serrata*. A nervura central é projetada para a face adaxial, o feixe é colateral, e laticíferos foram observados somente em *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis*, *S. macrocarpa*.

Conclusões: Os caracteres anatômicos foliares são úteis para distinguir as espécies de *Microstachys* e *Sebastiania*, sendo possível diferenciar as espécies a partir dos caracteres vegetativos. Não foram detectados caracteres que pudessem definir os dois clados neotropicais de *Microstachys*. A presença de nectários na margem de *S. klotzchiana*, *S. membranifolia* e *S. serrata* e de laticíferos em *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis*, *S. macrocarpa* deve ser avaliada em futuros tratamentos taxonômicos.

Palavras chave: anatomia foliar, nectários crateriformes, laticífero, *Microstachys* Neotropical.

Premise of the study: This study aims to identify leaf anatomical characters helping to distinguish species of *Microstachys* and *Sebastiania*. In addition, it was analyzed whether any morphological feature may contribute to differentiate these two genera. In addition, the two Neotropical clades of *Microstachys* hypothesized by molecular phylogeny were compared in order to find anatomical differences.

Methods: Standard methodology for light microscopy were utilized. Leaf samples were embedded in historesin, sectioned, stained and mounted in resin. Part of the samples was cleared to visualize the leaf venation pattern and stomata.

Key Results: Flat leaf blade, uniseriate epidermis, paracytic stomata, dorsiventral mesophyll, central vein designed for adaxial face, collateral bundle, palisade parenchyma in the central vein and broad tracheids are the common species of both genera. Distinguishing features are the serrated margin with high epidermal cells, epidermis with simple and starched trichomes, striated cuticle, and cells with straight contour with a wavy plane, amphistomatic leaves, smaller veins with dichotomous termination, presence of marginal or submarginal glands crateriformes in *Microstachys*. In *Sebastiania* the foliar membrane is denticated and the cells high cuties, glabrous and eglandular, smaller veins are bordered with dendritic terminations. Nectaries with a crateriform shape are only marginal in *S. klotzchiana*, *S. membranifolia* and *S. serrata*. The central vein is projected to an adaxial face, which is collateral, and laticiferous were observed only in *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis*, *S. macrocarpa*.

Conclusions: Anatomical characters are useful in distinguishing species of *Microstachys* and *Sebastiania*, and it is possible to differentiate species using vegetative traits. No character helping defining both Neotropical clades of *Microstachys* could be detected. The presence of marginal glands in *S. klotzchiana* and *S. serrata*, and laticifers in *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis* and *S. macrocarpa* should be evaluated in further taxonomical treatments.

Keywords: crateriform nectaries, laticifers, leaf anatomy, Neotropical clades of *Microstachys*.

INTRODUÇÃO

Microstachys foi descrito por Jussieu (1824) e circunscrito como uma seção de *Sebastiania* (Spreng.) na tribo Hippomanneae (Euphorbiaceae, Euphorbioideae). Devido à semelhança morfológica com outros gêneros da tribo, algumas espécies de *Microstachys* foram circunscritas em *Stillingia* Garden ex L. e até mesmo, em *Tragia* L., da tribo Plukenetiae (Govaerts et al. 2000). A complexidade taxonômica de *Microstachys* é reforçada pelo tamanho reduzido e uniformidade de suas flores que dificulta a diferenciação das espécies, além de serem comuns erros de identificação em coleções herborizadas e também em listas de espécies (Pscheidt 2015).

Microstachys e *Sebastiania* são frequentemente confundidos (Esser 1998) por compartilharem algumas vezes inflorescências bissexuais (tirso espiciformes), com flores solitárias ou reunidas em grupos de dois a três, sendo as pistiladas dispostas na porção proximal e as estaminadas na porção distal do eixo principal; estames livres ou conados na base; cálice trilobado ou com sépalas livres; pétalas e disco estaminal ausentes e ovário tricarpelar com três estiletos inteiros (Esser 2001; Pax & Hoffmann 1912; Webster 1994).

As espécies de *Microstachys* apresentarem hábito herbáceo ou subarborescente; margem foliar inteira ou com denticulos e glândulas na região submarginal do limbo, algumas vezes marginais; inflorescências opositifólias; ovários e frutos corniculados e sementes carunculadas (Pscheidt e Cordeiro 2012; Pscheidt, 2015). Enquanto que as espécies de *Sebastiania* são arbustos ou árvores, raramente subarborescentes com margem foliar serrada, raro inteiras, limbo eglandulares, apresentam flores pistiladas séssis ou curtamente pediceladas, flores pistiladas séssis ou curtamente pediceladas, flores estaminadas aclamídeas ou monoclamídeas, sépalas livres, ovário e frutos lisos raro equinados, sementes ecarunculadas, e columela persistente com excrecência carnosa (Esser 1994, Melo 2006).

Atualmente, *Microstachys* compreende 24 espécies, destacando-se como um dos maiores gêneros de Hippomanneae. Trata-se de um táxon predominantemente tropical, com (*M. acetosella* (Milne-Redh.) Esser, *M. dalzielii* (Hutch.) Esser, *M. faradianensis* (Beille) Esser e *M. linearis* (J. Léonard) Pscheidt, Cordeiro & Esser) ocorrendo nos Paleotrópicos em savanas africanas em planícies arenosas da Ásia e da Austrália (*M. chamaelea* (L.) Müll. Arg.). Já as 19 espécies Neotropicais, ocorrem somente na América do Sul, sendo o Brasil considerado o centro de diversidade do

gênero (Pscheidt 2015). As espécies americanas estão distribuídas em fitofisionomias de Campos Rupestres, Caatinga, Cerrado e Restinga, com espécies endêmicas ou de distribuição restrita ou ampla.

Recentemente foi realizado um estudo filogenético com 15 espécies Neotropicais de *Microstachys* resultando em uma árvore com dois clados: o clado 1 composto por *Microstachys bidentata* (Mart. & Zucc.) Esser, *M. corniculata* (Vahl) A. Juss. ex Griseb., *M. daphnoides* (Mart.) Müll. Arg., *M. glandulosa* (Mart. & Zucc.) Esser & M. J. Silva, *M. hispida* (Mart.) Govaerts, *M. revoluta* (Ule) Esser, *M. salicifolia* (Mart. & Zucc.) M. J. Silva e *M. uleana* (Pax & K. Hoffm.) Esser, são morfologicamente homogêneas e tem ampla distribuição no Cerrado, Campo Rupestre e Restinga, exceto *M. revoluta* e *M. uleana*. Já *M. ditassoides* (Didr.) Esser, *M. heterodoxa* (Müll. Arg.) Esser, *M. marginata* (Mart.) Klotzsch ex Müll. Arg., *M. nana* M. J. Silva & Esser, *M. nummularifolia* (Cordeiro) Esser e *M. serrulata* (Mart.) Müll. Arg.) pertencem ao clado 2 e são morfologicamente heterogêneas com distribuição restrita ou endêmica, na Caatinga, Cerrado, Campo Rupestre ou Restinga (Pscheidt 2015). Embora *Microstachys* tenha sido considerado monofilético e *Sebastiania* tenha emergido como grupo irmão, não foram reconhecidas sinapomorfias morfológicas que dessem suporte a estes clados (Pscheidt 2015).

Devido a sua complexidade morfológica, *Sebastiania* é considerado um gênero taxonomicamente complexo e constituído por um número inconstante de espécies (Pax e Hoffmann 1912). Trata-se de um gênero essencialmente Neotropical e composto por 79 espécies (Pax e Hoffmann 1912). Grande parte desses problemas foi solucionada por Esser (1994), o qual restringiu o conceito de *Sebastiania* à seção homônima (*Sebastiania* sect. *Sebastiania*), que compreende cerca de 25 espécies. As demais espécies pertencentes às outras seis seções de Pax e Hoffmann (1912), embora necessitando de revisão, foram segregadas de *Sebastiania* e alocadas em *Gymnanthes* Sw., *Microstachys* A. Juss. *Ditrysinia* Raf. e *Pleradenophora* H.-J. Esser. Melo (2006) ao revisar o gênero *Sebastiania* propôs uma nova circunscrição com 17 espécies, sendo 12 espécies de ocorrência na América do Sul e o Brasil apontado como centro de diversidade do gênero. Esta nova circunscrição foi principalmente baseada no formato das glândulas das brácteas, morfologia e tipo de nervação foliar, posição da inflorescência e na morfologia do fruto e semente. É importante ressaltar que este trabalho foi baseado nos estudos de Pax e Hoffmann (1912, 1924), Esser (2001) e Govaerts et al. (2000), uma vez que a revisão de Melo (2006) está em vias de

publicação. O estudo filogenético realizado com Euphorbiaceae fundamentando-se em dados moleculares, apontou *Sebastiania* como polifilético (Wurdack et al. 2005).

Melo (2006) salientou que em face da ampliação do conhecimento referente à morfologia das espécies e a atribuição de maior valor a caracteres tais como glândulas foliares, frutos e sementes, uma nova concepção das relações entre os gêneros da tribo Hippomaneae está se formando. Nesse sentido, a investigação de caracteres anatômicos se faz necessária para *Microstachys* e *Sebastiania* visando auxiliar na distinção das suas espécies. Os caracteres anatômicos foliares têm se mostrado úteis na resolução de problemas taxonômicos em diferentes famílias de monocotiledôneas (Bromeliaceae -Montovani et al. 2012) e eudicotiledôneas (Malpighiaceae- Araújo et al. 2010; Salicaceae Thadeo et al. 2014; Sapotaceae - Almeida- Jr et al. 2013). Nos estudos taxonômicos de Euphorbiaceae o tipo, a posição e a composição química das estruturas secretoras são relevantes, Vitarelli et al. (2015) identificaram cinco tipos de estruturas secretoras nas espécies das seções *Cleodora* e *Lamprocroton* (coléteres, idioblastos, laticíferos, nectários extraflorais e tricomas secretores) as quais podem servir como marcadores morfológicos contribuindo em estudos taxonômicos em Crotonae. A semelhança anatômica e posição das estruturas secretoras encontradas em *Croton echinocarpus* Baill. e *C. urucurana* Baill. refletem a proximidade filogenética entre essas espécies (Feio et al. 2016; Rinna et al. 2009). A similaridade anatômica dos nectários extraflorais sustenta a proximidade entre *Croton* L. e *Brasiliocroton* P. E. Berry & Cordeiro (Vitarelli et al. 2015). A presença de tricomas glandulares capitados é característica das espécies de *Hancea* Seem, enquanto que os tricomas glandulares em forma de disco são típicos das espécies de *Mallotus* Lour. (Pecnikar et al. 2012), e tais caracteres mostraram-se úteis para a diferenciação infragenérica nestes dois táxons. Em *Manihot*, a presença de epiderme papilosa é uma característica importante na distinção de *M. violacea* Pohl e *M. jacobinensis* Müll. Arg., uma vez que as demais espécies possuem epiderme com células unisseriadas de formato retangular (Neto et al. 2014). Feio et al (2018) elencaram caracteres anatômicos úteis na distinção das espécies da seção *Cyclostigma* como: presença de uma hipoderme fasciculada, tricomas em formato de almofada, tricomas dendríticos e ausência de nectários na margem foliar das espécies. Quanto a subfamília Euphorbioideae, existem poucos trabalhos que reportam caracteres anatômicos. No trabalho de Raju e Rao (1977) estriações cuticulares, presença de idioblastos mucilaginosos na epiderme, a presença de idioblastos contendo cristais do tipo drusas,

o tipo de estômato, sendo comum o paracítico, foram relatados como caracteres típicos desta subfamília. Mennega (2005) descreveu anatomia da madeira das espécies de Euphorbioideae, reconhecendo caracteres de valor para a taxonomia, caracteres anatômicos do lenho confirmaram a proximidade entre Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae. Também são tidos como raros os trabalhos reportados para Hippomaneae. Foram anatomicamente descritas folha de *Colliquaya odorifera* (Summers 1910); a inflorescência axial e a estípula das espécies de *Incadendron* (Wurdack e Farfan-Rios) e na monografia de *Sapium* foram reportados caracteres morfológicos tais como: formato da folha, tipo de venação, formato das glândulas peciolares e bracteolares (Kruijt 1996). Fica evidente, portanto que nos trabalhos em Euphorbioideae os caracteres morfológicos e moleculares são mais comumente utilizados nas abordagens filogenéticas (Esser 2012; Athiê-Souza 2011; Pscheidt 2015).

Dessa forma, elaboramos as seguintes perguntas:

- I. Existem caracteres ou conjunto de caracteres anatômicos que contribuem para a separação de *Microstachys* e *Sebastiania* e que podem ser indicados como possíveis sinapomorfias micromorfológicas?
- II. Serão evidenciados caracteres que podem ser indicados como possíveis sinapomorfias micromorfológicas para os dois clados reconhecidos para *Microstachys* dos Neotrópicos?
- III. Os nectários foliares crateriformes de *Microstachys* podem variar em posição?
- IV. As folhas de *Sebastiania* não possuem nectários?
- V. Laticíferos estão presentes em *Microstachys* e ausentes em *Sebastiania*?

Os objetivos do presente trabalho são verificar se os caracteres anatômicos foliares corroboram a distinção de *Microstachys* e *Sebastiania*, verificar se os caracteres anatômicos corroboram a formação dos clados Neotropicais apontados na filogenia molecular de *Microstachys* e indicar possíveis sinapomorfias micromorfológicas para *Sebastiania* e *Microstachys*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram amostradas as 15 espécies Neotropicais de *Microstachys* (Quadro 1), conforme a revisão taxonômica do gênero (Pscheidt 2015), obtidas em exsiccatas depositadas no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (SP). Treze espécies

Neotropicais de *Sebastiania* (Quadro 2), identificadas conforme tratamento taxonômico de Pax e Hoffmann (1912) foram selecionadas e as amostras, preferencialmente contidas em envelopes nas excicatas, foram obtidas de excicatas provenientes do herbário Vasconcelos Sobrinho (PEUFR) e dos herbários estrangeiros “Field Museum Herbarium” (F) e Herbário Nacional do México (MEXU).

Quadro 1. Lista de espécies de *Microstachys* analisadas compreendendo os dois clados Neotropicais, seus respectivos vouchers e ambientes de ocorrência, conforme registrado nas exsiccatas depositadas no herbário Instituto de Botânica em São Paulo (SP).

CLADO NEOTROPICAL I	Espécies	Voucher	Ambiente
	<i>M. bidentata</i>	Indivíduo 1 Col: AC Pscheidt 116 SP442657	Cerrado
		Indivíduo 2 Col: ML Fonseca 6139 SP465159	Cerrado
		Indivíduo 3 Col: NFO Mota 2069 SP471055	Cerrado
	<i>M. corniculata</i>	Indivíduo 1 Col: M Nee 46075 SP3446990	Restinga
		Indivíduo 2 Col: MM Arbo 5806 SP258752	Campo Rupestre
		Indivíduo 3 Col: AM Miranda 4482 SP373399	Caatinga
	<i>M. daphnoides</i>	Indivíduo 1 Col: J Semir 3374 SP142972	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: JG Jardim 3648 SP360546	Cerrado
		Indivíduo 3 Col: AM Giulietti 6152 SP	Campo Rupestre
	<i>M. glandulosa</i>	Indivíduo 1 Col: 89 SP 443571	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: R Simão-Bianchini 1823	Campo Rupestre
		Indivíduo 3 Col: 154 SP470969	Campo Rupestre
	<i>M. hispida</i>	Indivíduo 1 Col: 19790 SP14127	Serra do Espinhaço (mata de galeria)
		Indivíduo 2 Col: 502 SP279959	Serra do mar (Restinga)
		Indivíduo 3 Col: 421 SP	Cerrado
	<i>M. revoluta</i>	Indivíduo 1 Col: BS Andrade 17 SP420479	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: AC Pscheidt 193 SP452820	Campo Rupestre
		Indivíduo 3 Col:	Campo Rupestre
	<i>M. salicifolia</i>	Indivíduo 1 Col 3182 SP363301	Campo Rupestre
Indivíduo 2 Col: AC Pscheidt 171		Campo Rupestre	
Indivíduo 3 Col 1399 SP471058		Cerrado	
<i>M. uleana</i>	Indivíduo 1 Col: JP Souza 4987 SP 385092	Campo Rupestre	
	Indivíduo 2 Col: A Francener 1396 SP 471054	Cerrado	
	Indivíduo 3 Col: AC Pscheidt 192 SP452821	Cerrado	

.....continuação

CLADO NEOTROPICAL II	<i>M. anisodonta</i>	Indivíduo 1 Col: 613 SP 215894	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: 174 SP 215894	Cerrado
		Indivíduo 3 Col: 12846 SP 106143	Cerrado
	<i>M. ditassoides</i>	Indivíduo 1 col: 2811 SP 251593	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: 2154 SP 464918	Campo Rupestre
		Indivíduo 3 Col: 120 SP 442661	Cerrado
	<i>M. heterodoxa</i>	Indivíduo 1 Col: AC Pscheidt 198 SP 452823	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: OLM Silva 174 SP 471001	Campo Rupestre
		Indivíduo 3 Col: MER Junqueira 203 SP385298	Caatinga
	<i>M. marginata</i>	Indivíduo 1 Col: I Cordeiro 3395 SP 192004	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: OLM Silva 176 SP 471003	Campo Rupestre
		Indivíduo 3 Col: AC Pscheidt 142 SP 443603	Cerrado/Campo Rupestre
	<i>M. nana</i>	Indivíduo 1 col: I Cordeiro 3375 SP 446494	Cerrado
		Indivíduo 2 Col: 3375 SP 446494	Cerrado
		Indivíduo 3 Col: AC Pscheidt 187 SP 445017	Porto Amazonas
	<i>M. nummularifolia</i>	Indivíduo 1 Col: CV Vidal 180 SP 452680	Campo Rupestre
		Indivíduo 2 Col: AC Pscheidt 145 SP 443601	Campo Rupestre
		Indivíduo 3 Col: RM Harley 25047 SP 266930	Campo Rupestre/ Cerrado
	<i>M. serrulata</i>	Indivíduo 1 Col: 416 SP 443056	Cerrado
		Indivíduo 2 Col: 9753 SP 131056	Cerrado
		Indivíduo 3 Col: 41 SP446548	Mata secundária

Quadro 2. Lista de espécies de *Sebastiania* analisadas, seus respectivos vouchers e ambientes de ocorrência conforme registrado nas exsicatas depositadas nos Herbários Vasconcelos Sobrinho (PEUFR), Field Museum (F) e Herbário Nacional do México (MEXU).

Espécies	Número do coletor	Ambiente
<i>S. brasiliensis</i>	Indivíduo 1: col: Pirani JR & Jano O 511 Indivíduo 2: col: Custósio F et al. 844 Indivíduo 3: Cordovil et al. 4406	
<i>S. brevifolia</i>	Indivíduo 1: col: Harley M et al. 28445 Indivíduo 2: col: 38738 Indivíduo 3: col: Fernandes A et al. 40269 F	Campo rupestre
<i>S. glandulosa</i>	Indivíduo 1: col: Martinez S 28192 MEXU	
<i>S. integra</i>	Indivíduo 1: col: 8459 F	Savanas assentadas sobre rochas calcárias
<i>S. jacobinensis</i>	Indivíduo 1: col: Laurênio et al. 2056 Indivíduo 2: col: Alcoforado FG 41 Indivíduo 3: col: Luuna RFP 43843	Caatinga
<i>S. klotzschiana</i>	Indivíduo 1: col: 25 Indivíduo 2: col: Ruhlmann M et al. 40	Caatinga
<i>S. macrocarpa</i>	Indivíduo 1: col: Rodal MJN et al. 826 Indivíduo 2: col: 51331	Caatinga
<i>S. membranifolia</i>	Indivíduo 1: col: Barros F 2504 Indivíduo 2: col: Irwin HS et al. 17495 Indivíduo 3: col: Souza VC et al. 20098	
<i>S. pavoniana</i>	Indivíduo 1: col: Martiez 689 MEXU	
<i>S. pallens</i>	Indivíduo 1: col: Valeur E.J 725 F	Florestas de Montanha e Savana
<i>S. riparia</i>	Indivíduo 1: col: Silva RA et al. 1739 Indivíduo 2: Coelho DM et al. 466	
<i>S. serrata</i>	Indivíduo 1: col: Hoehne FC 53492 Indivíduo 2: col: Catharino ELM 79	
<i>S. trinervia</i>	Indivíduo 1: col: Blanchet 3657 F	

Foram amostrados pelo menos três indivíduos de cada espécie de *Microstachys* e de *Sebastiania*, e foram retiradas folhas expandidas em bom estado de preservação (Quadro 1 e 2). Estas amostras foram submetidas ao processo de reversão de herborização (Smith e Smith 1942), desidratadas em série etílica e armazenados em etanol 70%.

Fragmentos das folhas contendo a região apical do pecíolo e da porção mediana da lâmina foliar (nervura central e margem com e sem nectários) foram incluídos em

historresina (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Foram obtidos cortes transversais com 5µm de espessura em um micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2265, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), utilizando navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,7 (O'Brien e McCully 1981) e as lâminas montadas com resina sintética (Permout-Fisher).

Para proceder a caracterização da terminação da aréola, tipo de estômato, contorno da parede e o padrão de vascularização da margem, folhas inteiras foram submetidas ao processo de diafanização, conforme metodologia proposta por Vasco et al. (2014).

A descrição da forma da lâmina foliar e do padrão de terminação da aréola foi baseada em Ellis et al. (2009). O sistema vascular do pecíolo e o tipo de estômatos foram caracterizado conforme Metcalfe e Chalk (1979). Os herbários foram codificados de acordo com Thiers, B.

As observações e a captura de imagens foram realizadas em microscópio de luz (modelo Olympus® AX70TRF) com sistema U-Photo, com câmara digital acoplada (modelo: Zeiss HRC), no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

RESULTADOS

Morfologia foliar de *Microstachys* A. Juss. e *Sebastiania* Spreng.

Em todas as espécies de *Microstachys* as folhas são pequenas, variando de 3 mm em *M. revoluta* até 8 mm como em *M. salicifolia* (fig. 1). Na maioria das espécies a lâmina foliar é plana (fig. 1 B-C), exceto em *M. revoluta* e *M. ditassoides* que apresentam a margem convoluta (encurvada para a face abaxial), assumindo uma conformação ericoide (fig. 1A). As folhas de todas as espécies de *Sebastiania* são maiores que as de *Microstachys*, medindo por volta de 100 mm de comprimento. A maioria das espécies possui tricomas simples (fig. 1B). A margem da lâmina foliar é inteira em *M. uleana*, *M. revoluta* e *M. marginata* (fig. 2A); serreada em *M. corniculata*, *M. daphnoides*, *M. glandulosa*, *M. hispida*, *M. anisodonta*, *M. ditassoides*, *M. nana* e *M. serrulata* (fig. 2B) e denteada em *M. bidentata*, *M. nummularifolia*, *M. heterodoxa* e *M. daphnoides* (fig. 2C, D).

Nectários de formato crateriforme foram observadas em todas as espécies de

Microstachys, entretanto a posição pode variar (fig. 3A-B). Em *M. anisodonta*, *M. corniculata*, *M. daphnoides*, *M. ditassoides*, *M. glandulosa*, *M. marginata*, *M. nana*, *M. nummularifolia*, *M. salicifolia*, *M. serrulata* e *M. uleana*, elas são deslocadas para posição submarginal e são aleatoriamente distribuídas (fig. 3A). Já nas folhas de *M. bidentata*, *M. ditassoides*, *M. hispida*, e *M. revoluta* as glândulas assumem posição marginal (fig. 3B).

Anatomia foliar de *Microstachys*

Em *Microstachys* o formato do pecíolo variou de plano/convexo em *M. daphnoides*, *M. ditassoides* e *M. serrulata* (fig. 4A), côncavo/convexo em *M. anisodonta*, *M. bidentata*, *M. corniculata*, *M. glandulosa*, *M. heterodoxa*, *M. marginata*, *M. nana*, *M. salicifolia* e *M. uleana* (fig. 4B) e circular em *M. nummularifolia* e *M. revoluta* (fig. 4C). A epiderme é unisseriada em todas as espécies somente *M. daphnoides*, *M. glandulosa*, *M. heterodoxa* possuem tricomas simples. A cutícula é espessa com estrias em *M. anisodonta*, *M. bidentata*, *M. corniculata*, *M. daphnoides*, *M. ditassoides*, *M. glandulosa*, *M. nana*, *M. salicifolia*, *M. serrulata* fina e lisa em *M. hispida*, *M. heterodoxa*, *M. marginata*, *M. nummularifolia*, *M. uleana*, *M. revoluta*. Observa-se estômatos na epiderme que recobrem o parênquima clorofiliano do córtex em *M. bidentata*, *M. corniculata*, *M. daphnoides*. No córtex ocorrem idioblastos contendo drusas e laticíferos. O sistema vascular é constituído por feixes colaterais em todas as espécies, mas assumem uma conformação de arco aberto com três feixes separados por parênquima de preenchimento em *M. bidentata*, *M. corniculata*, *M. daphnoides*, *M. heterodoxa*, *M. marginata*, *M. salicifolia*, *M. serrulata*, *M. uleana* (fig. 4A), ferradura como em *M. anisodonta*, *M. glandulosa*, *M. hispida*, *M. nana* (fig. 4B) ou um único feixe em *M. ditassoides*, *M. nummularifolia* e *M. revoluta* (fig. 4C). Observa-se que os laticíferos estão associados ao sistema vascular.

Na lâmina foliar o contorno das células epidérmicas é reto a levemente ondulado em ambas as faces na maioria das espécies de *Microstachys* (fig. 4D), exceto em *M. anisodonta* que apresenta o contorno reto na face adaxial e sinuoso na face abaxial. Os estômatos são paracíticos em todas as espécies (fig. 4D), com as células subsidiárias que se projetam sobre as células guardas (fig. 4E), formando uma crista cuticular sobre o poro em *M. bidentata*, *M. corniculata*, *M. hispida*, *M. uleana* e *M. marginata*. Na margem da maioria das espécies, as células epidérmicas são altas exceto em *M. ditassoides*, *M. heterodoxa*, *M. marginata* e *M. uleana* que apresentam células epidérmicas de formato

semelhante em toda a sua extensão (fig. 4F). A epiderme é unisseriada em todas as espécies, as folhas são anfiestomáticas na maioria das espécies (fig. 5A) e hipoestomáticas em *M. hispida*, *M. revoluta*, *M. heterodoxa* e *M. ditassoides*. Tricomas tectores multicelulares e unisseriados foram observados em *M. corniculata*, *M. glandulosa*, *M. hispida*, *M. revoluta* (fig. 5B) e tricomas estrelados em *M. heterodoxa* (fig. 5C), as demais espécies (*M. bidentata*, *M. marginata*, *M. nana* e *M. uleana*) são glabras.

O mesofilo é dorsiventral e as células exibem um arranjo compacto na maioria das espécies de *Microstachys* (fig. 5D), exceto em *M. bidentata*, *M. marginata*, *M. nummularifolia*, *M. uleana* que possuem mesofilo isobilateral (fig. 5E). O parênquima paliçádico é contínuo na nervura central da maioria das espécies (fig. 5F), exceto em *M. nana*, *M. glandulosa* e *M. revoluta* que apresentam colênquima em posição subepidérmica em ambas as faces na região da nervura central. Idioblastos contendo cristais do tipo drusa foram observados somente no mesofilo de *M. corniculata*, *M. hispida*, *M. uleana*. Laticíferos estão dispersos pelo parênquima do mesofilo em todas as espécies (fig. 5G).

A nervura central é projetada para o exterior na face adaxial em *Microstachys bidentata*, *M. corniculata*, *M. daphnoides*, *M. glandulosa*, *M. marginata* e *M. serrulata*, para a face abaxial em *M. ditassoides* e *M. heterodoxa*, *M. revoluta*, *M. salicifolia*, *M. uleana* e para ambas as faces em *M. anisodonta* (fig. 5H).

As nervuras laterais de *Microstachys* são areoladas, com terminação do tipo dicotômico ramificado em *M. corniculata*, *M. daphnoides*, *M. glandulosa*, *M. hispida*, *M. revoluta*, *M. salicifolia*, *M. anisodonta*, *M. ditassoides*, *M. heterodoxa*, *M. nana*, *M. serrulata* (fig. 5I, J) e do tipo dendrítico ramificado em *M. bidentata*, *M. uleana*, *M. marginata*, *M. nummularifolia*. Observa-se traqueídes alargadas na nervura marginal (fig. 5J).

Os nectários crateriformes são anatomicamente formados por duas regiões: a porção periférica que delimita a depressão central (fig. 6A-B). Na porção central, a epiderme é secretora, constituída por células altas com espaços intercelulares e organizadas em uma paliçada, com células de paredes e cutículas delgadas e citoplasma denso (fig. 6A-C), enquanto na porção periférica as células são vacuolizadas e possuem paredes e cutícula espessadas (fig. 6A-C). Não foi observado acúmulo de secreção no espaço subcuticular, inclusive na região que recobre a depressão central que apresenta a cutícula extremamente fina. Logo abaixo do parênquima paliçádico, encontra-se o

parênquima nectarífero composto por células volumosas de parede delgada e citoplasma denso, e esta região é vascularizada por terminações vasculares, predominantemente floemáticas, que não atingem a epiderme secretora (fig. 6A, B, D).

Anatomia foliar de *Sebastiania*

Nas espécies de *Sebastiania* somente em *S. serrata* (fig. 7A) e *S. klotzschiana* (7B) ocorrem glândulas em posição submarginal.

Em *Sebastiania* o formato do pecíolo variou de plano/convexo *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. riparia* (fig. 8A), côncavo/convexo em *S. brasiliensis*, *S. integra*, *S. jacobinensis*, *S. pavoniana*, *S. klotzschiana*, *S. membranifolia*, *S. pallens*, *S. serrata* (fig. 8B), e côncavo/côncavo *S. macrocarpa*, *S. trinervia* (fig. 8C).

A epiderme do pecíolo é unisseriada em todas as espécies estudadas, a cutícula é espessa e estriada em *S. brevifolia*, *S. jacobinensis*, *S. klotzschiana*, *S. macrocarpa*, *S. pavoniana* e *S. riparia* delgada e lisa em *S. brasiliensis*, *S. glandulosa*, *S. integra*, *S. membranifolia*, *S. serrata* e *S. trinervia*. Observa-se estômatos na epiderme sobre o parênquima clorofiliano do córtex em *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. klotzschiana*, *S. macrocarpa*, *S. pavoniana*. Idioblastos contendo drusas ocorrem dispersos pelo córtex na maioria das espécies exceto em *S. integra*. Laticíferos próximos ao feixe vascular foram observados somente em *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis* e *S. macrocarpa*. O feixe vascular em todas as espécies é colateral, mas a sua conformação varia de arco aberto composto de três a onze feixes separados por uma faixa de células parenquimáticas, *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. integra*, *S. jacobinensis*, *S. klotzschiana*, *S. macrocarpa*, *S. pavoniana*, *S. riparia*, *S. trinervia* (fig. 8A, D), e ferradura *S. membranifolia*, *S. pallens* e *S. serrata* (fig. 8B).

O contorno da parede das células epidérmicas é sinuoso (fig. 8D) exceto em *S. integra*, *S. membranifolia* e *S. riparia* que possuem contorno reto a levemente ondulado. Os estômatos são paracíticos em todas as espécies. A cutícula é espessa e estriada em *S. brevifolia*, *S. jacobinensis*, *S. klotzschiana*, *S. macrocarpa*, *S. pavoniana* e *S. riparia* delgada e lisa em *S. brasiliensis*, *S. glandulosa*, *S. integra*, *S. membranifolia*, *S. serrata* e *S. trinervia*. As células da margem de todas as espécies estão no mesmo nível das demais células epidérmicas (fig. 8E). As folhas são hipoestomáticas na maioria das espécies, exceto em *S. macrocarpa*, *S. brevifolia*, *S. jacobinensis* que são anfiestomáticas. A epiderme da lâmina foliar na maioria das espécies é unisseriada, somente *S. pallens* possui

hipoderme (9A).

O mesofilo é dorsiventral na maioria das espécies (fig. 9B) e isobilateral em *S. brevifolia*, *S. membranifolia*, *S. pavoniana* e *S. riparia* (fig. 9C). *Sebastiania klotzchiana* é a única espécie que apresenta parênquima paliçádico duas vezes maior que o lacunoso. O parênquima paliçádico acompanha a nervura central na maioria das espécies (fig. 9D), exceto em *S. glandulosa*, *S. membranifolia*, *S. pavoniana*, *S. serrata* e *S. riparia*. Já o colênquima ocorre em ambas as faces da nervura central em *S. jacobinensis*, *S. membranifolia* e *S. trinervia*, na face abaxial em *S. macrocarpa* e na face adaxial de *S. pavoniana*. Idioblastos contendo drusas foram observados em *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. klotzschiana*, *S. membranifolia*, *S. riparia*.

A nervura central se projeta para a face adaxial na maioria das espécies em *S. brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. jacobinensis*, *S. riparia*, *S. serrata* e *S. trinervia* (fig. 9E). Para a face abaxial em *S. integra* e *S. pallens*, e em ambas as faces em *S. klotzschiana*, *S. macrocarpa*, *S. membranifolia* e *S. pavoniana*.

As nervuras laterais são areoladas na maioria das espécies com terminações do tipo dendrítica (Fig. 9F), exceto em *S. brasiliensis* e *S. pallens* que é do tipo dicotômica. Observa-se traqueídes alargadas em todas as espécies.

Caracteres anatômicos distintivos entre *Microstachys* e *Sebastiania*

Embora as espécies de *Microstachys* se assemelhem morfológicamente as de *Sebastiania*, foram identificados caracteres anatômicos que permitiram a distinção das espécies dos dois gêneros que podem ser possíveis sinapomorfias. A maioria das espécies de *Microstachys* possui folhas, com tricomas simples, exceto *M. heterodoxa* que possui tricomas estrelados, *M. ditassoides* e *M. revoluta* possuem folhas ericóides, as folhas são anfiestomáticas, a parede periclinal e anticlinal é reta a levemente ondulada, a epiderme é unisseriada, a terminação da aréola é dicotômica, todas as espécies possuem glândulas submarginais ou marginais e laticíferos. Diferente das espécies de *Microstachys* todas as espécies de *Sebastiania* possuem folhas planas, glabras, as folhas são hipoestomáticas, a parede periclinal e anticlinal sinuosa, nem todas as espécies possuem epiderme unisseriada, *S. pallens* possui epiderme bisseriada, somente *S. klotzschiana* e *S. serrata* possuem glândulas marginais que pela estrutura anatômica se assemelham com as glândulas encontradas nas espécies de *Microstachys*. E laticíferos somente em *S.*

brasiliensis, *S. brevifolia*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis* e *S. macrocarpa*.

Foram encontrados caracteres morfo-anatômicos úteis para distinguir a maioria das espécies. Entretanto, *M. daphnoides*, *M. nana*, *M. serrulata* são anatomicamente semelhantes e não puderam ser reconhecidas na chave de identificação elaborada. Por esse motivo, elas se encontram agrupadas no mesmo passo da chave conforme segue.

Chave de identificação para as espécies de *Microstachys* estudadas

1	Folhas ericóides.....	2
2	Folhas com margem inteiras.....	<i>M. revoluta</i>
2'	Folhas com margem serreadas	<i>M. ditassoides</i>
1'	Folhas não ericoides.....	3
3	Folhas com mesofilo isobilateral.....	4
4	Colênquima voltado para ambas as faces da folha na nervura central e a nervura central se projetada para a face adaxial	<i>M. bidentata</i>
4'	Colênquima na nervura central ausente, nervura central projetada para a face abaxial.....	<i>M. uleana</i>
3'	Folhas com mesofilo dorsiventral.....	5
5	Glândulas posicionadas na margem da folha.....	6
6	Parênquima paliçádico acompanha a nervura central	<i>M. heterodoxa</i>
6'	Parênquima paliçádico não acompanha a nervura central.....	<i>M. hispida</i>
5'	Glândulas posicionadas na região submarginal.....	7
7	Parede periclinal e anticlinal reta/sinuosa.....	<i>M. anisodonta</i>
7'	Parede periclinal e anticlinal reta levemente ondulada.....	8
8	Células epidérmicas na margem no nível das demais células.....	<i>M. marginata.</i>
8'	Células epidérmicas na margem mais altas que as demais.....	9
9	Idioblastos contendo drusas no córtex do pecíolo ausente.....	<i>M. glandulosa</i>
9'	Idioblastos contendo drusas no córtex do pecíolo presente.....	10
10	Terminação vascular da aréola do tipo dendrítica.....	<i>M. nummularifolia</i>
10'	Terminação vascular da aréola do tipo dicotômica.....	11
11	Idioblastos contendo drusas no mesofilo presente.....	<i>M. corniculata</i>
11'	Idioblastos contendo drusas no mesofilo ausente.....	12
12	Nervura central projetada para a face abaxial.....	<i>M. salicifolia</i>
12'	Nervura central projetada para a face adaxial.....	13
13	Traqueídes alargadas na nervura marginal.....	<i>M. daphnoides</i> , <i>M. nana</i> , <i>M. serrulata</i>

Chave de identificação para as espécies de *Sebastiania* estudadas

1	Epiderme bisseriada.....	<i>S. pallens</i>
1'	Epiderme unisseriada.....	2
2	Parênquima paliçadico não acompanha nervura central.....	<i>S. membranifolia</i>
2'	Parênquima paliçadico acompanha nervura central.....	3
3	Mesofilo isobilateral.....	<i>S. brevifolia</i>
3'	Mesofilo dorsiventral.....	4
4	Aréola tipo dicotômica.....	<i>S. brasiliensis</i>
4'	Aréola tipo dendrítica.....	5
5	Células subsidiárias cobrem as células guardas.....	<i>S. trinervia</i>
5'	Células subsidiárias não cobrem as células guardas.....	6
6	Colênquima presente em ambas as faces na nervura central.....	<i>S. jacobinensis</i>
6'	Colênquima ausente em ambas as faces na nervura central.....	7
7	Células epidérmicas mais altas na margem da folha.....	<i>S. pavoniana</i>
7'	Células epidérmicas com a mesma altura em toda a superfície foliar.....	8
8	Conformação do feixe do pecíolo em ferradura.....	<i>S. serrata</i>
8'	Conformação do feixe do pecíolo em arco aberto.....	9
9	Colênquima na nervura central somente na face abaxial.....	<i>S. macrocarpa</i>
9'	Colênquima na nervura central somente na face abaxial ausente.....	10
10	Parênquima clorofiliano voltado para a face abaxial do pecíolo formado por células colunares.....	<i>S. klotzschiana</i>
10'	Parênquima clorofiliano com células colunares ausente no pecíolo.....	11
11	Folha anfiestomática.....	<i>S. integra</i>
11'	Folha hipoestomática.....	12
12	Nervura projetada em ambas as faces.....	<i>S. glandulosa</i>
12'	Nervura não projetada em ambas as faces.....	<i>S. riparia</i>

PRANCHAS E TABELAS



Figura 1. Morfologia das folhas das espécies de *Microstachys* e *Sebastiana* evidenciando a diferença no tamanho da folha: A: 0,1 cm; B: 0,1 cm ; C: 8 cm. A, *M. revoluta* folha com margem convoluta. B, *M. salicifolia* folha com margem aplanada. C, *S. membranifolia* margem aplanada, Seta branca: margem convoluta, seta amarela nectários submarginais.

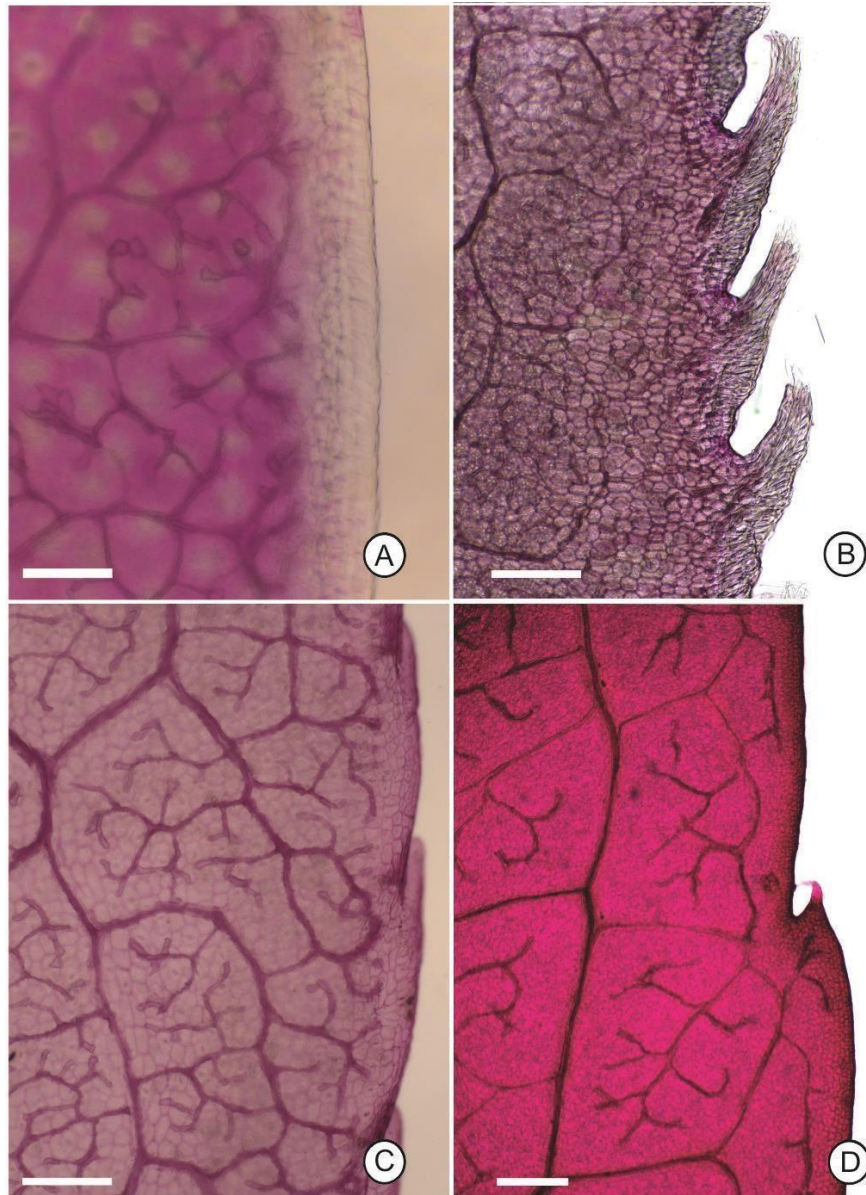


Figura 2. Diafanização da lâmina foliar das espécies de *Microstachys* e *Sebastiania* evidenciando o tipo de margem. A, *M. marginata* folha com margem inteira. B, *M. corniculata* folha com margem serrada. C, *M. daphnoides* e D, *S. brasiliensis* folhas com margem denteada. Barras de escala = A: 100 μm ; B, C, D: 200 μm .

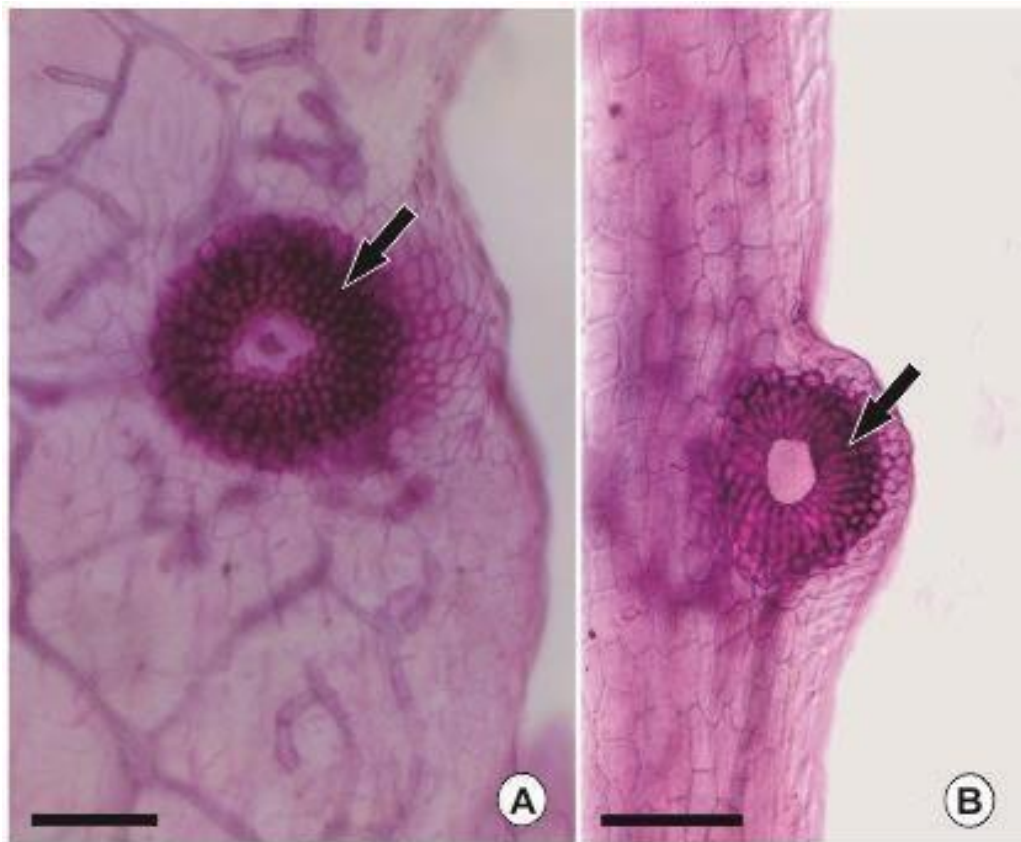


Figura 3. Diafanização da lâmina foliar das espécies de *Microstachys* evidenciando a posição dos nectários crateriformes: A, *M. serrulata* posição submarginal. B, *M. bidentata* posição marginal. Seta indicando a posição das glândulas. Barras de escalas = A, B100 μm .

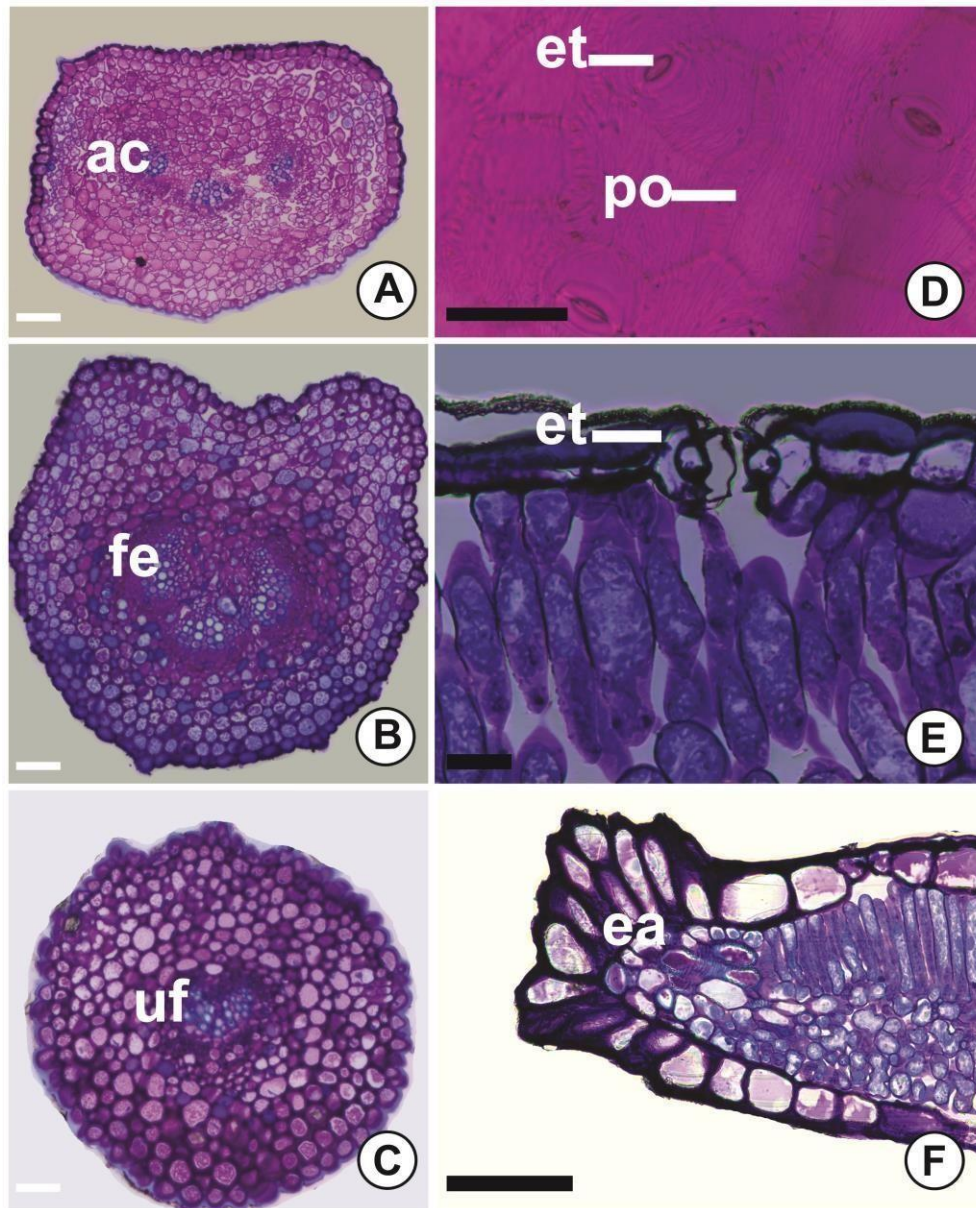


Figura 4. Formato do pecíolo, arranjo do sistema vascular em seção transversal e diafanização da lâmina foliar das espécies de *Microstachys*: A, *M. daphnoides*. B *M. anisodonta*. C *M. nummularifolia*. A plano convexo. B côncavo convexo. C circular. A feixe em arco aberto. B feixe em ferradura. C único feixe. D *M. glandulosa* parede periclinal levemente ondulada, E *M. uleana* célula subsidiária cobre a célula guarda. F *M. heterodoxa*. ea: epiderme alta. et: (estômato paracítico), po: parede periclinal levemente ondulada. Barras de escalas= A, B, C, D, E 100 μm ; F 150 μm .

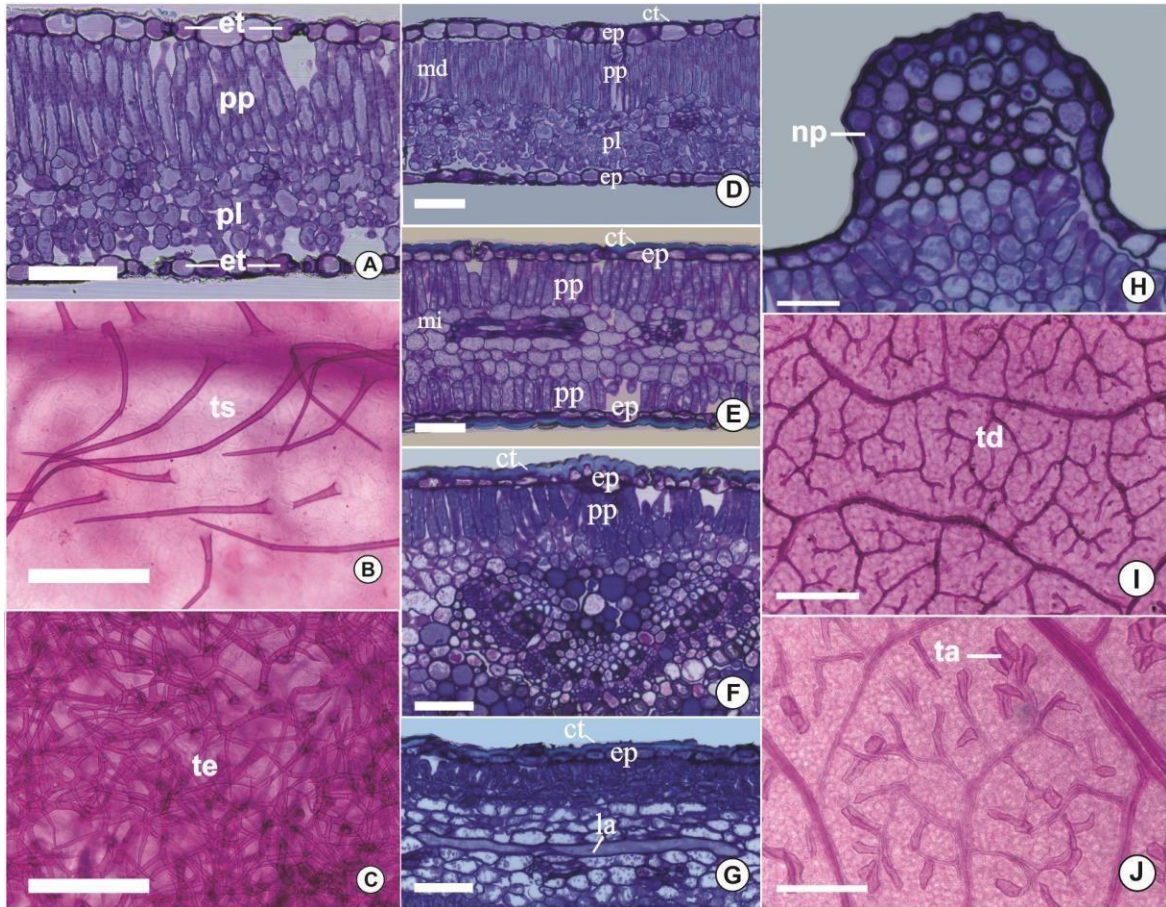


Figura 5. Diafanização e seções transversais das folhas das espécies de *Microstachys*. A, folha anfiestomática *M. serrulata*. B, tricomas simples *M. anisodonta*. C, tricomas estrelados *M. heterodoxa*. D, *M. serrulata* mesofilo dorsiventral; E, F, G, *M. uleana* mesofilo isobilateral, parenquima paliçádico contínuo na nervura laticífero não-articulado no mesofilo. H nervura projetada para a face adaxial, *M. daphnoides*; I terminação da aréola tipo dicotômico; *M. uleana*; J traqueídes alargadas; *M. ditassoides* *M. ulean*. ct: cutícula; ep: epiderme; et: estômato paracítico; la: laticífero; np: nervura principal; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico; ta: traqueídes alargadas; td traqueídes; tricomas estrelado, ts: tricomas simples; . Barras de escala = A 100 μm , B, C 200 μm . Barras de escala = D – G: 100 μm ; H: 200 μm ; I: 100 μm ; J: 300 μm .

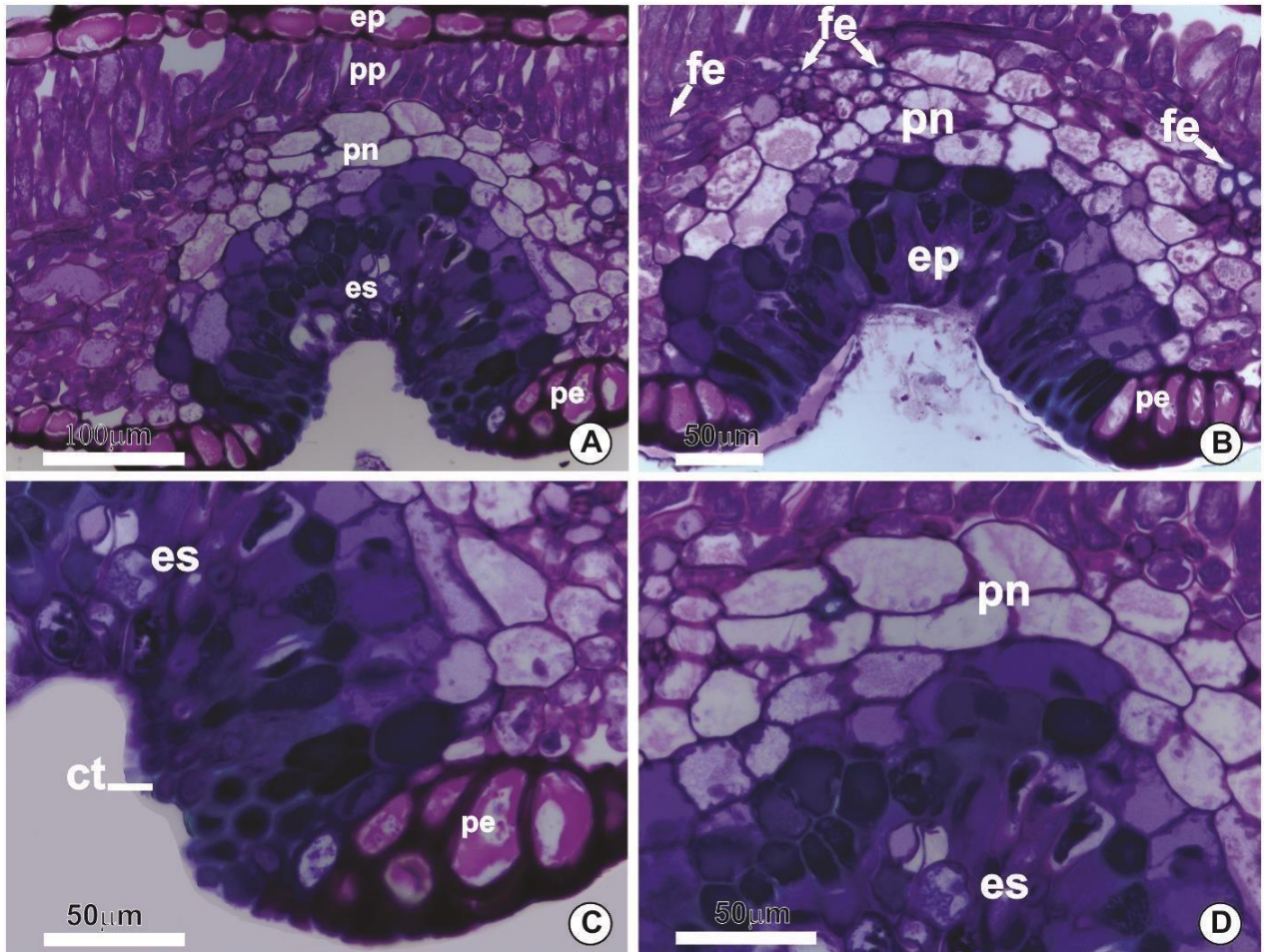


Figura 6. Seção transversal da glândula foliar de *M. corniculata*. A, estrutura da glândula. B detalhe da epiderme em paliçada; C detalhe da porção periférica; D detalhe do parênquima com células volumosas com parede delgada; ep: epiderme, es: epiderme secretora em paliçada; fe: feixes, pn: parênquima nectarífero com células volumosas com parede delgada; pe: porção periférica; pp: parênquima paliçádico. Barras de escala = A 100 µm; B, C, D: 50 µm.

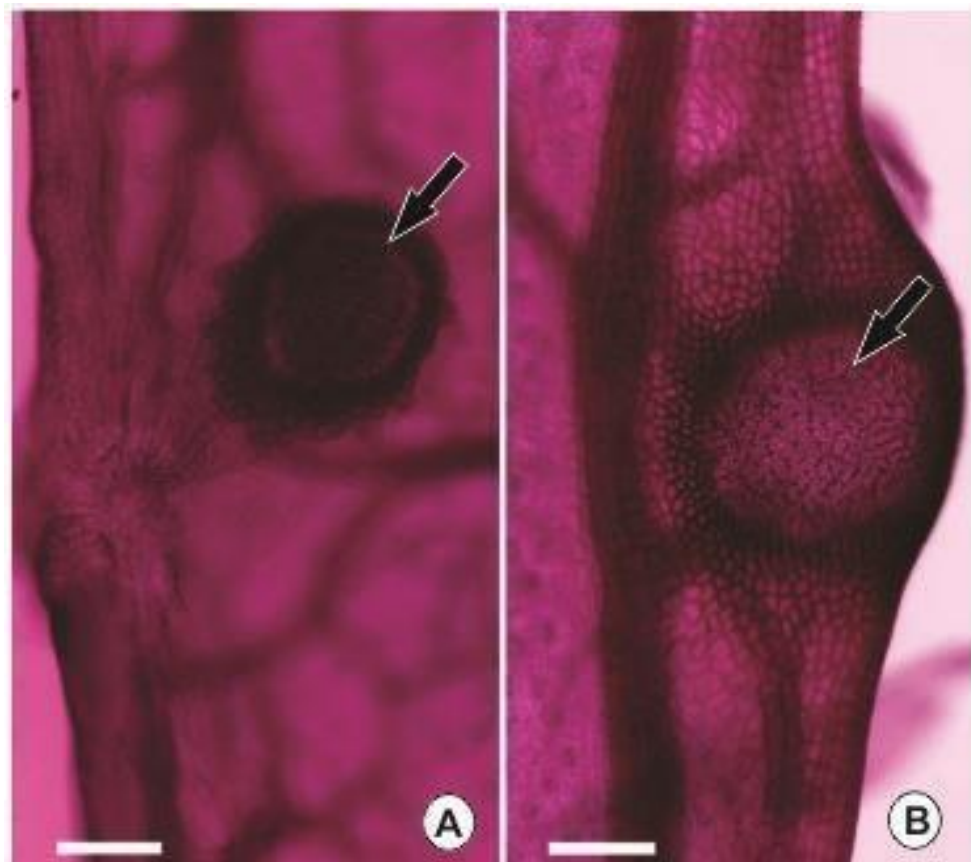


Figura 7. Diafanização da lâmina foliar das espécies de *Sebastiania* A *S. serrata* posição submarginal; B *S. Klotzchiana* posição marginal dos nectários crateriformes. Barra de escalas 100 µm.

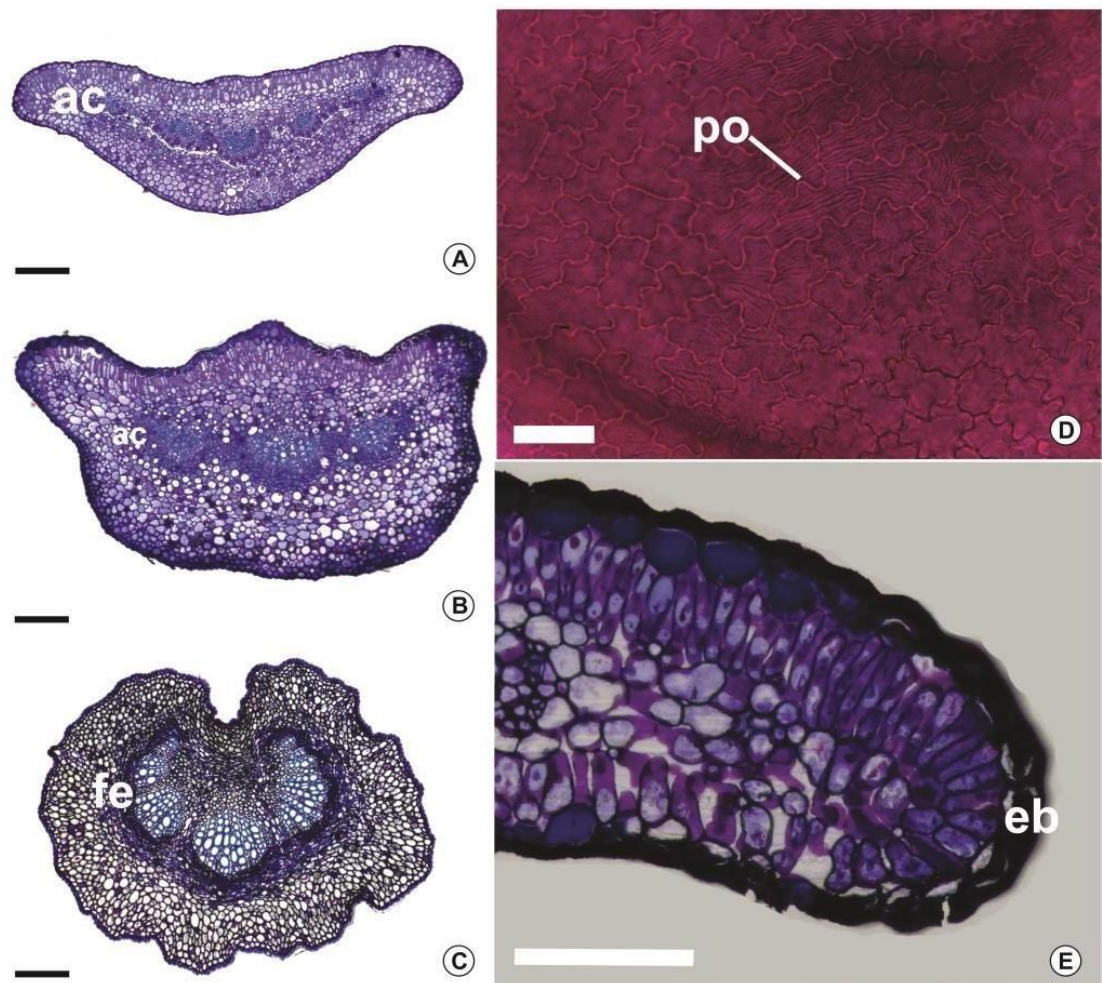


Figura 8. Formato do pecíolo e arranjo do sistema vascular em seção transversal das espécies de *Sebastiania*. A *S. brevifolia*; B *S. macrocarpa*; C *S. membranifolia*; A plano convexo; B côncavo convexo; C; côncavo-côncavo. D parede periclinal sinuosa *S. brasiliensis*, *S. macrocarpa*. E células da margem baixa. Barras de escala = A, B, C 200 µm; 300 µm E 100 µm.

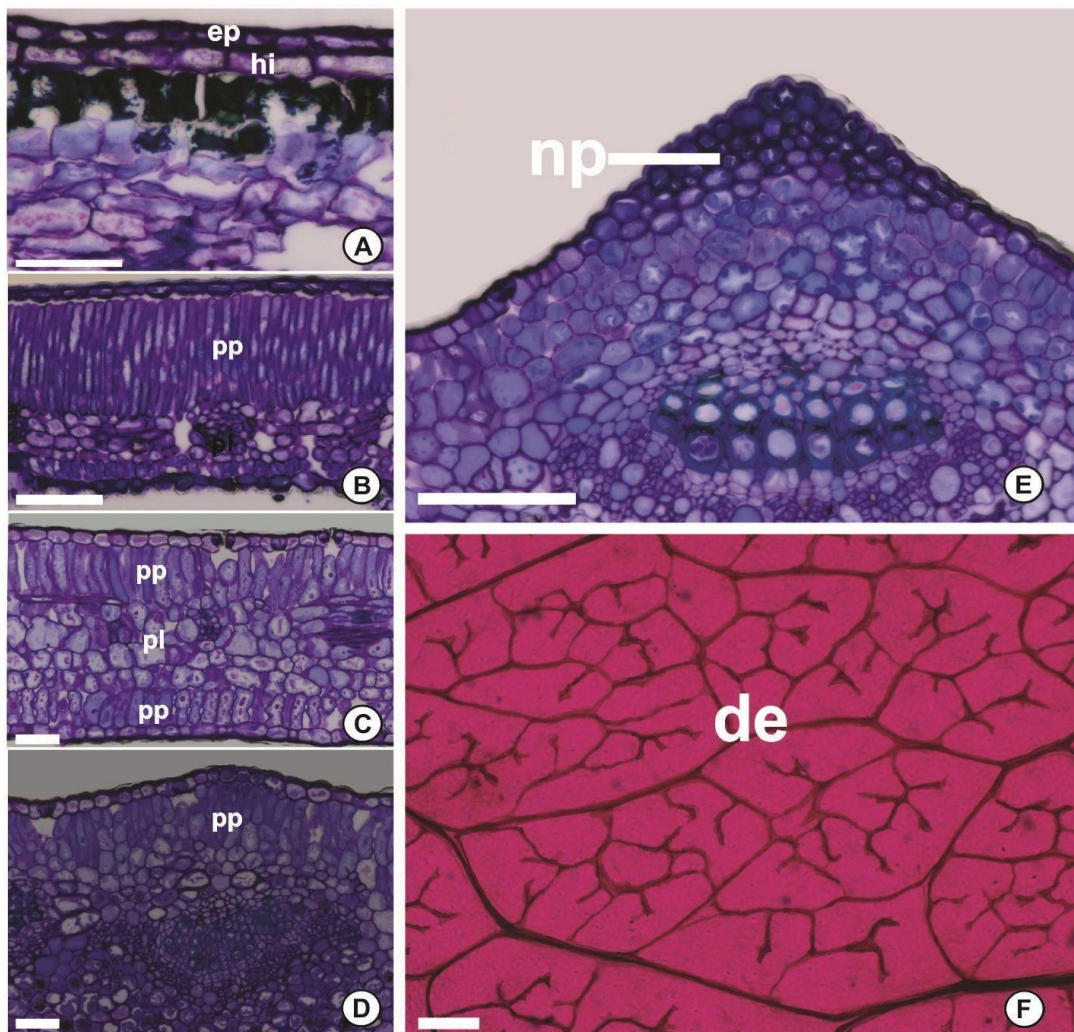


Figura 9. Seções transversais e diafanização das folhas das espécies de *Sebastiania*. A *S. pallens* hipoderme. B mesofilo dorsiventral, C mesofilo isobilateral, D parênquima paliçadico contínuo na nervura folha anfiestomática. E nervura pojetada para a face adaxial. F terminação da aréola dendrítica. Barras de escala = A, B, C 100 μm ; D 50 μm ; E 100 μm ; F 300 μm .

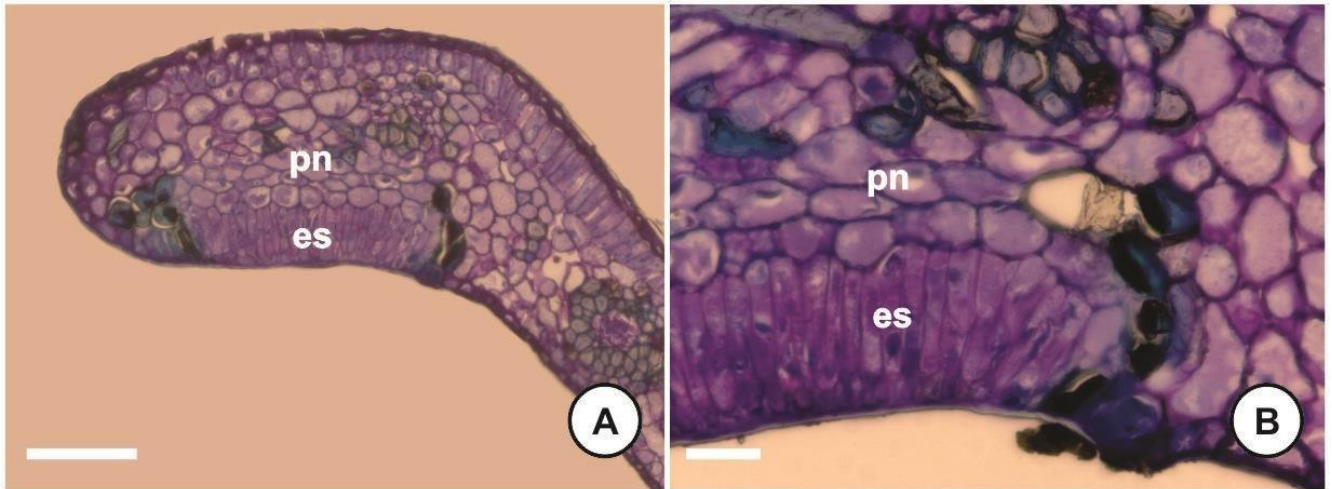


Figura 10. Seções transversais da glândula foliar de *Sebastiania serrata*. A, estrutura da glândula em seção transversal. B, detalhe da epiderme em paliçada e da cutícula. C, D detalhe da epiderme em paliçada e do parênquima com células mais volumosas com parede delgada. EP: epiderme, CUT: cutícula, ESE: epiderme secretora em paliçada, PA: parênquima com células volumosas de parede delgada. Barras de escala = A: 100 μm ; B, C, D: 50 μm .

Tabela 1: caracteres anatômicos das espécies de *Microstachys*

	Folha ericóide	<u>Margem da folha</u>			<u>Epiderme unisseriada</u>	<u>Tipo de Tricomas</u>		<u>Parede anticlinal e periclinal</u>	
		denteada	serreada	inteira		Simples	estrelado	Ada/aba	
CLADO N1	<i>M. bidentata</i>	-	+	-	-	+	-	-	ondulada
	<i>M. corniculata</i>	-	-	+	-	+	-	-	ondulada
	<i>M. daphnoides</i>	-	+	-	-	+	+	-	ondulada
	<i>M. glandulosa</i>	-	-	+	-	+	+	-	ondulada
	<i>M. hispida</i>	-	-	+	-	+	+	-	ondulada
	<i>M. revoluta</i>	+	-	-	+	+	+	-	ondulada
	<i>M. salicifolia</i>	-	-	+	-	+	+	-	ondulada
	<i>M. uleana</i>	-	-	-	+	+	-	-	ondulada
CLADO N2	<i>M. anisodonta</i>	-	-	+	-	+	+	-	Reta/ sinuosa
	<i>M. ditassoides</i>	+	-	+	-	+	+	-	ondulada
	<i>M. heterodoxa</i>	-	-	+	-	+	-	+	ondulada
	<i>M. marginata</i>	-	-	-	+	+	-	-	ondulada
	<i>M. nana</i>	-	-	+	-	+	-	-	ondulada
	<i>M. nummlarifolia</i>	-	+	-	-	+	-	-	ondulada
	<i>M. serrulata</i>	-	-	+	-	+	+	-	ondulada

Continuação

Espécie	Célula subsidiária Cobre a guarda	Cutícula estriada	Classificação da folha baseada na posição do estômato		Tipo de mesofilo		Mesofilo		
			tipo	da margem altas	dorsiventral	isobilateral	cristais	laticíferos	
CLADO N1	<i>M. bidentata</i>	-	+	paracítico	+	-	+	-	+
	<i>M. corniculata</i>	-	+	paracítico	+	+	-	+	+
	<i>M. daphnoides</i>	-	+	paracítico	+	+	-	-	+
	<i>M. glandulosa</i>	-	+	paracítico	+	+	-	-	+
	<i>M. hispida</i>	-	-	paracítico	+	+	-	+	+
	<i>M. revoluta</i>	-	-	paracítico	+	+	-	-	+
	<i>M. salicifolia</i>	-	+	paracítico	+	+	-	-	+
	<i>M. uleana</i>	+	-	paracítico	-	-	+	+	+
CLADO N2	<i>M. anisodonta</i>	-	+	paracítico	+	+	-	-	+
	<i>M. ditassoides</i>	-	+	paracítico	-	+	-	-	+
	<i>M. heterodoxa</i>	-	-	paracítico	-	+	-	-	+
	<i>M. marginata</i>	+	-	paracítico	-	-	+	-	+
	<i>M. nana</i>	-	+	paracítico	+	+	-	-	+
	<i>M. nummlarifolia</i>	-	-	paracítico	+	-	+	-	+
	<i>M. serrulata</i>	-	+	paracítico	+	+	-	-	+

Continuação

	Espécie	Traqueídes alargadas na nervura marginal	Nervura projetada		Parênquima paliçadico acompanha a nervura	Feixe colateral nervura	Colênquima na nervura	
			ada	aba			ada	aba
CLADO N1	<i>M. bidentata</i>	+	+	-	+	+	+	+
	<i>M. corniculata</i>	+	+	-	+	+	+	+
	<i>M. daphnoides</i>	+	+	-	+	+	+	-
	<i>M. glandulosa</i>	+	+	-	-	+	+	+
	<i>M. hispida</i>	+	-	-	+	+	-	-
	<i>M. revoluta</i>	+	-	+	-	+	-	+
	<i>M. salicifolia</i>	+	-	+	+	+	+	+
	<i>M. uleana</i>	+	-	+	+	+	-	-
CLADO N2	<i>M. anisodonta</i>	+	+	+	+	+	+	-
	<i>M. ditassoides</i>	-	-	+	+	+	-	+
	<i>M. heterodoxa</i>	+	-	+	+	+	+	+
	<i>M. marginata</i>	+	-	-	+	+	-	-
	<i>M. nana</i>	+	+	-	-	+	+	-
	<i>M. nummlarifolia</i>	+	-	-	+	+	-	+
	<i>M. serrulata</i>	+	+	-	+	+	+	-

Continuação

	Espécie	Pecíolo com epiderme unisseriada	Córtex do pecíolo		Feixe colateral	Estômatos na epiderme do pecíolo
			drusas	laticíferos		
CLADO N1	<i>M. bidentata</i>	+	-	+	+	+
	<i>M. corniculata</i>	+	+	+	+	+
	<i>M. daphnoides</i>	+	-	+	+	+
	<i>M. glandulosa</i>	+	-	+	-	+
	<i>M. hispida</i>	+		+	-	+
	<i>M. revoluta</i>	+	+	+	-	+
	<i>M. salicifolia</i>	+	-	+	-	+
	<i>M. uleana</i>	+	+	+	-	+
CLADO N2	<i>M. anisodonta</i>	+	-	+	-	+
	<i>M. ditassoides</i>	+	+	+	-	+
	<i>M. heterodoxa</i>	+	+	+	-	+
	<i>M. marginata</i>	+	+	+	-	+
	<i>M. nana</i>	+	+	+	-	+
	<i>M. nummlarifolia</i>	+	+	+	-	+
	<i>M. serrulata</i>	+	-	+	-	+

Continuação

	Espécie	Tricomas na epiderme do pecíolo		Conformação do feixe do pecíolo	
		-	Arco aberto	Único feixe	Ferradura
CLADO N1	<i>M. bidentata</i>	-	+	-	-
	<i>M. corniculata</i>	-	+	-	-
	<i>M. daphnoides</i>	+	+	-	-
	<i>M. glandulosa</i>	+	-	-	+
	<i>M. hispida</i>	-	-	-	+
	<i>M. revoluta</i>	-	-	+	-
	<i>M. salicifolia</i>	-	+	-	-
	<i>M. uleana</i>	-	+	-	-
CLADO N2	<i>M. anisodonta</i>	-	-	-	+
	<i>M. ditassoides</i>	-	-	+	-
	<i>M. heterodoxa</i>	+	+	-	-
	<i>M. marginata</i>	-	+	-	-
	<i>M. nana</i>	-	-	-	+
	<i>M. nummlarifolia</i>	-	-	+	-
	<i>M. serrulata</i>	-	+	-	-

Tabela 2: caracteres anatômicos das espécies de *Sebastiania*

	Margem da folha			Epiderme unisseriada	Tipo de Tricomas		Parede anticlinal e periclinal
	denteada	serreada	inteira		Simples	estrelado	Ada/aba
<i>S. brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	-	Sinuosa
<i>S. brevifolia</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa
<i>S. glandulosa</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa
<i>S. integra</i>	+	-	-	-	-	+	Ondulada
<i>S. jacobinensis</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa
<i>S. klotzschiana</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa
<i>S. macrocarpa</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa
<i>S. membranifolia</i>	+	-	-	-	-	+	Ondulada
<i>S. pavoniana</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa
<i>S. pallens</i>	+	-	-	-	+	-	Sinuosa
<i>S. riparia</i>	+	-	-	-	-	+	Ondulada
<i>S. serrata</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa
<i>S. trinervia</i>	+	-	-	-	-	+	Sinuosa

Continuação

	Célula subsidiária Cobre a guarda	Cutícula estriada	Classificação da folha baseada na posição do estômato		Tipo de mesofilo	
			tipo	posição	dorsiventral	isobilateral
<i>S. brasiliensis</i>	-	-	paracítico	Hipoestomática	+	-
<i>S. brevifolia</i>	-	+	paracítico	Anfiestomática	-	+
<i>S. glandulosa</i>	-	-	Paracítico	Hipoestomática	+	-
<i>S. integra</i>	-	-	Paracítico	Anfiestomática	+	-
<i>S. jacobinensis</i>	-	+	Paracítico	Hipoestomática	+	-
<i>S. klotzschiana</i>	-	+	Paracítico	Anfiestomática	+	-
<i>S. macrocarpa</i>	-	+	Paracítico	Hipoestomática	+	-
<i>S. membranifolia</i>	-	-	Paracítico	Hipoestomática	-	+
<i>S. pavoniana</i>	-	+	Paracítico	Hipoestomática	-	+
<i>S. pallens</i>	-	-	Paracítico	Hipoestomática	+	-
<i>S. riparia</i>	-	+	Paracítico	Hipoestomática	-	+
<i>S. serrata</i>	-	-	Paracítico	Hipoestomática	+	-
<i>S. trinervia</i>	+	-	Paracítico	Hipoestomática	+	-

continuação

	Traqueídes alargadas	<u>Nervura projetada</u>		Parênquima paliçadico acompanha a nervura	Feixe colateral nervura	<u>Colênquima na nervura</u>	
	-	ada	aba			ada	aba
<i>S. brasiliensis</i>	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. brevifolia</i>	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. glandulosa</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>S. integra</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>S. jacobinensis</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. klotzschiana</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. macrocarpa</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>S. membranifolia</i>	+	+	+	-	+	+	+
<i>S. pavoniana</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>S. pallens</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>S. riparia</i>	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. serrata</i>	+	+	-	-	+	-	-
<i>S. trinervia</i>	+	+	-	-	+	+	+

Continuação

	Pecíolo com epiderme unisseriada	-	Córtex do pecíolo		Feixe colateral	Estômatos na epiderme do pecíolo
			drusas	laticíferos		
<i>S. brasiliensis</i>	+		+	+	+	+
<i>S. brevifolia</i>	+		+	+	+	+
<i>S. glandulosa</i>	+		+	+	+	-
<i>S. integra</i>	+		-	-	+	-
<i>S. jacobinensis</i>	+		+	+	+	-
<i>S. klotzschiana</i>	+		+	-	+	+
<i>S. macrocarpa</i>	+		+	+	+	+
<i>S. membranifolia</i>	+		+	-	+	-
<i>S. pavoniana</i>	+		+	-	+	+
<i>S. pallens</i>	+		+	-	+	-
<i>S. riparia</i>	+		+	-	+	-
<i>S. serrata</i>	+		+	-	+	-
<i>S. trinervia</i>	+		+	-	+	-

Continuação

	Estômatos na epiderme do pecíolo	Conformação do feixe do pecíolo	
<i>S. brasiliensis</i>	+	+	-
<i>S. brevifolia</i>	+	+	-
<i>S. glandulosa</i>	-	+	-
<i>S. integra</i>	-	+	-
<i>S. jacobinensis</i>	-	+	-
<i>S. klotzschiana</i>	+	+	-
<i>S. macrocarpa</i>	+	+	-
<i>S. membranifolia</i>	-	-	+
<i>S. pavoniana</i>	+	+	-
<i>S. pallens</i>	-	-	+
<i>S. riparia</i>	-	+	-
<i>S. serrata</i>	-	-	+
<i>S. trinervia</i>	-	+	-

Discussão

Os caracteres anatômicos (comprimento da folha, conformação do feixe do pecíolo, folha de formato ericóide, epiderme bisseriada, tricomas, posição dos estômatos, formato da parede anticlinal e periclinal e o tipo de terminação da aréola) mostraram ser úteis para distinguir *Microstachys* e *Sebastiania*, além de poderem ser utilizados na elaboração de chaves de identificação que permitem o reconhecimento de espécies mesmo em ramos estéreis. Assim, a anatomia foliar mostrou-se relevante como uma ferramenta para auxiliar a taxonomia do grupo. Entretanto, não foram encontrados caracteres anatômicos que respaldassem os dois clados detectados em *Microstachys* pelas análises moleculares (Pscheidt 2015).

Microstachys e *Sebastiania* compartilharam caracteres anatômicos tais como feixes vasculares colaterais e pecíolos com formato côncavo/convexo e plano convexo. O formato do pecíolo variou de côncavo/convexo na maioria das espécies e circular somente em duas, portanto este caráter pode ser útil para distinguir *M. revoluta* e *M. nummularifolia* essas duas espécies das demais. Pecíolo de formato circular são comuns em Euphorbiaceae como reportado para *Euphorbia pulcherrima* (Bercu 2016), *Agrostistachys indica* Dalzell, *Neoscortechinia kingii* (Hook. f.) Pax & K. Hoffm. (Thakur & Patil 2011) e *Manihot esculenta* Crantz (Tavadi & Bhadane 2014). Por outro lado, o comprimento do pecíolo que é curto em todas as espécies de *Microstachys* e longo em todas as espécies de *Sebastiania*, é uma característica distintiva relevante. Dehgan (1982) utilizou o comprimento do pecíolo, juntamente com outros caracteres para discutir as relações infragenéricas em *Jatropha* L. Graciano-Ribeiro *et al* (2016) estudando sete espécies de *Manihot* Mill. elencaram caracteres anatômicos, dentre estes o comprimento do pecíolo na identificação das espécies.

Feixes vasculares em arco aberto foi o padrão mais comum em *Microstachys* e *Sebastiania*, já que a maioria das espécies exibiu este tipo de conformação de feixes. Feixe em arco aberto foram relatados como uma característica comum em Euphorbiaceae (Metcalf & Chalk 1950), embora outros padrões tenham sido relatados como: formato em anel e anel interrompido por uma faixa de células parenquimáticas em *Acalypha ciliata* Wall., *A. hispida* Blume e *A. fruticosa* Forssk. ou formato padrão cilíndrico interrompido pelo floema em torno do xilema em *Manihot pohlii* Wavra e *M. caerulescens* Pohl. (Tavadi *et al.* 2014; Ribeiro *et al.* 2016). No presente trabalho também foram notadas variações nesta tipologia mais comum, como os feixes em ferradura registrados para

Microstachys anisodonta, *M. hispida*, *M. glandulosa*, *M. nana*, *Sebastiania membranifolia*, *S. pallens* e *S. serrata*, tipologia também reportada em *Sapium glandulosum* (L.) Morong (Andrade *et al.* 2017) e *Hura crepitans* L. (Moawed *et al.* 2015). Assim, parece que este caráter tem pouca relevância para delimitação de táxons em nível infra-familiar, mas pode ser utilizado para diagnose de espécies, como no caso de *Sapium glandulosum*, onde feixe em arco aberto foi mencionado e utilizado como um caráter adicional para o reconhecimento da espécie (Andrade *et al.* 2017).

Folhas com formato ericóide e com epiderme da face abaxial densamente pilosa, como observadas em *Microstachys ditassoides* e *M. revoluta* no presente trabalho, são considerados caracteres xeromórficos selecionados em espécies que sobrevivem em ambientes com baixa disponibilidade hídrica (Dickison 2000). Como *M. ditassoides* e *M. revoluta* são espécies subarbustivas/arbustivas comuns em Campo Rupestre e Cerrado brasileiro em altitudes superiores a 750 metros (Pscheidt 2015), tais características podem ser relacionadas à fatores ambientais. Períodos de seca, altas temperaturas e alta luminosidade são fatores abióticos reportados por influenciar na estrutura das plantas de Campos Rupestres e Cerrado. Adicionalmente, no Cerrado, o solo é ácido, com elevados teores de alumínio e pobre em nutrientes, e devido a esses fatores, caracteres xeromórficos são comuns na flora desses ambientes (Branco 2000; Rapini *et al.* 2008). De forma equivalente, a presença de tricomas na face abaxial da folha também é enfatizada como uma estratégia relacionada à diminuição da perda d'água na forma de transpiração, pois a alta densidade desses tricomas permite a formação de um microclima minimizando a evapotranspiração da folha para o meio (Guvenc & Kendir 2012). Assim, densidade dos tricomas também pode ser relacionada à resposta as condições do ambiente onde essas espécies ocorrem.

O contorno das paredes anticlinais e periclinais das células epidérmicas se manteve constante em todas as espécies e espécimes de *Microstachys*, sendo reto a levemente ondulado, independentemente das condições ambientais do local de coleta. O contorno da parede levemente ondulado tem sido relatado nas espécies de Euphorbiaceae como uma característica comum (Metcalf & Chalk 1950). Entretanto na maioria das espécies de *Sebastiania* o contorno da parede é sinuoso, somente em *S. integra*, *S. membranifolia*, e *S. riparia* o contorno é levemente ondulado como ocorre nas espécies de *Microstachys*. Portanto essa característica anatômica tem relevância para distinção dos gêneros.

A epiderme foliar unisseriada ocorre em todas as espécies estudadas, e já foi

relatada em outras espécies de Euphorbiaceae (Metcalf & Chalk 1950). *Sebastiania pallens* foi a única espécie com epiderme bisseriada. Esta característica pode ter sido selecionada nessa espécie como uma estratégia para diminuir perda de água, e ter uma correlação com o ambiente onde a espécie sobrevive, como os afloramentos rochosos (Melo 2006). Adicionalmente, por ser exclusiva é uma característica potencialmente útil para o reconhecimento da espécie. Em *Microstachys* a cutícula pode ser espessa e estriada (em 9 espécies) ou delgada e lisa (em 6 espécies). Já nas espécies de *Sebastiania* a cutícula é espessa e estriada (em 6 espécies) e delgada e lisa (em 7 espécies). O aumento na espessura da cutícula pode ser uma adaptação as condições ambientais protegendo a folha contra altas temperaturas e luminosidade excessiva (Marques *et al.* 1999). Nas espécies de *Microstachys* não foi possível estabelecer essa correlação, pois nas espécies que são de Campo Rupestre e Cerrado também foi notada a presença de uma cutícula fina e lisa. Assim, essa diferença na estriação da cutícula pode ser utilizada para fins taxonômicos, porque elas se mantem independentemente do local de ocorrência das espécies. A ornamentação da cutícula foi útil para distinguir tribos de Euphorbiaceae (Crotoneae, Hippomaneae, Acalyphae) como proposto por Kulshreshtha Ahma (1992). O caráter cutícula espessa associado a outro conjunto de caracteres anatômicos é considerado típico de espécies xeromórficas, e foi útil na separação das espécies pertencentes a 22 famílias em três grupos distintos incluindo Euphorbiaceae (Simioni *et al.* 2017).

Os estômatos são paracíticos em todas as espécies estudadas, o que é comum nas espécies de Euphorbiaceae (Metcalf & Chalk 1950; Raju & Rao 1977; Kabouw *et al.* 2008; Kusdianti 2009; Pecnikar *et al.* 2012; Neto *et al.* 2014). Entretanto, outros tipos foram relatados como anisocítico em *Chamaesyce serpens* (Kunth) Small, anomocítico em *Euphorbia granulata* Forssk., e diacítico em *Tragia involucrata* L. (Inamdar & Gangadhara 1977; Raju & Rao 1977; Devi *et al.* 2013; Zahra *et al.* 2014; Talebi *et al.* 2017). A maioria das espécies de *Microstachys* possui folhas anfiestomáticas, já as espécies de *Sebastiania* possuem folhas hipoestomáticas. Geralmente, espécies com folha hipoestomática ocorrem em ambientes com baixa disponibilidade hídrica, nessas folhas os estômatos podem estar protegidos em câmaras, sulcos e ou em fendas, entretanto a maioria das espécies de *Sebastiania* ocorrem em ambientes próximos a leitos de rios (Metcalf & Chalk 1950; Raju & Rao 1977; Luttge 2008). O poro estomático pode ser recoberto por uma flange cuticular, como observado em 10 espécies de *Microstachys* (*M. anisodonta*, *M. corniculata*, *M. bidentata*, *M. daphnoides*, *M. glandulosa*, *M. marginata*,

M. nana, *M. hispida*, *M. nummlarifolia*, *M. uleana*) e em nove espécies de *Sebastiania* (*S. brasiliensis*, *S. glandulosa*, *S. jacobinensis*, *S. macrocarpa*, *S. membranifolia*, *S. pallens*, *S. pavoniana*, *S. trinervia*,). Somente *M. marginata* e *M. uleana*, apresentam célula subsidiária que se projeta sobre a célula guarda. Essas características auxiliam na proteção dos estômatos contra o excesso de transpiração pela folha (Fahn & Cutler 1992), mas também podem ser utilizadas para fins taxonômicos como reportado para outras famílias como Malpighiaceae (Araújo *et al.* 2010).

A maioria das espécies de *Microstachys* possui tricomas simples não-glandulares multicelulares e uniseriados, exceto *M. heterodoxa* que apresenta alta densidade de tricomas estrelados na superfície foliar. Já as espécies de *Sebastiania* são glabras. A alta densidade de tricomas pode contribuir para a manutenção de um microclima na folha, protegendo-a da luminosidade excessiva e de altas taxas transpiratórias, como enfatizado na literatura (Fahn & Cutler 1992; Pscheidt 2015, Simioni *et al.* 2017). Como as espécies ocorrem em ambientes semelhantes, em *M. heterodoxa* resposta a pressão seletiva do ambiente foi a alta densidade de tricomas. Mais uma vez confirmando que ambientes semelhantes podem selecionar estratégias distintas, assim como ambientes distintos podem levar a seleção de uma mesma estratégia (Dickson 2000).

A nervura mediana nas espécies de *Microstachys* é projetada para a face adaxial, na maioria das espécies (seis espécies), assim como em *Sebastiania* (em seis espécies). O formato da nervura central em sessão transversal tem sido utilizado com sucesso para diferenciar espécies como em *Manihot*, *Croton* e também membros de Malpighiaceae (Araújo *et al.* 2010; Neto *et al.* 2014; Feio *et al.* 2018).

Aréolas com terminação do tipo dicotômica registrada na maioria dos representantes de *Microstachys* e do tipo dendrítica para a maioria das espécies de *Sebastiania* podem representar possíveis sinaporfias micromorfológicas para os táxons, e promissoras para estudos filogenéticos. Já as traqueídes alargadas que ocorrem em todas as espécies estudadas de *Microstachys* e *Sebastiania*, também foram reportadas para outros gêneros de Euphorbiaceae, como em *Euphorbia* e *Mallotus* Lour. (Herbst 1972; Hussin *et al.* 1996). Adicionalmente, ocorrência de traqueídes alargadas poder estar relacionada ao ambiente com períodos de seca prolongado em que as espécies de *Microstachys* se encontram. Assim, as traqueídes alargadas funcionariam como um estoque de água para essas espécies durante esse período (Herbst 1972; Luckow 2002).

O tipo e organização do mesofilo podem estar relacionado ao ambiente onde as plantas ocorrem. O mesofilo isobilateral com arranjo compacto, como observado no

presente trabalho em *Microstachys bidentata*, *M. uleana*, *M. marginata*, *M. nummularifolia*, *Sebastiania brevifolia*, *S. membranifolia*, *S. pavoniana* e *S. riparia*, pode ser uma resposta a ambientes de alta intensidade luminosa e longos períodos de seca, essa estratégia permite que a planta perca menos água durante as trocas gasosas, tornando o processo fotossintético mais eficiente (Fahn & Cutler 1992). Embora as espécies estudadas que ocorrem em Campo Rupestre ou Cerrado possuam mesofilo isobilateral, existem outras espécies que são desses ambientes cujo mesofilo é dorsiventral. Assim, é possível que nessas espécies outras estratégias tenham sido selecionadas na tentativa de reduzir a perda de água na forma de transpiração, como folhas hipostomáticas com estômatos protegidos em câmaras ou sulcos, flanges cuticulares e folhas ericoides densamente pilosas entre outros (Fahn & Cutler 1992).

O parênquima paliçádico que acompanha a nervura central presente na maioria das espécies de *Microstachys* e em todas as espécies de *Sebastiania* estudadas, tem pouca relevância taxonômica, já que de acordo com os fatores ambientais essa característica pode variar (Metcalf & Chalk 1979). Nas espécies que não possuem parênquima paliçádico na nervura, o que se observa é a presença do colênquima, este é um tecido de sustentação principalmente em órgãos jovens que pode se desenvolver em espécies que ocorrem em ambientes onde ocorre fortes ventos (Evert 2006), como nos Campos Rupestres, vegetação típica de ocorrência das espécies de *Microstachys* e de *Sebastiania*. A ocorrência de idioblastos contendo drusas em *Microstachys* e *Sebastiania* é comum na nervura central, confirmando dados registrados para espécies de *Blumeodendron* (Müll. Arg.) Kurz, *Hancea* Seem. e *Mallotus* (Raju 1977; Pecnikaret al. 2012). Entretanto, no presente trabalho, a ausência de drusas no córtex do pecíolo e no mesofilo foi utilizada para distinguir *Microstachys glandulosa* e *M. corniculata*, respectivamente.

Laticíferos foram encontrados em todas as espécies de *Microstachys*, confirmando o que é relatado na literatura para as espécies de Euphorbioideae onde laticíferos não-articulados são considerados comuns (Esser 2012). Por outro lado, no presente trabalho somente em *Sebastiania brasiliensis*, *S. brevifolia*, *S. glandulosa* e *S. jacobinensis* e *S. macrocarpa* foram observados laticíferos. A presença e o tipo de laticífero foi utilizada para delimitar as cinco subfamílias de Euphorbiaceae *lato sensu* (Webster 1975). Crotonoideae e Euphorbioideae são latescentes; Phyllanthoideae são não latescentes e em Acalyphoideae os laticíferos são raros, somente registrados em *Omphalea* L. e *Macaranga* Thouars (Webster 1994). Embora laticíferos não-articulados sejam mais

comuns nas espécies de Euphorbiaceae, laticíferos articulados foram relatados em Crotonoideae, nas seções *Lamprocroton* e *Cleodora* (Vitarelli *et al.* 2015). De acordo com Rudall (1994), laticífero não-articulado é provavelmente um caráter plesiomórfico em Euphorbiaceae. Assim, estudos minuciosos que permitam assegurar a presença e o tipo de laticífero em Hippomaneae são necessários para se avaliar a sua real contribuição para abordagens filogenéticas. Adicionalmente, a presença de laticíferos em apenas cinco espécies de *Sebastiania* deve ser considerada em um estudo sistemático para avaliar a utilidade desta característica para a taxonomia e filogenia do grupo.

Nas folhas de todas as espécies de *Microstachys* ocorrem glândulas de posição marginal e submarginal, e não estão diretamente relacionadas ao formato da margem reta, serrada ou denteada. Também não houve correlação da posição das glândulas com os dois clados definidos pelas análises moleculares (Pscheidt 2015). Como na maioria das espécies as glândulas ocupam posição submarginal, a presença dessas estruturas na margem pode ser utilizada para diferenciar espécies. Já em *Sebastiania* apenas três espécies possuem glândulas e ocupam a posição marginal. Embora sejam bastante diminutos quando comparados com os nectários marginais descritos para outras espécies de Euphorbiaceae, anatomicamente essas glândulas apresentam caracteres típicos de nectários como: epiderme secretora em paliçada, parênquima nectarífero composto de células volumosas com paredes delgadas e vascularizados por floema. O formato, a posição e a composição química da secreção dessas estruturas variam entre as espécies de Euphorbiaceae. Em *Croton* seção *Adenophylli* a variação estrutural e a localização dos nectários extraflorais foram importantes na distinção das espécies em subgrupos: grupo 1: nectário sésil e superfície convexa, grupo 2: nectário estipitado com a superfície côncava, e o terceiro que se agrupa com espécies da seção *Cyclostigma* (Feio *et al.* 2018). Já nas espécies da seção *Cleodora* eles ocorrem em uma posição acropetolar e ou basilaminar, os autores sugeriram que a posição dos nectários extraflorais é um caráter diagnóstico para a seção *Cleodora* (Vitarelli *et al.* 2015). Estas estruturas secretoras são consideradas caracteres anatômicos comuns entre as espécies de Euphorbiaceae (Metcalf & Chalk 1979). Contudo, trabalhos com enfoque anatômico dessas estruturas secretoras em espécies de Euphorbioideae, especialmente da tribo Hippomaneae sejam ausentes.

Os caracteres anatômicos foliares são úteis quando se pretende distinguir com segurança as espécies de *Microstachys* e *Sebastiania* em amostras estéreis. Também foram importantes para reconhecer espécies dentro de cada gênero. Entretanto, os dados

obtidos no presente trabalho não respaldem a divisão das espécies de *Microstachys* em dois clados Neotropicais, como apresentado na filogenia publicada por Pscheidt (2015).

Os caracteres anatômicos sustentam o tratamento de *Microstachys* e *Sebastiania* como gêneros distintos. A ausência de glândulas na margem da folha de *Sebastiania* e a presença em *Microstachys* é uma possível sinapomorfia micromorfológica, desde que *S. klotzschiana*, e *S. serrata* sejam transferidas para outro gênero. Esta interpretação corrobora Melo *et al.* (2017), que enfatizou a presença de glândula na margem das folhas como um parâmetro importante para excluir espécies do gênero *Sebastiania*, como foi feito para *Sebastiania klotzschiana*, que foi transferida para *Gymnanthes klotzschiana* Mill. Arg. (Oliveira *et al.* 2013) e *Sebastiania serrata*, para *Gymnanthes serrata* Baill. ex Müll. Arg. (Melo 2006, ainda não validamente publicado). Os dados obtidos no presente trabalho devem ser considerados nos futuros estudos e tratamentos taxonômicos do grupo, já que demonstram a importância das análises mais acuradas para confirmar a presença das glândulas que parece não ter sido notada nas análises macromorfológicas.

Foram reconhecidos caracteres ou conjunto de caracteres anatômicos que contribuem para a separação de *Microstachys* e *Sebastiania*, sendo sugerido como possíveis sinapomorfias para *Microstachys* a presença de glândulas na margem da lâmina foliar e de laticíferos. Para *Sebastiania* uma possível sinapomorfia é a ausência de glândulas na margem foliar. Mas essa hipótese somente pode ser confirmada em um estudo mais abrangente, incluindo os outros gêneros de Hippomaneae, tais como *Gymnanthes*, *Sapium*, *Stillingia*, o que está em curso. Não foram encontrados caracteres micromorfológicos que corroborassem os dois clados reconhecidos para *Microstachys* dos Neotrópicos. As glândulas da margem da folha de *Microstachys* são anatomicamente semelhantes aos nectários de Euphorbiaceae e a variação na posição foi útil para separar espécies. Os caracteres encontrados demonstram a aplicação para a taxonomia e suscitam estudos complementares, em especial sobre a presença e tipo de laticíferos e a presença e tipo de glândula na margem da folha em outros gêneros de Hippomaneae.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Nós agradecemos ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico) pelo suporte e pela bolsa de produtividade em pesquisa para RMSA (# 307762/2016-5), a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio e financiamento de toda a pesquisa. Ao herbário SP do Instituto de Botânica em São Paulo, e o herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR) pertencente a Universidade Federal Rural de Pernambuco, por fornecer o material vegetal identificado. Agradecemos ao laboratório de anatomia vegetal pela infraestrutura, Aurora e Rosana pela assistência técnica.

Referências Bibliográficas

- Andrade EA, Folquitto DG, Lu LEC, Paludo KS, Farago PV, Budel JM. 2017. Anatomy and histochemistry of leaves and stems of *Sapium glandulosum*. Revivsta brasileira de farmacognosia 27: 282-289.
- Almeida JREB, Araújo JS, Santos-Filho FS, Zickel CS. 2013. Leaf morphology and anatomy of *Manilkara* Adans. (Sapotaceae) from northeastern Brazil. Plant Systematics and Evolution 299:1-9.
- Araújo JS, Azevedo AA, Silva LC, Meira RMSA. 2010. Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 16 species of Malpighiaceae found in the Cerrado area (Brazil) Plant Systematics and Evolution 286:117-131.
- Athiê-Souza SM. 2011. Estudos Morfológicos e Filogenéticos de *Sebastiania* Spreng. (Hippomaneae, Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco – PPGB/UFRPE.
- Bercu R. 2016. Comparative anatomical aspects of *Euphorbia milli* VAR. *Splendens* (bojer ex hook.) ursch & leandri and *Euphorbia pulcherrima* willd. Ex Klotzsch species leaves. Annals of West University of Timișoara, ser. Biology 19: 157-166.
- Branco SM. Cerrado: origem, natureza e curiosidades. 2000. editora moderna, São Paulo.
- Dickson WC. 2000. Integrative plant anatomy. Academic Press, SanDiego, California, USA.
- Devi NS, Padma Y, Narasimhudu CL, R.R. Raju RRV. 2013. Diversity of stomata and trichomes in *Euphorbia* L. J. Bangladesh J. Plant Taxon 20: 27-38.
- Ellis B, Daly DC, Hickey LJ, Johnson KR, Mitchell JD, Wilf P, Wing SL. 2009. Manual of leaf architecture. Página 88-107 the New York Botanical Garden Press.
- Esser HJ. 1998. New combinations in *Microstachys* (Euphorbiaceae). Kew Bulletin 53: 955-960.
- Esser HJ. 2001. Tribes Hippomaneae, Hureae, Pachystromateae. In: Radcliffe-Smith, A. Genera Euphorbiacearum. Kew Royal Botanic Gardens, pp. 352-397.

- Esser HJ. 2012. The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil. *Rodriguésia* 63: 209-225.
- Evert RF. 2006. *Esau's Plant Anatomy*, 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken.
- Fahn A, Cutler DF. 1992. Xerophytes In: *Encyclopedia of Plant Taxonomy* Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Feio AC, Meira RMSA, Riina R. 2018. Leaf anatomical features and their implications for the systematics of dragon's blood, *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 187: 614-632.
- Govaerts R, Frodin DG, Radcliffe-Smith A. 2000. World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae). Kew: Royal Botanic Gardens Press 4: 977-981.
- Guvenc A, Kendir G. 2012. The leaf anatomy of some *Erica* taxa native to Turkey 36: 253-262.
- Graciano-Ribeiro D, Hashimoto-Freitas DY, Nassar NMA. 2016. Comparative petiole anatomy of cassava (*Manihot*) species. *Genetics and Molecular Research* 15: 1- 13.
- Herbst D. 1972. Ontogeny of foliar venation in *Euphorbia forbesii*. *American Journal of Botany* 59: 843-850.
- Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>.
- Inamdab JA, Gangadhara M. 1977. Structure and ontogeny of stomata in some Euphorbiaceae. 19:37-70.
- Jussieu AL. 1824. *De Euphorbiacearum generibus medisque earumdem viribu tentamen*. Didot, Paris.
- Kabouw P, Peter C, Welzen V, Baas P, Heuven BJV. 2008. Styloid crystals in *Claoxylon* (Euphorbiaceae) and allies (Claoxylinae) with notes on leaf anatomy.
- Kulshreshthka K, Ahmad J. 1992. Cuticular ornamentations in some genera of Euphorbiaceae. *Feddes Repert.*, Berlin 5: 317-326.
- Kusdianti HT. 2009. Stomata Diversification and Phylogenetic Analysis of 13 Species of Family Euphorbiaceae *sensu lato*. *Biodiversitas* 10: 19-22.
- Kruijt RCH. 1996. A taxonomic monograph of *Sapium* Jacq., *Anomostachys* (Baill.) Hurus., *Duvigneaudia* J. Léonard and *Sclerocroton* Hochst. (Euphorbiaceae tribe Hippomaneae). 146: 1-19.
- Luckow M. 2002. Anatomical Features of the Leaves in the *Dichrostachys* Group (Leguminosae: Mimosoideae) and their Utility for Phylogenetic Studies. *Syst. Bot* 27: 29-40.
- Luttge U. 2008. *Physiological Ecology of tropical Plants*. Segunda edição.

- Mantovani A, Venda AKL, Almeida VR, Costa AF, Forzza RC 2012 Leaf anatomy of *Quesnelia* (Bromeliaceae): implications for the systematics of core bromelioids. *Plant Systematics and Evolution* 298: 787–800.
- Marques AR, Garcia QS, Fernandes GW. 1999. Effects of sun and shade on leaf structure and sclerophylly of *Sebastiania myrtilloides* (Euphorbiaceae) from serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. *Boletim de Botânica da USP SP* 18: 21-27.
- Melo, A.L. Revisão de *Sebastiania* Spreng. *sensu stricto* (Euphorbiaceae – Hippomaneae). 2006. tese de Doutorado – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Melo AL, Athiê-Souza Sam, Sales MF. 2017. A new combination and typifications in *Sebastiania* (Euphorbiaceae) from Mexico, Central America, and the Antilles. *Phytotaxa* 308:118-124.
- Mennega AMW. 2005. Wood Anatomy of the Subfamily Euphorbioideae. A comparison with subfamilies Crotonoideae and Acalyphoideae and the implications for the circumscription of the Euphorbiaceae. *Iawa Journal* 26: 1-68.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon, Oxford.
- Metcalf CR, Chalk L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*, vol I, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press.
- Moawed MM, Abdelsamie SSZ, Tantawy M. 2015. Phenetic Analysis of Certain Taxa of Euphorbiaceae Grown in Egypt. *Egyptian Journal of Botany* 55: 247-267.
- Neto ILC, Martins FM, Caiafa AN, Martins MLL. 2014. Leaf anatomy as subsidy to the taxonomy of wild *Manihot* species in *Quinquelobae* section (Euphorbiaceae) *Brazilian Journal of Botany* 37: 481–494.
- O'brien TP, Mccully ME. 1981. *The study of plant structure principles and selected methods*. Termarcarphi Pty. Ltda., Melbourne.
- Oliveira LSD, Melo AL, Silva MJ, Sales MF. 2013. Lectotypification and new synonym for *Gymnanthes klotzschiana* (Euphorbiaceae). *Phytotaxa* 135: 11-18.
- Pax F, Hoffmann K 1912 Euphorbiaceae-Hippomaneae. In: Engler, A. (ed.). *Das Pflanzenreich Regni vegetabilis conspectus IV.147.V. (Heft 52)*. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Pecnikar ZF, Kulju KKJ, Sierra SEC, BAAS P, WELZEN, PCV 2012 Leaf anatomy of *Mallotus* and the related genera *Blumeodendron* and *Hancea* (Euphorbiaceae *sensu stricto*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 645-676.
- Pscheidt AC, Cordeiro I. 2012. Sinopse da tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo.
- Pscheidt AC. 2015. O gênero *Microstachys* A. Juss. e a tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae). Tese (Doutorado Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo.

- Raju VS, Rao PN. 1977. Variation in the structure and development of foliar stomata in the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 75: 69-97.
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR. 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 1-2.
- Silva, M.J. & Esser, HJ. 2011. Two new taxa and two new combinations in *Microstates* (Euphorbiaceae) from South America. *Phytotaxa* 32: 18-26.
- Simioni PF, Eisenlohr PV, Pessoa MJG, Silva IV. 2017. Elucidating adaptive strategies from leaf anatomy: Do Amazonian savannas present xeromorphic characteristics? *Flora* 226: 38-46.
- Souza SMA. 2011. Estudos Morfológicos e Filogenéticos de *Sebastiania* Spreng. (Hippomaneae, Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco – PPGB/UFRPE.
- Smith FH, Smith EC. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany* 29: 464-471.
- Tadavi SC, Bhadane VV. 2014. Taxonomic significance of the rachis, petiole and petiolule anatomy in some Euphorbiaceae. *Biolife* 2:850-857.
- Thadeo M, Azevedo AA, Meira RMSA. 2014. Foliar anatomy of neotropical Salicaceae: potentially useful characters for taxonomy. *Plant Systematics and Evolution* 300: 2073–2089.
- Thakur HA e Patil DA. 2011. Petiolar Anatomy of some unstudied Euphorbiaceae. *Journal of Phytology*. 2: 54-59.
- Talebi SM, Noori M, Naniz HA. 2017. A study of epidermal leaf anatomy of 18 *Euphorbia* taxa from Kerman Province, Iran 63: 126-133.
- Vasco A, Thadeo M, Conover M, Daly DC. 2014. Preparation of samples for leaf architecture studies, a method for mounting cleared leaves. *Applications in Plant Sciences* 9: 1- 4.
- Zahra NB, Ahmad M, Shinwari ZK, Zafar M, Sultana S. 2014. Systematic Significance of Anatomical characterization in some Euphorbiaceous species. *Pakistan Journal of Botany* 46: 1653-1661.
- Webster GL. 1975. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. *Taxon* 24: 593-601.
- Webster GL. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 33-144.
- World Checklist of Selected Plant Families. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2012. Available: <http://www.kew.org/wcsp/>.

Conclusões Gerais

No presente trabalho foi possível reconhecer caracteres anatômicos foliares que corroboram o tratamento *Microstachys* e *Sebastiania* como gêneros distintos. Foram elencados caracteres úteis para distinguir espécies tanto de *Microstachys* quanto de *Sebastiania*, o que permite confirmar a identidade de espécies, mesmo quando faltam amostras florais. A base de dados anatômicos para Hippomaneae foi ampliada e estes dados mostraram-se promissores para os futuros estudos de sistemática e filogenia dos gêneros estudados. Destaca-se a presença de glândulas marginais em *S. serrata* e *S. klotzschiana* sugerindo uma revisão no posicionamento genérico destas espécies. A descrição acurada da presença e tipo de laticífero em *Sebastiania* é um outro dado que precisa ser enfatizado e que deve ser abordado em futuros estudos para se averiguar a sua relevância para a taxonomia.

De acordo com a estrutura anatômica, composição química e aspectos ultraestruturais é possível afirmar que as glândulas crateriformes marginais de *M. serrulata* são nectários. Estes, são anatomicamente semelhantes a outros nectários descritos em Euphorbiaceae e podem servir de parâmetro para que as estruturas semelhantes das outras espécies do gênero também possam ser tratadas como nectários. O estudo ultraestrutural permitiu elucidar o papel das organelas envolvidas na síntese do néctar, e correlacionar a ultraestrutura com a natureza química da secreção. Além disso, foi possível entender o mecanismo de secreção que ocorre por meio do deslocamento, ruptura e recomposição da cutícula.